



HAL
open science

Echauffement de nanoparticules par un champ magnétique haute fréquence: Applications en cancérologie et catalyse de réaction Fischer-Tropsch

Vincent Connord

► **To cite this version:**

Vincent Connord. Echauffement de nanoparticules par un champ magnétique haute fréquence: Applications en cancérologie et catalyse de réaction Fischer-Tropsch. Cancer. INSA de Toulouse, 2015. Français. NNT: 2015ISAT0016 . tel-01198611

HAL Id: tel-01198611

<https://theses.hal.science/tel-01198611>

Submitted on 14 Sep 2015

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

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

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées
Discipline ou spécialité : *Nanophysique*

Présentée et soutenue par *Vincent CONNORD*
Le 26 février 2015

Titre : *Echauffement de nanoparticules par un champ magnétique haute fréquence :
Applications en cancérologie et catalyse de réaction Fischer-Tropsch*

JURY

F. GAZEAU, rapportrice de thèse, directrice de recherche au MSC, Paris 7
O. SANDRE, rapporteur de thèse, chargé de recherche au LCPO, Pessac
J.-F. BOBO, examinateur, directeur de recherche au CEMES, Toulouse
M. del P. MORRALES, invitée, senior scientist à l'ICMM, Madrid
D. FOURMY, invité, directeur de recherche au RCTC, Toulouse

Ecole doctorale : *Science de la matière*
Unité de recherche : *Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-Objets*
Directeur(s) de Thèse : *Julian CARREY, Marc RESPAUD*

Remerciements

Je remercie en premier lieu « La main qui m'a nourri » (expression couramment employée par la noblesse du 17^{ème} siècle, et par J. Carrey du 21^{ème} siècle) en la personne morale du Multifun Project. Merci à tous les acteurs principaux, secondaires et même les figurants de ce grand projet, ça fait grandir de devoir présenter l'avancement de ses travaux devant un si large panel de scientifiques aguerris.

Je tiens ensuite à remercier chaleureusement mes deux rapporteurs Florence GAZEAU et Olivier SANDRE d'avoir accepté de juger mes travaux. J'ai pu lors de la discussion, apprécier le sérieux avec lequel vous vous êtes acquittés de votre tâche. Merci également à Jean François BOBO d'avoir accepté de présider ce jury de grande qualité. Je vous souhaite bonne chance pour la suite de l'aventure commune avec le LPCNO. Merci enfin à Puerto MORRALES d'être venue de Madrid pour répondre à mon invitation et d'avoir ainsi apporté à ce jury toute son expertise. Et un grand merci évidemment à Daniel FOURMY, dont l'intervention a été d'une éloquence mémorable.

Passons maintenant aux encadrants. C'est tout de même eux qui m'ont fait assez confiance pour me confier pendant trois ans (et des poussières...) un rôle important dans leurs projets de recherche. Un grand merci à vous deux pour m'avoir permis de prendre part à l'aventure. Merci Julian CARREY, dont la facilité d'abord et l'ouverture à la discussion ne sont des secrets pour personne dans ce laboratoire et au-delà. Tu m'as toujours fait confiance et tu m'as laissé les clés des manip. Je ne puis te dire combien c'est appréciable! J'ajoute à l'attention de mes quelques lecteurs que l'absorption en quantité de Guinness et de Becherovka n'altère en rien la qualité de tes raisonnements scientifiques, bien au contraire. Merci pour tous ces bons moments !! Un grand merci à Marc RESPAUD d'avoir toujours été présent tout au long de cette thèse, même si nos rencontres furent un peu moins nombreuses. J'ai pu apprécier ton engagement incessant à défendre tes valeurs scientifiques et les personnes qui t'entourent. Et comme je l'ai déjà précisé à l'oral j'ai été impressionné par ton incroyable pédagogie, cette faculté à faire passer des notions complexes en quelques mots simples.

Le prochain candidat aux remerciements n'est autre que le seul et unique Boubker MEHDAOUI. Les murs de la salle d'hyperthermie (enfin, ex-salle) résonnent encore de tes longs discours en moins de dix mots. Merci bien sûr à Reasmey TAN. Alors bon toi tu es hors catégorie bien sûr. Bref merci pour tout chef! Les pauses clopes où l'on parlait science entre autres... ou de crevettes, de Didier Bourdon, j'en passe et des meilleurs. Toujours chaud pour une petite bière à moitié fraîche sur un banc en pierre à refaire le monde. Merci à tout le reste de l'équipe Nanomag et notamment aux deux derniers Bee Gees Thomas BLON et Benjamin LASSAGNE qui complètent le trio. Et enfin bien sûr qu'aurait été ma thèse sans l'apport essentiel de Damien (géant vert), Charbel (Elliptic-man), Zizou (yamakasi) et tout les autres !! Et pour finir sur une note d'avenir, un grand merci à Nico aka le blond aka ronny aka bon je ne peux pas tout mettre. Merci à toi, tu m'as apporté une aide considérable sur la fin et comme je l'ai déjà précisé : ce sujet de recherche est entre de bonnes mains avec toi !

Le contenu de cette thèse hautement pluridisciplinaire a été réalisé en collaboration. Tout d'abord avec le labo RCTC de Toulouse. J'ai eu la chance de pouvoir travailler avec des passionnés de la cellule qui m'ont enseigné énormément sur le vaste monde de la biologie cellulaire et sur la cancéro en général. Merci donc à vous tous « les bios » comme on disait : Véronique, Pascal, Daniel, Claire, Darine. Dans le volet collaboration, merci également à l'équipe de chimie organométallique de Bruno CHAUDRET, et particulièrement Anca MEFFRE qui m'a permis de travailler sur des nano-objets d'une qualité exceptionnelle à chaque fois.

Je n'oublie pas le support d'ingénierie et de technique dont j'ai bénéficié durant cette thèse. Merci à Cathy (Gertrude pour les intimes), Francis (le bobineur de l'extrême), Seb (« mais non je le bois sans eau, sinon t'y a pas le goût »), Ali et Bruno de l'atelier méca etc.

Je remercie mes parents pour leur soutien et leurs encouragements sans aucune faille depuis près de 28 ans. « Etre né quelque part » comme dirait l'autre ; je n'aurais pas pu rêver meilleur endroit! J'étais on ne peut plus fier de passer ce dernier diplôme devant vous. Un énorme merci à mon petit frère qui m'a supporté en coloc durant ces trois ans. Tu m'as apporté peut être sans le savoir un soutien sans lequel cette aventure aurait été bien plus difficile. Une grosse pensée également pour tous les membres de ma merveilleuse famille dont quelques uns ont fait le déplacement jusqu'à Toulouse pour entendre des trucs sur nos NPs. Merci bien sûr à tous les amis. Impossible de vous remercier tous personnellement, je n'ai pas spécialement le temps d'écrire une deuxième thèse... En tout cas vous vous reconnaitrez tous je pense. On n'a pas fini de vivre des moments hors du commun j'en suis sûr, et ce même si je quitte notre belle ville rose. Je tiens à remercier Marion pour avoir supporté de me voir en couple avec ma rédaction durant de si longs mois et même de m'y avoir encouragé. Un grand merci également à ses parents pour tout leur soutien durant le sprint final (long sprint en plus !).

Je n'ai bien sûr pas la place de remercier comme il se doit toutes ces personnes sans qui je n'en serai pas là. Encore merci à tous !!

Dr Vincent CONNORD (Hell yeah !)

Table des sigles et abréviations

<i>A</i>	Aire du cycle d'hystérésis (J/g)
<i>ADN</i>	Acide désoxyribonucléique
<i>AMD</i>	Approximation magnéto-dynamique
<i>APTS</i>	3-aminopropyltriéthoxysilane
<i>ARN</i>	Acide ribonucléique
<i>C₁ ou C₂</i>	Capacités du circuit résonnant (μF)
<i>c_v</i>	Capacité calorifique volumique (J/(m ³ .K))
<i>DLS</i>	Dynamic Light Scattering
<i>DRX</i>	Diffraction de Rayons X
<i>d_c</i>	Diamètre critique (nm)
<i>ERO</i>	Espèces Réactives de l'Oxygène
<i>EDX</i>	Analyse dispersive en énergie (Energy Dispersive X-ray)
<i>E_{an}</i>	Energies d'anisotropie magnétocristalline
<i>E_B</i>	Energie de barrière
<i>E_{dip}</i>	Energies d'interactions dipolaires
<i>E_{éch}</i>	Energies d'échange
<i>E_H</i>	Energie de couplage avec le champ magnétique externe
<i>E_T</i>	Energie totale du système magnétique
<i>η</i>	Viscosité dynamique d'un liquide (g/(cm.s))
<i>f</i>	Fréquence du champ magnétique (Hz)
<i>FACS</i>	Fluorescence-Activated Cells Sorting
<i>FEMM</i>	Finite Element Method Magnetics
<i>FT</i>	Fischer-Tropsch
<i>GBF</i>	Générateur de basses fréquences
<i>Γ</i>	Largeur de paroi (nm)
<i>γ₀</i>	Rapport gyromagnétique
<i>HAADF</i>	High Angle Annular Dark Field
<i>HRTEM</i>	Microscopie Electronique à Transmission Haute Résolution
\vec{H}_{ef}	Vecteur de champ effectif
\vec{H}_{th}	Vecteur de champ aléatoire associé aux fluctuations thermiques
<i>IRM</i>	Imagerie par Résonance Magnétique
<i>K</i>	Constante d'anisotropie (J/m ³)
<i>K₀</i>	Constante d'amortissement

K_{eff}	Anisotropie effective (J/m^3)
K_{ind}	Anisotropie individuelle (J/m^3)
k_b	Constante de Boltzmann ($1.38 \times 10^{-23} J/K$)
K	Paramètre sans dimension (déf. page I.14)
ξ	Paramètre sans dimension (déf. page I.8)
ξ_f	Coefficient de friction
l_{ech}	Longueur d'échange (nm)
<i>LRT</i>	Théorie de réponse linéaire
M	Aimantation des nanoparticules (mT)
M_r	Aimantation rémanente (mT)
M_s	Aimantation à saturation (mT)
<i>MTT</i>	Méthode colorimétrique révélant le nombre de cellules vivantes
N_m	Couple magnétique
N_{th}	Couple des fluctuations thermiques
<i>NPs</i>	Nanoparticules
μ_0	Perméabilité du vide ($4\pi \times 10^{-7} H/m$)
$\mu_0 H$	Amplitude du champ magnétique (mT)
$\mu_0 H_c$	Amplitude du champ coercitif (mT)
$\mu_0 H_{crit}$	Amplitude de champ critique (mT)
$\mu_0 H_K$	Amplitude du champ d'anisotropie (mT)
$\mu_0 H_{max}$	Amplitude maximale du champ magnétique (mT)
ν_1^0 ou ν_2^0	Fréquences de passages (s^{-1})
<i>PEG</i>	Polyéthylène glycol
<i>PVC</i>	Polychlorure de vinyle
Φ	Angle entre la direction du champ appliqué et l'axe de facile aimantation
Φ	Retard de phase de l'aimantation par rapport au champ magnétique
<i>RMN</i>	Résonance Magnétique Nucléaire
P	Densité massique du milieu (kg/m^3)
S	Coefficient de rectitude du cycle d'hystérésis
<i>SAR</i>	Puissance spécifique absorbée (<i>Specific Absorption Rate</i>) (W/g)
<i>SQUID</i>	Superconducting Quantum Interference Device
Σ	Paramètre sans dimension (déf. page I.8)
T	Température ($^{\circ}C$ ou K)

<i>TEM</i>	Microscopie Electronique à Transmission
τ_0	Temps de relaxation limite (s)
τ_B	Temps de relaxation de Brown (s)
τ_N	Temps de relaxation de Néel (s)
τ_m	Temps de mesure (s)
τ_R	Temps de relaxation du moment magnétique (s)
θ	Angle entre l'axe de facile aimantation et le moment d'une nanoparticule
V	Volume de la nanoparticule (m ³)
<i>VSM</i>	Vibrating Sample Magnetometer
χ_0	Susceptibilité magnétique statique (sans dimension)
$\tilde{\chi}$	Susceptibilité magnétique complexe (sans dimension)

Introduction générale

Les nanotechnologies suscitent depuis longtemps un grand intérêt dans divers domaines de recherches (électronique, médecine,...). Avec des tailles nanométriques, ces objets composés parfois de quelques centaines d'atomes possèdent de fait des propriétés physico-chimiques particulières. La maîtrise de leurs synthèses et le contrôle de leurs propriétés font à l'heure actuelle l'objet de nombreuses recherches. Le LPCNO (Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-Objets), créé sur une volonté de partenariats étroits entre des équipes de chimie (synthèses organométalliques et modélisation) et des équipes de physique (optoélectronique et nanomagnétisme), travaille à l'élaboration et la caractérisation de ces objets pour des applications dans différents domaines, comme par exemple la microélectronique et la médecine.

Parmi le panel de propriétés physiques d'intérêt, cette thèse s'intéresse plus précisément à l'échauffement de nanoparticules soumises à un champ magnétique à haute fréquence. L'efficacité de cette forme de production d'énergie est fortement dépendante des propriétés individuelles et collectives des nano-objets. Le contrôle de la taille, de la forme ainsi que de la composition du cœur cristallin des nanoparticules influent directement sur ces propriétés de chauffe. Il est donc possible d'optimiser les paramètres de synthèses pour obtenir des puissances de chauffe plus importantes dans des conditions de champ magnétique choisies.

Ces propriétés de chauffe suscitent de l'intérêt dans la lutte contre le cancer. En effet, la recherche en cancérologie est actuellement confrontée à des difficultés d'innovation dans le domaine du diagnostic et du traitement. Les thérapies actuelles que sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie présentent toutes des lacunes qu'il convient de combler à l'aide de nouvelles "armes" à ajouter à la palette des traitements possible. Dans cette optique, les nano-objets et plus précisément les nanoparticules sont considérées comme des structures de choix pour amener un traitement au plus près de la cellule cancéreuse. La taille de ces nanoparticules (entre 5 nm et 30 nm) correspond environ à celle de certains virus, et sont donc bien plus petites qu'une cellule (environ 10 μm). Cela peut permettre de structurer les objets pour transporter des agents de traitements chimio-thérapeutiques, ou encore d'augmenter la température des cellules par application d'un champ magnétique. Cette dernière approche est appelée hyperthermie magnétique.

A l'heure actuelle, la très grande majorité des équipes travaillant sur cette thématique utilise des nanoparticules d'oxydes de fer, plus facilement transférables en milieu aqueux et biocompatibles. Lors des essais *in vitro*, on obtient généralement des taux de mort cellulaire significatifs, dus à la présence combinée de champ magnétique alternatif et de nanoparticules. Dans certains cas, cette mort est reliée à une élévation de température du milieu de culture au-dessus des 43°C couramment admis pour être fatals aux cellules. Dans d'autres cas cependant, des efficacités de traitement similaires sont obtenues sans pour autant que la moindre hausse de température macroscopique ne soit mesurée.

Les essais *in vivo* sont également nombreux et variés. Principalement sur de petits animaux (souris, rats), les équipes mesurent l'impact du traitement sur l'évolution de xénogreffes de tumeurs. Les nanoparticules sont le plus souvent amenées directement dans la tumeur *via* une injection. On mesure souvent la température intra-tumorale tout au long du traitement, pour constater que la réduction du volume de la tumeur coïncide avec une hausse de température macroscopique.

Cette même thérapie est appliquée sur des patients à l'hôpital de la Charité (Berlin) pour certains cancers du cerveau par exemple. Les nanoparticules sont dans ce cas également directement injectées dans la tumeur avant application d'un champ magnétique alternatif.

Dans l'état actuel de la thérapie, le mode invasif d'injection des nanoparticules et le manque de spécificité du traitement posent problème. Bien que certaines nanoparticules étudiées *in vitro* ou *in vivo* présentent des puissances de chauffes relativement importantes, celles utilisées sur patients ne sont pas optimisées pour des applications en hyperthermie. Les deux grands axes de recherches actuels sont donc l'optimisation des propriétés d'échauffements des nanoparticules et le ciblage du traitement aux cellules cancéreuses seulement, passant par une injection des particules par voie intraveineuse. En ce sens, l'enrobage et la fonctionnalisation des nanoparticules permettent de les rendre furtives vis-à-vis des mécanismes de défenses du corps et de cibler les cellules cancéreuses pour y être internalisées. Le projet MultiFun (*Multifunctional nanotechnology for selective detection and treatment of cancer*), par lequel cette thèse a été financée, a pour but de proposer des nano-objets spécialement optimisés pour des applications d'hyperthermie *in vivo*. Dans ce projet, différents types de particules ont été synthétisés et fonctionnalisés. Certaines, en particulier, pouvaient être vectrices d'agents chimio-thérapeutiques greffés à leurs surfaces. Toutes les particules ont été étudiées en magnétisme et en hyperthermie afin de définir les paramètres optimaux (taille, nature de l'enrobage, etc.) permettant de maximiser leurs puissances de

chauffe. Pour tous les types de nanoparticules susceptibles d'être testées *in vitro* ou *in vivo*, des études de biocompatibilités et de toxicités ont été menées. Des expériences *in vitro* et *in vivo* (sur souris ou cochon) ont ensuite été effectuées. Notre rôle a été de mettre en place des protocoles évaluant le potentiel hyperthermique de différentes synthèses de nanoparticules d'oxydes de fer, ce qui a par exemple nécessité le développement de bancs dédiés à l'étude de propriétés d'échauffement. Le projet incluant également des essais *in vivo*, nous avons eu à concevoir un inducteur de champs magnétiques hautes fréquences dédié aux traitements sur le petit animal (souris ou rat).

Parallèlement à ces travaux, nous avons collaboré avec le Laboratoire de Réceptologie et Ciblage Thérapeutique en Cancérologie (RCTC) de Toulouse, qui a développé une expertise dans le ciblage de cellules tumorales en utilisant un récepteur couplé aux protéines G, le récepteur RCCK2 de la cholécystokinine. Lors de la thèse de Claire Sanchez, soutenue en 2012 [1], un protocole permettant la vectorisation de nanoparticules avec un analogue de la gastrine, ligand spécifique du RCCK2, a été élaboré. Les nanoparticules ainsi vectorisées s'internalisent spécifiquement dans les cellules tumorales surexprimant le RCCK2 et sont dirigées vers les lysosomes, compartiments subcellulaires dans lesquels elles s'accumulent. La thèse de Darine El Hajj Diab, débutée au RCTC en même temps que la mienne, visait, dans un premier temps, à optimiser la vectorisation des nanoparticules dans le but d'augmenter l'accumulation des nanoparticules dans les cellules tumorales, puis à développer des expériences d'hyperthermie magnétique dans le but d'éradiquer les cellules tumorales. Nous avons accompagné le RCTC dans tout le processus permettant la mise en place d'expériences *in vitro*, en prenant en charge ce qui relevait de la physique et de l'instrumentation. Nous avons notamment développé une installation permettant d'appliquer le traitement d'hyperthermie magnétique *in vitro*. De plus, la volonté d'avoir accès aux mécanismes intracellulaires se produisant durant le temps de traitement nous a conduit à concevoir un système d'application de champ magnétique sous microscope confocal, ce qui permet pour la première fois de visualiser en temps réel des expériences d'hyperthermie magnétique *in vitro*.

La hausse de température de nanoparticules magnétiques soumises à un champ haute fréquence peut également être exploitée pour catalyser des réactions chimiques. Le contrôle de synthèses chimiques en flux continu utilisant des catalyseurs est un sujet très actif de recherche académique et industriel. Dans ce secteur, l'échauffement de nanoparticules par application d'un champ magnétique haute fréquence représente une alternative aux méthodes

de production de chaleur actuelles dans les réacteurs (four, chauffage par micro-ondes). En effet, les propriétés magnétiques de ces objets permettent d'élever quasiment instantanément la température de leurs surfaces ce qui est idéal d'un point de vue industriel. Les principaux travaux traitant de l'utilisation de nanoparticules synthétisées par voie chimique comme catalyseurs *via* l'induction magnétique ont été réalisés par l'équipe d'Andreas Kirschning. De nombreuses réactions chimiques y sont étudiées en phase liquide. L'installation qu'ils ont mis en place leur permet également de travailler sur des réactions en continu. Pour l'heure, aucune catalyse de réaction hétérogène exploitant l'échauffement de nanoparticules magnétiques soumises à un champ haute-fréquence n'a été montrée. Parmi le panel de réactions ayant un grand enjeu industriel, nous nous sommes intéressés ici à la réaction Fisher-Tropsch. Ce procédé, permettant d'obtenir des hydrocarbures de synthèse à partir de monoxyde de carbone et de dihydrogène, est déjà utilisé dans certains pays au niveau industriel pour réduire leur dépendance énergétique au pétrole. Il pourrait également avoir une importance croissante à l'avenir pour stocker les énergies intermittentes, dans l'approche « power to gas », actuellement en fort développement en Allemagne. La catalyse de cette réaction en utilisant des nanoparticules magnétiquement optimisées pourrait potentiellement réduire le coût énergétique du procédé et le rendre compatible avec les fluctuations de production des énergies renouvelables. L'équipe Nanostructures et Chimie Organométallique du LPCNO travaille sur l'optimisation des puissances de chauffe de nanoparticules de fer depuis environ 10 ans, essentiellement pour l'application en cancérologie. Au cours de cette thèse, un travail important visant à développer des nanoparticules possédant à la fois des fortes puissances de chauffe et des propriétés catalytiques a été réalisé par cette équipe. Nous présenterons les résultats obtenus en collaboration avec cette dernière, qui ont permis d'établir la preuve de concept attendue.

Cette thèse s'articule autour de quatre chapitres. Le Chapitre I est consacré à une étude bibliographique visant à définir le contexte de cette thèse. Nous exposerons les théories actuelles décrivant l'échauffement des nanoparticules sous un champ magnétique alternatif dans différents cas. Puis nous présenterons quelques résultats associés à l'étude des paramètres permettant de maximiser le SAR (*Specific Absorption Rate* en W/g, grandeur communément utilisée pour estimer le potentiel de chauffe) des nanoparticules. Compte tenu de la littérature considérable sur le sujet, nous n'avons pas cherché à être exhaustifs. Nous présenterons ensuite quelques travaux de références traitant de l'hyperthermie magnétique *in vitro*. Enfin, nous traiterons des réactions chimiques catalysées par l'échauffement magnétique de nanoparticules.

Le Chapitre II sera consacré à la contribution du LPCNO dans le projet MultiFun sur les bases duquel cette thèse a été financée. L'expertise du LPCNO dans le nanomagnétisme nous a donc permis d'étudier les propriétés d'échauffement par induction magnétique des nanoparticules en collaboration avec les équipes de chimie de synthèses du projet. Afin d'optimiser notre étude, nous avons conçu une bobine de mesures de cycles hautes fréquences. Nous expliquerons les protocoles de mesures physiques mis en place pour sélectionner les meilleures synthèses possibles. De plus, nous présenterons la conception d'un inducteur dédié à l'application de traitements *in vivo*.

Par la suite, nous exposerons en Chapitre III les résultats obtenus dans le cadre de la collaboration avec le Laboratoire de Réceptologie et Ciblage Thérapeutique en Cancérologie de Toulouse. Nous avons mis en place des expériences d'hyperthermie magnétique *in vitro* sur des cellules tumorales adhérentes. Nous présenterons ensuite l'approche que nous avons eue pour observer la cellule et ses organites durant le traitement sous microscopie confocale. Nous montrerons notamment comment l'utilisation de différents fluorochromes permet de suivre différentes réponses métaboliques des cellules durant le traitement.

Enfin, le Chapitre IV validera la preuve de concept sur l'utilisation de nanoparticules soumises à un champ magnétique haute-fréquence comme catalyseurs de réaction hétérogène en phase gazeuse. Nous présenterons les caractérisations poussées de ces objets, qui nous ont permises de déterminer leur structure. Nous étudierons également l'incidence des propriétés d'échauffement de ces particules sur le rendement des produits de réaction.

- [1] C. Sanchez, « Le récepteur CCK2 dans les cancers: ciblage diagnostique et thérapeutique grâce à la vectorisation de nanoparticules magnétiques », Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier, 2012.

Table des matières

Chapitre I : Etude bibliographique

<i>1</i>	<i>Hyperthermie magnétique des nanoparticules</i>	<i>I-1</i>
1.1	Magnétisme des Nanoparticules.....	I-1
1.2	Théorie de l'hyperthermie des nanoparticules monodomaines.....	I-7
1.3	Principaux travaux d'optimisation du SAR de nanoparticules magnétiques	I-40
<i>2</i>	<i>Induction de mort cellulaire par hyperthermie magnétique.....</i>	<i>I-48</i>
2.1	Mécanismes cellulaires essentiels à la mise en place du traitement par hyperthermie magnétique	I-49
2.2	Expériences in vitro de mort cellulaire par hyperthermie magnétique.....	I-51
<i>3</i>	<i>Catalyse de chaine carbonée par nanoparticules magnétiques.....</i>	<i>I-57</i>
3.1	Réaction Fischer-Tropsch.....	I-57
3.2	Réactions chimiques activées par induction magnétique	I-59

Chapitre II : Développement d'instrumentation pour l'optimisation de nanoparticules d'oxydes de Fer et l'application à des systèmes biologiques – Projet Multifun

<i>1</i>	<i>Conception d'un électroaimant à large entrefer :</i>	<i>II-1</i>
1.1	Banc de mesure d'hyperthermie du LPCNO.	II-1
1.2	Cahier des charges et conception de l'électroaimant à large entrefer :	II-3
1.3	Fonctionnement et démarches expérimentales	II-8
1.4	Conclusion et perspectives	II-17
<i>2</i>	<i>Bobine de mesures de cycles d'hystérésis hautes fréquences.....</i>	<i>II-18</i>
<i>3</i>	<i>Synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer par voie aqueuse – Optimisation pour l'hyperthermie magnétique</i>	<i>II-20</i>
<i>4</i>	<i>Conclusion.....</i>	<i>II-21</i>

Article II-1

Article II-2

Chapitre III : Hyperthermie magnétique in vitro: induction de mort cellulaire et observations en temps réel

<i>1</i>	<i>Traitement d'hyperthermie magnétique sur cellules adhérentes.....</i>	<i>III-1</i>
1.1	Propriétés magnétiques et mesures de concentrations de nanoparticules internalisées.....	III-2
1.2	Installation expérimentale	III-4
1.3	Présentation des résultats obtenus	III-5
<i>2</i>	<i>Visualisation de cellules cancéreuses pendant le traitement hyperthermique.....</i>	<i>III-6</i>
2.1	Développement d'un électroaimant miniaturisé	III-7
2.2	Présentation des résultats obtenus	III-15
<i>3</i>	<i>Conclusion.....</i>	<i>III-17</i>

Article III-1

Article III-2

Chapitre IV : Catalyse de réaction Fisher-Tropsch par échauffement de nanoparticules soumises à un champ magnétique haute fréquence

<i>1</i>	<i>Synthèses et caractérisations des catalyseurs.....</i>	<i>IV-3</i>
<i>2</i>	<i>Propriétés magnétiques des catalyseurs</i>	<i>IV-9</i>
<i>3</i>	<i>Propriétés catalytiques des nanoparticules durant la synthèse Fischer-Tropsch</i>	<i>IV-14</i>
<i>4</i>	<i>Discussion et conclusion</i>	<i>IV-26</i>

Chapitre I

Etude bibliographique

<i>1</i>	<i>Hyperthermie magnétique des nanoparticules</i>	<i>I-1</i>
1.1	Magnétisme des Nanoparticules.....	I-1
1.2	Théorie de l'hyperthermie des nanoparticules monodomaines.....	I-7
1.3	Principaux travaux d'optimisation du SAR de nanoparticules magnétiques	I-40
<i>2</i>	<i>Induction de mort cellulaire par hyperthermie magnétique</i>	<i>I-48</i>
2.1	Mécanismes cellulaires essentiels à la mise en place du traitement par hyperthermie magnétique	I-49
2.2	Expériences in vitro de mort cellulaire par hyperthermie magnétique.....	I-51
<i>3</i>	<i>Catalyse de chaîne carbonée par nanoparticules magnétiques</i>	<i>I-57</i>
3.1	Réaction Fischer-Tropsch.....	I-57
3.2	Réactions chimiques activées par induction magnétique	I-59

1 Hyperthermie magnétique des nanoparticules

1.1 Magnétisme des Nanoparticules

1.1.1 Energies mises en jeu et structuration en domaines magnétiques

Dans les matériaux magnétiques, les états stables correspondant à l'organisation spontanée des moments magnétiques résultent d'une compétition entre différentes contributions énergétiques. L'énergie totale (E_T) d'un système magnétique peut donc s'écrire comme la somme de ces différentes contributions:

$$E_T = E_{éch} + E_{an} + E_{dip} + E_H \quad (\text{I. 1})$$

avec $E_{éch}$ l'énergie d'échange qui tend à aligner les moments voisins dans les matériaux ferromagnétiques, E_{an} l'énergie d'anisotropie magnétocristalline qui tend à aligner les moments selon un axe facile d'aimantation, E_{dip} qui tend à refermer les lignes de champ pour éviter une structure magnétique polarisée et E_H résultante du couplage avec un champ externe appliqué. Nous décrivons ci-dessous la contribution de chacune de ces énergies appliquées dans le cas de nanoparticules magnétiques.

- i. L'énergie d'échange est une contribution valable seulement entre proches voisins. Cette énergie est caractérisée par une constante d'échange A , qui est la valeur de force nécessaire pour aligner les spins. On définit la longueur d'échange $l_{éch}$, pour délimiter les zones d'influences de l'énergie d'échange et de l'énergie dipolaire:

$$l_{éch} = \sqrt{\frac{2A}{\mu_0 M_s^2}} \quad (\text{I. 2})$$

avec M_s l'aimantation à saturation de la particule à la température d'étude. Dans le cas où l , dimension de l'objet est inférieure à $l_{éch}$, l'échange entre proches voisins prédomine et les spins sont donc alignés (pour le fer, $l_{éch} = 3,3$ nm).

- ii. L'anisotropie magnétocristalline provient de l'interaction électrostatique entre les orbitales des électrons responsables du magnétisme de l'atome et du champ

électrique lié à la distribution de charges de l'environnement nommée le champ cristallin. L'anisotropie magnétocristalline se manifeste au niveau du moment magnétique de l'atome par l'intermédiaire du couplage spin-orbite et rend le spin sensible au champ cristallin. Il devient donc plus "facile" pour ces composés ferromagnétiques d'aligner l'aimantation sur certains axes de facile aimantation, à la différence de ce que l'on pourrait observer dans un liquide ou un matériau amorphe. L'amplitude des effets d'anisotropie est conditionnée tout d'abord par la catégorie à laquelle appartient l'élément considéré (élément de transition 3d ou 4f), et ensuite par la structure cristalline du système étudié. Cet effet est caractérisé par la constante d'anisotropie K .

- iii. L'interaction dipolaire qui tend à refermer les lignes de champ est une contribution à longue distance et est dépendante du carré de l'aimantation spontanée de l'objet. Si l , dimension de l'objet, est supérieure à la longueur d'échange $l_{éch}$ (cf. (I. 2)), l'interaction tend à prédominer, les moments deviennent indépendants et le flux peut se refermer.

Les énergies de couplage et d'anisotropie magnétocristalline peuvent être simultanément minimisées par des domaines alignés le long des axes de facile aimantation. A l'inverse, les énergies d'échange et d'interaction dipolaire ne peuvent donc pas être minimisées en même temps. Pour minimiser leur somme, la structure magnétique du matériau est scindée en différents domaines magnétiques séparés par des parois (cf.

Figure I. 1).

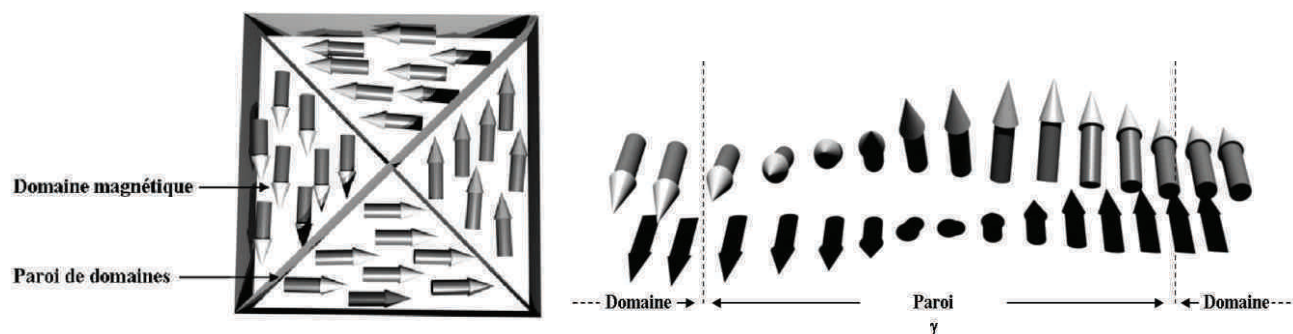


Figure I. 1 (a) Représentation d'une configuration magnétique structurée en différents domaines pour minimiser E_{an} et E_{dip} . (b) Représentation d'une paroi de Block entre deux domaines magnétiques. (Figure tirée de [1])

Cette configuration est qualifiée de multidomaine en comparaison avec une configuration monodomaine (un unique domaine magnétique), et est caractéristique d'un matériau magnétique massif. Les parois magnétiques séparant deux domaines présentent des moments qui tournent progressivement d'un axe de domaine à l'autre. La largeur γ d'une paroi varie et peut être importante pour permettre que l'angle entre proches voisins soit faible et donc minimiser l'énergie d'échange, ou au contraire réduite de manière à minimiser l'énergie d'anisotropie magnétocristalline en conservant les moments intra-domaines parallèles aux axes de facile aimantation.

Dans le cas des nanoparticules, les dimensions d'objets sont du même ordre que les longueurs d'échanges et largeurs de parois définis plus tôt. Dépendant de ces paramètres et de la nature du matériau étudié, les nanoparticules pourront présenter selon leurs tailles une configuration monodomaine ou multidomaine. Ainsi, pour chaque matériau, on introduit un diamètre critique d_c [2] séparant ces deux états magnétiques:

$$d_c = \frac{72\sqrt{AK}}{\mu_0 M_s^2} \quad (\text{I. 3})$$

Pour ce diamètre, les énergies de la configuration monodomaine et multidomaine sont égales. Pour des diamètres de nanoparticules inférieurs à d_c la structure monodomaine est favorisée. A l'inverse, pour des diamètres supérieurs à d_c , les nanoparticules seront en structures magnétiques multidomaines. Pour notre cas d'étude, nous nous cantonnerons à la description du magnétisme des particules monodomaines, plus favorables pour l'hyperthermie magnétique.

1.1.2 Magnétisme des particules monodomaines et superparamagnétisme

Dès 1949, Néel décrivait un état magnétique particulier des très petites particules monodomaines, appelé plus tard superparamagnétisme. Considérons donc le cas d'une nanoparticule monodomaine unique. En l'absence de champ magnétique externe son moment s'oriente spontanément suivant un seul axe de facile aimantation. Il peut ensuite avoir deux

orientations possibles, énergétiquement identiques, que l'on nomme "up" et "down" (voir Figure I. 2).

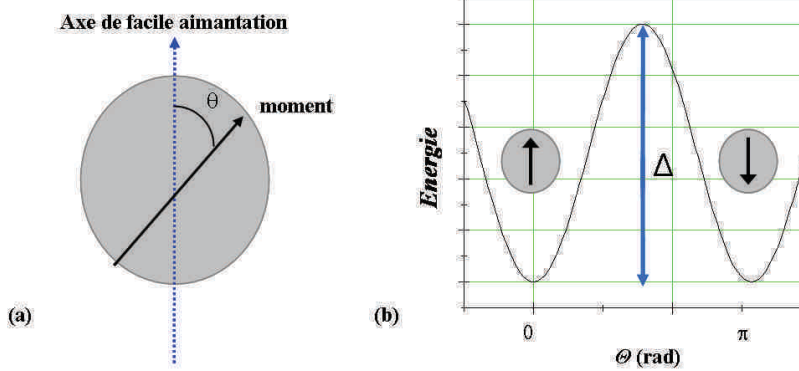


Figure I. 2 (a) Schéma d'une nanoparticule monodomaine avec l'axe de facile aimantation en pointillé et θ l'angle entre cet axe et le moment de la nanoparticule. (b) Diagramme énergétique de la nanoparticule en fonction de θ et représentation des orientations up et down. (Figure tirée de [1])

Considérons un angle θ aléatoire ; l'énergie totale d'anisotropie s'exprime comme ceci:

$$E_{an} = E_B \sin^2 \theta \quad (I. 4)$$

avec E_B l'énergie de barrière. Pour passer d'une position d'équilibre à l'autre, une énergie E_B doit donc être fournie. Dans le cas de petites particules, cette barrière devient de l'ordre de grandeur de celui de l'énergie thermique $k_B T$. La probabilité de passage du moment magnétique d'une position d'équilibre à l'autre en l'absence de champ magnétique externe n'est plus nulle. Néel introduit un temps de relaxation τ_N pour décrire le temps moyen de relaxation du moment magnétique:

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{E_B}{k_B T}\right) \quad (I. 5)$$

avec τ_0 le temps de relaxation limite, de l'ordre de 10^{-9} s. L'énergie de barrière E_B ne prend une forme simple que pour des particules idéales, c'est-à-dire n'ayant pas un diamètre plus petit que d_c , et suffisamment éloignées les unes des autres pour négliger les interactions magnétiques inter-particulaires. Dans ce cas, on considère que $E_B = KV$, où K est la constante d'anisotropie et V le volume de la particule.

Introduisons maintenant un champ magnétique H appliqué suivant l'axe de facile aimantation de la particule [3] . L'énergie résultante s'écrit:

$$E_{an} = E_B \sin^2 \theta - HVM_S \cos \theta \quad (\text{I. 6})$$

Le profil de la barrière énergétique suivant l'angle θ peut donc être décrit en fonction du rapport $HVM_S/2E_B$.

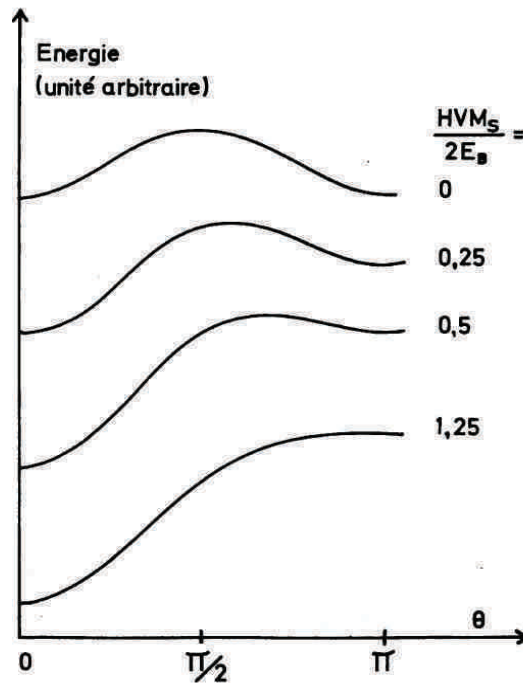


Figure I. 3 Diagramme énergétique d'une particule uniaxiale en fonction de θ et du champ magnétique extérieur appliqué suivant la direction de facile aimantation. (Figure tirée de [3])

Nous retrouvons bien sur ce diagramme les deux positions d'équilibre pour $\theta=0$ et $\theta=\pi$ en l'absence d'un champ magnétique extérieur. Puis, avec H croissant, la barrière énergétique devient plus importante pour $\theta = 0$ que pour $\theta = \pi$, et ce jusqu'à ce que E_{an} ne présente qu'un unique état énergétiquement stable pour $\theta = 0$, lorsque $H > 2K/M$.

Intéressons-nous maintenant à la probabilité de trouver l'aimantation d'une nanoparticule uniaxiale suivant l'angle θ . Pour un équilibre thermodynamique réalisé et à une température T , cette probabilité $f(\theta)d\theta$ est donnée par la formule de Boltzmann avec:

$$f(\theta) = \frac{1}{C} \exp\left(-\frac{E}{k_B T}\right) \sin \theta \quad (\text{I. 7})$$

où C est donné par: $C = \int_0^\pi \exp\left(-\frac{E}{k_B T}\right) \sin \theta d\theta$. Nous représentons en *Figure I. 4* cette probabilité $f(\theta)$ pour différents exemples d'énergie de barrière et de valeurs de champ appliqué.

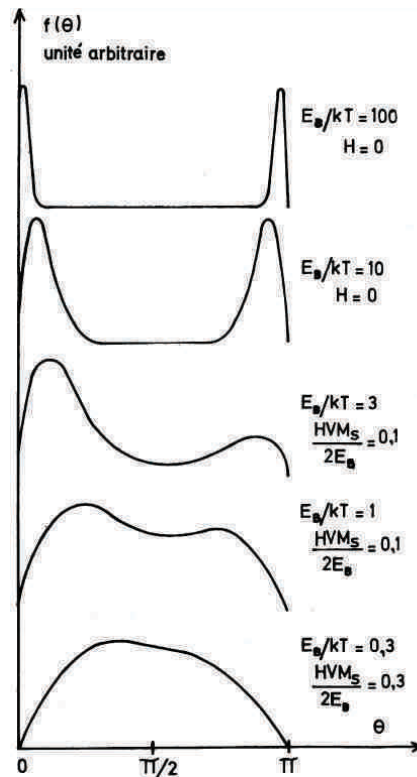


Figure I. 4 Variation de la fonction de probabilité de trouver l'aimantation suivant θ dans une particule uniaxiale en fonction de $E_B/k_B T$ et du champ magnétique appliqué H . (Figure tirée de [3])

Pour une énergie de barrière largement supérieure à $k_B T$ et en l'absence de champ magnétique appliqué, l'aimantation de la particule ne peut se trouver qu'aux minima énergétiques. Pour deux minima d'énergie, seuls les deux états correspondant à ces minima sont probables et avec une probabilité égale si $H = 0$. A cette condition, la probabilité de passer d'un état stable à l'autre est nulle. Un ensemble de petites particules idéales aura donc une aimantation résultante stable, et nulle si $H = 0$. Lorsque le rapport $E_B/k_B T$ diminue, les pics de probabilité s'élargissent autour des minima d'énergie et l'aimantation fluctue autour des deux valeurs de θ correspondantes.

Pour une énergie totale de même ordre de grandeur que l'agitation thermique $k_B T$, les pics de probabilité maximum s'atténuent peu à peu et $f(\theta)$ prend des valeurs significatives quel que soit θ .

L'effet du superparamagnétisme et des fonctions d'équilibres sur l'hyperthermie magnétique sera détaillé plus loin (cf. 1.2). Nous présentons simplement ici en *Figure I. 5* un

exemple de cycle d'hystérésis dans le cas de particules superparamagnétiques, paramagnétiques et ferromagnétiques.

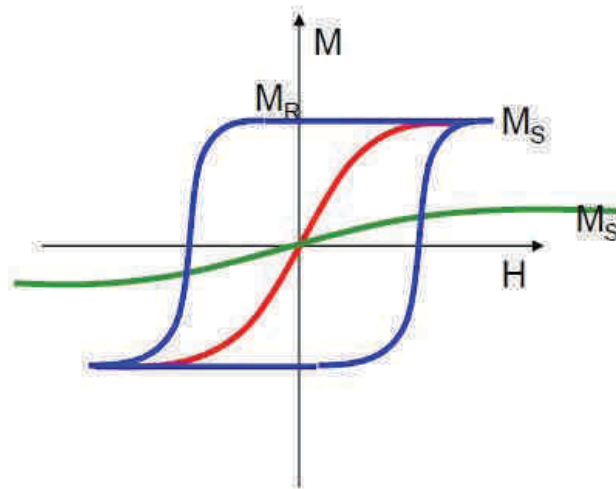


Figure I. 5 Représentation schématique de cycles d'hystérésis caractéristiques de nanoparticules superparamagnétiques (en rouge), paramagnétique (en vert) et ferromagnétique (en bleu).

La mesure d'un cycle $M(H)$ permet de déterminer les propriétés essentielles de coercivité H_c (champ appliqué nécessaire pour avoir $M = 0$), de saturation M_s (aimantation maximum pour H infini) et de rémanence M_R (aimantation pour $H = 0$). La mesure $M(H)$ correspondant à l'état ferromagnétique décrit un cycle avec une rémanence et une coercivité non nulles et donc une aire non nulle. A l'inverse, le fait que l'aimantation des particules superparamagnétiques puisse se retourner sous l'effet de l'agitation thermique entraîne une annulation de la rémanence et donc de l'aire du cycle d'hystérésis.

1.2 Théorie de l'hyperthermie des nanoparticules monodomaines

Un échantillon de nanoparticules magnétiques placé dans un champ magnétique alternatif de fréquence f et d'amplitude $\mu_0 H_{\max}$ décrit un cycle d'hystérésis. Sous l'effet du champ, les particules s'aimantent et leurs moments s'alignent progressivement suivant la direction du champ appliqué. Ce déplacement d'aimantation s'effectue par déplacement de parois magnétiques dans le cas de particules multidomaines, et par retournements cohérents dans le cas de particules monodomaines. La quantité de chaleur A délivrée par les nanoparticules durant un cycle d'hystérésis complet correspond simplement à l'aire de ce cycle d'hystérésis et s'exprime comme ceci:

$$A \equiv \int_{-H_{max}}^{+H_{max}} \mu_0 M(H) dH \quad (I. 8)$$

où $M(H)$ est l'aimantation des nanoparticules. La puissance spécifique absorbée par les nanoparticules (SAR, Specific Absorption Rate) s'exprimant en W/g est la grandeur significative communément utilisée pour décrire le pouvoir hyperthermique des nanoparticules magnétiques. Le SAR s'exprime:

$$SAR = Af \quad (I. 9)$$

et est donc directement dépendant de l'aire d'hystérésis. Comme nous le verrons dans cette partie, A est complexe à décrire et dépend principalement de l'anisotropie effective des particules K_{eff} , de leur volume V , leur température T , de la fréquence et l'amplitude du champ magnétique appliqué et des interactions magnétiques interparticulaires.

Nous détaillerons dans cette partie les différentes théories de l'hyperthermie dans le cas de nanoparticules indépendantes magnétiquement, fixes ou en mouvement. Ensuite nous introduirons l'influence des interactions magnétiques dans les calculs de puissances de chauffe. Enfin nous présenterons les récents travaux effectués sur la diffusion de chaleur autour d'une (plusieurs) nanoparticule(s) soumise(s) à un champ magnétique alternatif.

1.2.1 Hyperthermie des nanoparticules sans interactions magnétiques

1.2.1.1 Cas de nanoparticules fixes

Reprenons la schématisation d'une nanoparticule dans un champ magnétique extérieur H (cf. *Figure I. 2*) en introduisant un angle ϕ entre la direction du champ appliqué et l'axe de facile aimantation comme représentation en *Figure I. 6(a)*. L'équation (I. 6) devient [4]:

$$E(\theta, \phi) = K_{eff} V \sin^2(\theta) - \mu_0 M_S V H_{max} \cos(\theta - \phi) \quad (I. 10)$$

On utilisera par la suite les paramètres sans dimension [5]:

$$\sigma = \frac{K_{eff} V}{k_b T} \quad (I. 11)$$

$$\xi = \mu_0 M_S V H_{max} / k_b T \quad (I. 12)$$

Finalement, l'énergie magnétique réduite et normalisée par l'énergie thermique s'exprime comme ceci:

$$\frac{E(\theta, \phi)}{k_b T} = \sigma \sin^2(\theta) - \xi \cos(\theta - \phi) \quad (I. 13)$$

Nous pouvons voir l'évolution de cette énergie magnétique réduite sur le diagramme *Figure I. 6 (c)* avec ξ variant entre 0 et 2, un angle $\phi = 30^\circ$ et $\sigma = 1$. Nous remarquons que lorsque le champ appliqué $\mu_0 H_{max}$ est supérieur au champ d'anisotropie $\mu_0 H_K = 2K_{eff}/M_S$, le diagramme énergétique ne possède qu'un seul minimum dans la direction de l'axe d'anisotropie. A l'inverse, lorsque $\mu_0 H_{max}$ est inférieur à $\mu_0 H_K$, le profil énergétique possède deux minima notés (θ_1, E_1) et (θ_2, E_2) et deux maxima dont le plus petit est noté (θ_3, E_3) . En l'absence de champ appliqué (soit $\xi = 0$), nous retrouvons que l'énergie prend deux minima équivalents pour $\theta_1 = 0^\circ$ et $\theta_2 = 180^\circ$ (*Figure I. 6(c)* et *(d)*). Quand $\xi > 0$, un des deux minima est favorisé par rapport à l'autre, et on remarque qu'en augmentant l'amplitude du champ magnétique appliqué, l'abscisse du minima (θ_1, E_1) se déplace pour favoriser un alignement de l'aimantation selon la direction du champ $\mu_0 H_{max}$. Ainsi on tend progressivement dans cet exemple vers $\theta_1 = \phi = 30^\circ$. A l'inverse, pour $\xi < 0$, la position (θ_2, E_2) est favorisée et θ_2 tend vers 210° .

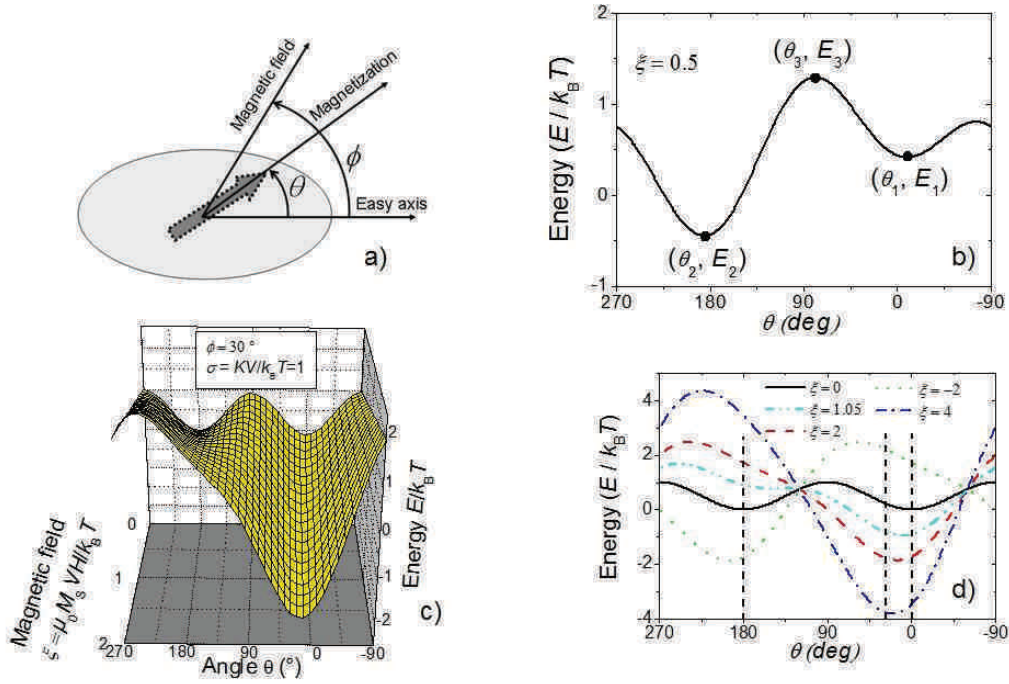


Figure I. 6 (a) Schéma d'une particule monodomaine avec les angles ϕ et θ . (b) Diagramme d'énergie magnétique réduite avec $\zeta = -0.5$, $\phi = 30^\circ$ et $\sigma = 1$. (c) Diagramme d'énergie réduite avec $\phi = 30^\circ$ et $\sigma = 1$. (d) Diagramme d'énergie réduite pour différentes valeurs de ζ avec $\phi = 30^\circ$ et $\sigma = 1$. (Figure tirée de [5])

1.2.1.1.1 Calcul de cycles d'hystérésis à partir des fonctions d'équilibres

En tenant compte de l'angle ϕ , l'expression des fonctions d'équilibres données en (I. 7) devient:

$$f(\theta, \phi) = \frac{\exp\left(\frac{E(\theta, \phi)}{k_b T}\right)}{\int_{\theta} \exp\left(\frac{E(\theta, \phi)}{k_b T}\right) d\theta} \quad (\text{I. 14})$$

A partir de cette expression, l'aimantation résultante de la nanoparticule dans la direction du champ magnétique appliqué est obtenue par intégrations numériques [6]. Nous pouvons distinguer deux cas d'étude, le premier en fixant $\phi = 0$ tel que le champ appliqué soit aligné selon l'axe d'anisotropie de toutes les nanoparticules (Figure I. 7(a)) et le second en considérant des axes d'anisotropie orientés aléatoirement (Figure I. 7(b)). Pour ce dernier cas de figure, l'aimantation résultante correspond à l'intégration des différentes aimantations de nanoparticules sur tout le domaine ϕ : $M = \int_0^{\pi/2} M(\phi) \sin\phi d\phi$. Dans le cas simple où l'anisotropie est négligée, σ devient nulle, l'aimantation s'exprime comme ceci:

$$M = M_s L(\xi) \quad (\text{I. 15})$$

avec $L(\xi)$ la fonction de Langevin: $L(\xi) = \coth(\xi) - 1/\xi$ qui est communément utilisée pour négliger les effets d'anisotropie des nanoparticules. On représente à titre de comparaison la fonction de Langevin sur les *Figure I. 7(a)* et *(b)*. A l'inverse, pour de fortes valeurs de σ , on utilise l'approximation à deux niveaux qui consiste à considérer que toutes les aimantations se trouvent sur les deux minima d'énergie. Cela revient à réduire l'intégration des aimantations à une somme de deux termes:

$$M = M_s \frac{\exp(\sigma + \xi) - \exp(\sigma - \xi)}{\exp(\sigma + \xi) + \exp(\sigma - \xi)} = M_s \tanh(\xi) \quad (\text{I. 16})$$

avec $\phi = 0$. Cette expression est tracée sur la *Figure I. 7(a)* dans le cas d'une distribution d'anisotropie non aléatoire. On peut observer dans ce cas les courbes d'aimantations qui évoluent progressivement entre ces deux limites théoriques $L(\xi)$ et $\tanh(\xi)$ pour σ variant respectivement de 0 à de grandes valeurs. On remarque de plus dans les deux cas que l'aimantation évolue de manière linéaire aux basses amplitudes de champ pour ξ compris entre 0 et 1.

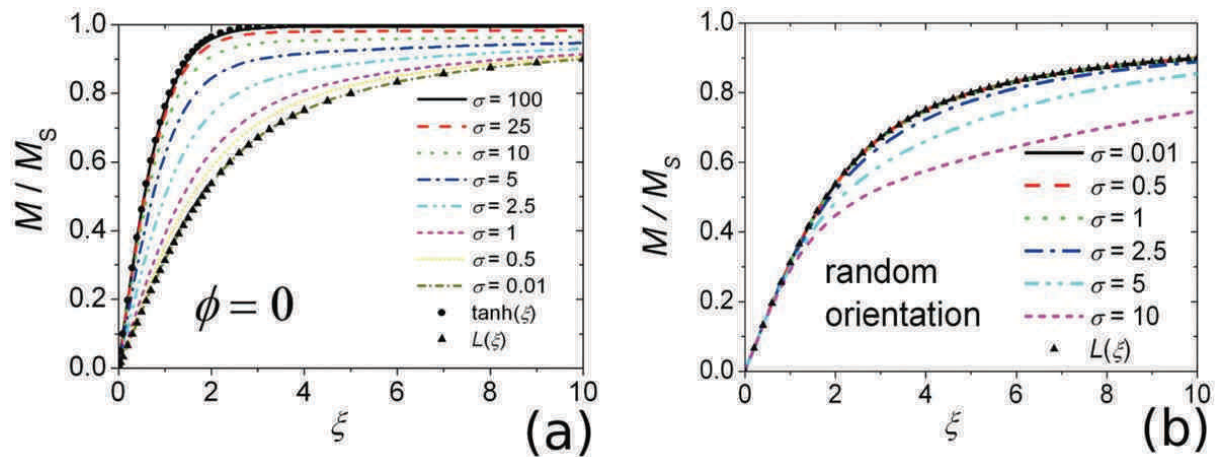


Figure I. 7 Cycles d'hystérésis calculés à partir des fonctions d'équilibre pour plusieurs valeurs de σ dans le cas (a) de $\phi = 0$ et (b) ϕ aléatoires (Figure tirée de [5])

La susceptibilité magnétique dans le cas des ϕ aléatoires est indépendante de l'anisotropie des nanoparticules et est donné par:

$$\chi_{0 \text{ Langevin}} = \frac{\mu_0 M_S^2 V}{3k_B T} \quad (\text{I. 17})$$

Dans le cas de nanoparticules avec $\phi = 0$, on constate *Figure I. 7(a)* que la susceptibilité magnétique est cette fois-ci dépendante de la valeur de σ et est comprise entre $\chi_{0 \text{ Langevin}}$ et $\chi_{0 \text{ tanh}}$ avec:

$$\chi_{0 \text{ tanh}} = \frac{\mu_0 M_S^2 V}{k_B T} = 3\chi_{0 \text{ Langevin}} \quad (\text{I. 18})$$

Pour des valeurs intermédiaires de σ , un calcul numérique permet de calculer les valeurs de $\chi_0(\sigma)$:

$$\frac{\chi_0(\sigma)}{\chi_{0 \text{ Langevin}}} = 3 - \frac{2}{1 + \left(\frac{\sigma}{3.4}\right)^{1.47}} \quad (\text{I. 19})$$

1.2.1.1.2 Calcul de cycles d'hystérésis avec le modèle de Stoner-Wohlfarth

Le modèle de Stoner-Wohlfarth [4], [7] décrit les processus d'aimantation d'échantillons de nanoparticules monodomaines, d'axes d'anisotropies aléatoires, indépendantes magnétiquement. Ce modèle ne prend pas en compte les effets d'activation thermique, il est donc valable à une température $T = 0$ K. De ce fait, les aimantations ne peuvent se trouver que sur les deux positions d'équilibre. Les rotations sont seulement possibles si la barrière énergétique est totalement levée par l'application d'un champ magnétique d'amplitude suffisante appelé champ critique.

Dans le cas de nanoparticules dont les axes faciles sont tous alignés sur le champ magnétique, la levée de barrière énergétique apparaît pour une amplitude de champ de $\mu_0 H_K$. Le champ coercitif est donc égal au champ critique et au champ d'anisotropie. Le cycle d'hystérésis décrit alors un carré parfait représenté *Figure I. 8(a)* pour $\kappa = 0$ (équivalent à $T = 0$ K, nous définirons κ ultérieurement). L'aire de ce cycle d'hystérésis est donnée par:

$$A = 4\mu_0 H_c M_S = 8K_{eff} \quad (\text{I. 20})$$

Si maintenant, on introduit un angle ϕ non nul pour toutes les particules, le cycle d'hystérésis se ferme progressivement jusqu'à se fermer totalement pour un angle $\phi = 90^\circ$ [8]. Ensuite, pour des orientations d'axes d'anisotropie aléatoires par rapport au champ appliqué, le champ coercitif est réduit tel que $\mu_0 H_c = 0.48 \mu_0 H_K$. L'aimantation rémanente devient $M_R = 0.5 M_S$ puisqu'elle est une somme de toutes les contributions. Ce cycle d'hystérésis est représenté en *Figure I. 8(b)* pour $\kappa = 0$. Son aire est réduite par rapport au cas précédent et vaut:

$$A = 2\mu_0 H_c M_S = 1.92 K_{eff} \quad (\text{I. 21})$$

1.2.1.1.3 Calcul de cycles d'hystérésis dynamiques utilisant l'approximation à deux niveaux

Nous avons vu que les cycles d'hystérésis de nanoparticules purement superparamagnétiques peuvent être calculés à partir des fonctions d'équilibre pour des orientations quelconques des moments magnétiques. Dans le cas limite $T = 0$ K, nous avons établi le calcul des cycles grâce au modèle de Stoner-Wohlfarth. Cependant entre ces deux cas limites, la description du comportement magnétique n'est pas simple. L'activation thermique du renversement magnétique due à une barrière énergétique faible (relaxation de Néel-Brown) pour des températures supérieures à 0 K, entraînant une baisse du champ coercitif $\mu_0 H_c$, est compliqué à intégrer dans un modèle. Dans bon nombre de modèles théoriques, le modèle de Stoner-Wohlfarth a été adapté aux températures supérieures à 0 K. Souvent, la variation du champ coercitif en température et en fréquence est exprimée comme dépendante du temps de mesure τ_m [9]. De ce fait, la valeur du champ coercitif dépendrait de la valeur du pas considéré ou de l'amplitude maximale du champ magnétique appliqué. Cette description est donc reliée à la définition du temps τ_m et entraîne nécessairement des conséquences non physiques.

Le modèle proposé par J. Carrey *et al.* [5] est similaire à ceux de Usov *et al.* [9] et Lu *et al.* [8], et repose sur l'approximation à deux niveaux. Le calcul des hystérésis ne dépend alors plus que des énergies des minima (θ_1, E_1) et (θ_2, E_2) et du maxima local (θ_3, E_3) (cf. *Figure I. 6(b)*). On néglige pour cela les états excités à l'intérieur de chaque puit énergétique. Pour une amplitude de champ magnétique appliqué inférieure à $\mu_0 H_K$, l'aimantation passe de la position θ_1 à la position θ_2 à une fréquence ν_1 et inversement de θ_2 à θ_1 à une fréquence ν_2 avec:

$$v_1 = v_1^0 \exp\left(-\frac{E_3 - E_1}{k_b T}\right) \quad (\text{I. 22})$$

$$v_2 = v_2^0 \exp\left(-\frac{E_3 - E_2}{k_b T}\right) \quad (\text{I. 23})$$

avec v_1^0 et v_2^0 les fréquences de passages, d'expressions assez complexes et dépendants de conditions expérimentales et de paramètres de matériaux. On applique un champ magnétique alternatif de forme $H(t) = H_{max} \cos(\omega t)$ avec un angle ϕ . Les probabilités p_1 et $p_2 = (1 - p_1)$ que l'aimantation soit dans les puits énergétiques 1 ou 2 se définit comme ceci en dépendance temporelle:

$$\frac{\delta p_1}{\delta t} = (1 - p_1)v_2 - p_1 v_1 \quad (\text{I. 24})$$

L'aimantation s'exprime:

$$M = M_S(p_1 \cos \theta_1 + (1 - p_1) \cos \theta_2) \quad (\text{I. 25})$$

Cette méthode permet de simuler numériquement des cycles d'hystérésis mineurs ou majeurs.

Nous allons maintenant définir la dépendance temporelle du champ coercitif. Historiquement, l'expression analytique se définissait à partir de l'approximation du temps de mesure τ_m définit précédemment [10]. Un paramètre sans dimension κ a récemment été introduit par Usov *et al.* [11] pour définir les variations du champ coercitif [11]:

$$\kappa = \frac{k_b T}{K_{eff} V} \ln\left(\frac{k_b T}{4\mu_0 H_{max} M_S V \tau_0}\right) \quad (\text{I. 26})$$

A partir de cette expression, et dans le cas $\phi = 0$, le champ coercitif devient:

$$\mu_0 H_c = \mu_0 H_K \left(1 - \kappa^{1/2}\right) \quad (\text{I. 27})$$

La Figure I. 8(c) présente des simulations numériques de cycles d'hystérésis comparés avec (I. 27) dont les valeurs de champs coercitifs ont été extraites. Les simulations sont en accord avec les expressions analytiques pour des valeurs de κ inférieures à 0,5.

Dans le cas maintenant d'orientations aléatoires, Usov *et al.* font l'approximation que le champ coercitif des nanoparticules équivaut au champ critique de retournement, ce qui n'est pas rigoureusement correct dans le cas de larges ϕ . Nous montrons en *Figure I. 8(d)* les simulations numériques de cycles d'hystérésis de Carrey *et al.* pour différentes valeurs de κ . Le fit numérique de cette courbe pour de faibles valeurs de κ donne:

$$\mu_0 H_c = 0,48 \mu_0 H_K (1 - \kappa^{0,8 \pm 0,05}) \quad (\text{I. 28})$$

Nous pouvons observer comme dans le cas précédent une bonne corrélation pour des valeurs de κ inférieures à 0,5.

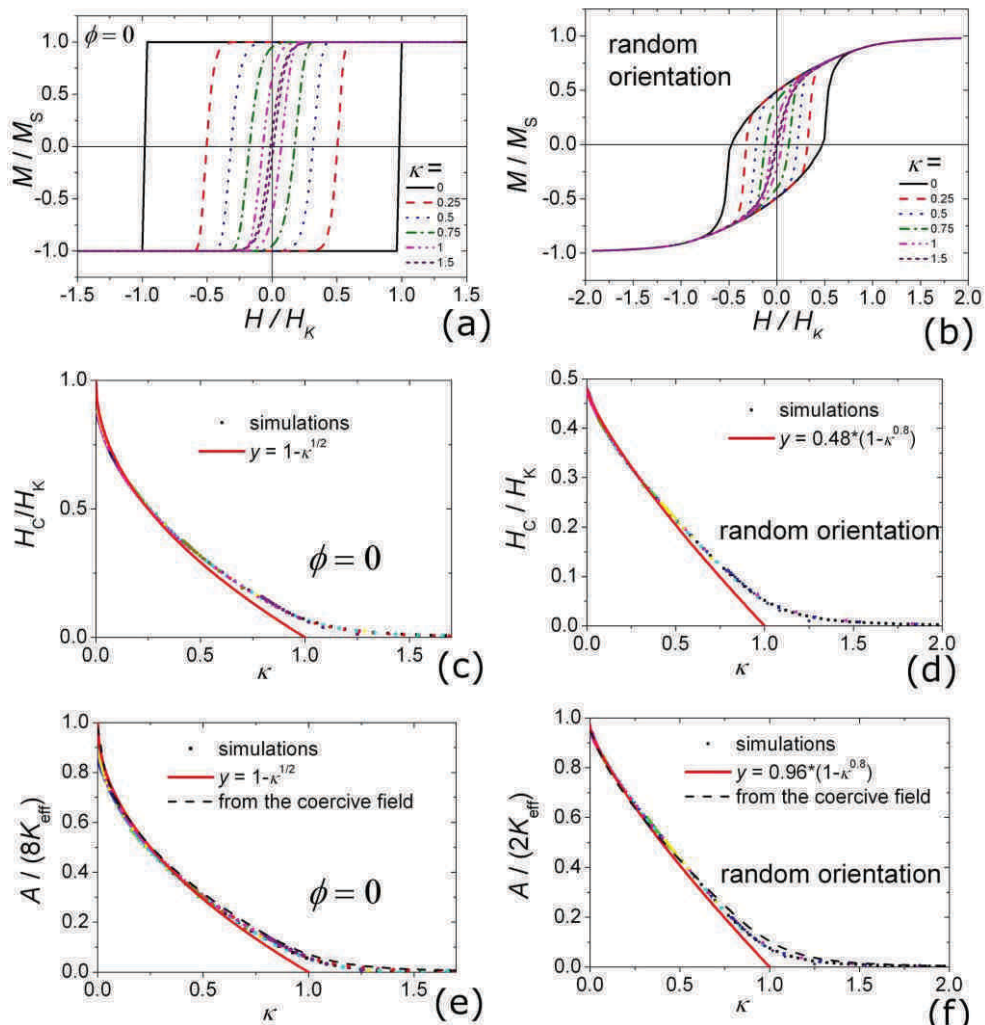


Figure I. 8 (a) et (b) Exemples de cycles d'hystérésis majeurs pour différentes valeurs de κ comprises entre 0 et 1,5 respectivement pour $\phi = 0$ et ϕ aléatoire. (c) et (d) Champ coercitif normalisé en fonction de κ . (e) et (f) Aire de cycles d'hystérésis normalisé en fonction de κ . (Figure tirée de [5])

Nous allons maintenant étudier la dépendance de l'aire d'hystérésis en fonction de la température et de la fréquence du champ magnétique appliqué. Nous avons vu que, pour $T = 0$, l'aire était calculée grâce aux équations (I. 20) et (I. 21). Comme précédemment concernant la dépendance en température du champ coercitif (*Figure I. 8(c)* et *Figure I. 8(d)*), Carrey *et al.* ont estimé l'aire de ces cycles pour un angle $\phi = 0$ et ϕ aléatoire. Des exemples de cycles sont tracés en *Figure I. 8(a)* et *Figure I. 8(b)* pour différentes valeurs de κ . Les aires calculées à partir de ces cycles sont ensuite comparées en *Figure I. 8(e)* et *Figure I. 8(f)* à celles déduites des expressions suivantes:

$$A(T) \approx 4\mu_0 H_c(T) M_S \quad (\phi = 0) \quad (\text{I. 29})$$

$$A(T) \approx 2\mu_0 H_c(T) M_S \quad (\phi \text{ aléatoire}) \quad (\text{I. 30})$$

avec $H_c(T)$ déduit des cycles d'hystérésis (courbes en tirets) et $H_c(T)$ calculés à partir des équations (I. 27) et (I. 28) (courbes en traits pleins). L'aire d'hystérésis $A(T)$ calculée se superpose parfaitement aux valeurs attendues dans le calcul du champ coercitif pour $\phi = 0$. Pour le cas d'orientations aléatoires, on note une différence à plus large κ , due à la baisse de rectitude des cycles simulés. Cette surestimation est compensée par la sous-estimation des valeurs de $H_c(T)$ à large κ . La compensation de ces deux effets donne une plus grande exactitude que les calculs utilisant les équations (I. 26) et (I. 28). De plus, nous pouvons déduire de cette figure la transition vers des cycles d'hystérésis réversibles. En effet en prenant pour approximation que la réversibilité apparaît pour $H_c \approx 0,01H_R$, on estime que la transition se situe vers $\kappa \approx 1,6$.

1.2.1.1.4 La théorie de réponse linéaire – Description de cycles mineurs

La théorie de réponse linéaire LRT est un modèle se basant sur la description dynamique d'une assemblée de nanoparticules par la relaxation de Néel-Brown. La LRT est couramment utilisée pour décrire l'aimantation des nanoparticules et a été utilisée dans de nombreux travaux [12]–[14]. Elle permet également de calculer les aires des cycles mineurs. Le premier postulat de cette théorie est que la réponse en aimantation du système de nanoparticules est linéaire en fonction du champ magnétique appliqué. Soit $M(t)$ dépendant de la susceptibilité complexe $\tilde{\chi}$ tel que:

$$M(t) = \tilde{\chi}H(t) \quad (\text{I. 31})$$

$$\tilde{\chi} = \chi_0 \frac{1}{1 + i\omega\tau_R} \quad (\text{I. 32})$$

avec χ_0 la susceptibilité statique définie précédemment, et τ_R définie comme le temps de relaxation du moment magnétique. Nous avons établi (1.2.1.1.1) que l'augmentation de l'aimantation était linéaire avec le champ magnétique appliqué pour des valeurs de $\xi < 1$. Il en est de même pour le domaine de validité de la LRT. De même, τ_R est une variable indépendante du champ magnétique seulement dans le cas de petites déformations de la barrière énergétique, soit pour $\mu_0 H_{max} \ll \mu_0 H_R$. Le temps de relaxation de l'aimantation pour des nanoparticules immobiles équivaut au temps de relaxation de Néel-Brown, soit:

$$\tau_R = \tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{K_{eff}V}{k_b T}\right) \quad (\text{I. 33})$$

La réponse en aimantation d'un système soumis à un champ magnétique $H(t) = H_{max} \cos(\omega t)$ s'exprime, dans le cadre de la LRT, de la manière suivante:

$$M(t) = |\chi| H_{max} \cos(\omega t + \varphi) \quad (\text{I. 34})$$

avec φ le retard de phase de l'aimantation par rapport au champ magnétique et $|\chi|$ la norme de $\tilde{\chi}$, définis à partir de (I. 32) comme:

$$|\chi| = \frac{\chi_0}{\sqrt{1 + \omega^2 \tau_R^2}} \quad (\text{I. 35})$$

$$\sin \varphi = \frac{\omega \tau_R}{\sqrt{1 + \omega^2 \tau_R^2}} \quad \cos \varphi = \frac{1}{\sqrt{1 + \omega^2 \tau_R^2}} \quad (\text{I. 36})$$

Les coordonnées $H(t)$ et $M(t)$ définissent l'équation paramétrique d'une ellipse dans le plan (H, M) dont l'aire $A_{ellipse}$ et l'angle γ entre les ordonnées et les abscisses sont donnés par:

$$A_{ellipse} = \pi H_{max}^2 |\chi| \sin \varphi = \pi H_{max}^2 \chi_0 \frac{\omega \tau_R}{1 + \omega^2 \tau_R^2} \quad (\text{I. 37})$$

$$\tan 2\gamma = \frac{2H_{max}^2 |\chi| \cos \varphi}{H_{max}^2 - H_{max}^2 |\chi|^2} = \frac{2\chi_0}{1 + \omega^2 \tau_R^2 - \chi_0^2} \quad (\text{I. 38})$$

En Figure I. 9(a) sont tracées les ellipses (H, M) pour différentes valeurs de $\omega\tau_R$ avec $H_{max} = 1$ et $\chi_0 = 0.1$. Les auteurs précisent que les aires d'hystérésis se retrouvent aussi bien par intégration directe de ces cycles que par calcul avec l'équation (I. 37). La Figure I. 9(b) représente l'évolution de γ en fonction de $\omega\tau_R$ calculés à partir de l'équation (I. 38) et par analyse graphique des cycles. Pour $\omega\tau_R \rightarrow 0$, le cycle est complètement fermé et présente une aire d'hystérésis nulle avec un angle correspondant à $\gamma(\omega\tau_R = 0) = \chi_0$. Dans le cas où $\omega\tau_R \rightarrow \infty$, $|\chi| \rightarrow 0$, ce qui entraîne une annulation de l'aire. L'aimantation du système dans ce cas-là n'a pas le temps de répondre au champ magnétique appliqué. Entre ces deux limites, le maximum de l'aire se trouve au point $\omega\tau_R = 1$.

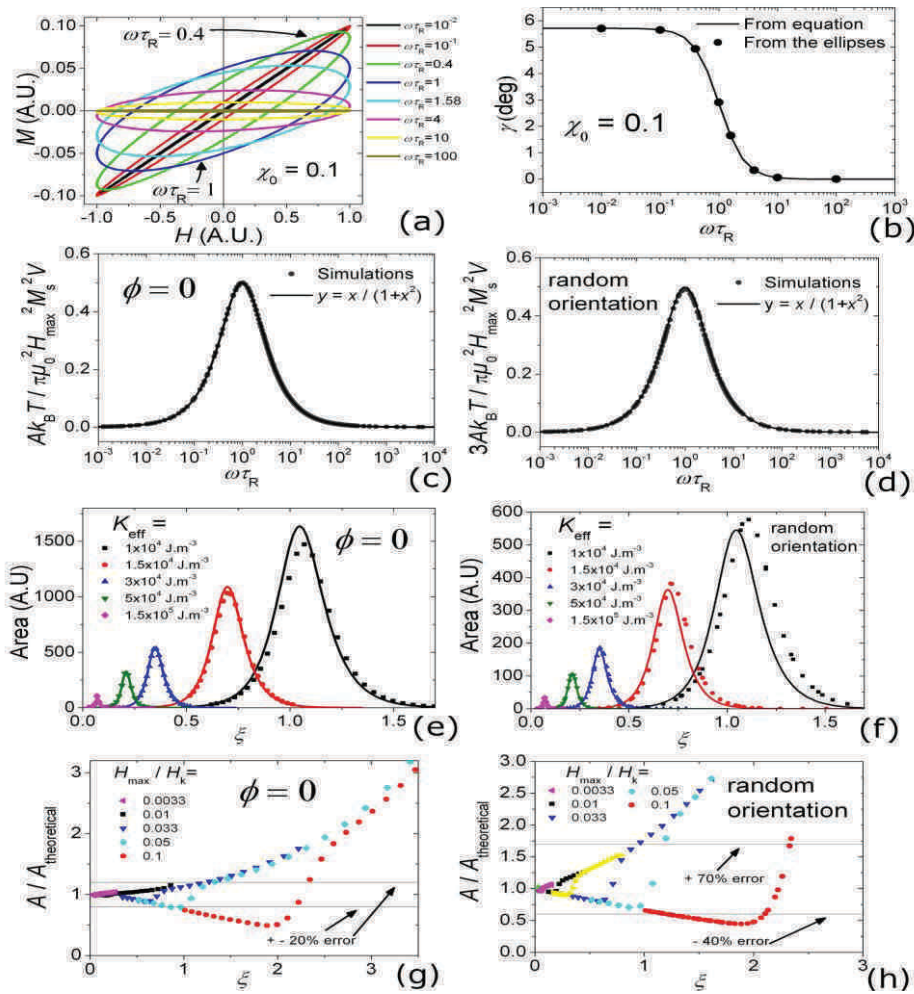


Figure I. 9 Illustration de la LRT (a) Cycles d'hystérésis pour différentes valeurs de $\omega\tau_R$ pour $H_{max} = 1$ et $\chi_0 = 0,1$. (b) Evolution de γ , angle entre le grand axe de l'ellipse et l'axe des abscisses, en fonction de $\omega\tau_R$. (c) et (d) Aires d'hystérésis normalisées en fonction de $\omega\tau_R$ pour les cas $\phi = 0$ et ϕ quelconque, les points correspondent à des simulations numériques, la ligne à la LRT. (e) et (f) Aires d'hystérésis obtenues par simulations numériques (en points) et par la théorie (lignes pleines) pour différentes valeurs de K_{eff} . (g) et (h) Ratio en aires d'hystérésis obtenues par simulations numériques et celle obtenues grâce à la théorie pour une large plage de ζ . Les lignes horizontales témoignent du degré de divergence à partir de $\zeta = 1$. Les valeurs correspondantes des différents H_{max} / H_K sont reportées sur les graphes. (Figure tirée de [5])

Par la suite, on pourra distinguer le calcul des aires dans les cas où les nanoparticules sont alignées et dans les cas où elles sont dans des orientations aléatoires grâce à la différenciation de χ_0 (en utilisant les équations (I. 17), (I. 18) et (I. 19)). Ainsi pour des nanoparticules orientées aléatoirement et pour des nanoparticules alignées avec σ négligeable, on obtient:

$$A = \frac{\pi\mu_0^2 H_{max}^2 M_S^2 V}{3k_b T} \frac{\omega\tau_R}{(1 + \omega^2\tau_R^2)} \quad (\text{I. 39})$$

(ϕ aléatoire) ou ($\phi = 0, \sigma \ll 1$)

Pour des nanoparticules alignées avec de fortes valeurs de σ , on obtient:

$$A = \frac{\pi\mu_0^2 H_{max}^2 M_S^2 V}{k_b T} \frac{\omega\tau_R}{(1 + \omega^2\tau_R^2)} \quad (\text{I. 40})$$

($\phi = 0, \sigma \gg 1$)

Pour des nanoparticules alignées avec σ quelconque, l'apport de l'équation phénoménologique (I. 19) nous donne:

$$A = \frac{\pi\mu_0^2 H_{max}^2 M_S^2 V}{3k_b T} \frac{\omega\tau_R}{(1 + \omega^2\tau_R^2)} \left(3 - \frac{2}{1 + \left(\frac{\sigma}{3.4}\right)^{1.47}} \right) \quad (\text{I. 41})$$

($\phi = 0, \sigma$ quelconque)

Dans nombres d'articles traitant de la théorie de l'hyperthermie [13]–[15], l'équation (I. 39) est qualifiée d'expressions de "pertes par relaxations", en opposition aux "pertes par hystérésis". Nous voyons ici que cette séparation n'a pas de réalité physique puisque tous les calculs de pertes précédents trouvent leurs origines dans l'expression de l'aire d'hystérésis et sont donc reliés de fait à des pertes par hystérésis.

En *Figure I. 9(c)* et *Figure I. 9(d)*, des calculs numériques sont comparés à l'évolution des aires d'hystérésis décrites par les équations (I. 39) et (I. 40) pour de larges intervalles de K_{eff} , V , f et $\mu_0 H_{max}$ tout en gardant $\xi \ll 1$ et $H_{max}/H_K \ll 1$. Nous retrouvons sur ces graphes le maximum d'aire à $\omega\tau_R = 1$ vu en *Figure I. 9(a)*. Ces figures montrent une superposition parfaite entre la simulation numérique et la LRT pour les deux cas d'études: $\phi = 0$ et ϕ aléatoire.

Par la suite, on étudie le domaine de validité de la LRT avec ξ et H_{max}/H_K variable. Les résultats d'intégration des cycles d'hystérésis sont illustrés en *Figure I. 9(e)* *Figure I. 9(f)* et comparés aux valeurs théoriques fournies par les équations (I. 39) et (I. 40) pour $\phi = 0$ et ϕ aléatoire respectivement. On fait varier ici le volume V des nanoparticules (ce qui entraîne la

variation de ξ) et leur anisotropie effective K_{eff} (ce qui entraîne une variation de H_{max}/H_K). Il est tout d'abord important de préciser que pour des valeurs de fréquence de mesure réalistes, ξ et H_{max}/H_K ne sont pas complètement indépendants. On remarque sur ces deux graphes qu'en augmentant ξ et H_{max}/H_K , la divergence entre les deux modèles s'amplifie. Cet effet est plus important dans le cas de ϕ aléatoire que pour $\phi = 0$. Pour des valeurs de K_{eff} croissantes la position du pic d'aire maximum est décalée du côté des fortes valeurs de ξ . Le ratio entre les aires données par les simulations et celles données par les calculs, traduisant l'erreur que l'on commet en utilisant la LRT, est représenté graphiquement pour les deux cas d'études en *Figure I. 9(g)* et *Figure I. 9(h)*. Cette erreur est tracée pour les valeurs de H_{max}/H_K correspondantes. Pour $\xi = 1$, l'erreur est environ $\pm 20\%$ dans le cas $\phi = 0$ et entre -40% et $+70\%$ dans le cas ϕ aléatoire. L'erreur diminue dans les deux cas pour $\xi < 1$. On observe également que la LRT peut sous-estimer ou surestimer l'aire du cycle et que la transition entre ces deux zones se trouve aux abords du pic d'aire maximum. Donc, si nous définissons deux zones, à gauche du pic pour le régime superparamagnétique et à droite du pic pour le régime ferromagnétique, nous pouvons conclure que pour $\xi > 1$, la LRT surestime l'aire d'hystérésis dans le régime superparamagnétique et la sous-estime dans le régime ferromagnétique. Une autre conséquence de ces résultats qui sera développée en détail plus loin, est que la LRT se révèle très utile pour décrire les systèmes de nanoparticules à fortes anisotropies.

1.2.1.1.5 Aires d'hystérésis dans le cas général

Nous venons de constater que la LRT ne peut s'utiliser que pour des systèmes où $\xi < 1$. Parallèlement, les modèles basés sur la théorie de Stoner-Wohlfarth ne sont valables que pour $\kappa > 0,7$ pour des cycles d'hystérésis majeurs. Hormis cela, seules les simulations numériques nous permettent d'obtenir les cycles et aires d'hystérésis. Nous allons maintenant voir le comportement des cycles d'hystérésis en fonction des paramètres du champ appliqué; étape indispensable dans la plupart des études d'hyperthermie magnétique. Il n'existe pas de paramètre universel sans dimension pour de telles études, en raison de la dépendance des cycles aux différents paramètres internes et externes des systèmes.

La *Figure I. 10(a)* représente les résultats des aires d'hystérésis en fonction du rayon des nanoparticules et de leurs températures. La *Figure I. 10(b)* représente l'évolution de l'aire en fonction du rayon et de l'amplitude du champ magnétique appliqué. Dans les deux cas, on se place à $\phi = 0$. Pour cette étude, les paramètres choisis, sont: $K_{eff} = 13000 \text{ Jm}^{-3}$,

$M_S = 10^6 \text{ Am}^{-1}$, $f = 100 \text{ kHz}$, $\mu_0 H_{max} = 20 \text{ mT}$, $T = 300 \text{ K}$ et $\nu_1^0 = 10^{10} \text{ Hz}$. Les deux figures montrent clairement que les valeurs d'aires les plus grandes sont obtenues pour de larges nanoparticules ferromagnétiques. Pour ce type de nanoparticules, une transition abrupte entre un régime avec de petites aires et un régime avec de fortes valeurs d'aire est remarquée en fonction de la température ou du champ magnétique. Suivant que la valeur du champ coercitif est plus petite ou plus grande que l'amplitude du champ appliqué, l'aire prendra respectivement de petites ou de fortes valeurs. Maintenant, pour un jeu de paramètres donné de champ appliqué, il est possible d'optimiser le rayon des nanoparticules pour maximiser l'aire d'hystérésis. Cette étude est primordiale en hyperthermie magnétique pour optimiser les caractéristiques propres aux nanoparticules adaptées aux différents types d'études.

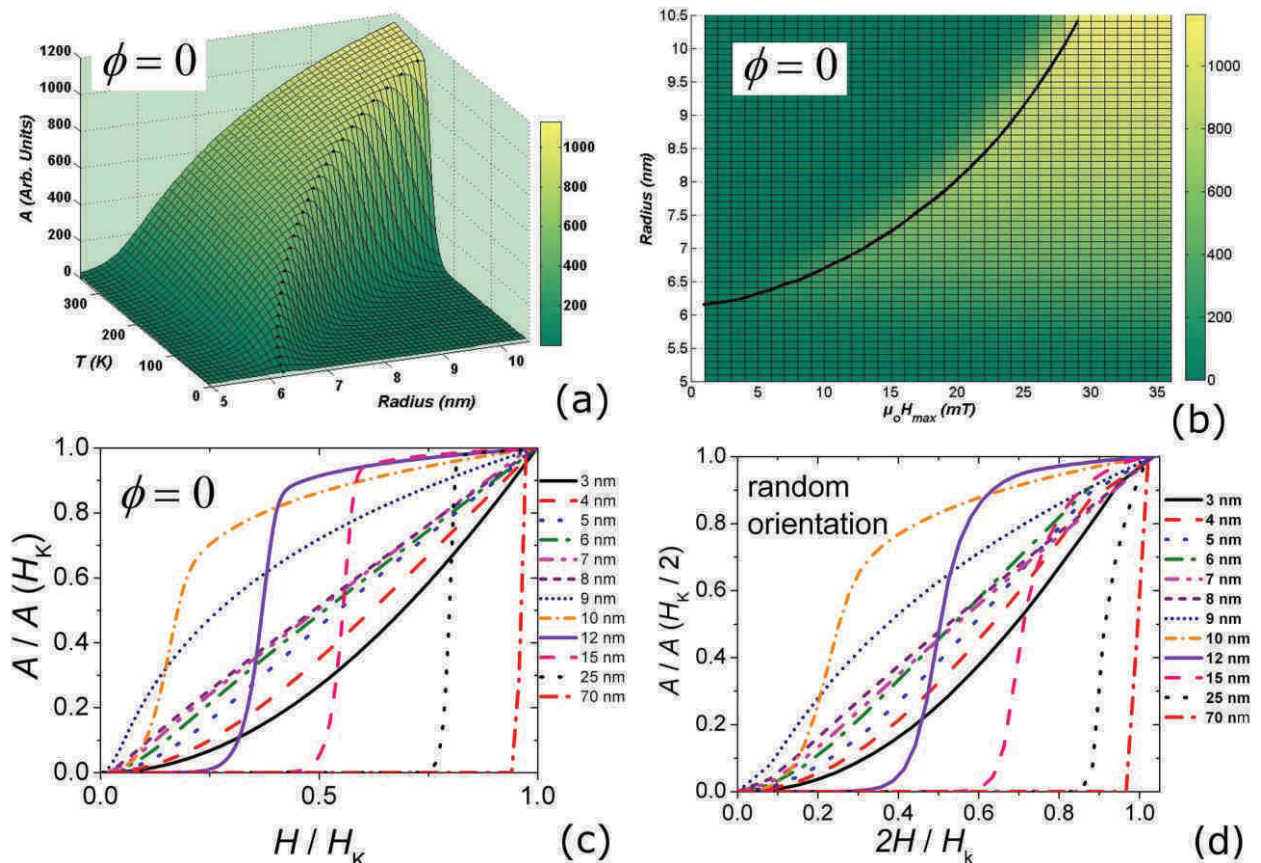


Figure I. 10 Profils d'aires d'hystérésis obtenus par simulations numériques. (a) Evolution de l'aire en fonction du rayon et de la température pour $\phi = 0$. La ligne en pointillé représente le profil d'aire maximale pour chaque température. (b) Evolution de l'aire en fonction de l'amplitude du champ magnétique et du rayon pour $\phi = 0$. La ligne représente le profil d'aire maximale pour chaque pas d'amplitude de champ. (c) et (d) Aires d'hystérésis normalisées en fonction du champ magnétique normalisés pour différentes valeurs de rayons respectivement pour $\phi = 0$ et ϕ aléatoire. (Figure tirée de [5])

Les *Figure I. 10(c)* et *Figure I. 10(d)* montrent la dépendance de l'aire d'hystérésis en champ magnétique appliqué, pour différentes valeurs de rayons de nanoparticules, pour $\phi = 0$ et ϕ aléatoire. Le champ appliqué va de 0 mT à $\mu_0 H_K$ (dans cet exemple $\mu_0 H_K = 26\text{mT}$) et est normalisé par $\mu_0 H_K$. Pour de très petites particules, les équations (I. 39) et (I. 41), ainsi que de nombreux travaux ([16], [17]) prévoient que l'application de la LRT implique une dépendance de l'aire d'hystérésis au carré de l'amplitude du champ appliqué. C'est également ce que nous pouvons constater dans cet exemple pour de faibles rayons. Pour des nanoparticules ferromagnétiques à larges rayons, on observe une aire quasi nulle pour de faibles valeurs de champ appliqué, puis une pente abrupte de la courbe au champ critique, se terminant par un plateau pour de plus fortes amplitudes de champ. Dans le cas de tailles de nanoparticules intermédiaires, la transition entre deux régimes présente des évolutions pouvant être linéaires. Le régime de transition de chaque courbe a été simulé numériquement pour déterminer le facteur de puissance correspondant (cf. *Figure I. 11*). Pour de très petites particules de rayon 3 nm, on retrouve une dépendance au carré, prévue par la LRT sur tout le domaine d'amplitude de champ balayé. Pour des particules plus grosses, cette dépendance reste observable pour de faibles valeurs de champ appliqué mais diminue ensuite. En effet, en *Figure I. 11*, on constate que pour des particules entre 4 nm et 9 nm, le facteur de puissance diminue progressivement de 2 à 0,6. Pour ces cas là aussi, l'ajustement numérique offre une très bonne superposition avec les simulations. Dans le cas de grosses particules ferromagnétiques (rayons supérieurs à 9 nm), l'évolution de l'aire présente une inflexion abrupte à la valeur du champ coercitif. Il n'est donc pas possible de sortir un facteur de puissance constant sur tout le domaine d'amplitude de champ. Cet ajustement n'est alors effectué que jusqu'au point d'inflexion. Le facteur de puissance augmente très rapidement en fonction du rayon des particules à partir de 9 nm (cf *Figure I. 11*). Nous verrons expérimentalement qu'une large plage de facteur de puissance peut être observée. Par exemple, les valeurs d'exposant supérieures à 2 ne seront pas forcément la preuve formelle de particules multi-domaines.

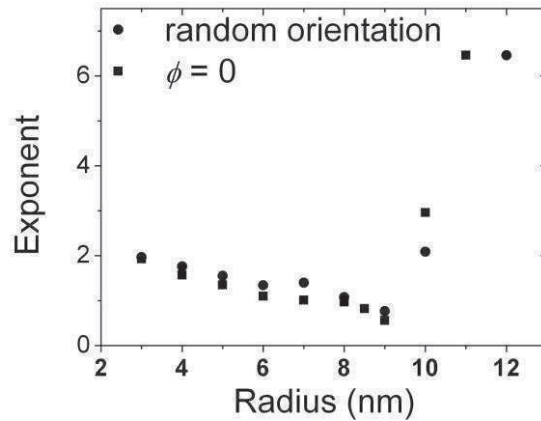


Figure I. 11 Facteur de puissance tiré des simulations numériques pour les courbes représentées en Figure I. 10(c) et Figure I. 10(d). Pour les courbes présentant un point d'inflexion, seules les données après ce point ont été prises en compte. (Figure tirée de [5])

1.2.1.1.6 Utilisation des modèles théoriques en fonction de la taille des nanoparticules

Après avoir exposé les différents modèles utilisables pour décrire les cycles d'hystérésis de nanoparticules fixes et indépendantes, nous allons résumer graphiquement leurs domaines de validité en fonction des paramètres du problème. Nous allons nous appuyer pour cela sur la Figure I. 12.

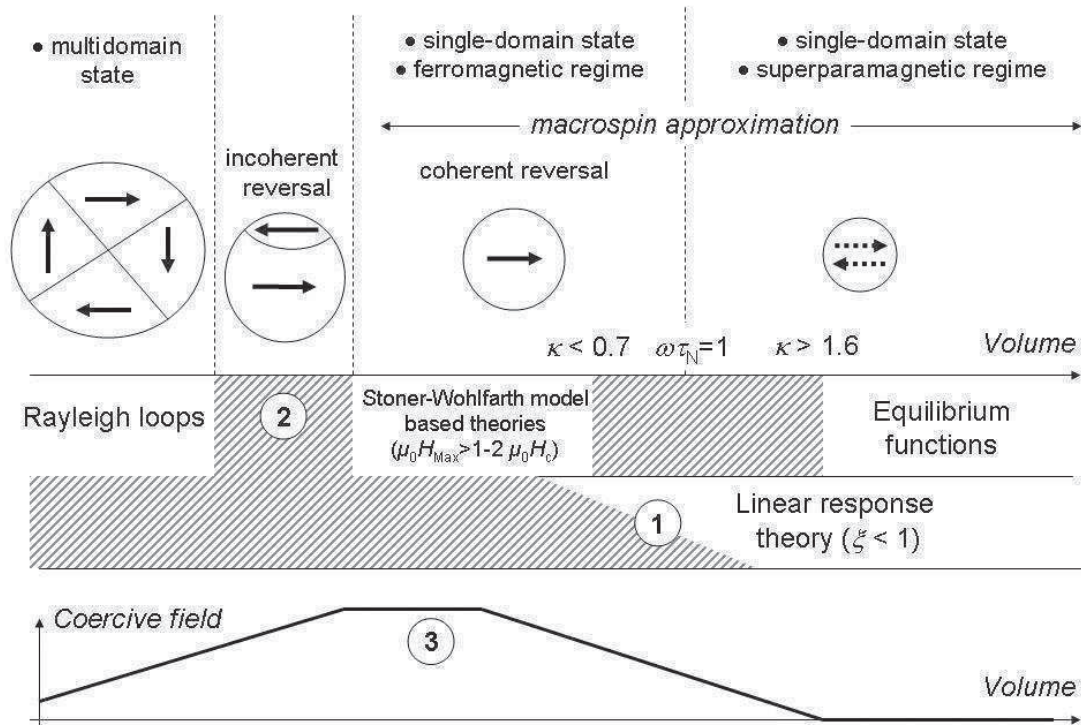


Figure I. 12 Représentation schématique des propriétés majeures des nanoparticules magnétiques en fonction de leurs tailles et des modèles numériques pour les décrire dans chaque cas. (Figure tirée de [5])

Commençons par le cas de petites nanoparticules, soit quand $\kappa > 1,6$. Pour ces particules, le cycle d'hystérésis est réversible, et le champ coercitif peut être considéré comme nul. On utilise alors les fonctions d'équilibres (décrites en 1.2.1.1.1) pour décrire l'évolution des cycles. Ces particules sont inutiles en hyperthermie à cause de leur cycle complètement réversible. On se sert néanmoins des fonctions d'équilibres pour déterminer la susceptibilité statique χ_0 ainsi que pour simuler numériquement le comportement de ces particules dans le régime superparamagnétique.

Quand le rayon augmente tout en gardant $\kappa > 1,6$, le cycle d'hystérésis commence à s'ouvrir, l'aire devient donc non nulle. Dans les cas de $\zeta \ll 1$ et $\zeta < 1$, la LRT permet à la fois de décrire le cycle d'hystérésis et d'en calculer l'aire suivant le degré de précision requis par l'analyse (cf. 1.2.1.1.4). La validité et l'exactitude de la LRT se réduisent ensuite au fur et à mesure que le volume des particules augmente comme décrit en *Figure I. 9(e)* et *(f)* et marqué en zone ① sur la *Figure I. 12*.

La transition entre un régime superparamagnétique et un régime ferromagnétique se situe à $\omega\tau_R = 1$. Aucun changement abrupt ne se produit à cette limite, le champ coercitif ayant commencé à augmenter avant et continuant après. Pour $\omega\tau_R > 1$, les particules sont donc dans un régime ferromagnétique où le cycle d'hystérésis s'ouvre de plus en plus à mesure que le volume augmente. Ces particules sont de fait les plus intéressantes pour l'hyperthermie car elles présentent les pertes d'hystérésis les plus importantes. Dans ce régime, on décrit préférentiellement le cycle d'hystérésis grâce au modèle basé sur la théorie de Stoner-Wohlfarth quand le volume des particules est loin de la transition superparamagnétique-ferromagnétique à $\kappa < 0,7$. L'utilisation de cette théorie est valable si le cycle est saturé soit pour $\mu_0 H_{max} > \mu_0 H_c$ dans le cas $\phi = 0$ et pour $\mu_0 H_{max} > 2\mu_0 H_c$ dans le cas de ϕ aléatoire. La description de cycles mineurs (à faible amplitude de champ appliqué) pourra se faire en utilisant la LRT.

Quand le volume des particules augmente encore, un mode de retournement magnétique incohérent prend place, ce qui a pour effet de décroître rapidement la valeur du champ coercitif et donc l'aire d'hystérésis. Des modèles analytiques permettent de calculer l'aire dans ces cas-là (marqué ② sur le graphe). A partir d'un certain volume, l'évolution du champ coercitif ne dépend plus du volume et correspond simplement au champ coercitif des particules à $T = 0$ K. Si le phénomène apparaît pour des particules dont le volume est inférieur au volume où le retournement incohérent apparaît, le champ coercitif décrit un maximum sous

la forme d'un plateau (marqué ③ sur le graphe). Si le mode de retournement incohérent apparaît avant ce plateau, on pourra observer à la place un pic dans l'évolution du coercitif.

Pour des volumes encore plus importants, les particules pourront présenter un mode vortex [18] puis une configuration magnétique multidomaine. Les aires d'hystérésis correspondantes à ces configurations étant faibles, les nanoparticules correspondantes ne présenteront pas d'intérêt pour l'hyperthermie magnétique.

1.2.1.2 Cas nanoparticules dans un liquide visqueux

Nous venons de voir la description de cycles d'hystérésis dans le cas idéal de nanoparticules fixes. Dans le cas de l'application biomédicale, il est cependant probable que les nanoparticules soient comme piégés, dans l'incapacité de se mouvoir physiquement. Néanmoins, la majorité des mesures d'hyperthermie magnétique (principalement des mesures de SAR) s'effectue sur des échantillons de nanoparticules en milieu liquide visqueux. Nous développons ici certains aspects théoriques relatifs à la dynamique des nanoparticules magnétiques soumis à un champ extérieur en milieu liquide [19].

Plongées dans un milieu visqueux, les nanoparticules ont la possibilité de se retourner physiquement grâce à l'action du couple magnétique et des fluctuations thermiques, décrits respectivement par les couples N_m et N_{th} . Pour décrire l'évolution dynamique des nanoparticules, on étudie les solutions aux équations stochastiques du mouvement à partir des vecteurs unitaires d'aimantation $\vec{\alpha}$ et de direction de facile aimantation \vec{n} .

Nous présentons maintenant l'évolution dynamique des vecteurs $\vec{\alpha}$ et \vec{n} en fonction des paramètres propres aux nanoparticules et au champ magnétique appliqué. Le vecteur unitaire d'aimantation $\vec{\alpha}$ est décrit par la loi stochastique de Landau-Lifshitz:

$$\frac{\delta \vec{\alpha}}{\delta t} = -\gamma_1 [\vec{\alpha}, \vec{H}_{ef} + \vec{H}_{th}] - K_0 \gamma_1 [\vec{\alpha}, [\vec{\alpha}, \vec{H}_{ef} + \vec{H}_{th}]] \quad (I. 42)$$

avec $\gamma_1 = |\gamma_0| / (1 + K_0^2)$, K_0^2 étant la constante d'amortissement et γ_0 le rapport gyromagnétique. \vec{H}_{ef} et \vec{H}_{th} sont respectivement les vecteurs de champ effectif et de champ magnétique aléatoire associé aux fluctuations thermiques du système.

L'équation de mouvement du vecteur unitaire \vec{n} tenant compte de la petite des particules magnétiques s'exprime:

$$\frac{\delta \vec{n}}{\delta t} = G(\vec{\alpha n})(\vec{\alpha} - (\vec{\alpha n})\vec{n}) - \frac{1}{\xi_f} [\vec{n}, \vec{N}_{th}] \quad (\text{I. 43})$$

avec $G = 2K_{eff}V/\xi_f$, ξ_f étant le coefficient de friction tel que $\xi_f = 6\eta V$ avec η la viscosité dynamique d'un liquide.

A partir de ce jeu d'équations à résoudre, nous pouvons décrire le comportement de nanoparticules magnétiques plongées dans un milieu visqueux sous l'influence d'un champ magnétique extérieur.

1.2.1.2.1 L'approximation magnéto-dynamique (AMD)

A titre comparatif, nous allons présenter l'approximation magnéto dynamique (AMD) qui consiste à décrire la dynamique de nanoparticules magnétiques dans un liquide visqueux en négligeant les effets de fluctuations thermiques. On annule donc les termes H_{th} et N_{th} des équations (I. 42) et (I. 43). Nous verrons plus loin que l'AMD se révèle utile pour comprendre l'évolution des cycles prenant en compte les fluctuations thermiques. Dans l'AMD, le comportement des nanoparticules est étroitement dépendant de l'amplitude du champ magnétique appliqué. Nous distinguerons donc deux cas: $H_0 \ll H_K$ et $H_0 \geq H_K$.

i- Champ appliqué de faible amplitude: $H_0 \ll H_K$

Comme nous le détaillerons plus tard, cette condition sur le champ appliqué implique un mode d'aimantation que nous appellerons "mode visqueux" car la puissance absorbée dans ce cas est principalement due des nanoparticules en rotation dans leurs milieux. Dans les exemples suivants en *Figure I. 13*, on fixe $H_K = 500 \text{ Oe}$.

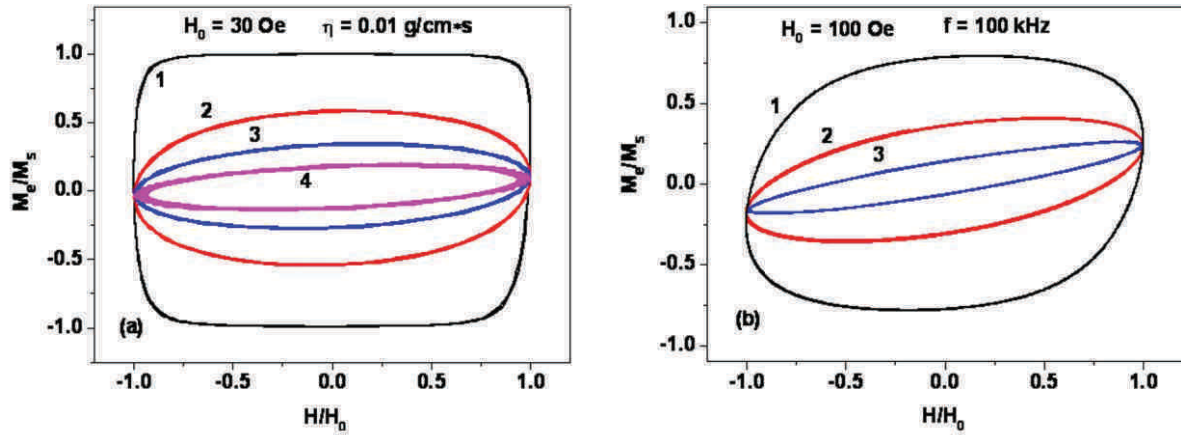


Figure I. 13 Cycles d'hystérésis MD d'une particule dans un liquide visqueux. (a) Pour $H_0 = 30$ Oe et $\eta = 0.01$ g/(cm.s) à différentes fréquences [1: $f = 10$ kHz, 2: $f = 50$ kHz, 3: $f = 100$ kHz, 4: $f = 200$ kHz]. (b) Pour $H_0 = 100$ Oe et $f = 100$ kHz à différentes viscosité du milieu [1: $\eta = 0,01$ g/(cm.s), 2: $\eta = 0,03$ g/(cm.s), 3: $\eta = 0,1$ g/(cm.s)]. (Figure tirée de [19])

La Figure I. 13(a) décrit l'évolution des cycles MD en fonction de la fréquence du champ appliqué pour des valeurs fixes d'amplitude de champ et de viscosité du milieu. Pour une faible fréquence de 10 kHz, les vecteurs $\vec{\alpha}$ et \vec{n} prennent les valeurs de $\pm \vec{h}_0$ à chaque oscillation de champ avec un déphasage $\pi/2$ par rapport au signal du champ magnétique appliqué. Pour des fréquences supérieures, l'amplitude des signaux α et n diminue par rapport à h_0 ce qui a pour conséquence d'abaisser drastiquement les valeurs d'aimantation dans les cycles. En effet, le champ magnétique n'est alors plus capable de provoquer une rotation complète des nanoparticules à cause de leurs inerties associées aux frictions avec le milieu visqueux.

Le même effet peut être observé en Figure I. 13(b) où l'augmentation de la viscosité du milieu entraîne une réduction des valeurs d'aimantation et donc de l'aire d'hystérésis. De plus pour une fréquence suffisante ($f \geq 100$ kHz) on constate sur les cycles l'apparition d'un angle entre l'axe long de l'ellipse et l'axe $M(H) = 0$.

ii- Champ appliqué de forte amplitude: $H_0 \geq H_K$

Dans ce cas de fortes amplitudes de champ appliqué, le vecteur \vec{n} reste parallèle à la direction du champ. On obtient donc $\vec{n} \approx +\vec{h}_0$ ou $\vec{n} \approx -\vec{h}_0$ suivant l'état de départ de la particule. L'égalité n'est pas toujours strictement parfaite, car on constate de petites oscillations à chaque saut du vecteur α d'une position $\pm \vec{h}_0$ à l'autre (visible en Figure I. 14).

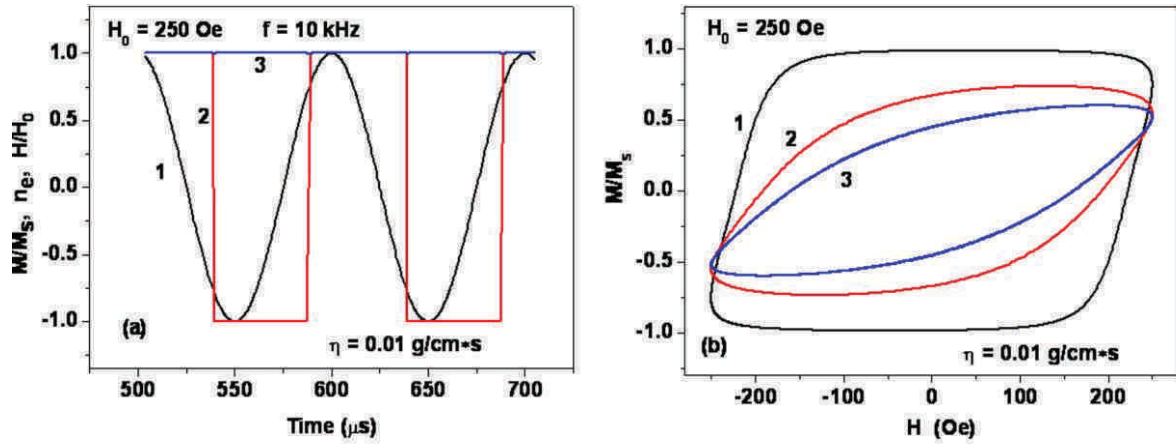


Figure I. 14 Pour $H_0 = 0,5H_K$ (a) Signaux de champ réduit (1), du vecteur aimantation (2) et du vecteur direction (3). (b) Cycles d'aimantations pour différentes fréquences (1) $f = 100$ kHz, (2) $f = 300$ kHz, (3) $f = 500$ kHz. (Figure tirée de [19])

Le régime d'oscillation magnétique observé pour ces conditions de champ est appelé le régime magnétique. L'énergie absorbée dans ce cas est très majoritairement due aux relaxations d'aimantation et non plus aux forces de frictions des particules dans le milieu. Le comportement des cycles résultants est donc similaire au cas de nanoparticules fixes dans un milieu (cf. 1.2.1.1, [5], [11]) car on obtient une orientation complète des aimantations suivant l'axe du champ. A l'inverse du mode visqueux, l'augmentation de l'amplitude du champ ou de la viscosité du milieu ne change quasiment pas la forme des cycles. Dans l'AMD, l'amplitude du champ pour laquelle apparait le mode magnétique augmente avec la fréquence. Pour $f = 10$ kHz par exemple, le mode magnétique apparait déjà à $H_0 = 0,5H_K$. La Figure I. 14(b) montre les cycles d'hystérésis dans l'AMD pour trois fréquences $f \geq 100$ kHz à $H_0 = 0,5H_K$. Ainsi on constate qu'à 100 kHz, le cycle est encore rectangulaire mais que pour des fréquences supérieures, l'aire décroît rapidement. Pour $f = 500$ kHz, le mode magnétique apparait pour $H_0 \geq 0,7H_K$.

Nous avons présenté l'AMD qui est utile à la compréhension des principes de dynamique de nanoparticules dans un milieu visqueux. Néanmoins, dans les cas d'études réelles, les fluctuations thermiques peuvent jouer un rôle important. Nous verrons cependant que les cycles MD sont souvent synonymes de limite pour les cas de nanoparticules à larges diamètres dont les moments magnétiques sont plus stables face aux fluctuations thermiques. Nous allons maintenant détailler les modes visqueux et magnétique dans le cas général en nous plaçant à température ambiante, $T = 300$ K.

1.2.1.2.2 Le mode visqueux

L'évolution des cycles d'hystérésis en fonction du diamètre de la particule est représentée en *Figure I. 15* pour $f = 100$ kHz et $H_0 = 100$ Oe ($H_0 \leq 0.5H_K$ pour se trouver dans le mode visqueux). Nous voyons que l'augmentation du diamètre de la particule augmente également l'aire d'hystérésis, et rend sa forme plus proche du cycle MD (cycle (5)). Ceci est précisément dû aux effets de fluctuations thermiques dont l'influence diminue pour des grands diamètres de particule. On constate cependant qu'à $T = 300$ K, la limite du cycle MD n'est pas atteinte même pour des particules de diamètre $D = 60$ nm.

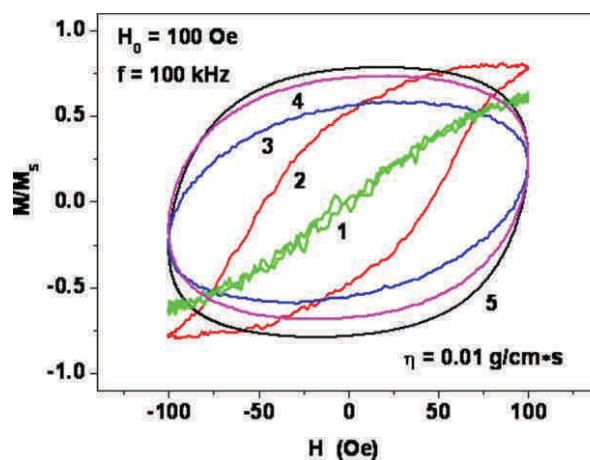


Figure I. 15 Cycles d'hystérésis de nanoparticules plongées dans un milieu visqueux en fonction de leurs diamètres: (1) $D = 16$ nm, (2) $D = 20$ nm, (3) $D = 28$ nm, (4) $D = 60$ nm, (5) cycle MD. (Figure tirée de [19])

Si l'aire d'hystérésis augmente continuellement en fonction du diamètre des particules dans le mode visqueux, il n'en est pas de même pour une assemblée de nanoparticules fixes. En effet dans ce cas-là, l'aire augmente dans un premier temps puis atteint un maximum et diminue ensuite, le champ extérieur n'étant plus à même d'orienter tous les moments magnétiques (cf. *Figure I. 10*). Similairement à ce que l'on observe pour les cycles MD (cf. *Figure I. 13*), l'aire des cycles diminue avec l'augmentation de la fréquence appliquée ou de la viscosité.

1.2.1.2.3 Le mode magnétique

La *Figure I. 16(a)* représente les cycles d'hystérésis à $H_0 = H_K$ pour différents diamètres de particules. Nous pouvons constater que l'allure de ces cycles est "carrée" comparée au cas du mode visqueux, dû à l'orientation complète des moments dans la direction

du champ appliqué. Ensuite, l'augmentation du diamètre provoque une augmentation de l'aire d'hystérésis tendant vers la limite du cycle MD (noté (5)). Néanmoins, même pour de grosses particules, le cycle n'atteint pas cette limite car les fluctuations thermiques jouent un rôle trop important à $T = 300$ K. Le champ coercitif diminue en fonction du diamètre des particules, dû aux fluctuations thermiques qui provoquent un retournement précoce du vecteur aimantation.

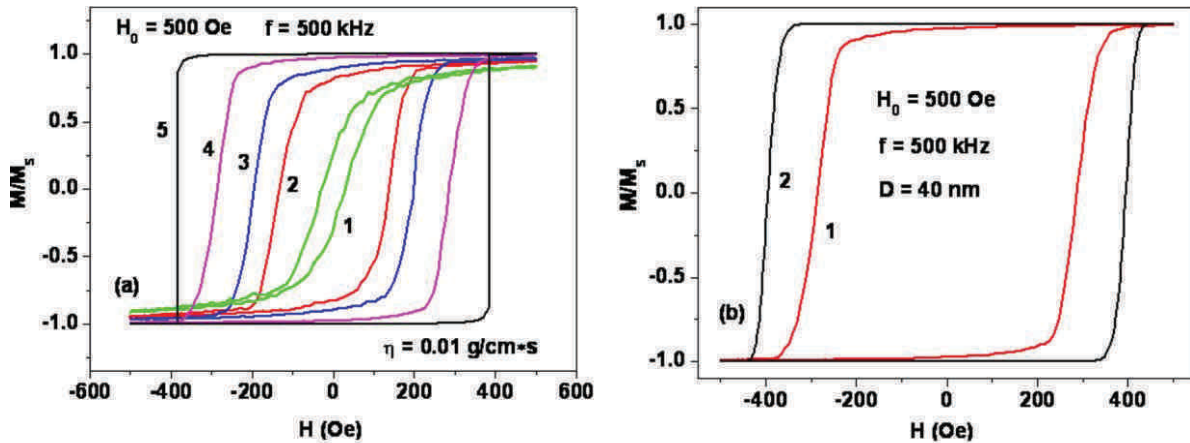


Figure I. 16 Cycles d'hystérésis dans un liquide visqueux dans le mode magnétique pour $H_0 = H_K = 500$ Oe et $f = 500$ kHz. (a) En fonction du diamètre de particules: (1) $D = 16$ nm, (2) $D = 20$ nm, (3) $D = 24$ nm, (4) $D = 40$ nm, (5) Cycle MD. (b) Comparaison entre: (1) correspondant au cycle (a)-(4) et (2) les mêmes particules fixées dans une matrice solide. (Figure tirée de [19])

En Figure I. 16(b) une comparaison entre des particules plongées dans un milieu visqueux (1) et fixées dans une matrice solide (2) est effectuée. On remarque que le cycle (1) présente un champ coercitif réduit par rapport au cycle (2). Cette différence est attribuée au léger saut du vecteur \vec{n} (visible en Figure I. 14) qui abaisse la barrière énergétique et permet ainsi le renversement de l'aimantation à des champs plus faibles. Comme abordé précédemment, les cycles MD dans le mode magnétique ne sont quasiment pas dépendants de la fréquence du champ et de la viscosité du milieu. Il en est de même pour les cycles tenant compte de l'influence des fluctuations thermiques.

1.2.1.2.4 Le cas frontière entre ces deux modes d'oscillations: $H_0 \approx 0,5 H_K$

Nous allons considérer le cas intermédiaire entre le mode visqueux et le mode magnétique qui se situe dans l'intervalle de champ $0,5H_K \leq H_0 \leq H_K$, la position exacte dépendant de la fréquence du champ et de la viscosité du milieu. A basse fréquence, comme

on peut l'observer en *Figure I. 17(a)* l'aire d'hystérésis augmente en fonction du diamètre des particules pour tendre vers la limite du cycle MD.

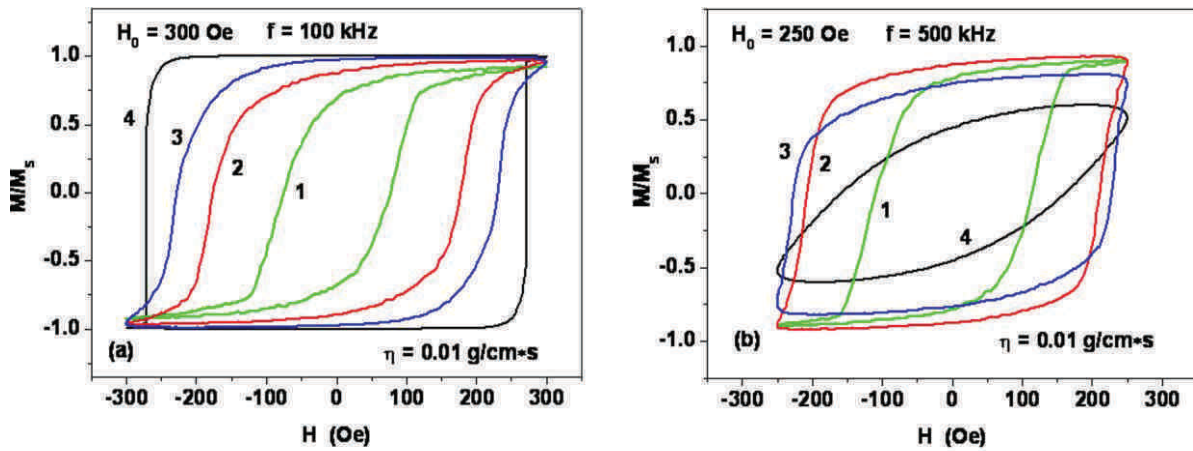


Figure I. 17 Cycles d'hystérésis de nanoparticules de diamètres dans un liquide visqueux en fonction de leurs diamètres (a) $H_0 = 300 \text{ Oe}$, $f = 100 \text{ kHz}$ (1) $D = 20 \text{ nm}$, (2) $D = 28 \text{ nm}$, (3) $D = 48 \text{ nm}$, (4) cycle MD. (b) $H_0 = 250 \text{ Oe}$, $f = 500 \text{ kHz}$ (1) $D = 20 \text{ nm}$, (2) $D = 30 \text{ nm}$, (3) $D = 40 \text{ nm}$, (4) cycle MD. (Figure tirée de [19])

A l'inverse, la *Figure I. 17(b)* montre qu'à une fréquence de 500 kHz, les cycles diffèrent énormément du cycle MD. En effet, pour une fréquence de champ suffisamment importante, la prise en compte des fluctuations thermiques abaisse considérablement la transition vers le mode magnétique.

1.2.1.2.5 Les conséquences sur le SAR

Comme vu précédemment avec l'équation (I. 9), le SAR dépend directement de l'aire d'hystérésis. Dans le régime visqueux et pour une fréquence de l'ordre de 10 kHz, le SAR résultant d'une assemblée de nanoparticules est assez faible. De plus, l'augmentation de la fréquence du champ appliqué abaisse l'aire d'hystérésis. Le régime visqueux n'est donc pas optimal pour les applications d'hyperthermie. A l'inverse, de larges valeurs de SAR sont obtenues en se plaçant dans le régime magnétique. Du fait de l'orientation complète des nanoparticules, les cycles décrits sont de forme carrée. Ce régime permet cependant d'atteindre des valeurs de SAR intéressantes pour des amplitudes de champs pas trop élevées avec des nanoparticules ayant de faibles anisotropies. De plus, d'un point de vue physiologique pour l'application sur le vivant, des conditions de champ trop extrêmes peuvent provoquer l'apparition de courants de Foucault dans le corps. Il est conclu dans cette étude que la condition intermédiaire $H_0 \approx 0,5H_R$ est optimale, avec des cycles d'hystérésis de formes carrées, et ce à des niveaux de fréquences et de champs acceptables. Nous montrons

en Figure I. 18 un exemple d'étude en SAR de nanoparticules dispersées dans l'eau ($\eta = 0,01$ g/(cm.s)). En Figure I. 18(a) est présentée l'étude du SAR en fréquence à différentes valeurs d'amplitude de champ appliqué. On peut constater que pour $H_0 < 0,5H_k$, les valeurs de SAR sont assez faibles, et augmentent significativement pour $H_0 \approx 0,5H_k$. La dépendance en fréquence est linéaire sur toute la gamme étudiée. La Figure I. 18(b) représente le SAR en fonction de l'amplitude du champ, à deux fréquences fixes. Nous constatons de même manière qu'en se plaçant à une fréquence trop faible, le SAR prend de faibles valeurs. Pour une fréquence suffisante, une augmentation nette du SAR est observée vers $H_0 \approx 0,5H_k$, due à la transition entre les deux modes et au caractère ferromagnétique de l'échantillon étudié.

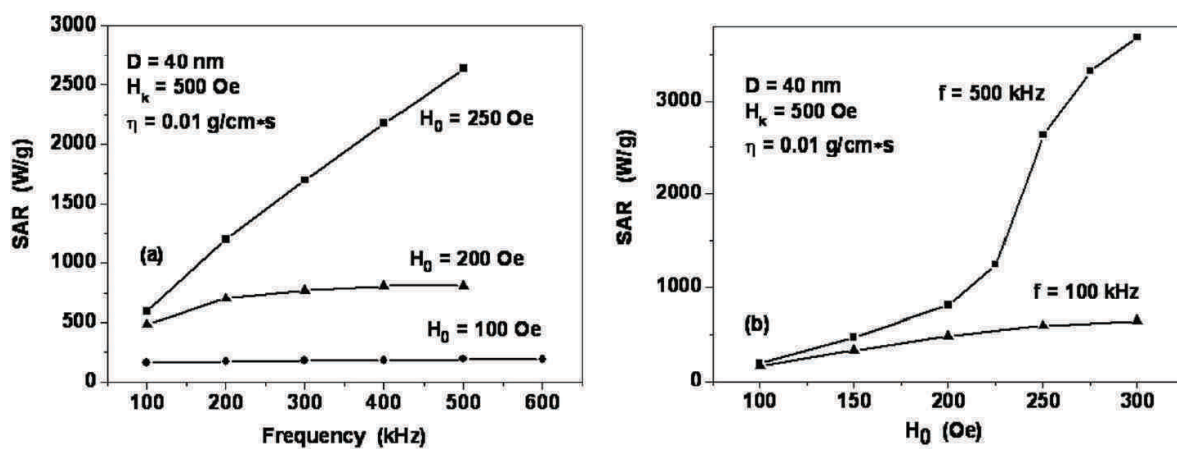


Figure I. 18 Etudes du SAR d'un échantillon de nanoparticules dans un liquide visqueux (a) en fonction de la fréquence pour différentes valeurs d'amplitude de champ (b) en fonction de l'amplitude du champ pour différentes valeurs de fréquences. (Figure tirée de [19])

1.2.2 Hyperthermie des nanoparticules magnétiques en interactions

Nous avons développé les théories de l'hyperthermie dans le cas de nanoparticules magnétiquement indépendantes. Néanmoins, pour un échantillon de nanoparticules magnétiques plongées ou non dans un solvant et soumis à un champ magnétique alternatif, il convient de ne pas ignorer les effets des interactions inter-particulaires. Expérimentalement, les études en SAR montrent que l'efficacité en pertes augmente [20], ou au contraire diminue [21] avec la concentration des échantillons.

Les effets sur le SAR dépendant de la concentration, des paramètres du champ magnétique, du diamètre des particules et de l'anisotropie magnétique (paramètre que nous développerons en 1.3), peuvent être résumés en un modèle simplifié: si les particules sont suffisamment éloignées les unes des autres, on peut les considérer comme des entités

magnétiques sans interactions et le SAR augmente en fonction de la concentration. Puis pour de plus fortes concentrations, quand les interactions magnétiques deviennent comparables ou supérieures au champ d'anisotropie, on peut observer une diminution du SAR.

Par ailleurs, les interactions interparticulaires ont pour effet d'organiser les particules sous l'effet d'un champ magnétique. On assiste ainsi à un réarrangement spatial des particules, sous formes d'agrégats ou "d'aiguilles" notamment comme montré dans l'exemple ci-dessous:

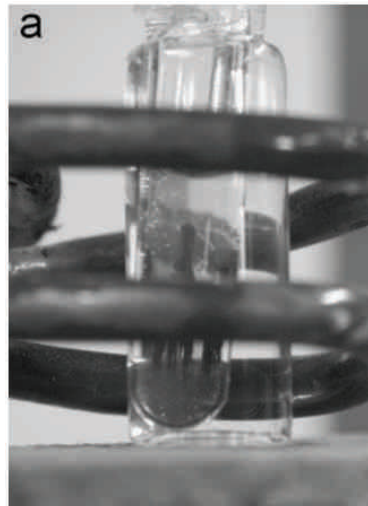


Figure I. 19 Réarrangement de nanoparticules en "aiguilles" sous un champ magnétique de 300 kHz et 66 mT. (Figure tirée de [22])

L'intensité des interactions dipolaires est primordiale pour la formation de chaînes de nanoparticules et représente la clé pour comprendre les propriétés magnétiques de ces systèmes. Nous allons voir comment le dimensionnement des aiguilles influence le cycle d'hystérésis en comparaison à d'autres types de réarrangements (cubes, agrégats, etc.).

1.2.2.1 Influence de différents types d'agrégation sur le cycle d'hystérésis

L'énergie magnétique des chaînes est dominée par les interactions interparticulaires. Elles permettent au système de garder les aimantations parallèles à la direction du champ appliqué. Il a également été montré que ces chaînes pouvaient se tordre et former ainsi des anneaux de nanoparticules. Par ailleurs, dû au caractère anisotrope des nanoparticules, différents réarrangements sont possibles. L'influence de la géométrie sur le cycle d'hystérésis est montrée théoriquement ci-dessous en *Figure I. 20* pour quelques exemples [23]:

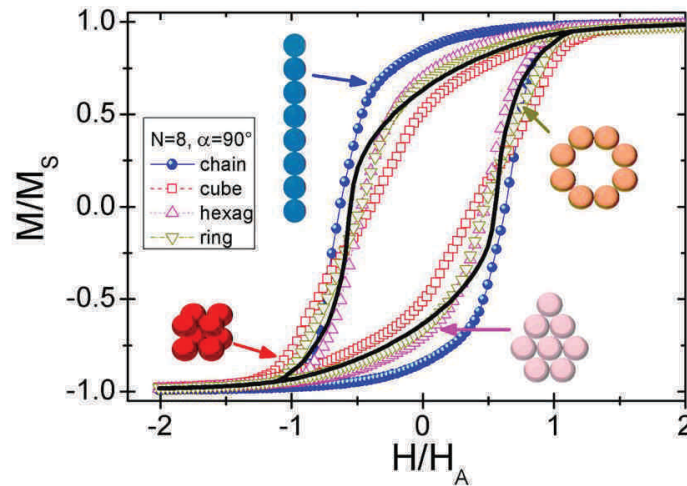


Figure I. 20 Courbes d'hystérésis pour différents arrangement: chaines (en bleu), cube (en rouge), anneau (en vert) et en hexagone (en rose); comparées dans les mêmes conditions $N = 8$ et $\alpha = 90^\circ$. Le cycle d'hystérésis dans les mêmes conditions de nanoparticules sans interaction est représenté en ligne noire. L'angle α définit un cône de distribution d'axe facile d'aimantation pour chaque particule. Il est fixé à 90° pour cette étude. (Figure tirée de [23])

Pour des configurations en cube, en anneau ou hexagone, les interactions dipolaires tendent à refermer les cycles et en diminuer l'aire par rapport aux mêmes nanoparticules sans interactions. La géométrie en aiguilles est la seule à présenter un cycle plus carré avec une augmentation du champ coercitif et une valeur d'aimantation rémanente qui se rapproche de l'aimantation à saturation. Pour cette étude, Serantes *et al.* ont montré qu'avec $N = 8$, on tend vers le maximum de pertes d'hystérésis, et donc vers le nombre optimal de nanoparticules par chaines.

1.2.2.2 Comportement d'aiguilles de nanoparticules d'oxydes de fer

Les nanoparticules d'oxydes de fer sont majoritairement utilisées pour des applications biomédicales en tant qu'agents de contraste IRM ou en tant que vecteurs d'hyperthermie magnétique. Nous développerons ultérieurement les études correspondant à l'optimisation de ces particules. Considérons pour l'instant le fait que les oxydes de fer sont des particules avec une faible anisotropie magnétocristalline, et que l'on peut synthétiser sous forme de sphères ou de cubes.

Pour minimiser leurs énergies globales, elles ont tendances à se réarranger en aiguilles. Par la suite, on s'intéresse aux pertes d'hystérésis d'une chaîne de nanoparticules cubiques de longueur variable. Les cycles d'hystérésis obtenus par simulation numérique sont présentés en Figure I. 21(a) [24]. On constate que l'élongation de la chaîne de nanoparticules augmente

considérablement l'aire du cycle grâce notamment à de fortes valeurs de champs coercitifs. Pour des amplitudes de champ appliqué suffisamment importantes ($0,48 H_K < H_{max} < H_K$, la valeur optimale dépendant de la concentration), le réarrangement en chaînes peut permettre d'optimiser le SAR.

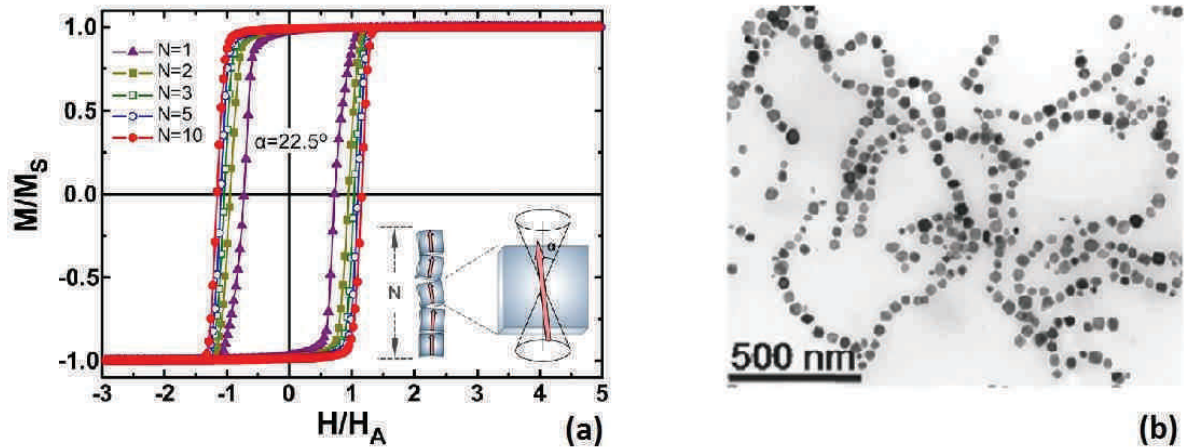


Figure I. 21 (a) Cycles d'hystérésis de chaînes de nanoparticules d'oxydes de fer de longueur N variable. Les nanoparticules possèdent un axe facile contenu dans un angle de $\pi/4$ [24]. (b) Chaînes de magnétosomes extraites de bactéries magnétostatiques AMB-1 (image TEM). (Figure tirée de [25])

Ces résultats sont en accord avec les travaux sur les magnétosomes d'Alphandéry *et al.* [25]. Les magnétosomes sont des nanoparticules d'oxyde de fer entourés de matériel biologique, synthétisés par des organismes vivants. Par ce biais, ses organismes ont la possibilité de suivre les lignes de champs magnétiques terrestres. Parmi eux, certaines bactéries magnétotactiques synthétisent ces magnétosomes en chaînes, que l'on peut extraire par la suite pour étude (voir Figure I. 21(b)). Ces particules sont particulièrement intéressantes car elles présentent de fortes valeurs de SAR en comparaisons d'autres oxydes de fer de synthèses (environ 400W/g à 183 kHz et 40 mT [25]). Il a également été montré que leur efficacité hyperthermique est nettement moins bonne quand les chaînes sont cassées et que l'on récupère des nanoparticules seules. Ce dernier résultat est donc en accord avec la Figure I. 21(a) où le cas $N = 1$ présente le minimum de pertes d'hystérésis. Dans le cadre des travaux d'Alphandéry *et al.*, l'utilisation des magnétosomes en chaînes dans un traitement par hyperthermie magnétique permet de réduire le volume des tumeurs chez la souris.

1.2.2.3 L'influence de l'anisotropie magnétique sur les pertes d'hystérésis

Le comportement de nanoparticules magnétiques en interactions résulte de la compétition entre l'anisotropie magnétique du système et des interactions inter particulaires. Considérons donc des aiguilles de nanoparticules de même taille, mais d'anisotropies magnétiques différentes. C'est un moyen différent de pouvoir étudier l'influence des interactions magnétiques dans des systèmes couplés. En *Figure I. 22* sont présentés des cycles d'hystérésis d'aiguilles de nanoparticules calculés pour différentes valeurs d'anisotropies individuelles K_{ind} [26]. On différencie également deux types de configurations ($6 \times 6 \times 6$ en *Figure I. 22(a)* et $6 \times 6 \times 42$ en *Figure I. 22(b)*). Dans le cas de fortes anisotropies individuelles, on constate que la forme des cycles n'est pas dépendante de la longueur de chaîne et présente des champs coercitifs faibles de l'ordre de la moitié du champ d'anisotropie $\mu_0 H_K$. A l'inverse, pour de faibles anisotropies individuelles, l'aire d'hystérésis est fortement influencée par la longueur de chaînes et est optimisée pour des chaînes longues.

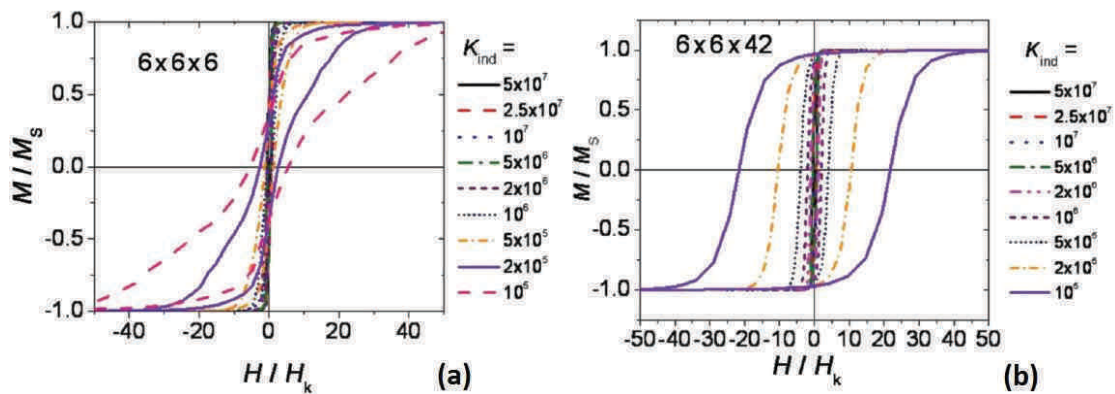


Figure I. 22 Simulations numériques de systèmes de nanoparticules magnétiquement couplées. Les aiguilles sont de dimensions (a) $6 \times 6 \times 6$ et (b) $6 \times 6 \times 42$. (Figure tirée de [26])

A partir des simulations numériques de cycles d'hystérésis, en prenant en compte différentes longueurs de chaînes, on présente en *Figure I. 23* l'évolution de la rémanence M_R (normalisée par M_{sat} , l'aimantation à 42 mT) et de la pente des cycles au champ coercitif en fonction de l'anisotropie individuelle des particules.

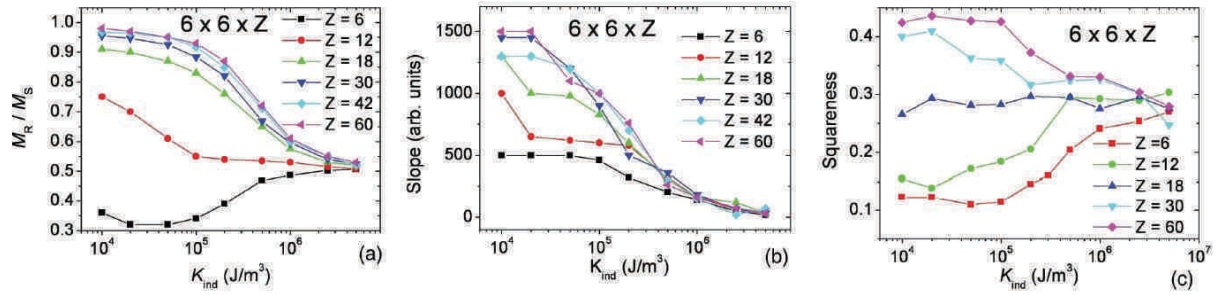


Figure I. 23 Données extraites de simulations numériques pour des aiguilles de dimensions $6 \times 6 \times Z$ de nanoparticules magnétiques couplées. Les paramètres pris en compte sont: $M_s = 2 \times 10^6 \text{ A.m}^{-1}$, $D = 13 \text{ nm}$ avec une distance interparticulaire de centre à centre de 15 nm . On montre ici (a) l'aimantation rémanente normalisée, (b) la pente au champ coercitif et (c) la rectitude des cycles en fonction de l'anisotropie K_{ind} . (Figure tirée de [26])

On définit également la rectitude des cycles d'hystérésis (*Squareness* en anglais sur la figure) comme étant le rapport de l'aire A du cycle sur l'aire maximale théorique (l'aire du rectangle) pour un jeu de paramètres H_{sat} et M_{sat} donné. Soit:

$$S = \frac{A}{4\mu_0 H_{sat} M_{sat}} \quad (\text{I. 44})$$

On constate *Figure I. 23(a)* que, dans le cas d'arrangements en cube ($Z = 6$), la rémanence augmente avec l'anisotropie des nanoparticules. A noter également que la rectitude *Figure I. 23(c)* d'un cube subit la même évolution. A l'inverse, pour des chaînes plus longues, la rémanence et la rectitude sont maximales pour de faibles valeurs de K_{ind} et décroissent ensuite. De plus, on constate en *Figure I. 23(b)* que les pentes au coercitif sont plus importantes pour des chaînes plus longues et pour des anisotropies plus faibles. Ces pentes diminuent ensuite pour des anisotropies croissantes.

Pour corréliser ces résultats avec les configurations magnétiques des nanoparticules, nous présentons en *Figure I. 24* la répartition des moments magnétiques de chaque particule pour quatre cas de figures caractéristiques: faible et forte anisotropie, faible et forte longueur de chaînes. A forte anisotropie (*Figure I. 24 (a) et (b)*) la répartition des moments des particules est aléatoire et ne dépend pas de la longueur de chaînes, alors qu'à faible anisotropie (*Figure I. 24(c) et (d)*), une organisation collective des moments est constaté pour une longueur de chaînes suffisante. On observe alors une anisotropie uniaxiale dans l'axe de l'aiguille.

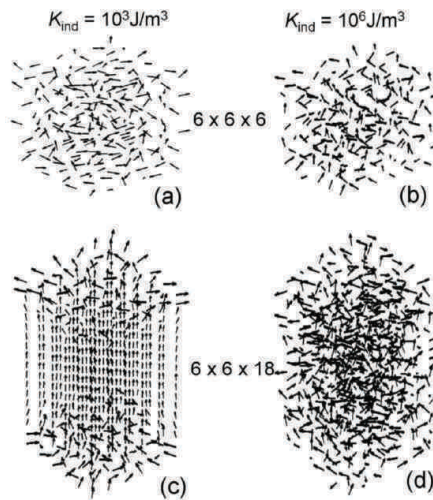


Figure I. 24 Représentation de l'orientation des moments magnétiques des nanoparticules en fonction d'un jeu de paramètres anisotropie / longueur de chaines. (a) $6 \times 6 \times 6$ et $K_{ind} = 10^3 J/m^3$; (b) $6 \times 6 \times 6$ et $K_{ind} = 10^6 J/m^3$; (c) $6 \times 6 \times 12$ et $K_{ind} = 10^3 J/m^3$; (d) $6 \times 6 \times 12$ et $K_{ind} = 10^6 J/m^3$. (Figure tirée de [26])

Nous pouvons tirer deux conclusions de ces observations. Tout d'abord, à forte anisotropie, le comportement des chaines est indépendant de leurs longueurs et se rapporte simplement à des nanoparticules sans interactions magnétiques (Figure I. 22 et Figure I. 23) avec un ratio M_R/M_S égal à 0,5, une rectitude égale à 0,25 et un champ coercitif du même ordre que le champ d'anisotropie. De plus quelle que soit la longueur de chaîne, les moments magnétiques sont orientés de manière aléatoire dans l'aiguille (Figure I. 24). Ces informations nous montrent que dans ce cas, la forte anisotropie des nanoparticules domine les effets dipolaires. Les aiguilles se comportent donc comme un échantillon de nanoparticules indépendantes magnétiquement. Pour de faibles anisotropies, on constate cette fois ci que le comportement magnétique des aiguilles est hautement dépendant de la longueur de chaines. On constate ainsi Figure I. 22(a) que, pour le cas d'un réarrangement cubique, l'organisation des moments magnétiques individuels favorisent un état désaimanté pour un champ appliqué nul, ce qui réduit notablement le coercitif et la rémanence. Ceci a pour effet de réduire la rectitude du cycle (Figure I. 23(c)). Dans le cas de chaines longues, l'anisotropie uniaxiale résultante de l'alignement des moments magnétiques individuels (Figure I. 24(c)) augmente considérablement la rectitude du cycle, sa rémanence, et optimise du même coup l'aire d'hystérésis. En conclusion, dans le domaine de l'hyperthermie magnétique, les nanoparticules en interaction ayant une anisotropie suffisamment petite seront plus efficaces.

1.2.3 Diffusion de chaleur autour de la nanoparticule

Après avoir présenté les aspects individuels et collectifs de l'hyperthermie magnétique, nous nous intéressons maintenant à la diffusion de chaleur et à la température dans le proche environnement de la nanoparticule. Pour beaucoup d'applications, comme la catalyse de réactions chimiques (cf I.3) ou même pour la compréhension des conséquences d'une hausse de température sur les mécanismes intracellulaires, il serait d'un grand intérêt de pouvoir accéder à la température de surface des nanoparticules. Malheureusement, peu ou pas de modèles traitent de ce sujet actuellement. Les théories avancées jusque-là utilisent l'équation de diffusion classique de la chaleur [24]–[26]:

$$\rho c_v \frac{\delta T}{\delta t} = \kappa \Delta T + Q \quad (\text{I. 45})$$

avec ρ la densité massique du milieu, κ le coefficient de conductivité thermique, T la température et c_v la capacité calorifique du milieu. On considère l'élévation de température comme continue avec comme source de chaleur une unique particule. On estime la température d'une position dans le milieu proche de la nanoparticule. La résolution de l'équation (I. 45) donne [27]:

$$\Delta T(z, t) = \frac{Q_s}{c_v \rho} \int_0^t \left(\frac{1}{2a\sqrt{\pi\tau}} \right) \exp\left(-\frac{z^2}{4a^2\tau} \right) d\tau \quad (\text{I. 46})$$

avec Q_s dissipation de chaleur surfacique moyenne, τ le temps de relaxation effectif. Comme nous pouvons le constater, ΔT décroît en exponentiel carré en s'éloignant de la surface de la nanoparticule.

On présente en *Figure I. 25* des exemples de résultats obtenus pour ces calculs. Ils représentent tout deux des élévations de température, dans un cas à la surface d'un cluster magnétique, et dans l'autre à la surface de la nanoparticule.

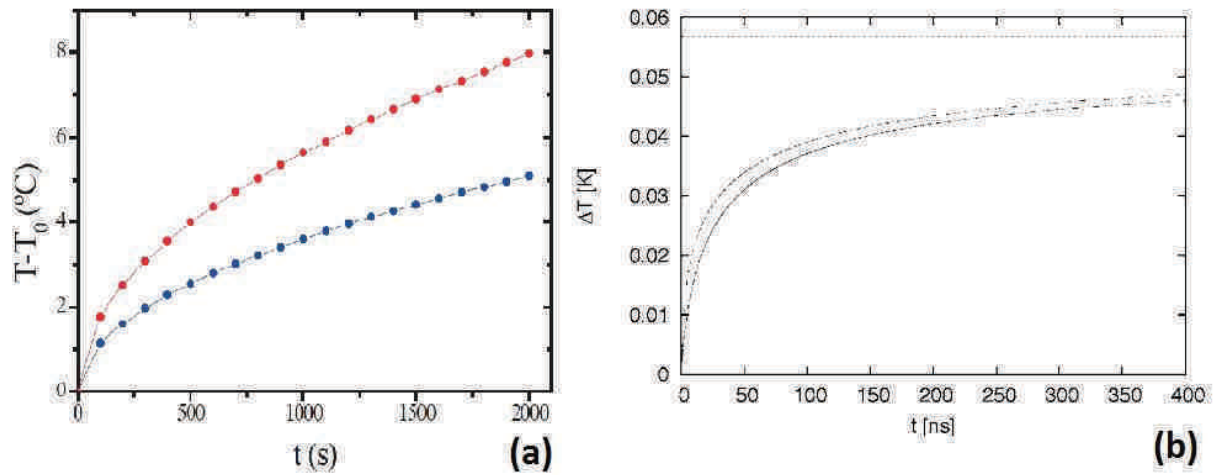


Figure I. 25 (a) Elévation de température moyenne d'une membrane cellulaire en fonction du temps. Système de clusters de 104 nanoparticules de 5,5 nm de rayon éloignés de 0,5 μm (en bleu) et de 0,4 μm (en rouge) [27]. (b) Elévation de température de surface pour une unique particule de 65 nm de rayon suivant deux méthodes de calculs [28].

Dans le deuxième cas, la température atteint une limite qui correspond à un équilibre thermique avec le milieu extérieur. Comme on peut le voir cet équilibre se met en place rapidement (de l'ordre de la dizaine de nanosecondes).

Ce modèle diffusif n'est valable que dans le cas où le libre parcours moyen du porteur de chaleur est plus petit que la taille caractéristique de la particule [28], [29]. En deçà d'une certaine distance donc, le modèle n'est plus valide et il faut prendre en considération l'existence d'un modèle de température discontinu et hors équilibre assez peu étudié à ce jour [29].

1.3 Principaux travaux d'optimisation du SAR de nanoparticules magnétiques

Dans ce paragraphe sont détaillés quelques résultats expérimentaux traitant des caractéristiques des nanoparticules pour optimiser le SAR. Compte tenu de la littérature extrêmement abondante sur le sujet, un traitement exhaustif ne peut être envisagé dans ce paragraphe et nous faisons le choix de développer les travaux qui nous semblent le plus pertinents. Nous avons vu précédemment ((I. 29), (I. 30)) qu'une des manières d'optimiser l'aire d'hystérésis était d'augmenter l'aimantation à saturation des nanoparticules. Une autre méthode plus récemment mise en lumière consiste à varier l'anisotropie magnétique du

matériau. Enfin l'étude en taille des nanoparticules permet également de maximiser le SAR pour un matériau donné.

1.3.1 Influence de la taille

L'étude de l'efficacité en SAR des nanoparticules en fonction de leur taille présente un fort intérêt pour toutes les applications associées. Cela peut permettre par exemple de diminuer la quantité de matériel magnétique requis pour atteindre une certaine quantité de chaleur libérée, ou encore d'être plus performant pour des caractéristiques de champ magnétique données.

La première étude que nous présentons ici est réalisée pour des nanoparticules d'oxydes de fer (Fe_3O_4) [30]. Les auteurs ont synthétisé des lots de nanoparticules de 3,2 nm à 50 nm. Ils comparent l'évolution en SAR de ces différents lots avec les valeurs d'aimantations à saturation correspondantes (Figure I. 26).

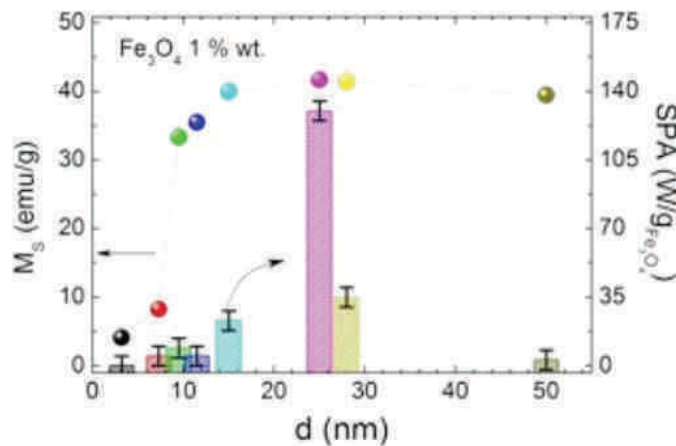


Figure I. 26 Etude des valeurs d'aimantations à saturation (axe de gauche, cercles colorés) et des valeurs de SAR (axe de droite, histogrammes colorés) en fonction du diamètre des particules. (Figure tirée de [30])

Les valeurs de SAR décrivent clairement une forte augmentation pour $d = 26$ nm et diminuent drastiquement ensuite. Les données de cette expérience suggèrent que le diamètre optimal se situe proche d'une taille critique située juste en dessous de la transition vers un multi-domaine magnétique. Concernant le M_s , on remarque qu'il reste constant après un diamètre d'environ 15 nm.

Nous allons maintenant nous intéresser au comportement de la taille optimale de nanoparticules en fonction des paramètres de champ appliqué. Pour ce faire, Mehdaoui *et al.*

[22] ont mesuré le SAR de nanoparticules de fer ayant des diamètres compris entre 5,5 nm et 28 nm (ci-dessous

Figure I. 27).

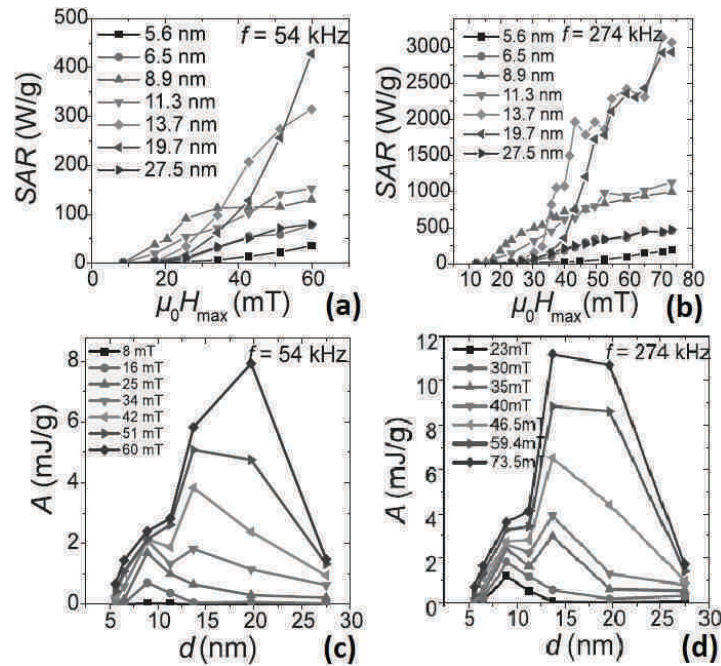


Figure I. 27 Evolution du SAR en fonction de l'amplitude de champ magnétique appliqué pour différents diamètres de nanoparticules de fer et pour (a) $f = 54$ kHz, (b) $f = 274$ kHz. Aires d'hystérésis à différentes valeurs d'amplitudes de champs en fonction du diamètre de nanoparticules et pour (c) $f = 54$ kHz, (d) $f = 274$ kHz. (Figure tirée de [22])

La dépendance du SAR en fonction de la taille a été étudiée ici pour deux fréquences de champ magnétique: 54 kHz et 274 kHz. On constate dans les deux cas que pour des diamètres faibles, les courbes de SAR ne présentent pas d'augmentations abruptes. Les valeurs de SAR restent alors assez faibles. Ensuite pour les échantillons 13.7 nm et 19.7 nm, le facteur de puissance décrit en Figure I. 11 augmente, ce qui conduit à de plus fortes valeurs de SAR. On observe sur les mesures à 274 kHz une augmentation abrupte puis une pseudo saturation, ce qui rappelle un comportement ferromagnétique (voir Figure I. 10). De même pour ces deux échantillons, le champ coercitif augmente fortement par rapport aux particules de diamètres inférieurs. La saturation est plus difficilement observable à 54 kHz car l'amplitude de champ maximum disponible est moins élevée. Enfin, pour un diamètre de 27.5 nm, les courbes de SAR retombent à nouveau dans de faibles valeurs. Cette chute d'efficacité est liée à une transition vers des nanoparticules multidomaines (voir Figure I. 12). Les Figure I. 27 (c) et (d) montrent l'évolution de l'aire d'hystérésis pour ces mêmes lots de nanoparticules en fonction de leurs diamètres et ce pour différentes valeurs d'amplitude de champ. On

remarque effectivement la présence de tailles optimales pour chaque amplitude de champ. De plus le maxima d'aire d'hystérésis se déplace vers les plus grands diamètres en augmentant l'amplitude du champ appliqué. Cette observation est directement reliée à la théorie de Stoner-Wohlfarth. Pour une meilleure efficacité en hyperthermie magnétique, il est donc préférable de travailler avec des nanoparticules proches de la taille critique. Néanmoins, ce diamètre optimal varie avec les conditions de champ appliqué. Il faut donc prendre en compte les paramètres expérimentaux pour ajuster la taille des particules.

1.3.2 Influence de l'anisotropie

Chaque type de matériau possède sa propre anisotropie magnétique à l'état massif. Dans le cas de nanoparticules, il est courant d'obtenir une anisotropie supérieure due aux effets de surface ou aux problèmes stœchiométriques. La *Figure I. 28* rassemble les valeurs de plusieurs matériaux massifs en fonction de leurs aimantations. Pour repère sont indiquées les courbes d'anisotropies optimales pour deux valeurs d'amplitude de champ magnétique : 20 mT et 50 mT.

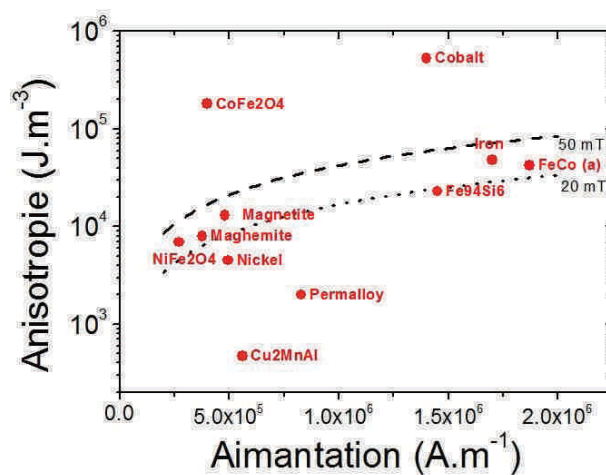


Figure I. 28 Anisotropies magnétiques de plusieurs matériaux massifs en fonction de leurs aimantations. Les courbes représentent les anisotropies optimales pour toutes valeurs d'aimantation à 20 mT (pointillés) et 50 mT (tirets). Dans les deux cas, la courbe inférieure représente le cas $\phi = 0$ et la ligne supérieure le cas d'orientations aléatoires.

Les oxydes de fer, actuellement utilisés en hyperthermie pour la cancérologie, sont de bons candidats pour de faibles amplitudes de champ mais n'ont pas des valeurs d'aimantations trop fortes. A l'inverse, on constate que le fer ou le FeCo ont des valeurs d'aimantations plus intéressantes mais pour des amplitudes de champs appliqués plus fortes. Le choix du matériau

magnétique dépend donc déjà de l'application envisagée et des paramètres de champ à appliquer. Par exemple, les particules de fer semblent être de meilleurs candidats pour l'hyperthermie sur le vivant que les oxydes de fer. Malheureusement, leur utilisation est optimale à trop forts champs pour le corps humain et ces nanoparticules risquent également de se révéler toxiques.

Mehdaoui *et al.* [26] ont étudié l'influence de l'anisotropie magnétique sur la forme du cycle d'hystérésis. Pour ce faire, différents lots de nanoparticules ont été synthétisés avec des diamètres comparables (de 12.1 nm à 14.6 nm) mais des anisotropies différentes (de 4.6 10^4J/m^3 à 9.5 10^4J/m^3) en variant leurs compositions.

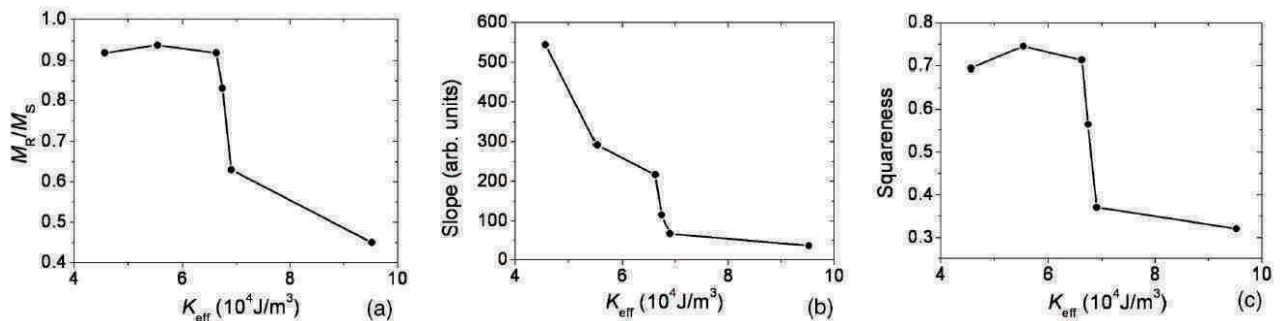


Figure I. 29 Analyses de cycles d'hystérésis mesurées à $f = 54 \text{ kHz}$ et $\mu_0 H_{\text{max}} = 42 \text{ mT}$ en fonction de l'anisotropie effective K_{eff} estimée des différents échantillons. (a) l'aimantation rémanente normalisée à l'aimantation à saturation. (b) la pente mesurée au champ coercitif. (c) la rectitude S du cycle (voir (I. 44)). (Figure tirée de [26])

On voit clairement sur les courbes expérimentales de la Figure I. 29 que les échantillons à plus faibles anisotropies sont plus intéressants d'un point de vue énergétique. En effet, une diminution de l'anisotropie entraîne ici une augmentation de la rémanence et de la pente au coercitif. Cela a pour effet d'augmenter la rectitude du cycle. Les auteurs précisent néanmoins que l'on se place dans le cas expérimental de nanoparticules en interactions magnétiques. En aucun cas on ne peut retrouver ces résultats pour un système de nanoparticules magnétiquement indépendantes.

Nous présentons maintenant une étude traitant de l'influence des contributions d'anisotropies d'échange et de surface sur le cycle d'hystérésis [31]. Dans ces travaux, Seung-hyun Noh *et al.* ont synthétisé des nanoparticules de $\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4$ de formes sphériques ou cubiques de différents volumes. Cette différence de formes induit une différence d'anisotropie de surface. Ils ont ensuite synthétisé ces mêmes particules mais en structure hybride cœur / coquille avec une coquille de CoFe_2O_4 . Cette autre différenciation permet de varier la contribution

d'anisotropie d'échange. L'ensemble des échantillons et leurs caractéristiques pour l'étude sont schématisés *Figure I. 31*.

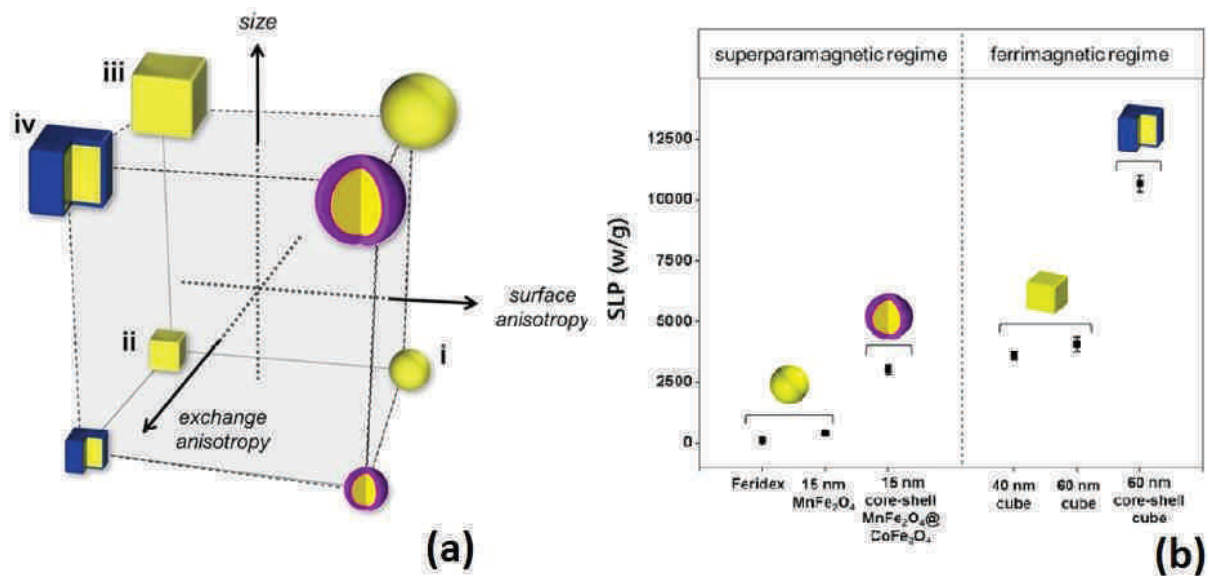


Figure I. 31 Evolution morphologique et structurale des nanoparticules magnétiques et l'influence correspondante sur le cycle d'hystérésis. (a) Nanoparticules magnétiques de différentes structures présentant des différences en tailles, en anisotropie de surface et en anisotropie d'échange. (b) Influence des paramètres précédents sur le cycle d'hystérésis.

Les auteurs ont déduit les valeurs d'anisotropies de surface de mesures de température de blocage (320 K pour les cubes et 360 K pour les sphères) sur des objets ayant le même volume. Il apparaît donc que la contribution d'anisotropie de surface est plus importante pour les sphères que pour les cubes (voir *Figure I. 31(a)*). L'influence de la taille des cubes est également étudiée dans ces travaux. Le M_s augmente avec la taille des nanocubes jusqu'à atteindre 95% de la valeur du massif (soit 190 emu/g) pour des cubes de 60 nm.

Les auteurs ont étudié l'influence d'une coquille magnétique dure sur l'échauffement des nano-cubes. La structure cœur / coquille avec ici une coquille magnétique dure de CoFe₂O₄ induit une augmentation drastique du champ coercitif (14 fois plus important dans le cas de cube de 60 nm avec une coquille de 5 nm). Les SAR correspondants pour des champs appliqués de 37,4 kA/m à 500 kHz sont exposés en *Figure I. 31(b)*. Pour ces paramètres de champ appliqués, les nanocubes en structure cœur / coquille présentent des valeurs de SAR nettement supérieures à celles des nanocubes de base pour les mêmes tailles d'objets, en raison de l'augmentation du champ coercitif et du fait que le champ magnétique appliqué reste néanmoins toujours supérieur au champ coercitif. Le contrôle des interfaces entre le

cœur doux et la coquille dure a ici été essentiel pour optimiser les interactions d'échanges entre spins magnétiques conduisant à la hausse du champ coercitif.

1.3.3 Influence des interactions

Comme précisé précédemment, on trouve dans la littérature des exemples de SAR qui augmentent, diminuent ou plus largement varient en fonction des interactions magnétiques. Pour visualiser les effets que peuvent avoir les interactions sur l'efficacité en hyperthermie, on expose en *Figure I. 32* deux exemples d'études de SAR en fonction de la concentration des échantillons.

La *Figure I. 32(a)* présente les valeurs de SAR (particules de fer sphériques d'environ 75 nm de diamètre) mesurées pour le même lot de nanoparticules mais à différentes concentrations. Les mesures sont faites dans des conditions non-adiabatiques. On constate qu'en augmentant la concentration, le SAR diminue.

Dans certains cas, il est possible de ne pas avoir une dépendance monotone du SAR en fonction de la concentration. On obtient alors une concentration optimale, comme dans l'exemple en *Figure I. 32(b)* pour des nanoparticules de fer (avec 33 nm de diamètre de cœur magnétique) enrobées d'oxyde de magnésium (structure cœur- coquille Fe-MgO) [32].

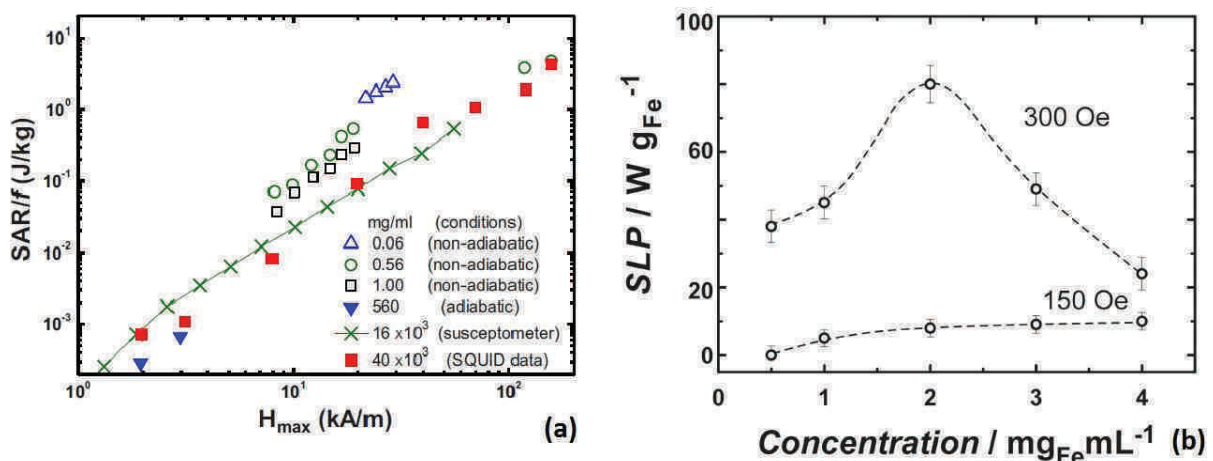


Figure I. 32(a) Etude de SAR en fonction de l'amplitude du champ appliqué pour différentes conditions expérimentales et différentes concentration [21]. On s'intéresse principalement ici aux mesures non-adiabatiques (b) Etude du SAR (=SLP) en fonction de la concentration de l'échantillon, pour une amplitude de champ appliqué de 150 Oe et de 300 Oe [32]. Les nanoparticules Fe-MgO étudiées ont une structure cœur-coquille. Les diamètres du cœur magnétique et de la nanoparticule complète sont respectivement de 33 nm et 37 nm.

Dans cet exemple pour un champ appliqué de 300 Oe (≈ 30 mT), le SAR (noté SLP pour *Specific Loss Power*) présente un maximum pour une concentration en particules de 2 mg_{Fe} / mL. A l'inverse pour un champ plus faible de 150 Oe (≈ 15 mT), le SAR est croissant en fonction de la concentration sur la gamme étudiée. Cette concentration optimale est donc également dépendante des caractéristiques du champ appliqué. L'étude complémentaire avec différents diamètres révèle que l'augmentation du diamètre déplace la position du maximum de SAR vers les basses concentrations. Dans tous les cas on note une augmentation du SAR pour les faibles concentrations jusqu'à un maximum à partir duquel le SAR diminue. Ce phénomène est certainement régulé par la compétition entre l'anisotropie magnétique et les interactions dipolaire et dépend donc des paramètres du champ appliqué ainsi que les caractéristiques intrinsèques des nanoparticules (taille, K , M_s).

1.3.4 Diffusion de la chaleur

De récents travaux ont été menés pour mesurer la température à la surface ainsi qu'en périphérie des nanoparticules sous l'influence d'un champ magnétique extérieur [33]–[36]. Nous allons voir que la chaleur dissipée par hyperthermie magnétique décroît rapidement en s'éloignant de la surface. Une caractérisation de la montée en température à quelques nanomètres de la surface en fonction du temps d'exposition au champ sera également développée. Ces études de diffusion de la chaleur au plus proche des nanoparticules peut fournir un début d'explication aux résultats de morts cellulaires par hyperthermie magnétique sans qu'une hausse de température macroscopique ne soit détectable [37].

Dans la plupart des études, l'information sur la température est récupérée via la fluorescence de fluorochromes (molécules thermosensibles qui fluorescent à des longueurs d'ondes spécifiques après excitation). Dong *et al.* [34] ont ainsi détecté une hausse de température à la surface de particules d'oxydes de fer sous champ magnétique alternatif tout en gardant celle du milieu constante. Dans cette expérience, les nanoparticules sont encapsulées dans des sphères de silice mésoporeuses. Leurs travaux (*Figure I. 33*) révèlent la rapidité de cette montée en température. Puis à l'arrêt du champ, cette température diminue drastiquement jusqu'à l'équilibre avec le milieu. Le système retourne ensuite à l'équilibre de manière homogène.

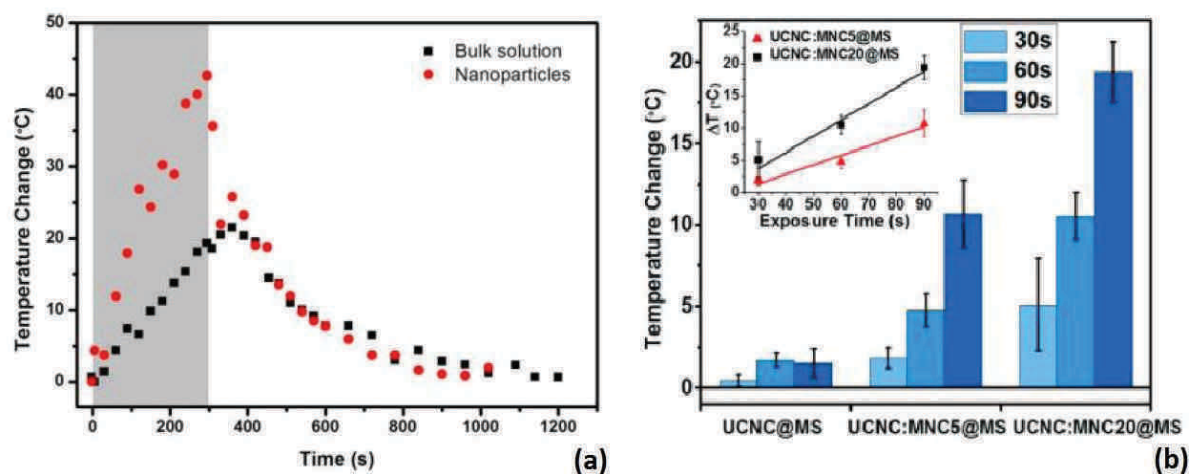


Figure I. 33(a) Détection de température *in situ* pendant et après une exposition de 5 minutes à un champ magnétique alternatif (zone grise). Comparaison entre la température des nanoparticules (cercles rouges) et celle du milieu (carrés noirs). (b) Détection de hausse de température sous différentes conditions d'expériences: trois temps d'expositions (30s, 60s et 90s), deux tailles de nanoparticules (5 nm pour UCNC:MNC5@MS et 20 nm pour UCNC:MNC20@MS) en comparaison d'une capsule de silice mésoporeuse sans nanoparticules (UCNC@MS). (Figure tirée de [34])

Comme dans les expériences d'hyperthermie présentées dans les sections précédentes, les auteurs ont montré la dépendance en taille de l'efficacité (cf. Figure I. 33(b)), ainsi que l'influence du temps d'exposition au champ magnétique. On remarque ainsi que la température augmente de manière proportionnelle en fonction du temps d'exposition. Comme constaté précédemment, les nanoparticules de 20 nm se révèlent plus efficaces pour tout temps d'exposition. L'échauffement des contrôles (capsules de silice mésoporeuse vides de matériel magnétique) reste négligeable et indépendant des conditions d'expérimentation.

On s'intéresse maintenant à la diffusion de la chaleur autour de la particule. Pour ce faire, différentes méthodes sont employées pour placer une molécule fluorescente à une distance contrôlée de la surface de la nanoparticule. Reidinger *et al.* [35] utilisent des molécules de PEG comme écarteur, puis un fluorochrome attaché à une molécule thermosensible (voir Figure I. 34(a)). Dias *et al.* [36] se servent quant à eux de brin d'ADN à la fois comme écarteur et comme thermo-senseurs (voir Figure I. 34(b)). Par la suite, ces brins d'ADN sont hybridés avec trois différents oligonucléotides modifiés chacun avec un fluorochrome différent.

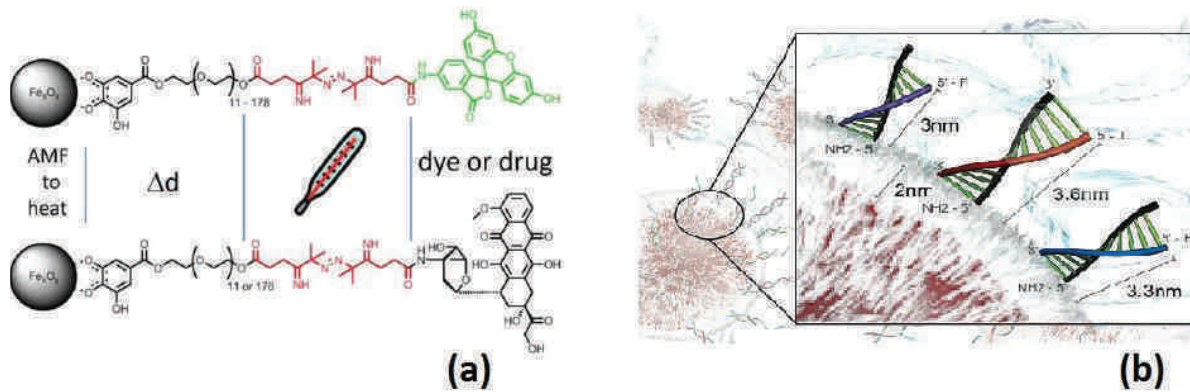


Figure I. 34 Schématisation des stratégies expérimentales pour obtenir le gradient de température en fonction de l'éloignement de la surface. (a) Un écarteur PEG qui permet de contrôler la distance Δd en noir, une molécule thermosensible en rouge et une fluorochrome en vert. (Figure tirée de [35]) (b) Des brins d'ADN sont couplés à différents oligonucléotides (DNA-F: 3 nm, DNA-H: 3,3 nm et DNA-T: 3,6 nm). (Figure tirée de [36])

Grâce à leur protocole, Reidinger *et al.* ont pu mesurer la température en fonction de l'éloignement du fluorochrome par rapport à la particule, pour différentes amplitudes de champ appliqué (Figure I. 35(a)). Dans un premier temps, l'intensité du spectre de photoluminescence provenant des fluorochromes est normalisée par un maximum d'intensité (défini comme étant le signal accumulé en chauffant l'échantillon à 80°C pendant 48h). On remonte ensuite à la température locale via une loi logarithmique. La Figure I. 35(a) révèle que la température est dépendante de l'amplitude du champ appliqué. L'augmentation de température en fonction de la distance correspondante est représentée en Figure I. 35(b). Les points de mesures sont représentés par les symboles. Les données ont ensuite été ajustées avec une fonction exponentielle. On peut voir que la température diminue de manière drastique en fonction de l'éloignement. Ainsi, à 4 nm de la surface de la nanoparticule, quasiment aucune hausse de température n'est détectée. Dans le proche environnement de la particule, une hausse très significative de la température est donc observée. On remarque même que l'on peut très bien s'approcher de la température d'ébullition d'un solvant.

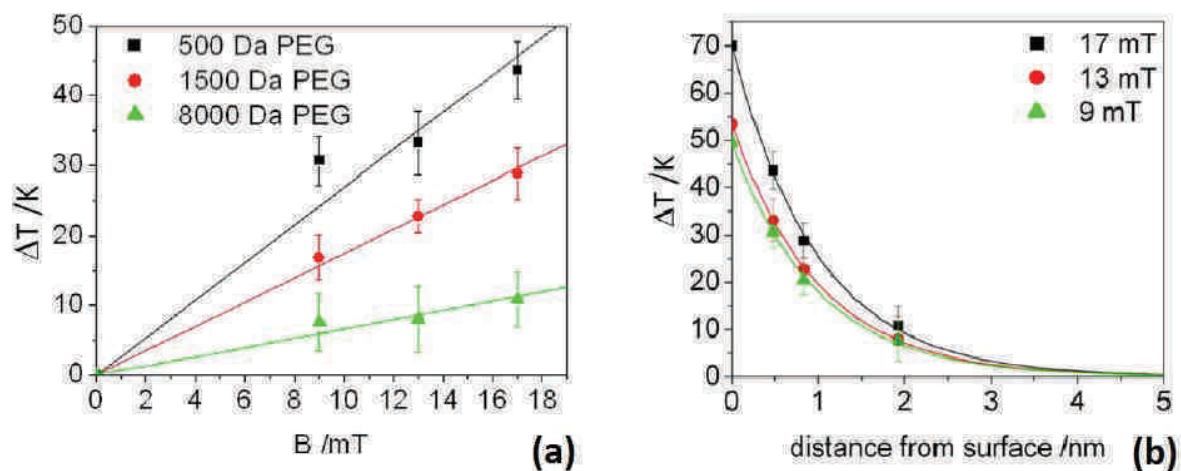


Figure I. 35(a) Elévation de température en fonction de l'amplitude du champ magnétique appliqué pour différents poids moléculaires de PEG. (b) Gradient de température pour les trois amplitudes de champs étudiées. Les poids moléculaires de PEG indiqués en (a) (500 Da, 1500 Da, 8000 Da) entraînent des éloignements du fluorochrome par rapport à la surface de la particule (respectivement 0,48 nm, 0,83 nm et 1.93 nm). (Figures tirées de [35])

Les mêmes auteurs ont ensuite remplacé le fluorochrome par un agent chimiothérapeutique, la doxorubicine. Ils montrent qu'un relargage contrôlé de cette molécule est possible en maîtrisant la distance par rapport à la surface, et l'amplitude de champ. Ces résultats présentent un immense intérêt pour contrôler la dose injectée en oncologie.

2 Induction de mort cellulaire par hyperthermie magnétique

Nous allons maintenant nous intéresser aux travaux récents visant à induire la mort cellulaire par hyperthermie magnétique. Pour cette thèse, nous avons étudié l'impact du traitement *in vitro* sur des cellules tumorales (adhérentes ou en suspension, nous le développerons ultérieurement dans le Chapitre III). Bien que de nombreuses études traitent de la problématique *in vivo*, nous ne l'aborderons pas ici. Après une brève introduction sur la structure de la cellule et ses mécanismes d'internalisation et de mort, nous synthétiserons donc les principaux résultats visant à induire la mort *in vitro*.

2.1 Mécanismes cellulaires essentiels à la mise en place du traitement par hyperthermie magnétique

2.1.1 La cellule et ses voies d'internalisation

Le monde de la biologie se divise en deux catégories de cellules: les cellules procaryotes et eucaryotes. Les cellules eucaryotes composent tous les membres des familles animales ou végétales. Elles possèdent un noyau enfermant le matériel génétique, ainsi que de nombreuses membranes internes délimitant les organites (cf *Figure I. 36(a)*). Parmi ces derniers, on trouve les lysosomes, responsables de la dégradation des protéines et autres objets extracellulaires ou encore des organites internes défectueux.

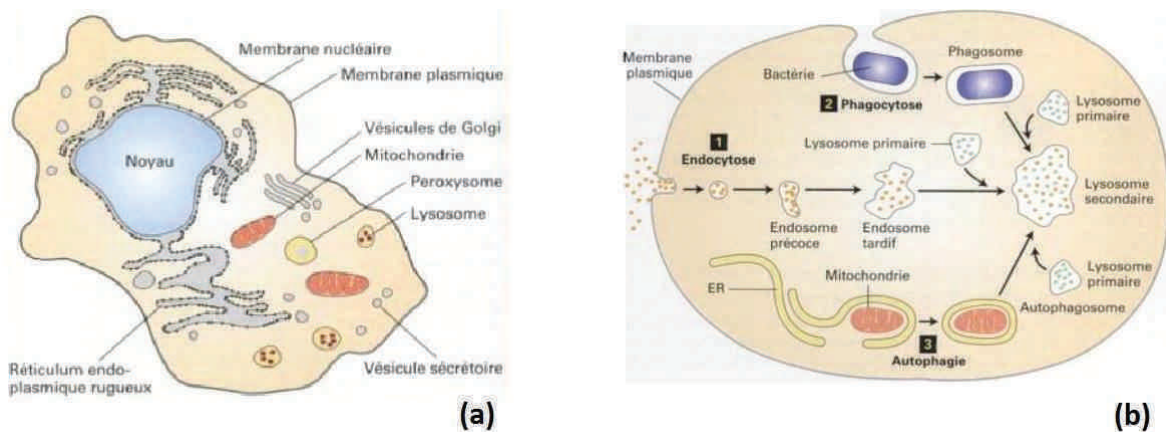


Figure I. 36(a) Représentation schématique d'une cellule eucaryote composée des différents organites entourés de cytoplasme. (b) Vue d'ensemble de trois différentes voies amenant différents matériaux jusqu'aux lysosomes. (Figures tirées de [38])

La *Figure I. 36(b)* présente trois voies d'acheminement de matériaux intra ou extra cellulaires vers les lysosomes. La phagocytose (noté 2), permet de digérer des bactéries entières ou autres grosses particules insolubles. L'autophagie (notée 3), littéralement "se manger soi-même", est un processus qui recycle les organites usagés. Et enfin l'endocytose (notée 1), conduit à l'internalisation des macromolécules reconnues par la cellule à l'aide de récepteurs membranaires. C'est grâce à cette voie que la cellule puise dans son milieu de quoi survivre, se développer et se reproduire. Après reconnaissance et fixation à la surface de la cellule des macromolécules d'intérêts, la membrane plasmique se déforme en un puits recouvert qui est conduit vers un endosome précoce, puis un endosome tardif. Par la suite, le contenu est acheminé vers les lysosomes. Les lysosomes ont un contenu qui diffère nettement du reste de la cellule. On y trouve une multitude d'enzymes comme les nucléases (qui

dégradent l'ADN ou l'ARN en éléments mononucléotidiques) et les protéases (qui dégradent toutes sortes de peptides et de protéines). Les enzymes lysosomiales sont efficaces à pH acides. L'intérieur du lysosome est donc acidifié en permanence grâce à des "pompes à protons" qui assurent l'échange d'ions avec le milieu cellulaire.

L'endocytose dépendante des récepteurs est qualifiée d'internalisation spécifique. Ce mécanisme présente un intérêt particulier en cancérologie car la densité et la variété des récepteurs présents sur la membrane sont différentes entre une cellule saine et une cellule infectée. Il est donc possible de cibler certains récepteurs en greffant les ligands correspondants à des objets à internaliser. La cellule utilise aussi une forme d'internalisation non spécifique, la pinocytose, qui vise à internaliser et assimiler des gouttelettes de milieu. Les composants extracellulaires peuvent donc entrer dans la cellule par cette voie non spécifique.

2.1.2 Les mécanismes de la mort cellulaire

La mort cellulaire est un processus naturel dans la vie d'une entité vivante, et n'est pas forcément une réponse à une agression extérieure. En effet, la mort cellulaire contrôlée nous permet lors de l'embryogénèse de ne pas avoir les mains palmées ou que des restes de queue ne persistent.

Il y a deux grandes familles de morts cellulaires (*cf. Figure I. 37*):

- L'apoptose ou mort contrôlée: ce mécanisme de mort est "volontaire" de la part de la cellule et peut être enclenché par une multitude de causes (défaut, fin de travail de la cellule). Comme schématisé plus bas, la cellule se fragmente en compartiments fermés par une membrane qui seront ensuite phagocytés par des cellules phagocytaires.
- La nécrose: à l'instar de l'apoptose, cette mort cellulaire n'est pas programmée et est causée par des lésions cellulaires importantes. Typiquement les cellules enflent et éclatent, libérant ainsi l'intérieur de la cellule. Ce mécanisme peut entraîner des dommages dans les cellules voisines et des inflammations de tissus.

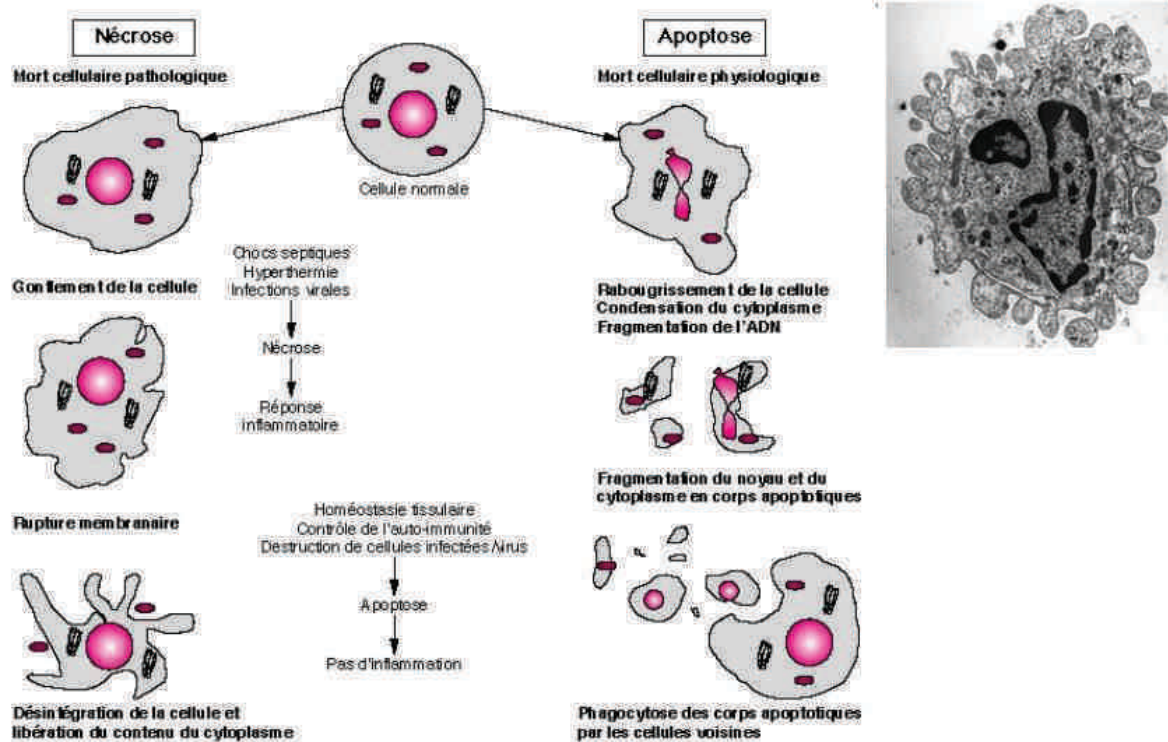


Figure I. 37 Caractéristiques morphologiques des cellules lors des processus de mort par apoptose et par nécrose. A droite, une image TEM d'une cellule apoptotique. (Figure tirée de [38])

Une des voies thérapeutiques consiste donc à tuer les cellules infectées par apoptose, qui est une mort "propre" non inflammatoire. Ensuite, sans rentrer dans les détails, beaucoup de voies peuvent mener à l'apoptose de la cellule. On peut citer par exemple l'existence d'agents de mort cellulaire qui une fois sécrétés ou libérés en réponse à une agression extérieure commandent à la cellule d'entrer en apoptose.

2.2 Expériences *in vitro* de mort cellulaire par hyperthermie magnétique

Nous présentons maintenant les résultats expérimentaux *in vitro* d'hyperthermie magnétique utilisant des nanoparticules d'oxydes de fer. Ces nanoparticules sont mises en contact avec différentes lignées cellulaires et les paramètres du champ magnétique alternatif varient également entre les expériences. Ces résultats sont séparés en deux sous-catégories: ceux où une augmentation de température macroscopique suffisamment élevée pour engendrer la mort cellulaire est détectée, et ceux où aucune hausse de température macroscopique n'est relevée.

Dans les deux cas, on incube des lignées de cellules cancéreuses par des lots de nanoparticules ou des magnétosomes. Le système peut ensuite être laissé à l'étuve avec une atmosphère à 37°C et 5% de CO₂ pendant plusieurs heures pour permettre aux cellules

d'internaliser les nanoparticules. Les cellules sont ensuite exposées à un champ magnétique alternatif avec des paramètres (fréquence, amplitude de champ et temps d'exposition) variables entre expérimentateurs. L'analyse de mort/survie cellulaire se fait ensuite traditionnellement au FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting), méthode utilisée pour différencier l'état de cellules concernant un paramètre choisi (comme par exemple absence/présence d'une protéine) ou encore par MTT (méthode colorimétrique révélant le nombre de cellules vivantes) pour observer les effets plusieurs heures après l'exposition au champ.

2.2.1 Traitement hyperthermique avec augmentation de température

Dans l'étude suivante, D. Baba *et al.* [39] ont comparé l'incidence de deux lots de nanoparticules d'oxydes de fer de tailles différentes (13 nm et 44 nm) sur la survie cellulaire. Les cellules ont été préparées en suspension après incubation avec les nanoparticules. On précise que le milieu a été lavé après incubation ce qui élimine la majorité de nanoparticules extracellulaires du système. L'exposition à un champ magnétique de 250 kHz a duré 20 minutes. La température des suspensions a été mesurée durant toute la durée de l'expérience. Les résultats présentés ci-dessous en *Figure I. 38* traduisent l'influence des deux différents lots de nanoparticules à différentes concentrations sur la survie cellulaire.

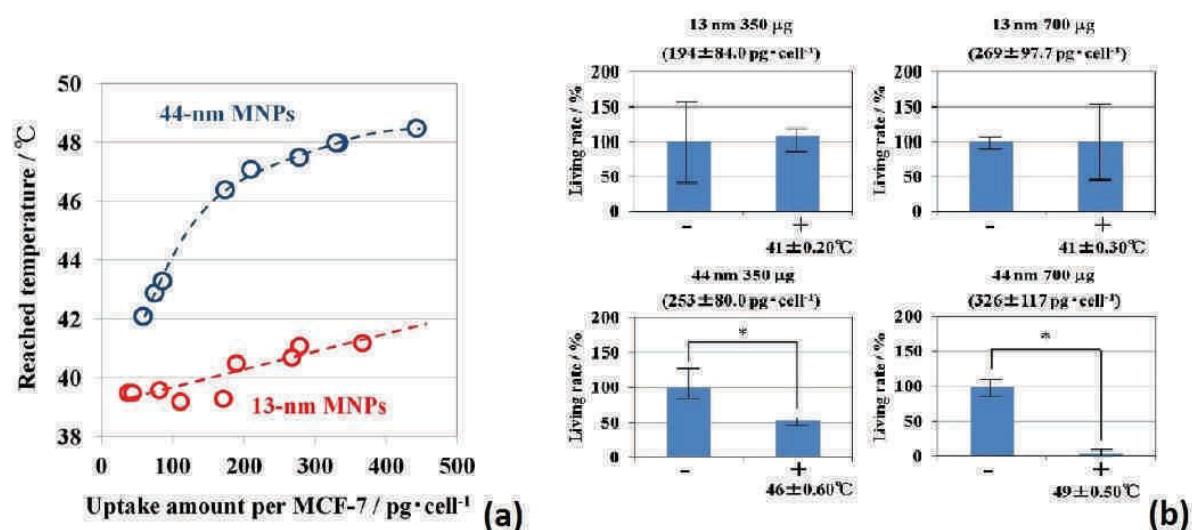


Figure I. 38(a) Relation entre la quantité par cellule de nanoparticules de 13 nm (en rouge) et de 44 nm (en bleu) et la température atteinte dans la suspension. (b) Pourcentage de survie cellulaire pour chaque quantité de nanoparticules (quantité de nanoparticules en pg précisé dessous) et pour les deux tailles. Les auteurs précisent également la température atteinte dans chaque cas. (Figure tirées de [39])

La *Figure I. 38(a)* indique une hausse de température clairement mesurable durant les expériences. Cette hausse diffère en fonction de la taille des particules. En effet, les suspensions contenant les nanoparticules de 44 nm, théoriquement plus efficaces en hyperthermie, atteignent des hausses de températures plus importantes, dépassant largement les 43°C fatals aux cellules. Concernant les suspensions contenant des nanoparticules de 13 nm, la température ne dépasse pas 42°C même aux plus fortes concentrations. Cela a pour incidence de ne causer aucune mort significative après exposition, comme le montre la *Figure I. 38(b)*. A l'inverse, les expériences avec des particules de 44 nm conduisent à une nette diminution de la survie cellulaire. Cette survie est de plus dépendante de la quantité de nanoparticules internalisées puisque, si on obtient environ 50% de survie avec 350 pg par cellule dans la suspension, toute les cellules ou presque sont tuées avec 700 pg par cellule.

Nous présentons maintenant une étude basée sur l'utilisation de magnétosomes extraits de bactéries AMB-1, travaux menés par Alphandéry *et al.* [25]. Comme précédemment, la température est mesurée pendant l'exposition de 20 minutes au champ magnétique ($f = 183$ kHz). Les cellules sont incubées en présence de magnétosomes et les solutions ne sont ici pas lavées avant exposition. L'influence de la concentration en matériel magnétique et de l'amplitude de champ est étudiée. Les mesures de température ainsi que la survie cellulaire mesurée en cytométrie en flux (FACS) sont présentées en *Figure I. 39*.

Pour une amplitude de champ de 20 mT, aucune hausse de température significative n'est détectée dans les suspensions quelles que soit les concentrations en magnétosomes. A 40 mT par contre, la température se stabilise dans les premières minutes, avec une température d'équilibre croissante en fonction de la concentration en magnétosomes.

Concernant les résultats de survies cellulaires, on retrouve effectivement de meilleurs résultats pour un champ appliqué de 40 mT ou plus avec des conditions présentant quasiment une mortalité complète. Cependant, pour la plupart des concentrations, une hausse de la mortalité est à relever à 20 mT, même si à cette amplitude de champ aucune augmentation de température macroscopique n'est mesurée.

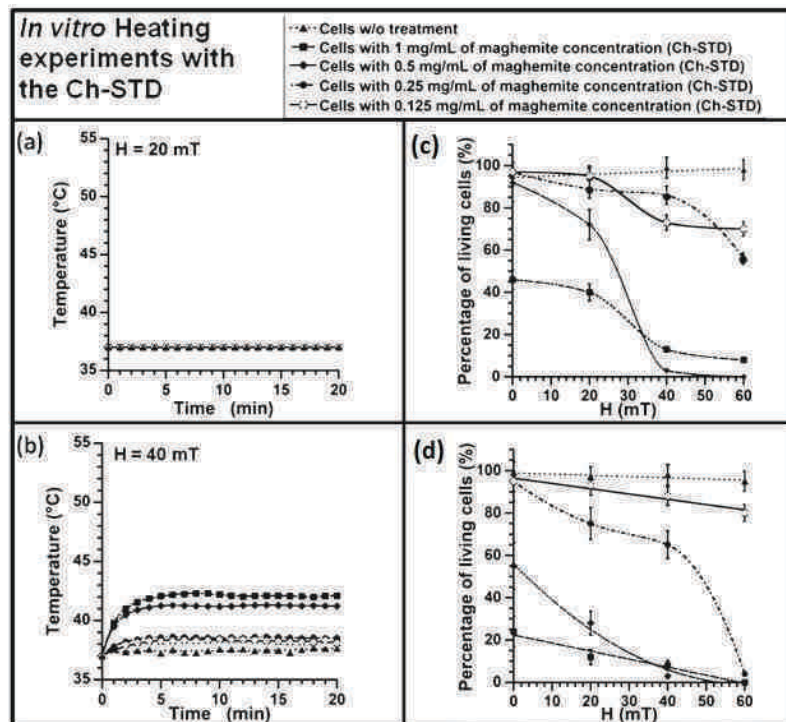


Figure I. 39 Résultats présentés ici pour différentes concentrations en matériel magnétique. (a-b) Mesures de température *in situ* pour deux conditions de champ: 20 mT et 40 mT. (c-d) Pourcentage de survie cellulaire en fonction de l'amplitude du champ appliqué. La période d'incubation est de 24h pour (c) et 72h pour (d). (Figures tirées de [25])

D'autres travaux mettent également en évidence l'efficacité du traitement de cellules tumorales par hyperthermie magnétique en relation avec une hausse de température dans le milieu cellulaire (voir la revue de Gerardo F. Goya *et al.* [40]).

2.2.2 Traitement hyperthermique sans augmentation de température

Nous présentons ici les résultats d'expériences équivalentes à celles du sous chapitre précédent mais pour lesquelles aucune hausse de température macroscopique n'a été mesurée. Ci-dessous (Figure I. 40) des résultats de survies cellulaires comparant l'efficacité de trois diamètres de nanoparticules de magnétite sont présentés [41]. Les cellules en suspension sont exposées pendant 15 minutes dans une bobine à 373 kHz et 14 kA/m.

Les mesures d'échauffement des nanoparticules ont été réalisées dans les mêmes conditions de champ. On observe pour ces trois lots de particules que le SAR augmente avec la taille avec de biens meilleurs résultats pour les particules de 16 nm. Les résultats sur la mort cellulaire en Figure I. 40(b) suivent la même tendance, et ce quelle que soit la concentration de nanoparticules magnétiques. Dans tous les cas, aucune hausse de

température du milieu n'est détectée. Ainsi, au maximum de concentration, on a une mortalité d'environ 60% pour les nanoparticules de 16 nm, ce qui est bien plus important que les 5% et 25% pour les nanoparticules de 12 nm et 13 nm respectivement. Il est intéressant de noter qu'il semble y avoir un palier en concentration au-dessus duquel l'efficacité reste constante.

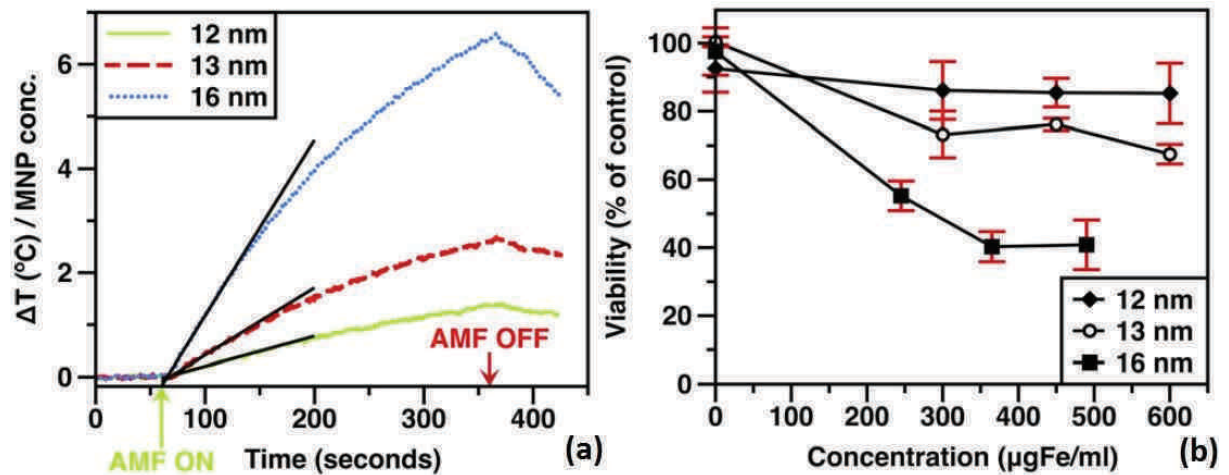


Figure I. 40(a) Courbes d'échauffements normalisées pour les échantillons de 12 nm, 13 nm et 16 nm dans l'eau déminéralisée. (b) Résultats de survie cellulaire utilisant les trois lots de particules précédents. (Figure tirées de [41])

Autre exemple, avec l'une des nombreuses études menées sur le sujet par l'équipe de G. F. Goya [40], [42]. L'influence de l'amplitude de champ et du temps d'exposition sur la survie de cellules dendritiques en suspension est étudiée. Les cellules dendritiques font partie du système immunitaire, leur principale fonction étant de capter et apprêter les antigènes. Après incubation d'une nuit, les cellules sont lavées pour éliminer les particules non assimilées. Elles sont ensuite soumises à un champ magnétique de fréquence $f = 260$ kHz en variant les paramètres d'amplitudes et de temps d'exposition comme le montre la Figure I. 41.

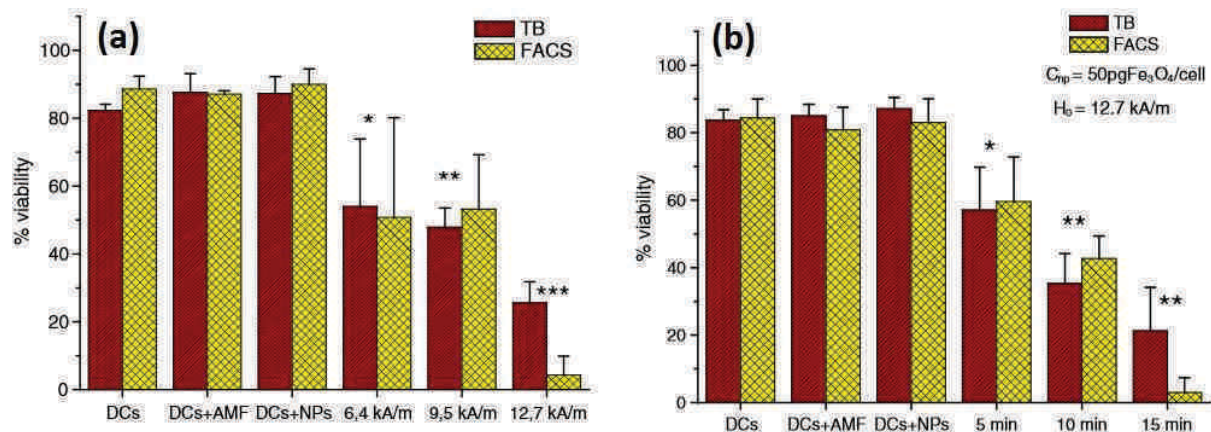


Figure I. 41 Résultats de mort cellulaire mesurée 15 minutes après exposition au bleu de trypan (noté TB) et 3-4 heures après exposition par FACS. Les suspensions ont été incubées avec 50 pg(Fe_3O_4)/cellule puis lavées. Chaque expérience est appuyée par des contrôles: cellules sans champ sans nanoparticules (noté DCs), cellules avec champ sans nanoparticules (noté DCs+AMF), cellules sans champ avec nanoparticules (DCs+NPs). Etudes de l'influence (a) de l'amplitude de champ appliqué pendant 15 minutes, (b) du temps d'application du champ à 12,7 kA/m. (Figures tirées de [43])

Les résultats de survie cellulaire ont été obtenus par deux techniques, le FACS 4h après exposition et la révélation au bleu de trypan (noté TB sur la figure) qui colorie en bleu les cellules mortes grâce à la perméabilité de leurs membranes, 15 minutes après exposition. Les résultats expérimentaux sont appuyés par des contrôles de survie de cellules: sans particules et sans champ, sans particules et avec champ et avec particules et sans champ. La Figure I. 41 met en lumière l'influence de l'amplitude du champ magnétique. La hausse de l'amplitude de 6,4 kA/m à 12,7 kA/m a pour effet de baisser la viabilité cellulaire de 55% à 25%. Pour un temps plus long, on observe environ 5% de survie à 12,7 kA/m. A même concentration, la Figure I. 41 compare les résultats à différents temps d'exposition au champ magnétique. Comme on peut le voir, seulement 10 minutes de champ magnétique sont nécessaires pour tuer environ 50% des cellules (par rapport aux 80-85% des contrôles). A noter que la différence entre les deux méthodes de mesure n'est pas significative pour des temps de 5 et 10 minutes. Par contre, pour les conditions les plus extrêmes de cette expérience (15 minutes à 12,7 kHz), un temps d'attente après exposition plus long implique une mortalité plus importante. Les auteurs précisent que, là encore, la température des cultures cellulaires est restée constante au long des expériences.

Nous venons de voir que certains travaux montrent une mort cellulaire due à un traitement d'hyperthermie magnétique mais sans élévation de température macroscopique (voir également les travaux cités dans la revue de Gerardo F. Goya *et al.* [40]). Ces résultats

diffèrent du postulat de base qu'une élévation de température à 43°C du milieu est nécessaire pour tuer les cellules. Pour la suite, il est nécessaire d'avoir une vue des mécanismes de mort cellulaire provoqués par hyperthermie de nanoparticules magnétiques et ainsi avoir une meilleure compréhension de ce traitement.

3 Catalyse de chaîne carbonée par nanoparticules magnétiques

La catalyse de réaction chimique est un pan de recherche qui représente un grand intérêt industriel. En se basant sur l'échauffement de nanoparticules soumises à un champ magnétique alternatif, un nouveau mode de catalyse par induction est envisageable. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur la réaction de Fischer-Tropsch qui conduit à la production d'hydrocarbure.

3.1 Réaction Fischer-Tropsch

La réaction Fischer-Tropsch (FT) est un procédé catalytique de synthèse d'hydrocarbures à partir de monoxyde de carbone et de dihydrogène [44]. Il est utilisé pour la conversion énergétique du charbon, comme en Allemagne ou en Afrique du sud par exemple, où les réserves en charbon sont excédentaires et celles en hydrocarbures déficitaires. Le charbon devrait devenir la plus grande source de conversion en fuels via, par exemple, la réaction FT. Les enjeux concernant l'optimisation du procédé sont donc d'un intérêt majeur.

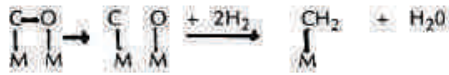
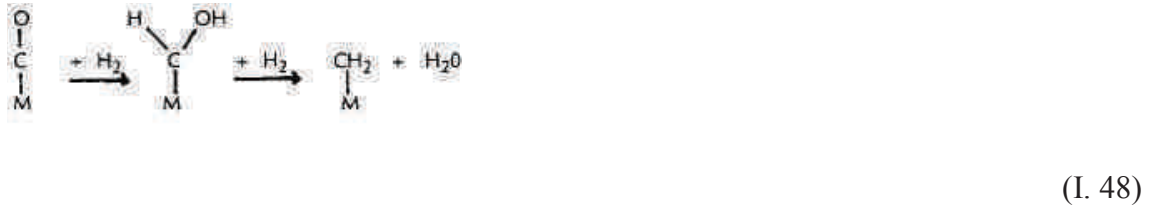
3.1.1 Principe de réaction FT et catalyseurs

Le procédé FT est une réaction catalytique. Les catalyseurs les plus courants sont le Fer, le Cobalt, le Ruthénium, le Nickel, tous des métaux de transition. Le Nickel n'est cependant pas le meilleur choix car il favorise la formation de méthane CH_4 , soit la plus petite chaîne carbonée existante. Au cours des nombreuses études sur le procédé FT, beaucoup de mécanismes chimiques ont été proposés pour expliquer la formation de chaînes carbonées.

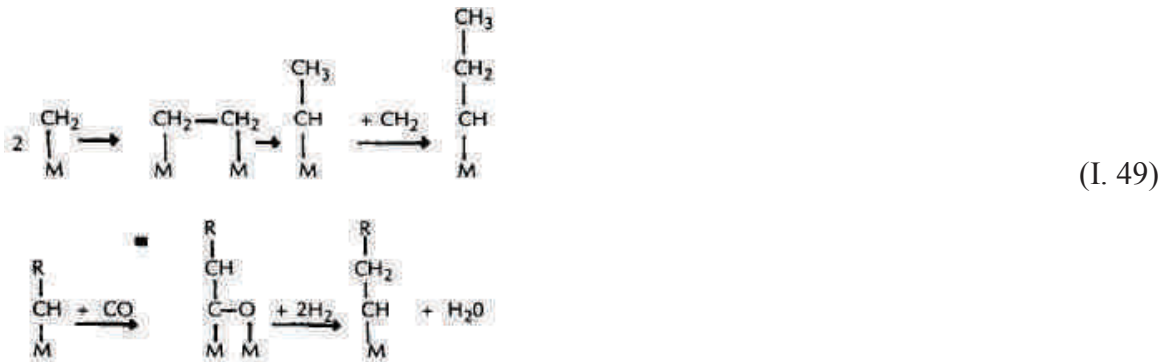
La première étape est la liaison du CO avec la surface du catalyseur métallique, qui peut se faire de différentes manières:



Par la suite, la réaction avec le dihydrogène et la formation du premier CH₂ peut se passer (plusieurs possibilités) comme ceci:



Enfin, l'élongation des chaînes carbonées peut également suivre différentes voies:



Suite à ces différentes étapes, la chaîne carbonée est ensuite détachée de la surface du catalyseur par différents mécanismes probables qui changent également la terminaison de la molécule finale (alcane, acide carboxylique, alcool, aldéhyde).

Cette liste de scénarios possibles est non exhaustive et il est probable que ces réactions ne se produisent pas toutes. Il ne fait aucun doute que la catalyse FT est un processus hétérogène et que par conséquent un grand nombre d'espèces intermédiaires et activées peuvent jouer un rôle dans la synthèse finale.

Le choix du catalyseur est aussi primordial pour la sélectivité des produits FT. Le cobalt métallique favorise l'hydrogénation des réactifs et conduit donc plus facilement à des chaînes longues qu'à des chaînes de carbones insaturées. Les catalyseurs sont de tailles inférieures à 100 μm . Des catalyseurs plus petits peuvent être envisagés pour augmenter la surface de contact avec les réactifs.

Tous les types de catalyseurs subissent une dégradation systématique au fil des réactions qui baisse l'activité, contraignant à renouveler les catalyseurs. Un travail d'optimisation est nécessaire pour que les catalyseurs aient un rendement maximum dans les réacteurs.

3.1.2 Influence de la température

La température du réacteur FT régule la sélectivité des espèces produites. Les températures élevées augmentent la probabilité d'hydrogénation des chainons CH_2 et baisse leur concentration à la surface du catalyseur. Ce surplus d'hydrogénation empêche l'élongation de la chaîne carbonée et se traduit par une augmentation de production de CH_4 indésirable. En accord avec la thermodynamique, la formation de CH_4 est plus favorisée que les chaînes d'hydrocarbures plus longues. De plus, un fonctionnement de la réaction FT à température trop élevée engendre un dépôt de carbone sur le catalyseur, diminuant ainsi drastiquement son efficacité. Un contrôle de la température dans la chambre de réaction FT ainsi qu'à la surface du catalyseur (dans le cas où celui fait office de source de chaleur) est donc primordial pour orienter la sélectivité de la production.

3.2 Réactions chimiques activées par induction magnétique

L'utilisation de catalyseurs comme source de chaleur par induction magnétique a été étudiée et approfondie par l'équipe d'Andreas Kirsching [45]–[48]. Ils ont en effet démontré l'efficacité de ce procédé pour différentes réactions chimiques classiques et utilisant et comparant différents catalyseurs et différentes caractéristiques de champ magnétique. L'idée était de créer une réaction en flux continu et d'analyser les produits directement en fin de réaction comme schématisé en *Figure I. 42*.

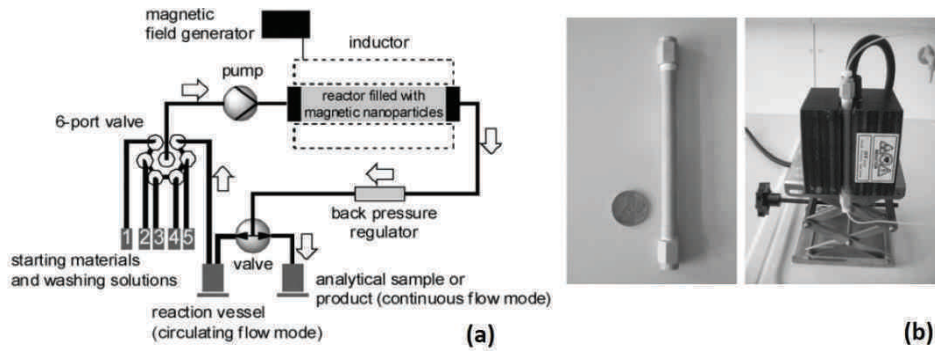


Figure I. 42(a) Schéma du montage complet à flux continu. (b) A gauche le réacteur (en verre ou en polymère), à droite l'inducteur contenant le réacteur. (Figures tirées de [45], [46])

Le réacteur est rempli de catalyseurs: des nanoparticules d'oxydes de fer de 10 à 40 nm de diamètre entourées de SiO_2 (voir Figure I. 43). Cette couche protectrice permet aux particules d'éviter les attaques chimiques de réactants et empêche une éventuelle coalescence de NPs due à la génération de chaleur. Les auteurs ont comparé l'efficacité de plusieurs catalyseurs (billes de Fer, etc.) du point de vue de la génération de chaleur (Figure I. 43). Il apparait que les oxydes de fer sont plus avantageux énergétiquement. Il faut néanmoins préciser que les nanoparticules ont une température locale plus élevée que la température macroscopique mesurée avec un pyromètre [46]. La surface en silice des particules peut également être fonctionnalisée. Dans le cadre de ces travaux, des particules de palladium en surface ont montré de bonnes propriétés catalytiques en flux. Ces catalyseurs sont réutilisables plusieurs fois sans dégradation.

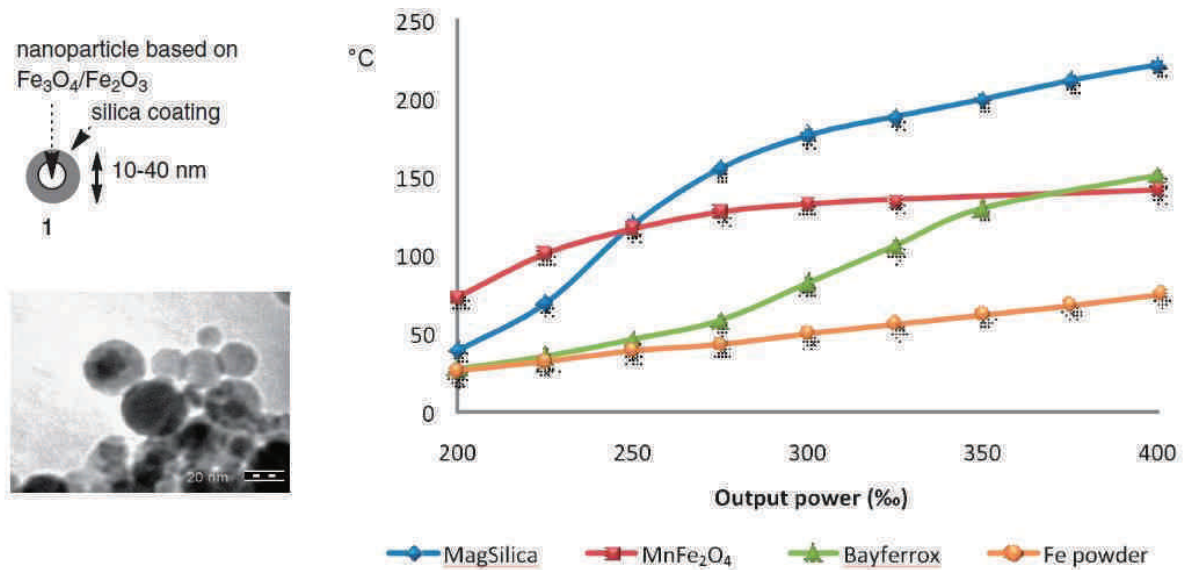


Figure I. 43(à gauche) Schéma de structure des nanoparticules MagSilica avec le cœur magnétique d'oxydes de fer et la coquille de silice. Cliché TEM des nanoparticules MagSilica. (à droite) Comparaison de puissances de chauffe des différents catalyseurs en fonction de la puissance de sortie du générateur. (Figures tirées de [46])

La catalyse de réactions chimiques par induction s'est révélée plus efficace dans beaucoup de cas que des techniques de génération de micro-ondes, grâce probablement à une température de surface plus élevée [46]. De plus, une plus grande diversité de nanoparticules magnétiques et de catalyseurs peut être étudiée pour améliorer la sélectivité d'une réaction et augmenter son rendement. Enfin, la surface des nanoparticules a la particularité unique par rapport aux méthodes classiques de catalyse de monter en température de façon quasi instantanée. Pour exemple, nous présentons ci-dessous quelques exemples de réactions utilisant les MagSilica comme catalyseurs.

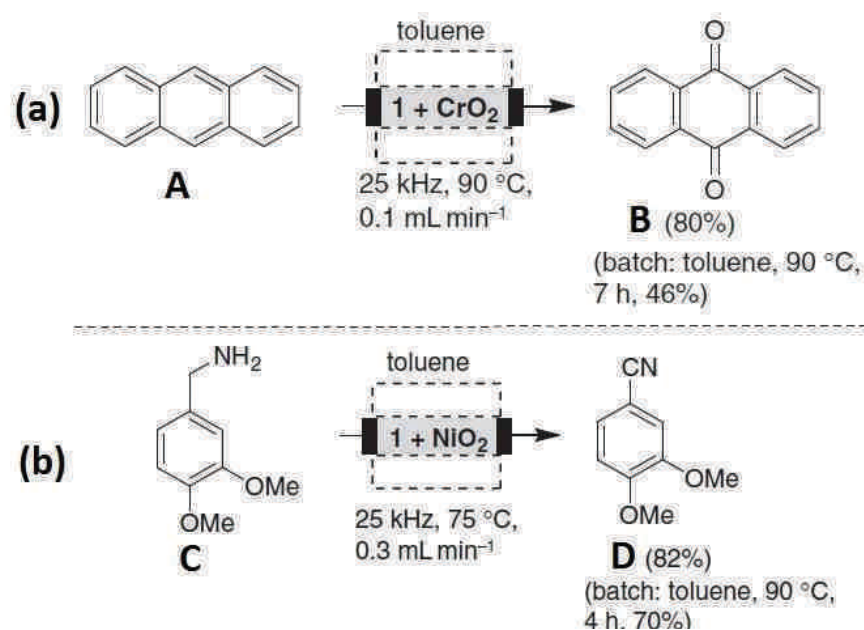


Figure I. 44 Exemples de réactions chimiques catalysées par le composé MagSilica (noté 1). La température de réaction, la fréquence appliquée par l'inducteur ainsi que le débit de réactif sont précisés sous le schéma des réacteurs. Le rendement final et le temps nécessaire au processus sont indiqués sous les produits. (a) Oxydation de l'antracène (A) catalysée par 1 en présence de CrO₂. (b) Oxydation du benzyle amine (C) en nitrile (D) catalysé par 1 en présence de NiO₂. (Figure tirées de [46])

Les exemples ci-dessus sont des réactions d'oxydations catalysés par des nanoparticules MagSilica mixées avec des oxydants solides. Une liste plus complète de réactions étudiées par l'équipe d'Andreas Kirschning est disponible [45]–[48]. Les températures atteintes dans le réacteur peuvent varier de 70°C à 140°C pour des réactions catalysées par des nanoparticules magnétiques. Cette technique est adaptable à beaucoup de réactions et représente donc un grand intérêt pour la recherche et l'industrie. Les travaux présentés traitent exclusivement de réactions catalysées en phase liquide. Pour l'heure, aucun

exemple de catalyse par hyperthermie magnétique de nanoparticules en phase gazeuse n'a été publié.

- [1] L.-M. Lacroix, "Nanoparticules de fer de taille contrôlée pour l'hyperthermie : Synthèse par voie organométallique, caractérisations magnétiques et mesures de puissance dissipée," INSA Toulouse, LPCNO, 2008.
- [2] C. Kittel, "Physical Theory of Ferromagnetic Domain," *Rev. Mod. Physics*, vol. 21, no. 4, p. 51, 1949.
- [3] J. L. Dormann, "Le phénomène de superparamagnétisme," *Rev. Phys. Appliqué*, p. 17, 1981.
- [4] E. C. Stoner and E. P. Wohlfarth, "A Mechanism of Magnetic Hysteresis in Heterogeneous Alloys," *Philos Trans R Soc Lond.*, vol. 240, no. 599, p. 44, 1948.
- [5] J. Carrey, B. Mehdaoui, and M. Respaud, "Simple models for dynamic hysteresis loops calculation: Application to hyperthermia optimization," *J. Appl. Phys.*, vol. 109, no. 083921, p. 17, 2010.
- [6] M. Respaud, "Magnetization process of noninteracting ferromagnetic cobalt nanoparticles in the superparamagnetic regime: Deviation from Langevin law," *J. Appl. Phys.*, vol. 86, no. 556, p. 6, 1999.
- [7] C. Tannous and J. Alonso, "The Stoner-Wohlfarth of ferromagnetism," *Eur. J. Physics*, vol. 29, p. 13, 2008.
- [8] J. J. Lu, H. L. Huang, and I. Klik, "Field orientations and sweep rate effects on magnetic switching of Stoner–Wohlfarth particles," *J. Appl. Phys.*, vol. 76, no. 3, p. 1726, 1994.
- [9] H. Pfeiffer, "Relaxation Behaviour of Magnetic Particle Assemblies due to Thermal Fluctuations," *Phys. Status Solidi A*, vol. 120, no. 1, pp. 233–245, juillet 1990.
- [10] J. Garcia-Otero and A. J. Garcia-Bastiva, "Influence of temperature on the coercive field of non-interacting fine magnetic particles.pdf," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 189, p. 7, 1998.
- [11] N. A. Usov and Y. B. Grebenshchikov, "Hysteresis loops of an assembly of superparamagnetic nanoparticles with uniaxial anisotropy.pdf," *J. Appl. Phys.*, vol. 106, no. 023917, p. 11, 2009.
- [12] Y. L. Raikher, V. I. Stepanov, and R. Perzynski, "Dynamic hysteresis of a superparamagnetic nanoparticle.pdf," *Phys. B*, vol. 343, p. 5, 2004.
- [13] R. Hergt, W. Andra, C. G. d' Ambly, I. Hilger, W. A. Kaiser, U. Richter, and H. G. Schmidt, "Physical Limits of Hyperthermia Using Magnetite Fine Particles," *IEEE Trans. Magn.*, vol. 34, no. 5, p. 10, 1998.
- [14] R. Hergt and S. Dutz, "Magnetic particle hyperthermia - biophysical limitations of a visionary tumour therapy," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 311, p. 6, 2006.
- [15] R. Hergt, S. Dutz, and M. Zelsberger, "Validity limits of the Néel relaxation model of magnetic nanoparticles for hyperthermia.pdf," *Nanotechnology*, vol. 21, no. 015706, p. 5, 2009.
- [16] B. Mehdaoui, A. Meffre, L.-M. Lacroix, J. Carrey, S. Lachaize, M. Respaud, M. Gougeon, and B. Chaudret, "Magnetic anisotropy determination and magnetic hyperthermia properties of small Fe nanoparticles in the superparamagnetic regime," *ET J.*, vol. 107, no. 09A324, p. 3, 2010.
- [17] R. Hiergeist, W. Andrä, N. Buske, R. Hergt, I. Hilger, U. Richter, and W. Kaiser, "Application of magnetite ferrofluids for hyperthermia," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 201, p. 3, 1999.
- [18] E. Snoeck, C. Gattel, L.-M. Lacroix, T. Blon, S. Lachaize, J. Carrey, M. Respaud, and B. Chaudret, "Magnetic Configurations of 30 nm Iron Nanocubes Studied by Electron Holography.pdf," *Nano Lett.*, vol. 8, p. 4293, 2008.
- [19] N. A. Usov and B. Y. Liubimov, "Dynamics of magnetic nanoparticle in a viscous liquid: Application to magnetic nanoparticle hyperthermia," *J. Appl. Phys.*, vol. 112, no. 2, p. 023901, 2012.

- [20] C. L. Dennis, A. J. Jackson, J. A. Borchers, P. J. Hoopes, R. Strawbridge, A. R. Foreman, J. van Lierop, C. Grüttner, and R. Chantrell, “Nearly complete regression of tumors via collective behavior of magnetic nanoparticles in hyperthermia,” *Nanotechnology*, vol. 20, no. 395103, 2009.
- [21] D. Serantes, D. Baldomir, C. Martinez-Boubeta, K. Simeonidis, M. Angelakeris, E. Natividad, M. Castro, A. Mediano, D.-X. Chen, A. Sanchez, L. Balcells, and B. Martínez, “Influence of dipolar interactions on hyperthermia properties of ferromagnetic particles,” *J. Appl. Phys.*, vol. 108, no. 7, p. 073918, 2010.
- [22] B. Mehdaoui, A. Meffre, J. Carrey, S. Lachaize, L.-M. Lacroix, M. Gougeon, B. Chaudret, and M. Respaud, “Optimal Size of Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia: A Combined Theoretical and Experimental Study,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 21, no. 23, pp. 4573–4581, décembre 2011.
- [23] D. Serantes, K. Simeonidis, M. Angelakeris, O. Chubykalo-Fesenko, M. Marciello, M. del P. Morales, D. Baldomir, and C. Martinez-Boubeta, “Multiplying Magnetic Hyperthermia Response by Nanoparticle Assembling,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 118, no. 11, pp. 5927–5934, Mar. 2014.
- [24] C. Martinez-Boubeta, K. Simeonidis, A. Makridis, M. Angelakeris, O. Iglesias, P. Guardia, A. Cabot, L. Yedra, S. Estradé, F. Peiró, Z. Saghi, P. A. Midgley, I. Conde-Leborán, D. Serantes, and D. Baldomir, “Learning from Nature to Improve the Heat Generation of Iron-Oxide Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia Applications,” *Sci. Rep.*, vol. 3, avril 2013.
- [25] E. Alphandéry, S. Faure, O. Seksek, F. Guyot, and I. Chebbi, “Chains of Magnetosomes Extracted from AMB-1 Magnetotactic Bacteria for Application in Alternative Magnetic Field Cancer Therapy,” *ACS Nano*, vol. 5, no. 8, pp. 6279–6296, Aug. 2011.
- [26] B. Mehdaoui, R. P. Tan, A. Meffre, J. Carrey, S. Lachaize, B. Chaudret, and M. Respaud, “Increase of magnetic hyperthermia efficiency due to dipolar interactions in low-anisotropy magnetic nanoparticles: Theoretical and experimental results,” *Phys. Rev. B*, vol. 87, no. 17, May 2013.
- [27] O. Lunov, V. Zablotskii, J. M. Pastor, J. I. Pérez-Landazábal, C. Gómez-Polo, T. Syrovets, and T. Simmet, “Thermal Destruction on the Nanoscale: Cell Membrane Hyperthermia with Functionalized Magnetic Nanoparticles,” in *AIP Conference Proceedings*, 2010, vol. 1311, pp. 288–292.
- [28] P. Keblinski, D. G. Cahill, A. Bodapati, C. R. Sullivan, and T. A. Taton, “Limits of localized heating by electromagnetically excited nanoparticles,” *J. Appl. Phys.*, vol. 100, no. 5, p. 054305, Sep. 2006.
- [29] G. Chen, “Nonlocal and Nonequilibrium Heat Conduction in the Vicinity of Nanoparticles,” *J. Heat Transf.*, vol. 118, no. 3, pp. 539–545, août 1996.
- [30] G. F. Goya, J. Lima, A. D. Arelaro, T. E. Torres, H. R. Rechenberg, L. Rossi, C. Marquina, and M. R. Ibarra, “Magnetic Hyperthermia with Fe₃O₄ nanoparticles: the Influence of Particle Size on Energy Absorption,” *IEEE Trans. Magn.*, vol. 44, no. 11, pp. 4444–4447, Nov. 2008.
- [31] S. Noh, W. Na, J. Jang, J.-H. Lee, E. J. Lee, S. H. Moon, Y. Lim, J.-S. Shin, and J. Cheon, “Nanoscale Magnetism Control via Surface and Exchange Anisotropy for Optimized Ferrimagnetic Hysteresis,” *Nano Lett.*, vol. 12, no. 7, pp. 3716–3721, juillet 2012.
- [32] C. Martinez-Boubeta, K. Simeonidis, D. Serantes, I. Conde-Leborán, I. Kazakis, G. Stefanou, L. Peña, R. Galceran, L. Balcells, C. Monty, D. Baldomir, M. Mitrakas, and M. Angelakeris, “Adjustable Hyperthermia Response of Self-Assembled Ferromagnetic Fe-

- MgO Core-Shell Nanoparticles by Tuning Dipole-Dipole Interactions,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 22, no. 17, pp. 3737–3744, Sep. 2012.
- [33] L. Polo-Corrales and C. Rinaldi, “Monitoring iron oxide nanoparticle surface temperature in an alternating magnetic field using thermoresponsive fluorescent polymers,” *J. Appl. Phys.*, vol. 111, no. 7, p. 07B334, Apr. 2012.
- [34] J. Dong and J. I. Zink, “Taking the Temperature of the Interiors of Magnetically Heated Nanoparticles,” *ACS Nano*, vol. 8, no. 5, pp. 5199–5207, mai 2014.
- [35] A. Riedinger, P. Guardia, A. Curcio, M. A. Garcia, R. Cingolani, L. Manna, and T. Pellegrino, “Subnanometer Local Temperature Probing and Remotely Controlled Drug Release Based on Azo-Functionalized Iron Oxide Nanoparticles,” *Nano Lett.*, vol. 13, no. 6, pp. 2399–2406, Jun. 2013.
- [36] J. T. Dias, M. Moros, P. del Pino, S. Rivera, V. Grazú, and J. M. de la Fuente, “DNA as a Molecular Local Thermal Probe for the Analysis of Magnetic Hyperthermia,” *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 52, no. 44, pp. 11526–11529, Oct. 2013.
- [37] M. Creixell, A. C. Bohórquez, M. Torres-Lugo, and C. Rinaldi, “EGFR-Targeted Magnetic Nanoparticle Heaters Kill Cancer Cells without a Perceptible Temperature Rise,” *ACS Nano*, vol. 5, no. 9, pp. 7124–7129, Sep. 2011.
- [38] M. H. Lodish, M. A. Berk, P. Matsudaira, and J. Darnell, *Biologie moléculaire de la cellule*. De Boeck Supérieur, 2005.
- [39] D. Baba, Y. Seiko, T. Nakanishi, H. Zhang, A. Arakaki, T. Matsunaga, and T. Osaka, “Effect of magnetite nanoparticles on living rate of MCF-7 human breast cancer cells,” *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 95, pp. 254–257, juin 2012.
- [40] G. F. Goya, L. Asín, and M. R. Ibarra, “Cell death induced by AC magnetic fields and magnetic nanoparticles: current state and perspectives,” *Int. J. Hyperth. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperth. Group*, vol. 29, no. 8, pp. 810–818, Dec. 2013.
- [41] A. P. Khandhar, R. M. Ferguson, J. A. Simon, and K. M. Krishnan, “Enhancing cancer therapeutics using size-optimized magnetic fluid hyperthermia,” *J. Appl. Phys.*, vol. 111, no. 7, p. 07B306, 2012.
- [42] G. Goya, Grazu, Silber, Moros, Asin, Torres, Marquina, and Ibarra, “Application of magnetically induced hyperthermia in the model protozoan *Crithidia fasciculata* as a potential therapy against parasitic infections,” *Int. J. Nanomedicine*, p. 5351, Oct. 2012.
- [43] L. Asín, M. R. Ibarra, A. Tres, and G. F. Goya, “Controlled Cell Death by Magnetic Hyperthermia: Effects of Exposure Time, Field Amplitude, and Nanoparticle Concentration,” *Pharm. Res.*, vol. 29, no. 5, pp. 1319–1327, May 2012.
- [44] M. E. Dry, “Practical and theoretical aspects of the catalytic Fischer-Tropsch process,” *Appl. Catal. Gen.*, vol. 138, no. 2, pp. 319–344, mai 1996.
- [45] S. Ceylan, C. Friese, C. Lammel, K. Mazac, and A. Kirschning, “Inductive Heating for Organic Synthesis by Using Functionalized Magnetic Nanoparticles Inside Microreactors,” *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 47, no. 46, pp. 8950–8953, Nov. 2008.
- [46] S. Ceylan, L. Coutable, J. Wegner, and A. Kirschning, “Inductive Heating with Magnetic Materials inside Flow Reactors,” *Chem. – Eur. J.*, vol. 17, no. 6, pp. 1884–1893, février 2011.
- [47] A. Kirschning, L. Kupracz, and J. Hartwig, “New Synthetic Opportunities in Miniaturized Flow Reactors with Inductive Heating,” *Chem. Lett.*, vol. 41, no. 6, pp. 562–570, 2012.
- [48] J. Hartwig, S. Ceylan, L. Kupracz, L. Coutable, and A. Kirschning, “Heating under High-Frequency Inductive Conditions: Application to the Continuous Synthesis of the Neurolepticum Olanzapine (Zyprexa),” *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 52, no. 37, pp. 9813–9817, Sep. 2013.

Chapitre II

*Développement d'instrumentation pour
l'optimisation de nanoparticules d'oxydes
de Fer et l'application à des systèmes
biologiques – Projet Multifun*

<i>1</i>	<i>Conception d'un électroaimant à large entrefer :</i>	<i>II-1</i>
1.1	Banc de mesure d'hyperthermie du LPCNO.	II-1
1.2	Cahier des charges et conception de l'électroaimant à large entrefer :	II-3
1.3	Fonctionnement et démarches expérimentales	II-8
1.4	Conclusion et perspectives	II-17
<i>2</i>	<i>Bobine de mesures de cycles d'hystérésis hautes fréquences</i>	<i>II-18</i>
<i>3</i>	<i>Synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer par voie aqueuse – Optimisation pour l'hyperthermie magnétique</i>	<i>II-20</i>
<i>4</i>	<i>Conclusion</i>	<i>II-21</i>

Article II-1

Article II-2

Ma bourse de thèse a été financée dans le cadre du projet Multifun (*Multifunctional nanotechnology for selective detection and treatment of cancer*), fondé par le *European Community's Seventh Framework Programm*. Ce chapitre est dédié aux principaux résultats obtenus par le LPCNO dans le cadre de ce projet.

Le projet Multifun a pour but de développer et valider de nouvelles nano-plateformes de diagnostic et de traitement de tumeurs cancéreuses du sein et du pancréas. Ces nano-plateformes ont pour base des nanoparticules d'oxydes de fer qui seront utilisées en tant qu'agents de contraste IRM et inducteurs d'hyperthermie magnétique. Une étude poussée de la fonctionnalisation de leurs surfaces permet d'assurer un ciblage de cellules cancéreuses par greffage de peptides et un transport d'agents chimiothérapeutiques. L'impact de ce traitement doit ensuite être étudié sur différents systèmes biologiques, *in vitro* mais également *in vivo*. En parallèle, la toxicité des nanoparticules ainsi que leur biodistribution sont étudiées *in vivo* par détection de matériel magnétique résiduel dans les différents organes des modèles animaux (souris, rats et cochons).

La première étape à la base de toute l'étude est l'optimisation des nanoparticules. Elles doivent avoir des tailles de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres, et être stable en suspension colloïdale dans l'eau. Leur efficacité en hyperthermie doit également être maximale. Les protocoles de synthèses sélectionnés sont ensuite transmis à des entreprises spécialisées dans la synthèse de larges quantités de nanoparticules. La mesure des SARs et des cycles d'hystérésis haute-fréquence des nanoparticules a été confiée au LPCNO. Nous avons donc étudié en relation avec les équipes partenaires le potentiel hyperthermique d'échantillons provenant de différentes synthèses et de différents laboratoires ou entreprises. L'application d'un traitement d'hyperthermie magnétique sur des systèmes biologiques nécessite également du développement d'instrumentation adapté, que le LPCNO a également pris en charge. L'objectif était de développer un système générant un champ homogène et ne nécessitant pas de refroidissement à l'eau.

Nous présentons dans ce chapitre le développement d'un inducteur à large entrefer adaptable aux conditions de traitements sur systèmes biologiques. Par la suite, nous exposons la conception d'un système de mesure de cycles d'hystérésis hautes fréquences ainsi que son application dans l'optimisation du SAR de nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées par voie aqueuse.

1 Conception d'un électroaimant à large entrefer :

L'hyperthermie magnétique générée par induction se mesure traditionnellement par le SAR qui est considéré comme grandeur de référence. La plupart du temps, la génération du champ est assurée par un inducteur similaire à ceux trouvés dans les fours à induction : il s'agit d'un tube de cuivre enroulé de manière à former une bobine de quelques spires, et quand lequel circule à la fois un très fort courant (jusqu'à 30000 A) et de l'eau de refroidissement. Les puissances dissipées peuvent varier de quelques kW à près de 40 kW suivant les volumes de métaux à travailler (jusqu'à plusieurs dizaines de tonnes). De nombreux bancs de ce type sont présents dans les laboratoires travaillant sur l'hyperthermie magnétique.

Depuis 2008, le LPCNO dispose d'un électroaimant à fréquence de résonance ajustable [1]. L'avantage d'une technologie électroaimant est qu'il n'est pas obligatoire de refroidir l'inducteur par circulation d'eau car les puissances mises en jeu peuvent parfois être évacuées par une circulation d'air. De plus l'amplitude de champ magnétique est plus homogène dans l'entrefer de l'électroaimant que dans une bobine. L'électroaimant disponible dans notre laboratoire a cependant été conçu pour l'étude d'échantillons de nanoparticules dispersées dans des tubes de faibles diamètres : il dispose d'un entrefer de largeur 1 cm et d'une section de 3x3 cm. Dans le cadre du projet Multifun, nous devons développer un système adapté à l'application d'un champ magnétique sur boîtes de culture cellulaire et sur souris. Ainsi, pour garantir un champ homogène sur tout le volume d'exposition, nous avons dû concevoir un inducteur de type électroaimant à plus large entrefer et plus large section. Nous présentons ici avec un bref rappel, sa conception et son étude.

1.1 Banc de mesure d'hyperthermie du LPCNO.

Nous présentons en préambule l'électroaimant développé préalablement à ma thèse. Le principe général de ce montage est de pouvoir ajuster en amont la fréquence de résonance souhaitée. Cet ajustement est possible avec un jeu de condensateur dont les valeurs déterminent la fréquence de travail du circuit. Le circuit est schématisé en *Figure II. 1*.

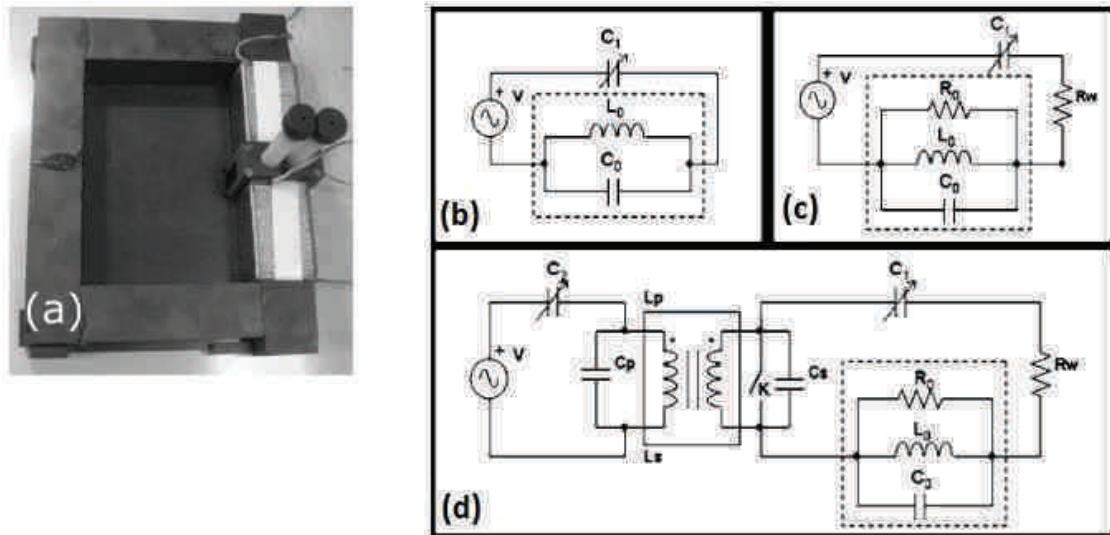


Figure II. 1 [1] (a) Photographie de l'électroaimant. L'électroaimant est décrit avec (b) un modèle inductance / capacité, C_1 est une capacité variable, (c) avec un modèle RLC en parallèle avec R_w la résistance des fils. (d) Schéma complet du montage avec électroaimant et transformateur "maisons".

L'électroaimant (photo Figure II. 1(a), schématisé en Figure II. 1(c)), est composé de ferrites assemblées (Ni-Zn, Epsos N27) sur un support PVC avec un entrefer de 1,1 cm.

Les deux bobines visibles sur la photo sont connectées en parallèles, ce qui permet de diviser le courant de moitié dans chaque bobine tout en doublant le nombre de tours. Le ratio champ magnétique/courant est donc inchangé, mais l'impédance résiduelle s'en retrouve légèrement diminuée ([1], [2]). Le GBF est relié à un amplificateur de courant HSA 4201 délivrant un courant alternatif maximum de $\pm 2,8A$. Pour pouvoir augmenter l'amplitude maximale du champ et donc étudier le SAR sur une plus large gamme, Lacroix *et al.* ont conçu un transformateur en utilisant les mêmes ferrites que l'électroaimant, et qui permet de multiplier le courant dans la boucle secondaire par 12. Une boîte de capacité réglable permet de régler finement la résonance de la boucle primaire (noté C_2). Quant à la boucle secondaire où circule un courant plus important, la résonance est réglée en variant le nombre de condensateur (100 nF, 2500V, 386 MMKP, VISHAY) en séries. La hausse de température est ensuite mesurée durant l'expérience par des sondes à fibre optique (Neoptics, Reflex4) insensibles aux champs magnétiques alternatifs. L'ensemble du dispositif nous permet de travailler à des fréquences comprises entre 6 kHz et 100 kHz pour des amplitudes de champs pouvant aller jusqu'à 60 mT. L'amplitude du champ magnétique présent dans l'entrefer est exprimée comme ceci:

$$B \approx \frac{\mu_0 N i}{l} \quad (\text{II. 1})$$

avec N le nombre de spires, i le courant et l la largeur de l'entrefer. Pour plus de détails sur les plages de fonctionnement, se reporter à [1], [2].

De nombreux résultats d'hyperthermie attestent de la fiabilité de ce banc d'expérimentation [3]–[5]. Dans le cadre d'une collaboration avec le *Departamento de Química Física Aplicada, (Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid)*, la puissance de chauffe de nanoparticules de cobalt ferrite CoFe_2O_4 de deux tailles (13 nm et 28 nm) synthétisées par voie électrochimique a été étudiée [6]. La *Figure II. 2* présente ces résultats pour les particules en fonction de l'amplitude du champ magnétique et de la fréquence. Les résultats complets de cette étude de Mazarío et al. sont disponibles en référence [6].

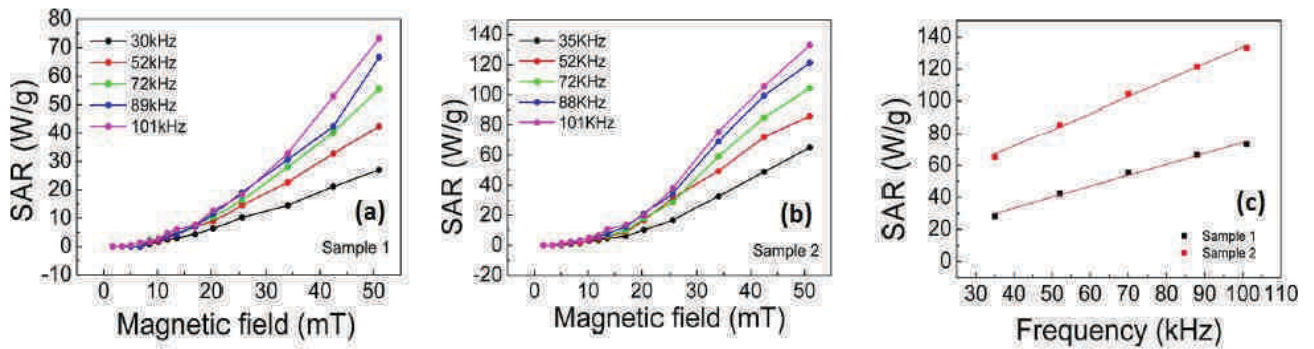


Figure II. 2 Mesures de SAR d'échantillons de CoFe_2O_4 , en fonction de l'amplitude du champ à différentes fréquences: (a) pour des nanoparticules de 13 nm, (b) pour des nanoparticules de 28 nm. (c) Mesures de SAR en fonction de la fréquence à 51 mT pour les deux échantillons.

Nous pouvons constater que le deuxième lot (*Sample 2*) présente de plus fortes valeurs de SAR et ce à toutes les fréquences. L'étude montre que le facteur de puissance (décrit en *Figure I. 1*) varie entre 2,26 et 2,40 pour l'échantillon 2 et de 1,61 à 1,97 pour l'échantillon 1 selon les fréquences. En accord avec des simulations réalisées dans la même étude, il est probable que l'échantillon 2 soit proche d'un état de transition vers une configuration magnétique multidomaine. Enfin, la *Figure II. 2(c)* montre une dépendance linéaire du SAR avec la fréquence du champ.

Les résultats montrés dans cette étude sont reproductibles, comme tous ceux cités dans d'autres travaux ([3]–[5], [7]) et qui utilisent ce banc de mesure de SAR.

1.2 Cahier des charges et conception de l'électroaimant à large entrefer :

Initialement, la contribution de l'équipe Nanomagnétisme du LPCNO prévoyait de sous-traiter la conception/production de l'inducteur à large entrefer. Néanmoins, compte tenu

de la complexité du problème et de nos premiers contacts avec des entreprises susceptibles de répondre, nous n'étions pas sûrs que notre appel d'offre soit couronné de succès. Nous avons donc décidé d'assurer nous-même la conception d'un prototype en parallèle, ce qui aurait constitué une solution de repli. Par la suite, la société Fives Celes (Lautenbach) a répondu à l'appel d'offre pour la livraison de cinq installations complètes d'application de champ magnétique haute-fréquence, mais en se basant sur une approche standard, basée sur des inducteurs constitués de tubes de cuivre refroidis à l'eau.

1.2.1 Cahier des charges

Le cahier des charges que nous avons élaboré en concertation avec nos partenaires européens était le suivant :

- i) **Un entrefer de 3 cm de largeur et une section de ferrite de 5 cm × 5 cm** pour prévoir l'expérimentation sur souris et sur boîte de Pétri. La manipulation d'une souris dans un espace comme celui-ci requiert son anesthésie et donc le maintien de son corps à température à l'aide d'une circulation d'eau dans un "matelas" sous l'animal pendant toute la durée du traitement.
- ii) **Une génération de champ** à fréquence variable jusqu'à 100 kHz avec une amplitude de champ maximum de 60 mT. Ce champ doit être homogène à 10% près sur toute la section de l'entrefer.
- iii) **Un système de refroidissement à air** et donc sans besoin de connecter l'inducteur à une circulation d'eau. Ce point rend l'utilisation du banc pratique pour nos partenaires dont les laboratoires ne sont pas forcément équipés. De plus la température au niveau de l'entrefer ne doit pas excéder 37°C durant tout le traitement.
- iv) **L'ensemble doit être sécurisé** électriquement pour tout expérimentateur n'ayant pas d'habilitation électrique, et permettre une utilisation aisée.

1.2.2 Conception de l'appareil

On présente ci-dessous en *Figure II. 3* l'appareillage final. La réalisation de cet inducteur peut être divisée en plusieurs étapes: l'inducteur lui-même, le système de refroidissement et la génération de courant AC à fréquence de résonance contrôlée.

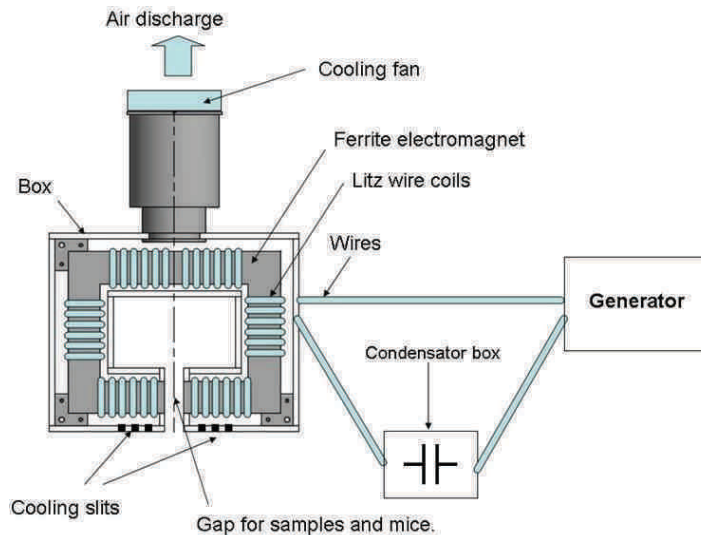


Figure II. 3 Représentation schématique de l'ensemble du dispositif.

1.2.2.1 L'inducteur

L'inducteur est la partie la plus délicate de l'installation. Une attention particulière a été apportée au choix du matériau de base: la structure en ferrite. En effet, celle-ci doit avoir une valeur d'aimantation à saturation suffisante, plus élevée que nos amplitudes de travail. Egalement, pour permettre le maintien de l'ensemble à température acceptable (et plus particulièrement celle de l'entrefer à 37°C), la ferrite doit présenter le minimum de pertes de chaleur spécifique aux paramètres de champ souhaités. En tenant compte de ces contraintes, le matériau choisi est le modèle I100/25/25-3C90 (Ferroxcube), qui facilite l'assemblage de la structure avec sa géométrie en pavée droit de dimensions 100×25×25 mm. L'aimantation à saturation atteint ≈ 350 mT à 100°C, à 10 kHz et 250 A/m (voir *Figure II. 4(a)*). La puissance dissipée est ≈ 20 kW/m³ à 100°C, à 100 kHz et pour 60 mT d'amplitude de champ (voir *Figure II. 4(b)*), ce qui représente pour notre électroaimant de 2375 cm³ de volume total une puissance théorique à évacuer de 47,5 W. Cette valeur ne reflète cependant pas les puissances dissipées dans notre inducteur. En effet, la génération d'un champ de 60 mT dans l'entrefer nécessite une induction dans la ferrite de bien plus forte amplitude en raison des fuites de

champ, notamment aux angles de l'électroaimant. De plus, l'échauffement du bobinage impose d'injecter une puissance électrique plus élevée pour obtenir les amplitudes de champ souhaitées. Nous verrons par la suite que les valeurs réelles de puissances mises en jeu sont bien plus importantes.

Le choix du fil de Litz est également un point d'étude crucial pour l'optimisation de l'installation. Nous détaillerons ce choix dans la partie 1.3.

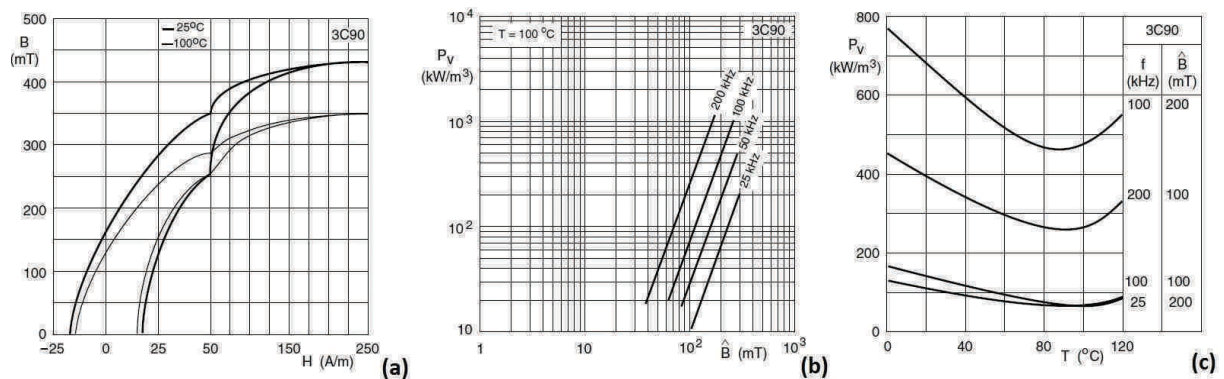


Figure II. 4 Caractéristiques du matériau 3C90 (Ferroxcube). (a) Cycles d'aimantation à 25°C et 100°C. (b) Pertes de puissance spécifique en fonction de l'amplitude maximale de champ appliqué pour plusieurs fréquences de travail. (c) Pertes de puissance spécifique pour différentes combinaisons de fréquences / amplitudes de champ en fonction de la température de la ferrite.

1.2.2.2 Le système de refroidissement

L'inducteur en ferrite génère de la chaleur en fonctionnement qu'il convient d'évacuer du système: pour assurer le fonctionnement de l'installation durant tout le traitement sans aucune dégradation, mais aussi pour assurer une température maximale de 37°C à l'entrefer. Le cahier des charges prévoit l'utilisation d'une extraction par air pour maintenir l'appareil à la bonne température de fonctionnement. Nous avons donc conçu un boîtier en plexiglass transparent (plan en *Figure II. 5*) pour nous permettre de garder le visuel sur l'inducteur. De plus le plexiglass est un matériau non magnétique et donc insensible aux champs magnétiques alternatifs. Pour la même raison, les vis et boulons de maintien et de fermeture de l'ensemble sont en acier inoxydable non magnétique. Le boîtier est en deux parties identiques, la partie supérieure pouvant être enlevée facilement en dévissant les quatre boulons de fermeture. Les cales en forme de L permettant de maintenir l'électroaimant dans le boîtier sont en PCV, plus résistant à haute température que le plexiglass. Le boîtier dispose de deux ouvertures au niveau de l'entrefer pour laisser passer les sections de ferrite et ainsi laisser disponible à l'expérimentateur toute la largeur de l'entrefer.

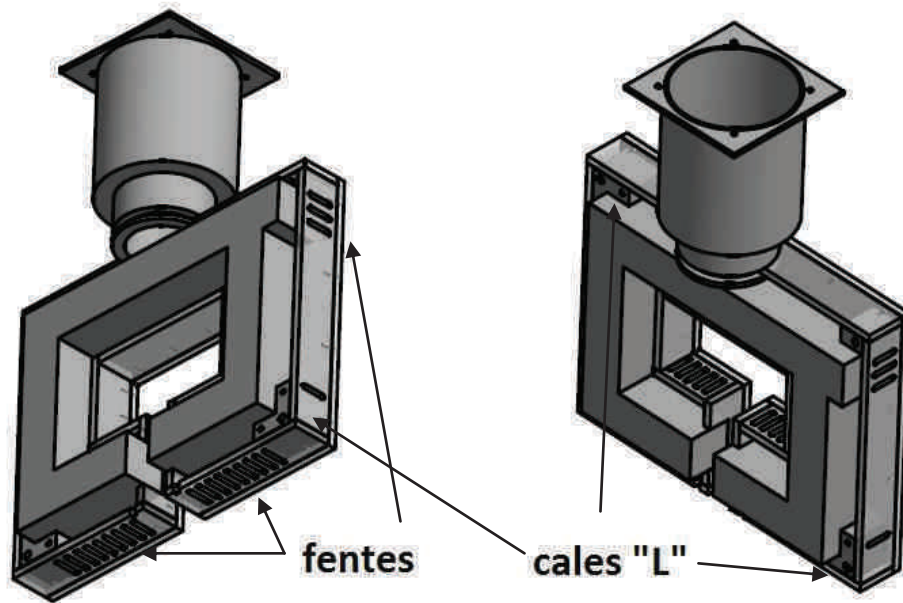


Figure II. 5 Représentation du boîtier avec le noyau de ferrite monté. La partie supérieure de l'enceinte est retirée

Le boîtier est équipé d'une sortie à l'opposé de l'entrefer pour intégrer à l'appareillage une aspiration d'air et assurer ainsi la ventilation de l'enceinte. Le tuyau en PVC permet d'éloigner de l'influence du champ tout type de composants métalliques (comme ceux présent dans un ventilateur par exemple). Des fentes verticales (que l'on peut apercevoir *Figure II. 5*) de 6 mm de largeur ont été prévues tout le long de l'enceinte en plexiglass pour assurer l'entrée d'air. Ces fentes peuvent s'obstruer pour concentrer le flux d'air dans les zones de l'inducteur à refroidir.

1.2.2.3 La génération de courant

La société Fives Celes a développé pour ce projet un prototype de générateur de courant alternatif (MS 3/100, S 4570), qui se règle automatiquement à la fréquence de résonance de l'inducteur. Il permet de remplacer par rapport à l'électro-aimant schématisé *Figure II. 1(d)* toute la boucle primaire et le transformateur. Ce générateur possède une batterie de 12 condensateurs 47 nF / 750 V pour obtenir des fréquences de travail entre 25 kHz et 100 kHz et un transformateur ayant un rapport de transformation réglable par l'utilisateur au prix de quelques manipulations à l'intérieur du générateur. Il peut délivrer une puissance maximum de 3 kW.

Il revient à l'expérimentateur d'ajuster la valeur de la capacité dans la boucle de l'inducteur (noté *Condensator box* sur la *Figure II. 3*) pour ajuster la fréquence de résonance.

1.3 Fonctionnement et démarches expérimentales

1.3.1 Optimisation des composants et des configurations

L'entrefer de l'électroaimant a été fixé à 3 cm dès le début des essais pour rester en accord avec le cahier des charges (on précise que l'entrefer est initialement variable entre 0 et 5 cm). L'ensemble de la structure en ferrite a été recouverte de kapton, ruban adhésif électriquement isolant capable de tenir des températures de 400°C. Le fil de Litz que nous avons choisi est composé de 2520 fils de 0,1 mm tressés (PACK Feindrähte, 2520×0.10), noté Fil 1. Les condensateurs sont de différentes valeurs de capacité de 5,6 nF à 10 nF (1700V p-p, 375 KP/MKP SW1, Texas Instrument).

Une bobine pick-up a été spécialement construite pour la mesure du champ dans cet entrefer. En mesurant la tension induite par le champ généré, on remonte à l'amplitude crête du champ par:

$$B_{max} = \frac{e_{max}}{NS2\pi f} \quad (\text{II. 2})$$

avec: e_{max} la tension crête du signal sinusoïdal, N le nombre de spires, S la section et f la fréquence de travail.

Nous avons cherché en premier lieu à caractériser électriquement notre installation. Pour cette partie, la génération de courant est assurée par le même système d'amplification de courant que celui décrit en 1.1. Les principaux résultats sont résumés dans le *Tableau II. 1*. Comme on peut le voir, on atteint en variant la valeur de la capacité du secondaire une large fourchette de fréquences de travail (lignes (1) à (5)). Néanmoins, pour ces valeurs de courant très faibles, le fil s'échauffe de manière excessive dès les premières secondes, à cause de la forte impédance des fils. De plus, la rigidité du fil nous empêchait de bobiner correctement autour du noyau de ferrite. Nous avons donc essayé de remplacer le fil de bobinage par un fil plus fin (480×0.071, PACK Feindrähte) noté Fil 2, tout en gardant le même nombre de spires. Ceci a eu pour effet d'augmenter encore l'impédance du fil bobiné (ligne (6) et (7)). Par la suite, toujours avec ce dernier fil et dans le but de diminuer l'impédance, nous avons tenté de bobiner 41 spires (lignes (8) et (9)) et 23 spires (lignes (10) et (11)), toujours réparties sur

l'ensemble de la ferrite. Il apparait que l'on obtient une impédance suffisamment basse seulement avec 23 spires. De plus, cette faible valeur d'impédance n'augmente pas quand on passe de 1,5 A à 3 A.

Essai n°	Fil n°	Nb de spires	C (nF)	f (kHz)	I _{ind} (A)	U _{ind} (V)	Z (Ω)			
(1)	Fil 1	50	13,2	38,86	0,9	1,8	2			
(2)			2,8	77,40	0,4	1,7	4			
(3)			1,87	81,2	0,42	1,7	4			
(4)			1,12	110	0,28	1,7	6			
(5)						2	20	10		
(6)	Fil 2	55	1,12	101	0,2	1,7	8,5			
(7)								1,5	18	12
(8)								0,4	1,8	4,7
(9)		41	1,87	108	0,4	1,8	4,7			
(10)								3	20	6,6
(11)								1,5	1,8	1,1
(11)		23	5,6	100	1,5	1,8	1,1			
(11)					3	3,5	1,1			

Tableau II. 1 Récapitulatif des caractéristiques de l'inducteur en fonction des différentes conditions testées pour de faibles courants.

Ces différentes configurations ont ensuite été testées avec le générateur Fives Celes, pour des intensités injectées plus importantes. Dans tous les cas, à l'exception du dernier (23 spires), les fils et les condensateurs ont surchauffés. Nous avons également observé dans certains cas des étincelles entre le fil de Litz et le noyau de ferrite. Seule la configuration avec un nombre moindre de spires semble être viable pour la sécurité de l'installation et pour la stabilité de l'impédance du bobinage. Ce dernier point est crucial pour l'étude suivante de montée en amplitude de champ. Nous avons cependant ajouté des coques en polypropylène de 3 mm d'épaisseur pour écarter le bobinage du noyau et changé les condensateurs par des assemblages de marques différents de 100 nF (2500V, 386 MMKP, VISHAY).

A partir de là, nous avons effectué des tests d'amplitudes de champ pour des configurations à nombres de spires réduits (de 10 à 30 spires) avec le générateur Fives Celes. Les principaux résultats sont présentés *Tableau II. 2*. Nous avons relevé la puissance nominale fournie par le générateur pour tous les essais afin de relier l'échauffement de l'installation à

une puissance dissipée. Dans certains cas, il nous est impossible de faire résonner le signal à ≈ 100 kHz avec ce nouveau jeu de condensateurs; nous avons donc travaillé aux fréquences disponibles les plus proches. On précise que les bobines pick-up ont souvent été endommagées par une induction trop importante et ont donc dû être remplacées régulièrement.

Essai n°	Fil n°	Nb de spires	$P_{\text{gén}} \text{ (kW)}$	$I_{\text{ind}} \text{ (A)}$	$f \text{ (kHz)}$	$Z \text{ (}\Omega\text{)}$	$B_{\text{max}} \text{ (mT)}$
(12)	Fil 2	10	0,09	23	93	0,95	8,5
			0,42	45	90	1,07	16,7
			1,22	70	89,3	1,42	26,0
			2,59	90	89,5	1,79	33,8
(13)		16	0,07	17	98	2	10,2
			0,27	29	95,9	1,78	17,4
			0,73	45	94,9	2,15	27
			1,61	60	94,7	2,68	36
(14)		20	0,18	17	103	4,8	12,8
			0,68	29	101,4	4,42	22
			1,91	43	101	5,89	32
(15)		25	0,23	14	89,6	6,18	13,2
			0,93	26	88,73	6,14	24,4
			2,13	33	88,5	7,82	31
(16)		30	0,12	14	70,2	5	15,6
			0,84	30	69,8	5,6	31,5
			2,08	45	71,37	6,01	47
(17)	Fil 3	20	0,41	23	99,3	2,10	17,3
			1,75	45	98,5	2,11	33,8
			2,71	52	98,8	2,32	39

Tableau II. 2 Principales caractéristiques des tests de montée en puissance de l'inducteur pour différentes configurations de bobinage.

La première constatation est que l'amplitude du champ maximale que nous atteignons est de 47 mT (Essai (16)), en dessous des 60 mT initialement prévues pour le projet. Nous pouvons ensuite relever des comportements communs à tous les essais. La montée en champ

s'accompagne toujours d'une augmentation de l'impédance du bobinage, alors qu'elle doit être gardée la plus basse possible pour éviter un échauffement trop important. De même, la puissance fournie par le générateur augmente de manière drastique avec le courant mesuré. La quantité de chaleur dissipée dans l'enceinte en plexiglas est censée être très proche de puissance électrique injectée par le générateur. Il est donc également primordial de minimiser cette valeur pour garder le contrôle de la température lors de fonctionnement de plus longue durée.

Nous analysons le *Tableau II. 2* par nombre de spires croissants. Dans la configuration 10 spires (Essai (12)), les intensités de courant nécessaires à la génération de champ sont trop élevées. En effet, 70 A et 90 A sont des courants trop importants pour la sécurité de l'installation et de l'expérimentateur malgré des impédances intéressantes. En effet, à de telles intensités, les condensateurs chauffent de manière excessive, et la gaine du fil commence à fondre autour de celui-ci. En augmentant le nombre de spires à 16 (Essai (13)), on diminue cet effet. Néanmoins, l'intensité maximale de 60 A (pour 36 mT) est encore trop forte et entraîne une surchauffe du noyau de ferrite, et les condensateurs, s'échauffent trop fortement à partir de 45 A. Pour 20 spires (Essai (14)), le rapport entre intensité du courant et amplitude de champ semble bon même si l'intensité maximale n'est que de 32 mT. Nous arrivons à conserver cette configuration pendant plusieurs secondes sans échauffement excessif de l'inducteur. Pour des nombres de spires supérieurs, nous sommes obligés de réduire la fréquence de travail pour trouver la résonance. Le fil devient trop résistif et chauffe pour de plus faibles valeurs de courant. Pour 30 spires (Essai (16)), le signal de courant fluctue énormément et les condensateurs sont endommagés à partir de 30 A.

En parallèle, nous avons reçu un troisième type de fil de Litz (800×0.20, PACK Feindrähte), noté Fil 3. Nous n'avons malheureusement pas eu le temps d'effectuer la même étude en fonction du nombre de spires, ce qui nous a contraints à ne faire qu'un essai avec le nombre de spires optimal déterminé précédemment (Essai (17)). Le résultat est cependant très satisfaisant puisque pour la même amplitude de champ (cases grisées), l'échauffement du fil est moindre pendant plusieurs dizaines de secondes et les impédances associées sont inférieures. Nous avons donc choisi de conserver le Fil 3 avec un bobinage à 20 spires pour la suite de l'étude.

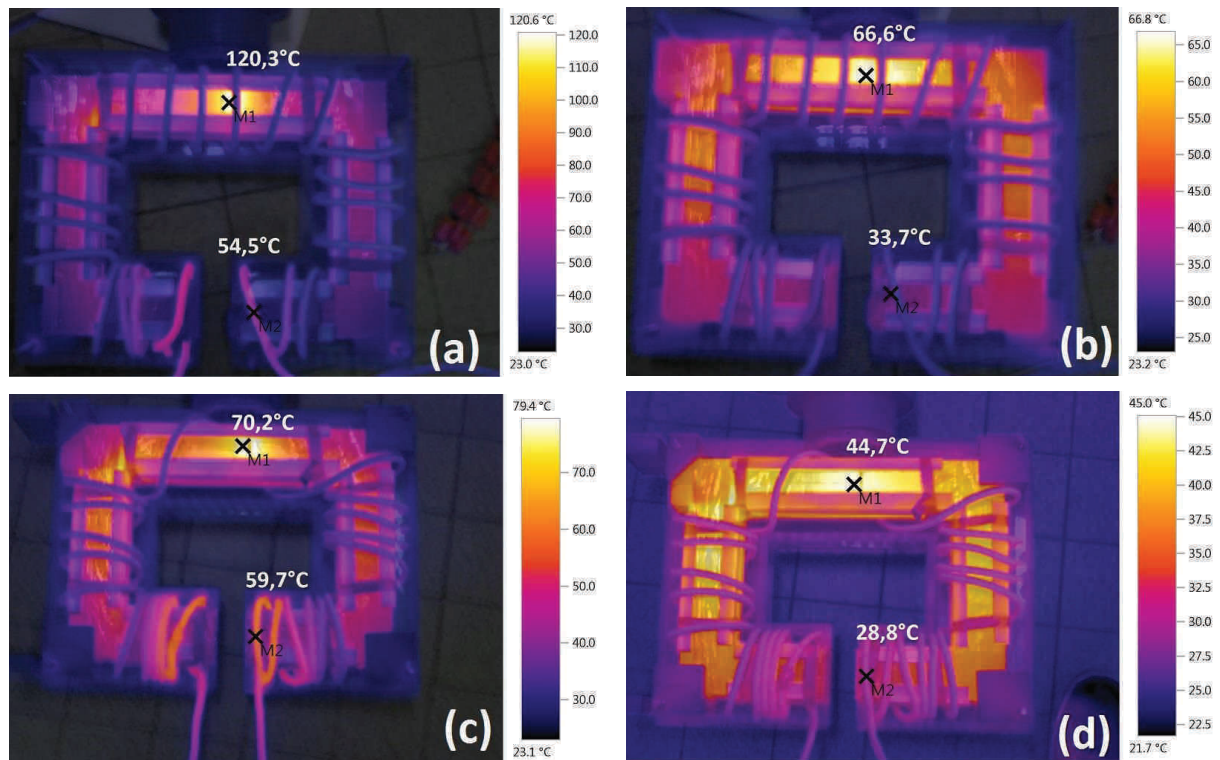
1.3.2 Fonctionnement

Pour cette partie, l'inducteur est inclus dans son boîtier de refroidissement pour former l'installation définitive (*Figure II. 3*). Le refroidissement est assuré par un aspirateur ménager. Nous utilisons une caméra thermique haute résolution Testo 885 afin de contrôler l'échauffement des différents composants tout au long des essais. Étant donné que cette caméra capture la température de surface, nous avons dû retirer la partie supérieure du boîtier juste avant chaque prise.

Nous avons entamé les essais de stabilité avec la configuration retenue précédemment (Essai (17), *Tableau II. 2*) pour des temps courts de 5 minutes. Les *Figure II. 6(a)* et *(b)* nous montrent les relevés infrarouges de l'inducteur, respectivement à 5 minutes de fonctionnement et à 5 minutes de refroidissement après arrêt du champ. Les périodes de refroidissements de l'appareil se font boîtier fermé et aspiration en marche. Nous constatons après seulement 5 minutes de fonctionnement l'apparition d'un point chaud (120°C) sur la partie proche de la zone d'aspiration. De plus, les fils à proximité de l'entrefer s'élèvent à une température de 54°C ce qui peut être problématique pour un fonctionnement à plus longue durée. Après 5 minutes de refroidissement, ces deux valeurs ont été quasiment divisées par deux. Ce dernier résultat nous rassure tout de même sur l'efficacité du système de refroidissement.

Pour le deuxième essai, nous concentrons les 20 spires à proximité de l'entrefer pour dégager le point chaud central et n'y laisser qu'une spire. L'image thermique *Figure II. 6(a)* montre qu'effectivement le point chaud a fortement diminué en température. En revanche, l'environnement de l'entrefer est aux alentours de 40°C avec des fils toujours à 50°C .

Afin de voir si la présence de ce point chaud au milieu de la branche de l'électroaimant opposée à l'entrefer est due à la symétrie du bobinage, nous décidons de concentrer le bobinage sur un côté de l'inducteur avant d'étudier de la même manière le fonctionnement pendant 5 minutes à 30 A (*Figure II. 7(a)* et *(b)*). Un nouveau point chaud de température acceptable apparaît (64°C) sous le bobinage, tandis que l'échauffement du point central n'est plus que de 72°C . Cette dissymétrie des spires semble donc répartir la puissance dissipée et diminuer la température au voisinage de l'entrefer. Cette dernière est aux alentours de 36°C , ce qui est en accord avec les conditions d'expérimentation sur organismes vivants.

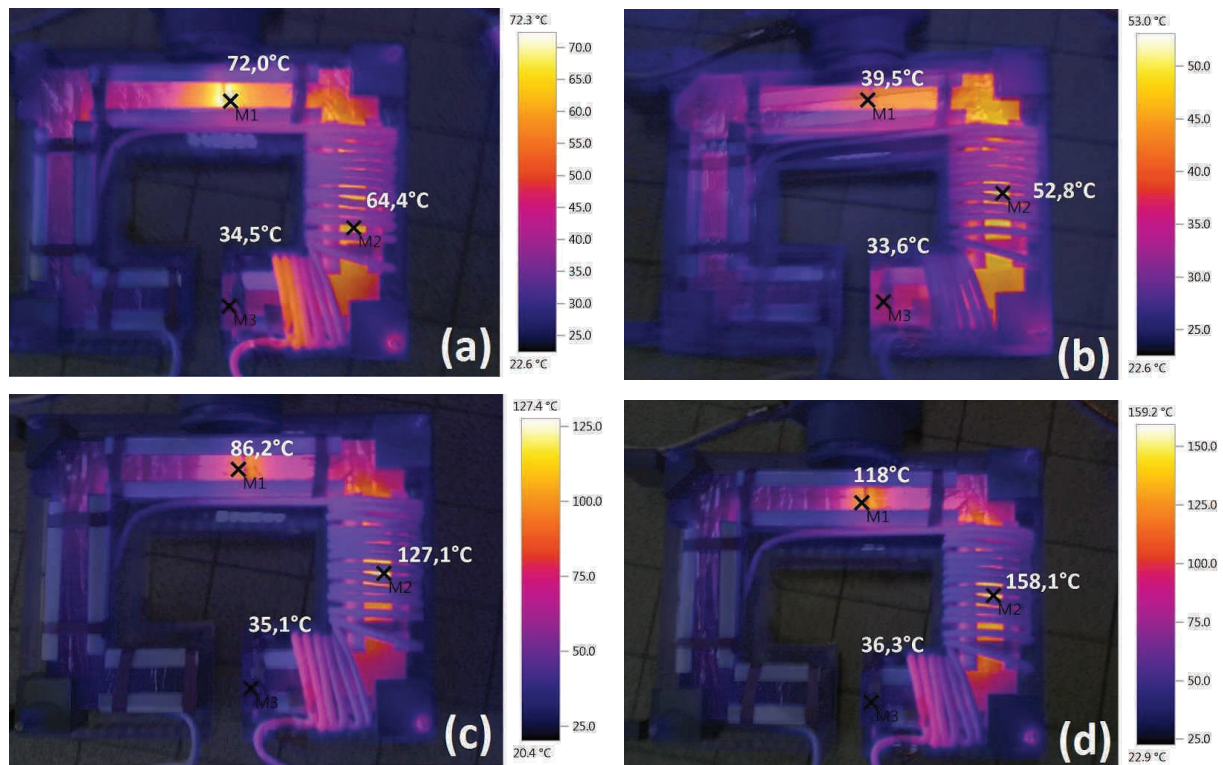


Cliché	f (kHz)	P _{géné} (kW)	I _{ind} (A)	B _{max} (mT)
(a)	104,3	0,68	30	23
(c)	108	0,67	30	24,9

Figure II. 6 Test de fonctionnement pendant 5 minutes pour deux répartitions différentes des 20 spires autour du noyau. (a) et (c) après 5 minutes de fonctionnement, (b) et (d) après 5 minutes de refroidissement post fonctionnement.

Après ce bon résultat, nous avons étendu l'essai à différentes intensités (cliché Figure II. 7(c) et (d)). Les constantes électriques sont stables au cours du fonctionnement. On constate que l'augmentation du courant entraîne un échauffement plus important de l'inducteur. On maintient malgré cela une température proche de l'entrefer inférieure au seuil des 37°C. (Figure II. 7 (c))

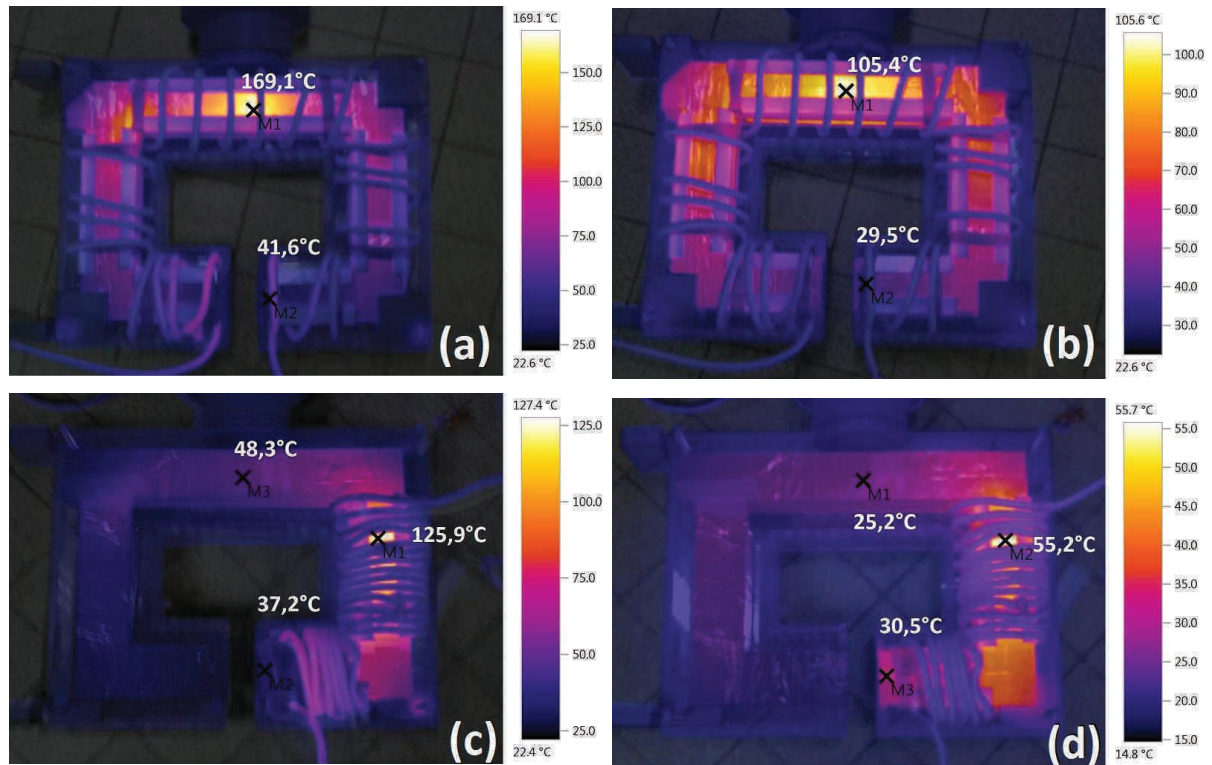
Nous sommes ensuite passés à des tests de 15 minutes dans ces mêmes conditions d'intensités de courants. Avant cette étape nous avons remplacé l'aspirateur dont le flux d'aspiration variait beaucoup au cours d'un même essai par un ventilateur (ebm papst, 6314/2TDHHP) à tension nominale de 24 V DC (fonctionnement 16-36 V DC). Les essais à 40 A et 50 A n'ont pas aboutis car le courant ainsi que la fréquence de résonance n'étaient pas stables et oscillaient dangereusement. De plus, d'autres signes alarmants (odeur de brûlé, fumée dans l'enceinte en plexiglass) nous ont contraints à arrêter les tests en cours.



Cliché	f (kHz)	P _{géné} (kW)	I _{ind} (A)	B _{max} (mT)
(a)	102	0,63	30	23
(c)	98,7	1,00	40	25,3
(d)	99,1	1,73	50	30,6

Figure II. 7 Test de fonctionnement pendant 5 minutes pour différentes amplitudes de champ avec 20 spires regroupées sur un côté de l'électroaimant. (a) et (b) respectivement après 5 minutes de fonctionnement et après 5 minutes de refroidissement post fonctionnement à 30 A. (c) après 5 minutes de fonctionnement à 40 A. (d) après 5 minutes de fonctionnement à 50 A.

Le test à 30 A s'est par contre bien déroulé. Les constantes ont été stables tout au long de l'expérience. Nous avons également effectué le même test pour une durée de 15 minutes à 30 A dans la configuration de spires réparties symétriquement. Ces résultats sont résumés Figure II. 8. La température en fin de fonctionnement au niveau du entrefer est trop élevée (49°C sur le fil et $\approx 40^\circ\text{C}$ sur la ferrite) dans le cas de spires réparties. En revanche pour un bobinage à droite on constate (Figure II. 8 (c)) que la ferrite à proximité de l'entrefer ne dépasse pas les 37°C, avec toutefois le point chaud sous les spires qui atteint 126°C.

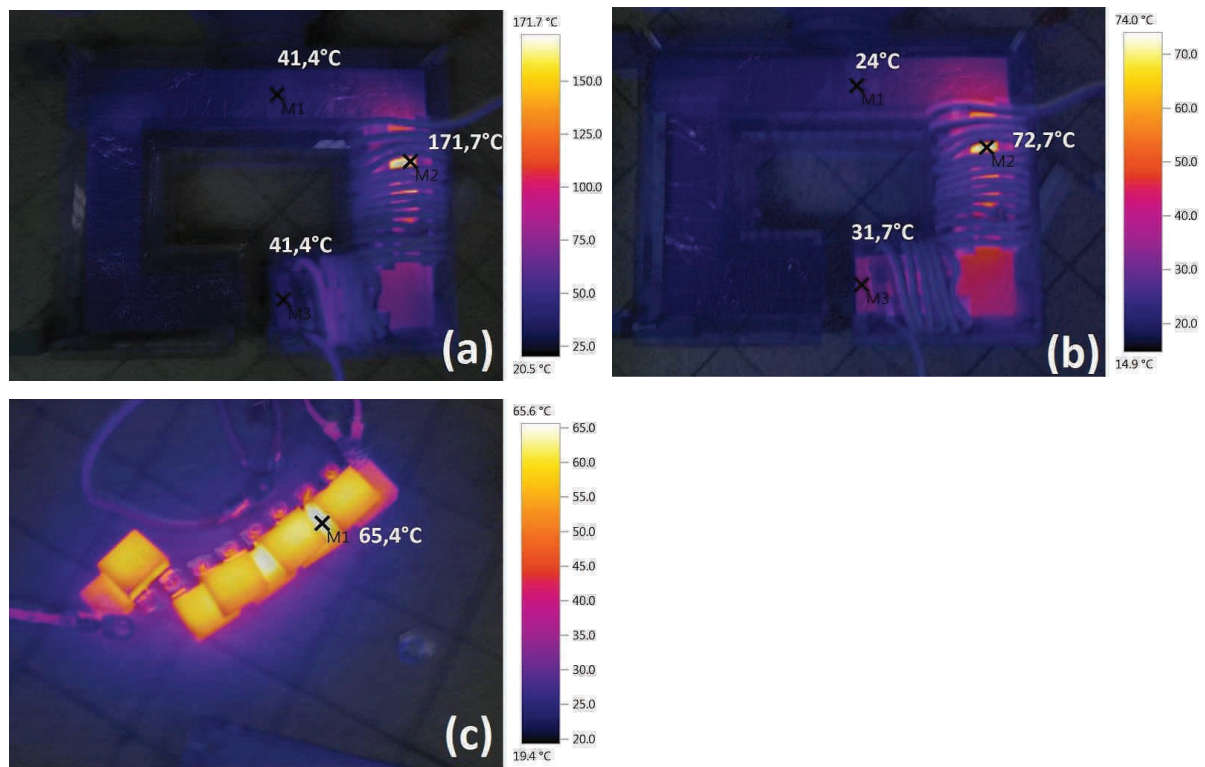


Cliché	f (kHz)	P _{géné} (kW)	I _{ind} (A)	B _{max} (mT)
(a)	102,7	0,81	30	23
(c)	102,56	0,73	30	23

Figure II. 8 Test de fonctionnement pendant 15 minutes. Comparaison entre un bobinage (a) et (b) sur tout le noyau de ferrite et (c) et (d) sur un côté. (a) et (c) Images thermiques après fonctionnement. (b) et (d) Images thermiques après 15 minutes de refroidissements post fonctionnements.

En conservant ce jeu de paramètres optimisés (20 spires bobinées sur un côté, 30 A) nous avons poursuivi l'étude en effectuant un test de fonctionnement d'une heure. Les résultats sont présentés Figure II. 9. La ferrite à proximité de l'entrefer est mesurée à 41°C en fin de fonctionnement. La température du point chaud présent sous le bobinage après 1 heure est restée constante par rapport à 15 minutes de fonctionnement. En parallèle, nous avons également contrôlé l'échauffement des condensateurs (Figure II. 9(c)) et nous constatons qu'ils se stabilisent très rapidement à des températures raisonnables. Le courant mesuré dans l'inducteur est également stable tout au long de l'essai. Par contre, la puissance nominale lue sur l'interface du générateur a diminué de plus de 35% entre le début et la fin du test. Le système voit également sa fréquence de résonance dévier de manière significative en 60 minutes passant de 103 kHz à 125 kHz. Cela est probablement dû à une température de ferrite

qui augmente tout au long de l'essai changeant ainsi la valeur d'inductance du circuit. Cette variation d'inductance dans le cœur de ferrite aurait pour effet de décaler la résonance. Malgré cela, l'installation est en mesure de fonctionner pendant 60 minutes en fournissant une amplitude de champ de 23 mT à ≈ 100 kHz. En outre, 30 minutes de refroidissements sont suffisantes pour permettre à l'expérimentateur de renouveler l'expérimentation. Dans le cas d'échantillons biologiques, la température à l'entrefer devra cependant être contrôlée au cours des différentes expériences pour s'assurer qu'elle ne dépasse pas 37°C.

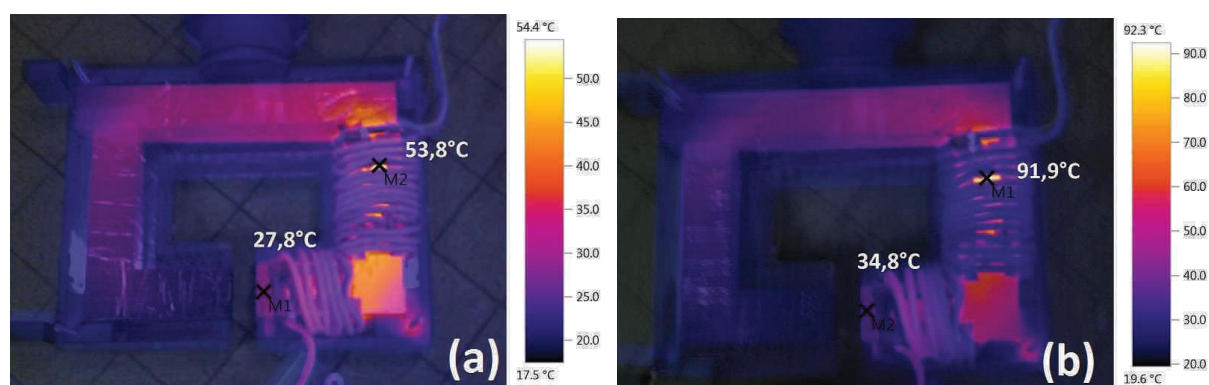


Temps (min)	f (kHz)	P _{géné} (kW)	I _{ind} (A)	B _{max} (mT)
1	102,98	0,69	30	23
30	121,50	0,47	30	23
60	125,00	0,44	30	23

Figure II. 9 Test de fonctionnement pendant 60 minutes. (a) Image thermique au bout de 60 minutes (b) Installation refroidit après 30 minutes post fonctionnement. (c) Image thermique des condensateurs à 60 minutes de fonctionnement.

Par la suite nous avons voulu répéter l'expérience à une fréquence réduite de 50 kHz. Les résultats sont présentés en Figure II. 10. A 23 mT, toutes les constantes électriques sont stables pendant une heure, avec des températures aux points clés contrôlées à un excellent

niveau. Cette baisse de fréquence a également permis à l'installation de générer un champ plus élevé (de 30 mT) durant une heure avec une légère dérive des constantes électriques, mais qui reste néanmoins acceptable. On précise tout de même que l'expérience a été tentée avec un courant de 50 A, et qu'elle a donné lieu au bout de quelques minutes à l'explosion d'un condensateur. Cependant, il serait possible de réduire la puissance électrique reçu par chaque condensateur en créant un réseau à capacité équivalente ce qui diviserait la tension appliqué et préserverait donc les condensateurs.



Cliché	Temps (min)	f (kHz)	P _{gén} (kW)	I _{ind} (A)	B _{max} (mT)
(a)	1	50,15	0,25	30	23
	30	50,22	0,24	30	23
	60	50,15	0,24	30	23
(b)	1	49,28	0,48	40	30,6
	30	49,90	0,39	38	30,1
	60	50,02	0,39	38	30,1

Figure II. 10 Test de fonctionnement pendant 60 min pour une fréquence réduite ≈ 50 kHz à des amplitudes de courants de (a) 30 A et (b) 40 A

1.4 Conclusion et perspectives

Par rapport au cahier des charges, nombres de points clés sont manquants. Premièrement, nous n'avons jamais atteint 60 mT d'amplitude de champ et cela même pendant des temps très courts. Nous ne pouvons tout simplement pas refroidir l'ensemble du système assez efficacement pour ne pas l'endommager à de tels champs. Par ailleurs, pour les tests

d'une heure de fonctionnement à 100 kHz, la fréquence de fonctionnement dévie de 25% entre le début et la fin de l'expérience.

La société Fives Celes qui avait répondu à l'appel d'offre basée sur le même cahier des charges a obtenu des résultats encore moins satisfaisants. En effet, la fréquence maximale atteignable par leurs prototypes était de 86 kHz avec un gap de 3,3 cm. De plus, le champ maximum de 55 mT n'était viable que pour un fonctionnement de 60 secondes. Pour des champs plus faibles, le prototype n'offrait pas plus de quelques minutes de fonctionnement. Face à cet échec, la société Fives Celes a dû, en accord avec nos partenaires européens, revenir à une technologie standard basée sur des inducteurs constitués de tubes de cuivre refroidis à l'eau, comme ils avaient l'habitude de le proposer. Ceci a permis de produire les 5 installations nécessaires au déroulement du projet.

Néanmoins, pour de plus faibles champs, notre installation est fiable pour une heure de fonctionnement à plusieurs fréquences de travail. L'entrefer de cet électroaimant est dimensionné pour pratiquer des expériences sur boîtes de Pétri ou sur des souris, moyennant un contrôle de la température et des dispositifs empêchant les contacts avec la ferrite. Le dispositif peut également s'orienter avec un champ vertical ou horizontal simplement en le tournant sur des supports adaptés (inclus dans le boîtier de refroidissement). De plus, pour des expériences d'hyperthermie de longues durées, l'électroaimant offre la possibilité de garder une vue sur l'échantillon, ce qui est plus difficile avec un inducteur de type four à induction commercial.

D'autres essais (non développés dans cette thèse) avec un entrefer plus étroit ont montré une bonne stabilité de la puissance injectée et de la température de la ferrite. En diminuant la largeur de l'entrefer, on diminue également la puissance électrique nécessaire pour obtenir des champs de mêmes niveaux d'amplitude. Cet électroaimant est donc également utilisable pour l'application de champs magnétiques haute fréquence avec un entrefer réduit.

2 Bobine de mesures de cycles d'hystérésis hautes fréquences

Les applications en hyperthermie magnétique se situent dans des gammes de hautes fréquences, comprises entre 10 kHz et 300 kHz. Habituellement, le pouvoir hyperthermique

d'un échantillon est déterminé en mesurant le SAR par élévation de température quand celui-ci est placé dans un champ magnétique. La mesure d'un cycle d'hystérésis permet d'avoir accès à de plus amples informations sur l'état d'agrégation et d'interactions des nanoparticules. Si les cycles sont complètement saturés on peut également obtenir les valeurs d'aimantations à saturation et de champs coercitifs. L'aire d'hystérésis étant directement reliée au SAR par la fréquence du champ appliqué (voir équation I. 9), l'acquisition de cycles à hautes fréquences permettrait de contrôler les mesures d'élévations de température par une méthode radicalement différente.

Il est cependant difficile techniquement de pouvoir générer un champ magnétique haute fréquence dans une bobine simplement refroidie par air et d'adapter un système de mesure d'aimantation. Nous proposons ici une installation à moindre coût, utilisant les bonnes propriétés du fil de Litz à haute fréquence, qui nous permettent de concevoir une bobine refroidie par circulation d'air. La conception de notre outil de travail ainsi que les tests de comparaisons avec d'autres installations expérimentales sont présentés en **Article II-1**.

On peut constater pour les échantillons étudiés que les mesures de cycles sont cohérentes avec les expériences d'hyperthermie par mesures d'élévation de température. D'autres exemples de mesures de cycles d'hystérésis utilisant cette installation sont disponibles ([3], [4], [8]). Dans l'exemple qui suit en *Figure II. 11*, les cycles hautes fréquences ont été mesurés sur l'échantillon de CoFe_2O_4 "Sample 2" de la *Figure II. 2(b)* ([6]) à 52 kHz. Nous pouvons constater une bonne superposition des courbes de SAR calculées par mesures de cycles et par mesures de températures.

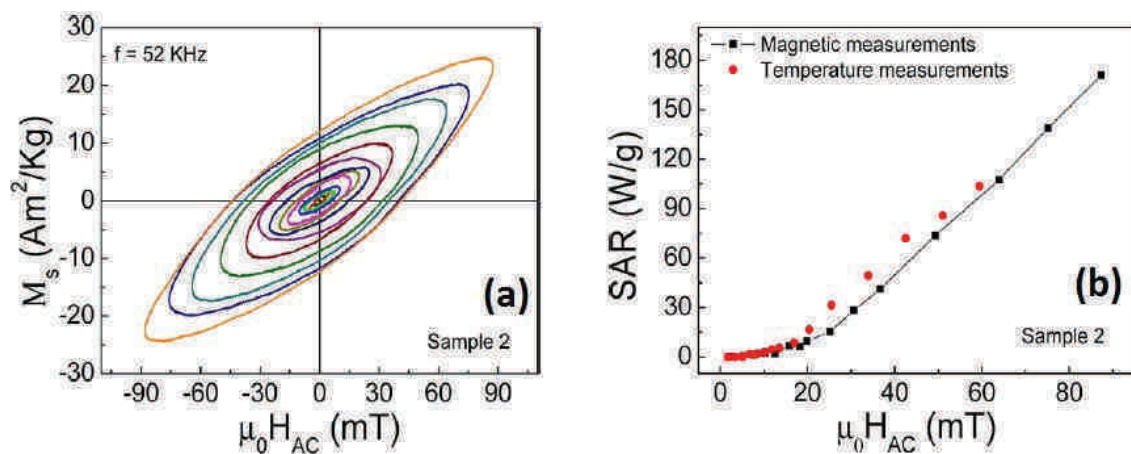


Figure II. 11 (a) Mesures de cycles d'hystérésis hautes fréquences de l'échantillon "Sample 2" pour plusieurs valeurs d'amplitude de champ appliqué. (b) Comparaison entre les SAR obtenus par mesures d'élévation de température et par mesures de cycles d'hystérésis.

Cette bobine de mesure de cycles haute fréquence est un outil précieux pour la compréhension du pouvoir hyperthermique des nanoparticules. Dans le cadre de notre contribution au projet Multifun, nous avons étudié une quantité importante d'échantillons en utilisant en parallèle les deux méthodes mises à notre disposition. Nous présentons maintenant une recherche de tailles optimales pour l'hyperthermie magnétique, dans le cadre du projet Multifun.

3 Synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer par voie aqueuse – Optimisation pour l'hyperthermie magnétique

Le projet Multifun nous a permis de travailler en collaboration avec des équipes de chimie pour optimiser la production de nanoparticules pour l'hyperthermie magnétique. L'objectif était de pouvoir transférer des protocoles de synthèses optimisées (comprenant synthèse et recouvrement adapté pour la fonctionnalisation) vers l'industrie pour pouvoir produire en grande quantité pour les besoins du projet. Dans cette optique, Marciello *et al.* ont synthétisés par voie aqueuse des nanoparticules d'oxyde de fer de tailles contrôlées comprises entre 22 nm et 34 nm (**Article II-2**). Nous avons étudié chaque produit de synthèse pour trouver la dépendance du SAR en fonction de la taille dans les conditions expérimentales fixées par le cahier des charges du projet (45 mT / 70 kHz et 20 mT / 100 kHz). Après avoir sélectionné une taille de synthèse optimale, nous avons ensuite étudié l'influence du choix du revêtement sur les propriétés d'hyperthermie magnétique. L'ensemble des résultats est présenté en **Article II-2**.

En complément de cette étude, nous avons mesuré le SAR d'une synthèse de A22 recouvert directement de 3-aminopropyltriéthoxysilane d'abréviation APTS (noté A22-A). Les cycles à hautes fréquences ont également été mesurés, ces résultats ainsi que la comparaison entre les deux méthodes sont montrés en *Figure II. 12*. Les valeurs de SAR étant plus faibles, ce revêtement n'a pas été retenu pour l'étude. Néanmoins, on constate une bonne cohérence entre les deux méthodes de mesures. Les valeurs d'aimantation sont plutôt hautes pour des nanoparticules d'oxydes de fer ce qui démontre la bonne qualité de la synthèse. Le fit numérique effectué sur la courbe de SAR nous indique un facteur de puissance de 1,94 ce qui situe ces nanoparticule dans un régime superparamagnétique.

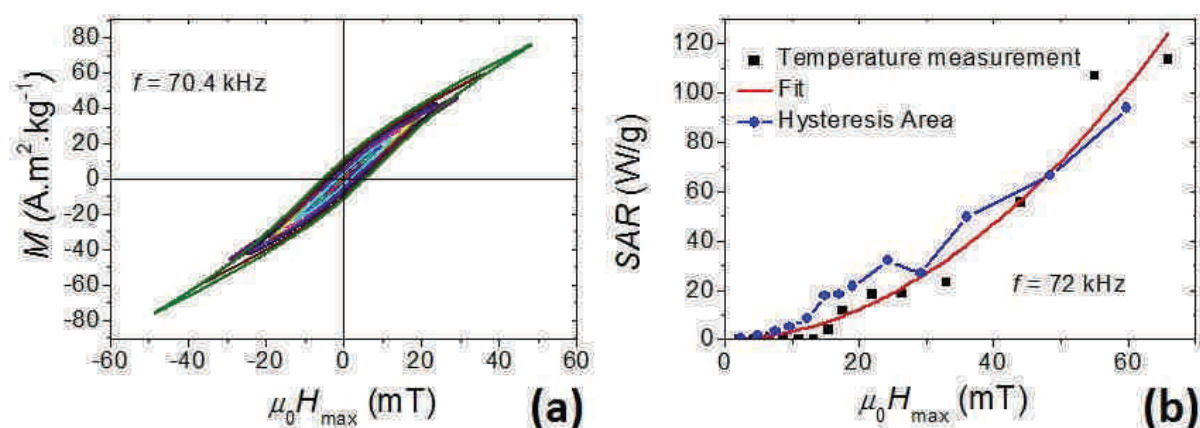


Figure II. 12 Propriétés d'hyperthermie magnétique de A22-A (a) Cycles d'hystérésis à différentes valeurs d'amplitude de champ appliqué pour une fréquence de $f = 70,4$ kHz. (b) Graphe comparant l'évolution du SAR en fonction de l'amplitude de champ appliqué, calculé à partir des mesures de températures (ronds bleus reliés) et calculés à partir de l'intégration des cycles d'hystérésis en (a) (carrés noirs). Un fit numérique a également été réalisé sur les mesures de SAR (courbe rouge), le facteur de puissance (voir Figure I. 11) de cette courbe est de 1,94.

Les résultats d'hyperthermie magnétique nous montrent que les nanoparticules de 22 nm synthétisées par voie aqueuse possèdent des puissances de chauffe maximisées pour des conditions de champ appliqué proches de celles utilisées par MagForce à Berlin. Les mesures DLS révèlent de plus une taille hydrodynamique d'environ 130 nm, ce qui est acceptable pour pouvoir internaliser les nanoparticules dans les cellules cibles. Cette synthèse permet de produire de manière reproductible 20 g de nanoparticules dans un même lot. C'est largement supérieur à la plupart des synthèses en laboratoire. Cette étude pourrait également être menée pour optimiser cette même synthèse (ou une autre) pour des paramètres de champ appliqués différents.

4 Conclusion

Dans le cadre de notre implication au sein du projet Multifun, nous avons développé des équipements et mis en place des protocoles de mesures expérimentales pour évaluer le potentiel hyperthermique de nanoparticules. Par ces mesures, nous avons essayé de répondre à des besoins d'optimisations de synthèses. Ces équipements fonctionnent dans les gammes d'applications d'hyperthermie magnétique en conditions réelles de traitement. Nous pouvons

donc tout à fait nous servir de ces mêmes protocoles pour affiner la compréhension des paramètres optimaux sur d'autres synthèses (comme nous le verrons au Chapitre IV). La bobine de mesure de cycles d'hystérésis se révèle indispensable à l'étude de nombres de systèmes de nanoparticules en suspension [6]–[8] et dans d'autres travaux en cours. De même, nous avons développé un inducteur à large entrefer destiné à recevoir des échantillons biologiques (boîtes de Pétri ou souris). Ses caractéristiques sont en deçà de celles escomptées initialement, mais il présente l'avantage d'être entièrement refroidi à l'air. Cet inducteur nous permettra également d'appliquer des champs magnétiques haute fréquence sur des matériaux magnétiques développés au LPCNO, en ajustant la largeur de l'entrefer aux besoins des expériences. L'inducteur haute fréquence refroidi par eau, développé par Fives Celes, a quant à lui été distribué aux cinq partenaires pour les phases de tests *in vitro* et *in vivo*. Les essais sont actuellement en cours.

- [1] L.-M. Lacroix, J. Carrey, and M. Respaud, "A frequency-adjustable electromagnet for hyperthermia measurements on magnetic nanoparticles," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 79, no. 9, p. 093909, Sep. 2008.
- [2] L.-M. Lacroix, "Nanoparticules de fer de taille contrôlée pour l'hyperthermie : Synthèse par voie organométallique, caractérisations magnétiques et mesures de puissance dissipée," INSA Toulouse, LPCNO, 2008.
- [3] B. Mehdaoui, R. P. Tan, A. Meffre, J. Carrey, S. Lachaize, B. Chaudret, and M. Respaud, "Increase of magnetic hyperthermia efficiency due to dipolar interactions in low-anisotropy magnetic nanoparticles: Theoretical and experimental results," *Phys. Rev. B*, vol. 87, no. 17, May 2013.
- [4] A. Meffre, B. Mehdaoui, V. Kelsen, P. F. Fazzini, J. Carrey, S. Lachaize, M. Respaud, and B. Chaudret, "A Simple Chemical Route toward Monodisperse Iron Carbide Nanoparticles Displaying Tunable Magnetic and Unprecedented Hyperthermia Properties," *Nano Lett.*, vol. 12, no. 9, pp. 4722–4728, Sep. 2012.
- [5] B. Mehdaoui, A. Meffre, J. Carrey, S. Lachaize, L.-M. Lacroix, M. Gougeon, B. Chaudret, and M. Respaud, "Optimal Size of Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia: A Combined Theoretical and Experimental Study," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 21, no. 23, pp. 4573–4581, décembre 2011.
- [6] E. Mazario, N. Menéndez, P. Herrasti, M. Cañete, V. Connord, and J. Carrey, "Magnetic Hyperthermia Properties of Electrosynthesized Cobalt Ferrite Nanoparticles," *J. Phys. Chem. C*, vol. 117, no. 21, pp. 11405–11411, May 2013.
- [7] M. Marciello, V. Connord, S. Veintemillas-Verdaguer, M. A. Vergés, J. Carrey, M. Respaud, C. J. Serna, and M. P. Morales, "Large scale production of biocompatible magnetite nanocrystals with high saturation magnetization values through green aqueous synthesis," *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, no. 43, p. 5995, 2013.
- [8] B. Mehdaoui, J. Carrey, M. Stadler, A. Cornejo, C. Nayral, F. Delpech, B. Chaudret, and M. Respaud, "Influence of a transverse static magnetic field on the magnetic hyperthermia properties and high-frequency hysteresis loops of ferromagnetic FeCo nanoparticles," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 100, no. 5, p. 052403, Jan. 2012.

Article II-1

An air-cooled Litz wire coil for measuring the high frequency hysteresis loops of magnetic samples—A useful setup for magnetic hyperthermia applications

V. Connord, B. Mehdaoui, R. P. Tan, J. Carrey,^{a)} and M. Respaud

Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-objets (LPCNO), Université de Toulouse, INSA, UPS, CNRS (UMR 5215), 135 avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

(Received 16 June 2014; accepted 1 September 2014; published online 23 September 2014)

A setup for measuring the high-frequency hysteresis loops of magnetic samples is described. An alternating magnetic field in the range 6–100 kHz with amplitude up to 80 mT is produced by a Litz wire coil. The latter is air-cooled using a forced-air approach so no water flow is required to run the setup. High-frequency hysteresis loops are measured using a system of pick-up coils and numerical integration of signals. Reproducible measurements are obtained in the frequency range of 6–56 kHz. Measurement examples on ferrite cylinders and on iron oxide nanoparticle ferrofluids are shown. Comparison with other measurement methods of the hysteresis loop area (complex susceptibility, quasi-static hysteresis loops, and calorific measurements) is provided and shows the coherency of the results obtained with this setup. This setup is well adapted to the magnetic characterization of colloidal solutions of magnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia applications.

© 2014 AIP Publishing LLC. [<http://dx.doi.org/10.1063/1.4895656>]

I. INTRODUCTION

Magnetic hyperthermia has been the subject of an intense research activity in the past decade.¹ This experimental cancer therapy uses the heat generated by magnetic nanoparticles (MNPs) put in an alternating magnetic field (AMF) of typical frequency in the range 50–300 kHz. Experimentally, the heating power value is most of the time determined by measuring the temperature rise of a colloidal solution placed in AMFs.² Since the heat generated by the MNPs during one cycle equals the area of their hysteresis loop,¹ an alternative method consists in measuring directly the hysteresis loop. However, since the hysteresis loop shape depends tremendously on the frequency of the AMF, quasi-static measurements performed in a standard magnetometer are not satisfying; measurements should be done at a frequency similar to the one used in magnetic hyperthermia. Measuring the hysteresis loop instead of performing temperature measurements presents two major advantages: (i) the complete hysteresis loop shape contains much more information than its simple area; information on saturation magnetization, magnetic interactions, aggregation of MNPs, MNP anisotropy can for instance be deduced from the hysteresis loop shape. We and other groups have already shown the interest of this method to get an insight into the physics of magnetic hyperthermia.^{3–6} (ii) It is much faster than temperature measurements. A typical temperature measurement takes in itself around 1 min, but the stabilisation of the temperature is much longer, so the typical delay between two measurements is 10 min. A high-frequency hysteresis loop measurement takes in itself a few microseconds, with no need of waiting between two measurements.

So far, only a few groups have reported on the development of setups permitting such measurements. Several groups

have reported on the building of susceptometers, which provide real and imaginary components of the susceptibility at low AMF.⁷ A hysteresis loop tracer working at a moderate frequency of 2 kHz was reported in Ref. 8. Bekovic *et al.* have built a setup with an objective and an approach similar to ours.^{6,9} However, because of the technology used for the production of the AMF, the maximum AMF amplitude was only 19 mT and the coil had to be water cooled. Finally, a setup with similar functionalities as the one which will be presented here has been built by Garaio *et al.*¹⁰ Unfortunately, very few technical and building details are provided in this reference, preventing anyone to envisage building a similar setup.

In this article, we present a setup permitting to measure the hysteresis loops of colloidal solutions of MNPs in a frequency range 6–56 kHz and up to 80 mT. Being based on the use of Litz wires, this setup presents the main advantage that a low power is necessary to produce the AMF so it can be air-cooled. Measurement results on typical samples are provided.

II. DESCRIPTION OF THE SETUP

A. Electric circuit

This setup is based on a resonant circuit similar to the one described in Ref. 2. The principle is to produce an alternating current at a chosen frequency using a function generator (MTX 3240, Metrix) coupled to a voltage amplifier (HSA 4052, NP Corporation), which can deliver a current of ± 2.8 A and voltage of ± 150 V at a maximum frequency of 500 kHz. The electrical circuit is shown in Fig. 1(a). Since the amplifier maximum current is limited to 2.8 A, a home-made transformer is used to increase the current amplitude. It is composed of 4 commercial I-shaped Ni-Zn ferrites assembled in square (Epsos, material N27). The transformer has 23 turns

^{a)} Author to whom correspondence should be addressed. Electronic mail: julian.carrey@insa-toulouse.fr

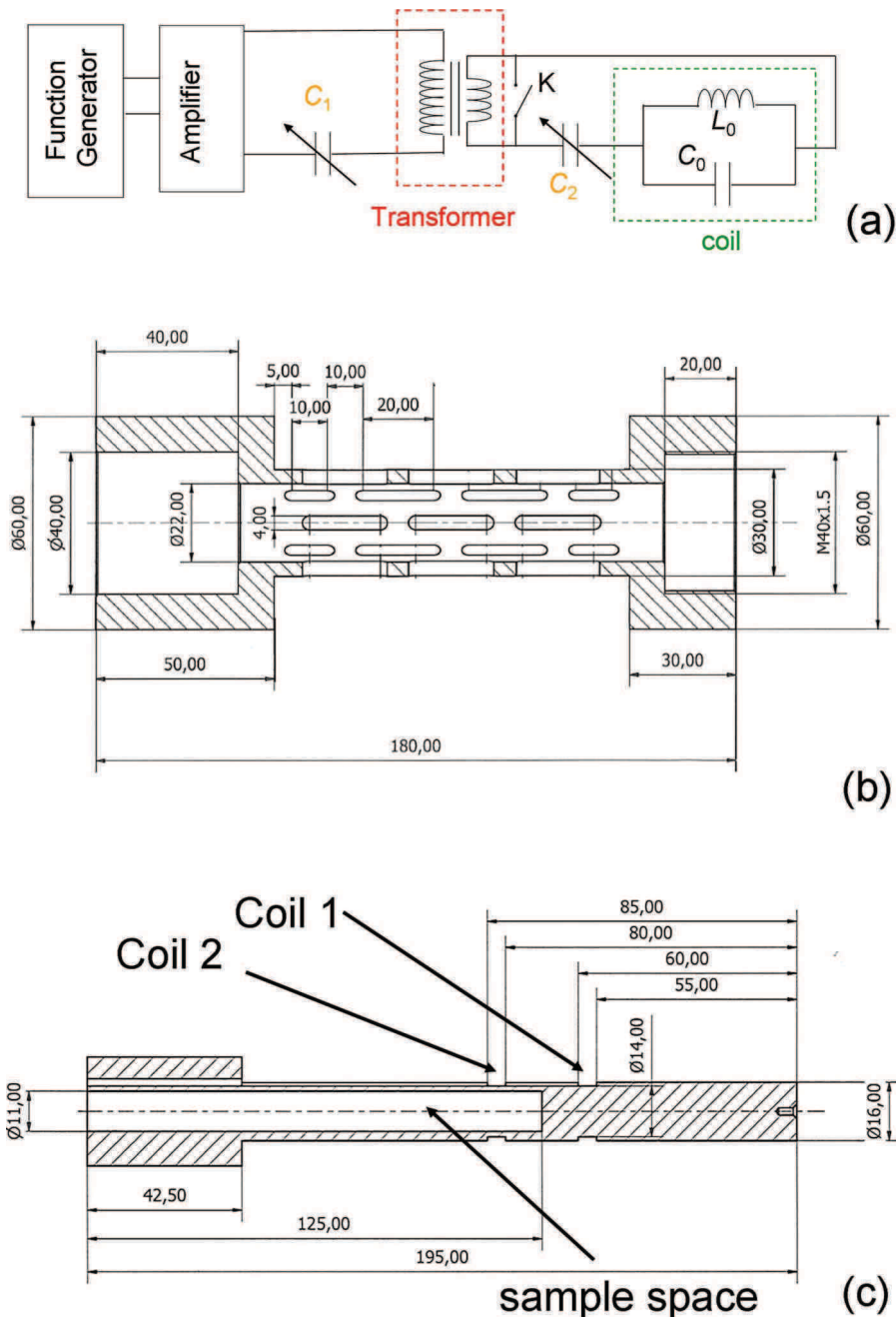


FIG. 1. (a) Electric schematic of the setup. C_1 (C_2) is a variable capacitor permitting the resonance of the primary (secondary) circuit. The main coil is schematized by a parallel inductor/capacitor (L_0/C_0) circuit. (b) Technical drawing of the main coil former. (c) Technical drawing of the sample holder.

of Litz wire (240×0.05 mm, Connect systems) at the primary and 2.5 turns at the secondary, which increases the output current amplitude by a factor 9. To bring the transformer to resonance, a home-made high-voltage ceramic disks adjustable capacitance C_1 is introduced in the primary loop; its building has been described in Ref. 2. A second capacitor C_2 is placed into the secondary circuit to bring it to resonance. C_2 is composed of several high-voltage ceramic capacitors in series (Vishay, 100 nF, 2500 V). The current in the setup is measured with an AC current probe (3274 clamp probe, Hioki). Finally, a home-made coil which is electrically equivalent to a inductor/capacitor parallel circuit is placed into the secondary circuit to produce the AMF.

B. Production of magnetic field by the main coil

The main magnetic coil is composed of Litz wires (480×0.071 mm, Pack Feindrähte). Using Litz wire is essential to avoid the skin effect due to the high frequency current, and to keep the impedance of the coil as low as possible. 120 turns of wires are rolled up around a polyvinyl chloride (PVC) structure. Each layer of wire is separated from the others by a 0.5 mm thick fiberglass mesh to prevent electrical breakdown and sparking between the layers. Thanks to the low impedance of the coil, the heat generated inside it is moderate and can be extracted by a forced air approach. For that purpose, the coil former is pierced of several rectangular holes

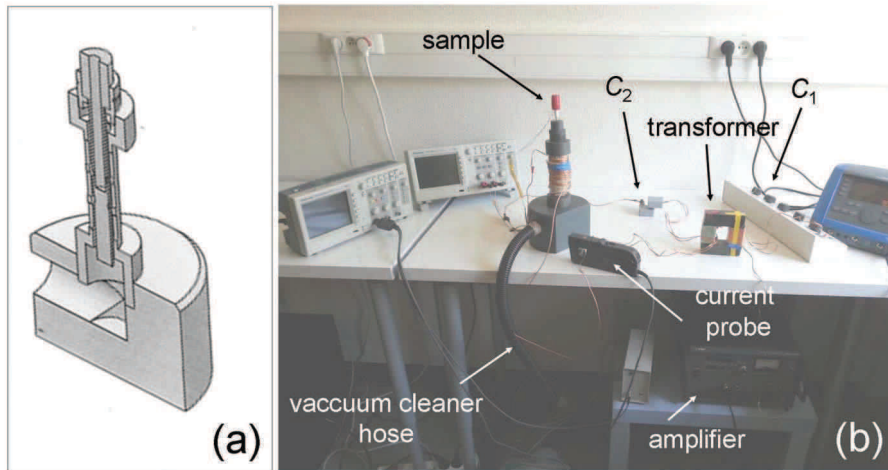


FIG. 2. (a) Technical drawing of the complete setup. (b) Picture of the complete setup.

allowing the air to go through [see Fig. 1(b)]. The coil is then put on a hollow holder and connected to a simple vacuum cleaner (Ultra Active Green, Electrolux) so the air is forced from outside the coil to the inside [see Figs. 2(a) and 2(b)]. This cheap system keeps the coil temperature stable even if a high amplitude AMF is applied during hours. In absence of cooling, the coil burns in a few tens of seconds. AMF amplitude was calibrated using a pick up coil inserted into the main coil. The amplitude of the AMF is calculated using

$$\mu_0 H_{\max} = \frac{\varepsilon}{n S_{\text{coil}} \pi f}, \quad (1)$$

where n and S_{coil} are the number of turns and surface of the pick-up coil, f the frequency of the AMF, and ε the voltage appearing at the coil terminal. Fig. 3(a) shows the AMF maximum amplitude as a function of the coil current at a fixed frequency of 54 kHz. AMF amplitude is linear with the applied current, with a factor of 2.0 ± 0.1 mT/A. Fig. 3(b) shows the evolution of the AMF amplitude as a function of the position inside the coil. As expected, the field amplitude decreases on the sides of the coil. There is a 4 cm depth plateau where AMF does not vary by more than 4%. This 4 cm height zone is used as a working area to put the sample and the measurement coils (see below).

Table I displays the evolution of the maximum AMF amplitude and current which can be generated as a function of the working frequency. The corresponding coil impedance $Z(\Omega)$ as well as the C_1 and C_2 values leading to the circuit resonance are also shown. Coil impedance increases with the applied frequency inducing a decrease of the maximum AMF. Simultaneously, this also increases the heat generated inside the coil, which is compensated by adjusting the vacuum cleaner power.

C. Hysteresis loop measurements

Now the home-made system permitting to measure the high-frequency hysteresis loop of magnetic samples is described. The detection system is schematized in Fig. 4(a). It consists of two identical contrariwise-wounded pick-up coils (7 turns of a copper wire, 0.7 mm diameter) connected in series. Let us call coil 2 the pick-up coil wounded around the

sample and coil 1 the other one [see Fig. 1(c)]. These pick-up coils are wounded around a PVC holder which maintains the sample and the pick-up coils at a constant height inside the main coil [see Fig. 1(c)]. A tapping and a nut at the top of the sample holder permit to adjust precisely its height. Two signals are required to measure the high-frequency hysteresis loops: let $e_1(t)$ be the voltage at the terminals of pick-up coil 1 and $e_2(t)$ the one at the terminals of the two coils in series [see Fig. 4(a)]. These high-frequency signals are measured by an oscilloscope (TDS 2022B, Tektronix) connected by universal serial bus (USB) to a computer and then transmitted to the latter.

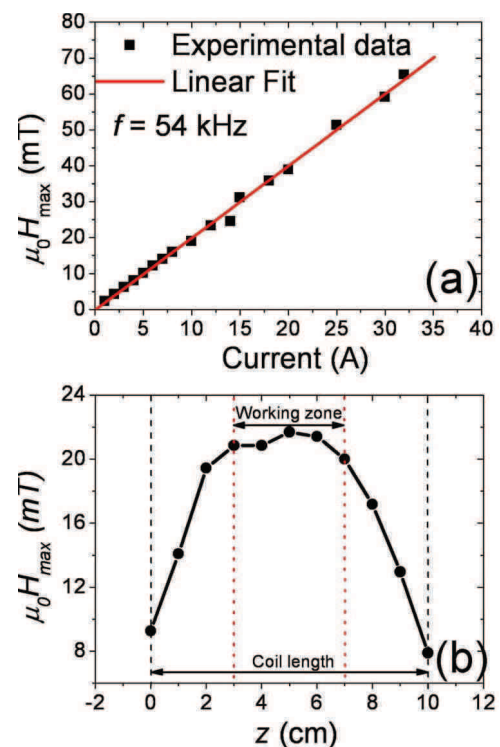


FIG. 3. (a) AMF measured as a function of the ac current sent through the main coil. (b) AMF amplitude as a function of the position inside the coil. Vertical dashed lines show the limits of the coil. Dotted lines delimitate the working zone, where the pick-up coils and the sample are placed.

TABLE I. Electrical and magnetic properties of the main coil as a function of the working frequency f . Values of capacitor in the primary and secondary circuits (C_1 and C_2), of the maximum current I , of the impedance Z , and of the magnetic field $\mu_0 H_{\max}$ are provided.

f (kHz)	C_1 (nF)	C_2 (nF)	I (A)	Z (Ω)	$\mu_0 H_{\max}$ (mT)
6.8	2200	1100	40	0.25	80
13.5	657	560	40	0.2	75
22.5	200	200	40	0.2	75
31.9	111	100	40	0.28	75
45.0	53.1	50	40	0.33	75
55.2	34.1	33	40	0.4	75
63.7	24	25	35	0.45	65
71.1	20	20	33	0.5	61
84.1	7.8	14.3	28	0.6	52
95.4	4	11.1	25	0.63	46

The protocol to measure the hysteresis loop of the sample is the following. First, the height of the empty sample holder is adjusted roughly to get a maximized signal in coil 1. Then a fine adjustment of the height is done by minimizing $e_2(t)$ signal. Each hysteresis cycle measurement then requires three steps:

- Measurement of $e_1(t)$ and $e_2(t)$ for a blank sample, which is the same vessel as the true sample filled with the same quantity of solvent but without any magnetic material.
- Measurement of the true sample.

- Then, the signal $e_2(t)$ from the blank sample is subtracted from the signal $e_2(t)$ obtained from the true sample.

A typical signal obtained from coil 1 is shown in Fig. 4(b). Signals $e_2(t)$ obtained from a magnetic sample and from the blank sample are shown in Fig. 4(c). To obtain the magnetic field and magnetization values, $e_1(t)$ and $e_2(t)$ are integrated numerically using

$$\mu_0 H(t) = \frac{\int e_1(t) dt}{n S_{\text{coil}}}, \quad (2)$$

$$\sigma(t) = \frac{\int e_2(t) dt}{\mu_0 n \rho S_{\text{sample}} \phi}, \quad (3)$$

$$M(t) = \frac{\int e_2(t) dt}{\mu_0 n S_{\text{sample}} \phi}, \quad (4)$$

σ is the magnetization per unit mass of magnetic material, M its magnetization per unit volume, S_{sample} the surface of a section of the magnetic sample, ϕ the volume concentration of the sample, and ρ the density of the magnetic material. The numerical integration is performed on data coming from a single period of the AMF; the average value of the signal on this period is subtracted from the signal before integration. The hysteresis loop is obtained by plotting σ or M as a function of $\mu_0 H$, as shown in Fig. 4(d).

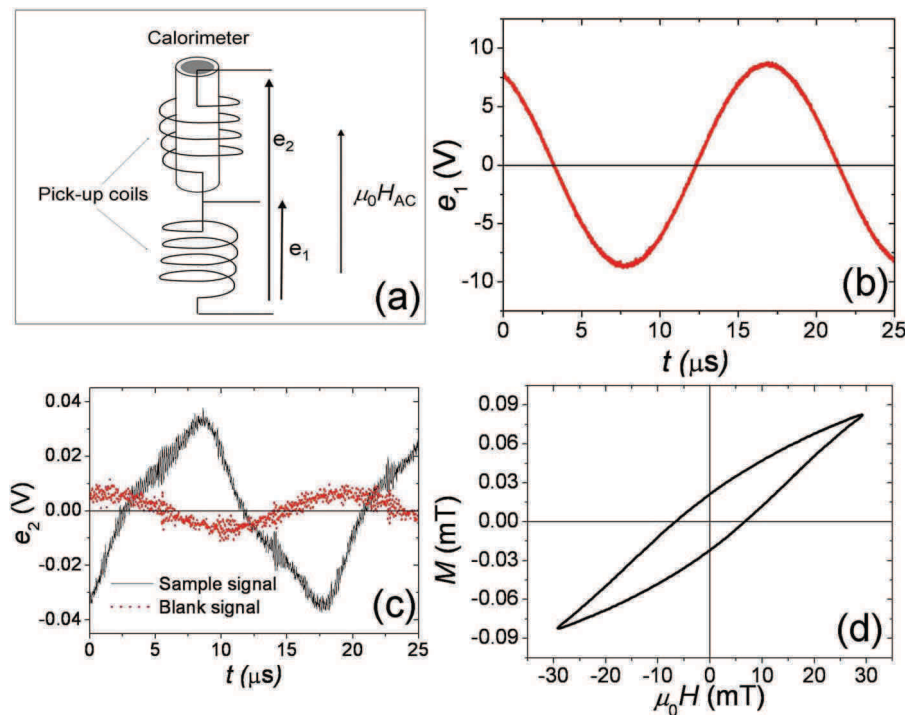


FIG. 4. (a) Schematic illustrating the detection principle using pick-up coils. (b) Typical measurement of voltage signal $e_1(t)$ measured on coil 1. (c) Typical measurement of voltage signal $e_2(t)$ measured on coil 1 and coil 2 in series. Dots correspond to the signal obtained when a blank sample is inserted. Plain line corresponds to the signal obtained when a typical magnetic sample is put inside the setup. (d) Hysteresis loop obtained after subtracting the blank sample signal from the sample one, and subsequent numerical integration.

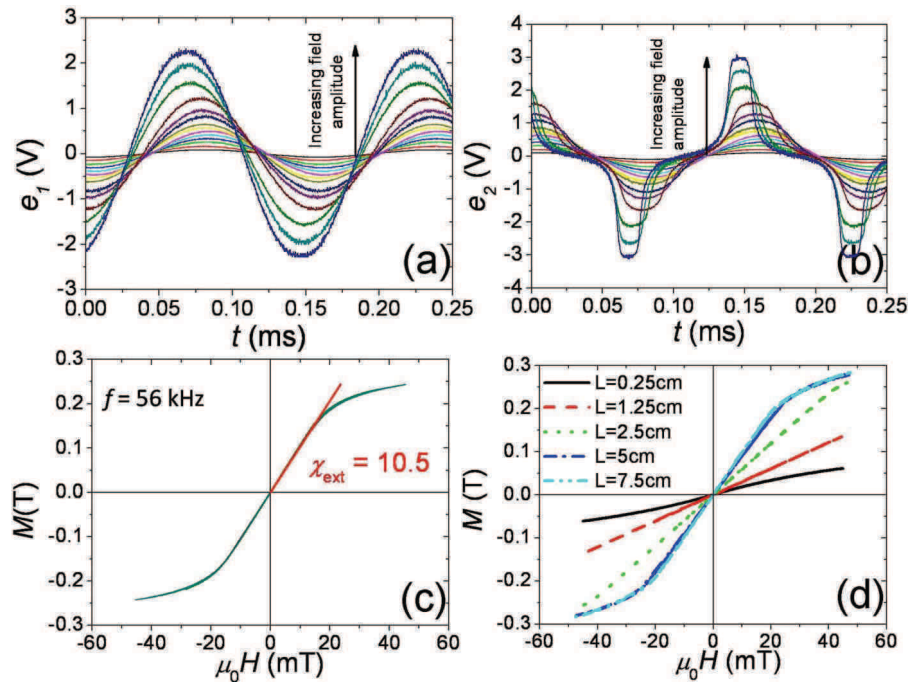


FIG. 5. Measurements of ferrite cylinder samples. (a) and (b) Signals $e_1(t)$ and $e_2(t)$ when the AMF is increased from 0 to 50 mT at a frequency of 56 kHz. A 2.5 cm long ferrite sample is measured. (c) Hysteresis loops obtained from the previous signals. All curves are superimposed on a single one. (d) Hysteresis loops obtained for ferrite samples of varying length L .

III. MEASUREMENT EXAMPLES

A. Ferrite cylinders

To validate our setup, we have performed measurements on commercial ferrite cylinders. In Fig. 5, measurements of ferrites cylinders (Ferroxcube ROD8/2563S3, 8 mm diameter) at fixed frequency as a function of AMF amplitude are shown. Raw signals in coils 1 and 2 are shown in Figs. 5(a) and 5(b) for a 2.5 cm long ferrite cylinder. Corresponding hysteresis loops obtained after numerical calculation are shown in Fig. 5(c). These ferrite cylinders display a negligible coercive field, which explains why the various hysteresis loops all collapse on a single reversible curve. The ferrite saturation is clearly observed. On this experiment, the hysteresis loop could not be measured at larger field because $e_2(t)$ became too large to be measured by the oscilloscope. The approximate saturation magnetization value (≈ 0.25 T) matches the one expected for this ferrite (0.32 T from constructor). At low AMF, the cycles display a linear part, the slope of which corresponds to the external magnetic susceptibility χ_{ext} , which in this case equals 10.5.

External susceptibility χ_{ext} is directly linked to the demagnetizing factor of the cylinder, itself being related to the cylinder length. To check the influence of this parameter, we have measured the response of ferrite cylinder of different lengths [see Fig. 5(d)]. As expected, χ_{ext} strongly diminishes when shorter cylinders are measured. Three different theoretical values of χ_{ext} have been calculated. χ_m and χ_f are derived from the magnetometric and fluxmetric demagnetizing factors extracted from the tables of Ref. 11. χ_{Boz} is another calculation derived from fluxmetric demagnetizing factors by Bozorth.¹² Comparison between these theoretical values and the experimental is shown in Table II. The agreement between

the experimental value and the theoretical one is acceptable for short ferrites, since there is a factor of 2 between both. The discrepancy increases significantly for longer samples, probably because long samples have a significant part out of the working area and are thus submitted in average to a lower AMF. However, both the reversible hysteresis loops and the saturation value expected for these ferrite cylinders are first signs of our setup validity.

B. Measurements on an iron oxide nanoparticle ferrofluid

1. Hysteresis loop measurements

The samples studied in this work were colloids of magnetite/maghemite prepared by a modified version of the well known co-precipitation method originally due to Khalafalla and Reimers.¹³ The samples were prepared by precipitation of the oxyhydroxides from molar solutions of ferrous (Fe^{2+}) and ferric (Fe^{3+}) salts. The precipitation was undertaken using ammonia. Following the initial precipitation gentle

TABLE II. Comparison between the external value of the susceptibility χ_{ext} and different theoretical values. χ_{Boz} is extracted from Ref. 12. χ_f and χ_m are extracted from Ref. 11. The constructor value for the ferrite magnetic permeability $\mu = 350$ was used.

Length (mm)	χ_{ext}	χ_f	χ_m	χ_{Boz}
6.25	1.9	4.329	4	4.35
12.5	3.9	12.48	7.87	9.09
25	8.1	31.25	17.24	25
50	19.2	104.17	35.71	66.7
75	22.1	177.3	71.43	833

warming was used to convert the oxyhydroxides nominally to magnetite (Fe_3O_4) but due to the alkalinity of the solution partial oxidation to maghemite (Fe_2O_3) occurred. Subsequently using closely controlled conditions of temperature and pH a controlled growth process was used to produce a system with a narrow particle size distribution. The particle size distribution was measured using a JEOL 2011 transmission electron microscopy (TEM) with a resolution of about 0.3 nm. Particle sizes were measured using a Zeiss particle size analyser which is essentially a light box such that the diameter of individual particles is obtained by an equivalent circle method. To ensure good statistics over 500 particles were measured and as expected a good fit to a lognormal distribution function was found. Figs. 6(a) and 6(b) show a transmission electron micrograph of the particles and the subsequent size distribution. The particles were dispersed in water using Dimercaptosuccinic acid (DMSA) at a concentration of 5 mg of Fe per ml of water. As can be seen from the TEM image the particles were relatively well dispersed with little aggregation. The colloid was dialysed to remove remaining traces of the initial salt solutions.

To measure the sample, we put 0.5 ml of colloidal solution inside a 5 mm in diameter vessel. The measurement process here is exactly the same as for the ferrite samples except that, at the end of the measurement, Eq. (3) is used instead of Eq. (4) so the magnetization per mass of MNPs σ is obtained. In Fig. 7 hysteresis loops measurements as a function of the AMF amplitude and for four frequencies in the range of our setup (19, 32, 56, and 92 kHz) are shown. For each frequency, all the cycles are plotted on the same graph. Measurements at the three lower frequencies show a very high coherency, all the curves being interlocked one inside the others. At the largest frequency (92 kHz), the observed lack of coherency reflects a lack of reproducibility on the measurements. This is due to the fact that, at large frequencies, the signal is more sensitive to even slight modification of the position of the sample inside the sample holder. As a consequence, when this setup was used for measuring various nanoparticle systems, we have always restricted our frequency to a maximum value of 56 kHz.³⁻⁵

2. Comparison between our setup and other measurement methods

To check the validity and coherency of the results obtained using our setup, we have compared it to three other measurement approaches. First, at low AMF, any magnetic system responds linearly with the applied magnetic field so its magnetic response is completely characterized by its complex susceptibility, $\tilde{\chi}$. In this regime, the hysteresis loop is an ellipse, the area of which can be calculated using¹

$$A = \pi H_{\max}^2 \chi'' , \quad (5)$$

where χ'' is the imaginary component of $\tilde{\chi}$. In Fig. 8(a), we show that the hysteresis loops measured between 2 and 30 mT at 56 kHz are all ellipses with the same shape once normalized. The data are perfectly fitted with an ellipse using Eqs. (30) and (31) of Ref. 1. From this fit, $|\tilde{\chi}|$, φ (the phase delay between the AMF and the magnetization) and so

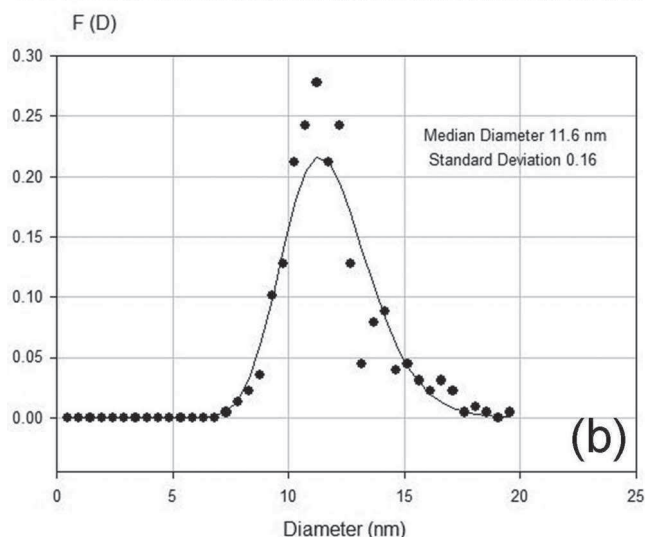
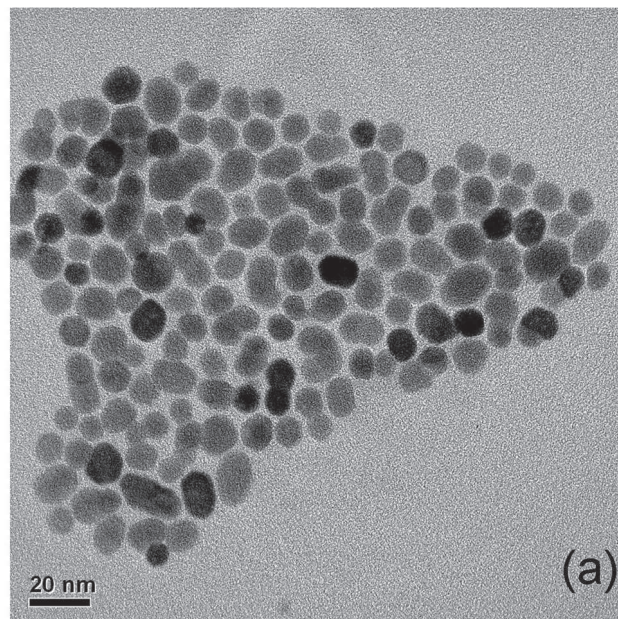


FIG. 6. (a) Transmission electron microscopy of the synthesized MNPs. (b) Size distribution of the MNPs fitted by a log-normal distribution.

$\chi'' = |\tilde{\chi}| \sin \varphi$ were determined. The hysteresis area calculated using Eq. (5) and χ'' determined this way is shown in Fig. 8(b) along with the area resulting from the integration of the individual hysteresis loops; both are logically in good agreement. In this regime where the linear response theory is valid, standard ac susceptibility measurements are in principle sufficient to determine the hysteresis area. To check it, we have connected the output of the pick-up coils to a lock-in amplifier (SR830 DSP, Stanford Research Design). As expected, phase values obtained from the lock-in amplifier are independent of the AMF amplitude in the range 2–23 mT, leading to a phase value of $\varphi = 8.7 \pm 2.6^\circ$. This means that at low magnetic, the results given by our setup matches what would be obtained with a standard susceptometer.

Second, we have compared the hysteresis loop obtained on our setup with the one obtained using a vibrating sample magnetometer (VSM) measuring the static hysteresis loop. For that purpose, a dried powder issued from the ferrofluid

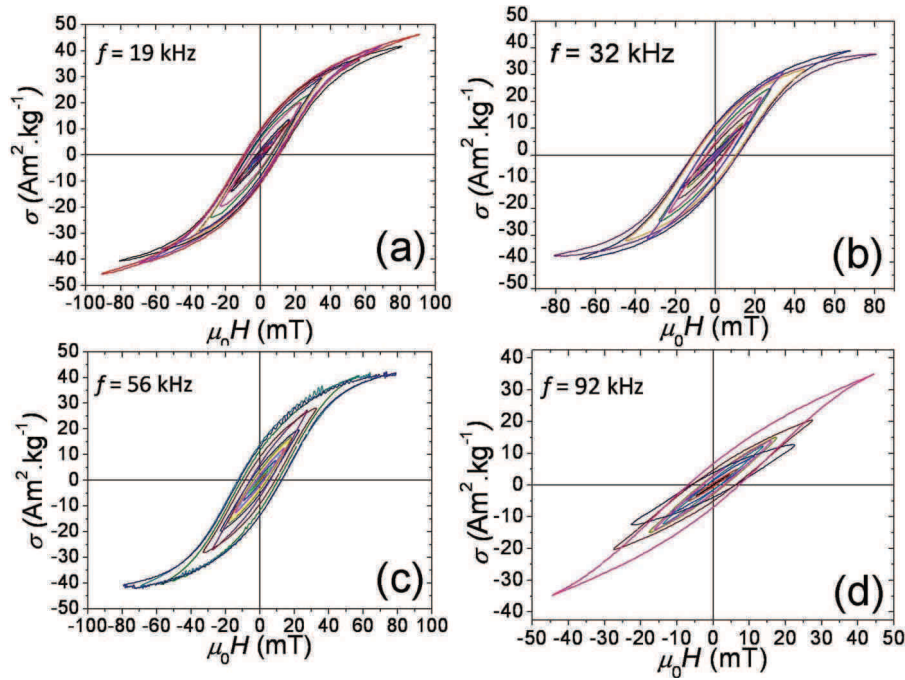


FIG. 7. Measurements on an iron oxide nanoparticle ferrofluid. The figures show the hysteresis measurements as a function of the AMF at frequencies of (a) 19 kHz, (b) 32 kHz, (c) 56 kHz, and (d) 92 kHz.

was measured. In Fig. 8(c), both measurements are compared. The static hysteresis loop measured at the VSM has a negligible coercive field, whereas the high-frequency one displays an opened hysteresis loop. In spite of this non-surprising difference due to the frequency dependence of the coercive field,

we notice that the amplitude of the magnetization and the curvature of the hysteresis loop are very similar in both setups, which is another sign of the validity of our setup.

Finally, we compare the obtained hysteresis loop with a calorific method. Indeed, the hysteresis area is related to the

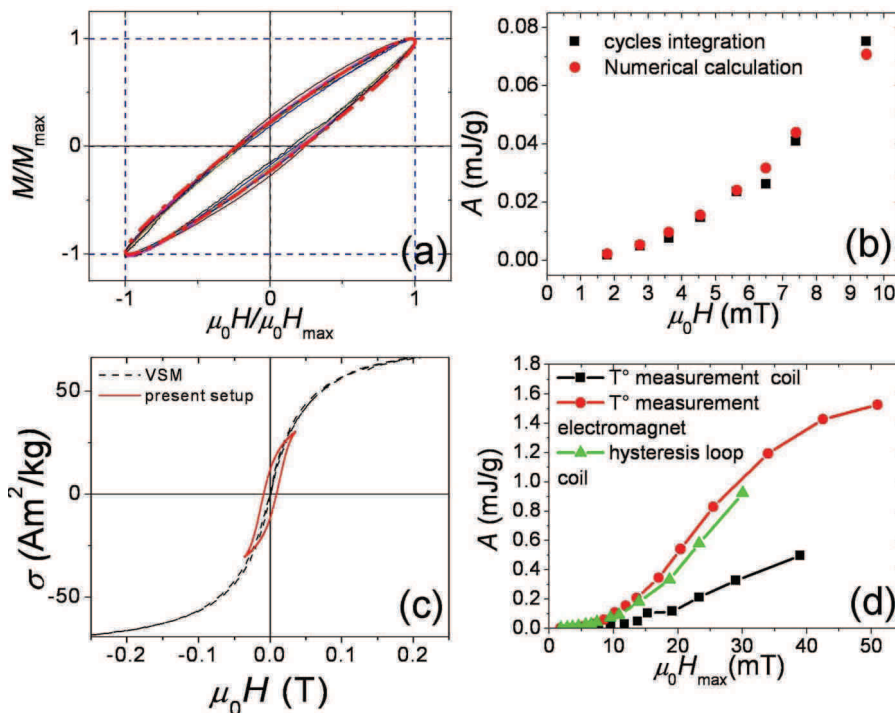


FIG. 8. Comparison between various measurement methods. (a) Normalized hysteresis loops measured at 56 kHz for $\mu_0 H_{\max}$ ranging from 2 to 18 mT. (b) Area calculated at low AMF by two methods: (■) by integration of the hysteresis loop, (●) by using Eq. (5). (c) Comparison between the hysteresis loop measured using our setup (plain line) and VSM (dashed line). (d) The hysteresis area is calculated using (■) temperature measurements inside our setup, (●) temperature measurement inside an electromagnet, (▲) integration of hysteresis loops.

specific absorption rate (SAR) of MNPs by:

$$SAR = Af. \quad (6)$$

We have thus performed SAR measurements using the protocol and analysis method described in Ref. 2. Briefly, it consists in measuring the temperature rise of the colloidal solution when the AMF is put on. We have performed these measurements (i) directly inside the present setup using the sample holder as a calorimeter, and (ii) inside the electromagnet described in Ref. 2. The hysteresis area deduced from these temperature measurements is plotted in Fig. 8(d) along with the values obtained after integrating the hysteresis loops. Hysteresis area deduced from temperature measurements on the electromagnet is in very good agreement with the one obtained from integration, which is a last confirmation of the validity of our setup. However, it is obvious from data shown in Fig. 8(d) that the present setup is not adapted to perform temperature measurements; it is very likely that, due to the presence of a strong air flow inside the setup to cool down the coil, the calorimeter losses are very large and prevent to perform any correct calorimetric measurements inside the setup. This point could be improved by inserting an adiabatic chamber inside the sample holder to insulate thermally the sample from the remaining of the setup.

IV. CONCLUSION

We designed a Litz wire coil able to generate an AMF in the range 6–100 kHz with amplitude up to 80 mT. This coil is air-cooled so no water flow is required to run the setup. Magnetic hysteresis loops are obtained using contrary-wide wounded pick-up coils inserted in a coil space where the AMF is homogeneous. Pick-up coils signals are acquired by an oscilloscope and then numerically integrated. Reproducible and stable hysteresis loops are obtained up to frequency of 56 kHz. At low AMF, when the system responds linearly to

the AMF, connecting the coils to a lock-in simply transforms the setup into a standard susceptometer. In these conditions, hysteresis area analysis and complex susceptibility measurements give identical results with respect to the magnetic response of the system. Comparison with VSM and temperature measurements indicates the coherency of our measurement results. The present setup permits an insight on the physics of magnetic hyperthermia and has proven its utility in previously published articles.^{3–5}

ACKNOWLEDGMENTS

This research was partly funded by the European Community's Seventh Framework Programm under Grant Agreement No. 262943 "MULTIFUN." We acknowledge Liquids Research for supplying the magnetic nanoparticles through the MULTIFUN Project. We thank A. Khalifaoui and B. Simonigh for machining the setup.

- ¹J. Carrey, B. Mehdaoui, and M. Respaud, *J. Appl. Phys.* **109**, 083921 (2011).
- ²L.-M. Lacroix, J. Carrey, and M. Respaud, *Rev. Sci. Instrum.* **79**, 093909 (2008).
- ³B. Mehdaoui, J. Carrey, M. Stadler, A. Cornejo, C. Nayral, F. Delpech, B. Chaudret, and M. Respaud, *Appl. Phys. Lett.* **100**, 052403 (2012).
- ⁴A. Meffre, B. Mehdaoui, V. Kelsen, P. F. Fazzini, J. Carrey, S. Lachaize, M. Respaud, and B. Chaudret, *Nano Lett.* **12**, 4722 (2012).
- ⁵B. Mehdaoui, R. P. Tan, A. Meffre, J. Carrey, S. Lachaize, B. Chaudret, and M. Respaud, *Phys. Rev. B* **87**, 174419 (2013).
- ⁶M. Bekovic, M. Trlep, M. Jesenik, V. Gorican, and A. Hamler, *J. Magn. Magn. Mater.* **355**, 12 (2014).
- ⁷M. Alderighi, G. Bevilacqua, V. Biancalana, A. Khanbekyan, Y. Dancheva, and L. Moi, *Rev. Sci. Instrum.* **84**, 125105 (2013).
- ⁸S. B. Slade, G. Kassabian, and A. E. Berkowitz, *Rev. Sci. Instrum.* **67**, 2871 (1996).
- ⁹M. Bekovic and A. Hamler, *IEEE Trans. Magn.* **46**, 552 (2010).
- ¹⁰E. Garaio, J. M. Collantes, J. A. Garcia, F. Plazaola, S. Mornet, F. Couillard, and O. Sandre, *J. Magn. Magn. Mater.* **368**, 432 (2014).
- ¹¹D.-X. Chen, J. A. Brug, and R. B. Goldfarb, *IEEE Trans. Magn.* **27**, 3601 (1991).
- ¹²Richard M. Bozorth, *Ferromagnetism* (Wiley-VCH, 1993), pp. 992.
- ¹³S. E. Khalafalla and G. W. Reimers, *IEEE Trans. Magn.* **16**, 178 (1980).

Article II-2

Large scale production of biocompatible magnetite nanocrystals with high saturation magnetization values through green aqueous synthesis†

Cite this: DOI: 10.1039/c3tb20949k

Marzia Marciello,^{*a} Vincent Connord,^c Sabino Veintemillas-Verdaguer,^a Manuel Andrés Vergés,^b Julian Carrey,^c Marc Respaud,^c Carlos J. Serna^a and M. Puerto Morales^a

In this work, a straightforward aqueous synthesis for mass production (up to 20 g) of uniform and crystalline magnetite nanoparticles with core sizes between 20 and 30 nm, which are the optimum nanoparticle core sizes for hyperthermia applications, is proposed. Magnetic and heating properties have been analyzed showing very high saturation magnetization and magnetic heating values. To stabilize the naked magnetite nanocrystals at physiological pH and increase their circulation time in blood, they have been covalently coated with carboxymethyl dextran, a biocompatible polymer. The influence of this superficial modification on the magnetic and heating properties has been studied showing that these biocompatible magnetic nanocrystals maintain high saturation magnetization values, good colloidal stability and hyperthermia properties in the presence of the polymeric external layer. These particles, suitably functionalized, could be used to selectively kill cancer cells under a moderate alternating magnetic field (44 mT and 70 kHz).

Received 7th July 2013

Accepted 10th September 2013

DOI: 10.1039/c3tb20949k

www.rsc.org/MaterialsB

Introduction

Magnetic nanoparticles are promising drug delivery systems because they can be manipulated by a magnetic field avoiding a general systemic distribution of the drug bound to the nanoparticle and achieving high local drug concentrations with the administration of lower doses.^{1–3} They can be applied in diagnosis as molecular magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents, in specific drug targeting, in magnetofection for gene therapy,⁴ tissue engineering and repair, biosensing, biochemical separations, bioanalysis⁵ and also in cancer treatment by hyperthermia.^{6,7} In particular, iron oxide magnetic nanoparticles (magnetite, Fe₃O₄, and maghemite, γ -Fe₂O₃) have received a considerable interest in this field because of their biocompatibility, biodegradability and physiological stability.¹

Hyperthermia is an attractive strategy of cancer treatment based on heat generation by magnetic nanoparticles on the tumor site⁸ presenting fewer side effects compared to chemo-

radiotherapy and it can be used in combination with conventional therapeutic treatments.⁹ The mechanism of hyperthermia relies on selective tumoral cell heating (in the temperature range of 41–46 °C) resulting in the activation of natural intra and extracellular degradation mechanisms that finally lead to apoptosis with cancer cell death.⁸ Theoretical and experimental optimal nanoparticle diameter for this application increases with the magnetic field and decreases with frequency in a range that depends on the anisotropy of the material, concentration, media viscosity, *etc.*¹⁰ In the case of magnetite, 16 nm seems to be the optimum size for uniform and spherical particles showing maximum heating efficiency in a 373 kHz, 20 mT alternating magnetic field,¹¹ while for cube-shaped nanoparticles, 19 nm particles had the best performance under all tested conditions (up to 30 mT and 700 kHz).⁶ For elongated Fe₃O₄ nanoparticles with aspect ratio 1.5, the optimum size ranges from 13 to 18 nm as the magnetic field amplitude increases from 6 to 36 mT, keeping the value of $H \cdot f$ constant.¹² These large core sizes are also preferable for magnet-assisted drug targeting because of their higher magnetic moment per particle.^{13,14} However, to obtain nanoparticles in this size range (superparamagnetic–ferromagnetic limit) with the strict condition of uniformity and colloidal stability in physiological conditions required for biomedical applications is not an easy task. Nanoparticles should also form a stable colloidal suspension under physiological conditions with a hydrodynamic size (nanoparticle size in solution) lower than 100 nm to slow down the immune system detection by macrophage-mediated uptake.^{3,15,16}

^aInstituto de Ciencia de Materiales de Madrid, ICMM/CSIC, Campus UAM, Sor Juana Inés de la Cruz 3, 28049 Madrid, Spain. E-mail: marziamarciello@icmm.csic.es; Fax: +34 913720623; Tel: +34 913349000

^bDepartamento de Química Orgánica e Inorgánica, Universidad de Extremadura, Avda Elvas s/n, 06071 Badajoz, Spain

^cLaboratoire de Physique et Chimie des Nano-Objets, LPCNO, UMR 5215, 135 avenue de Rangueil, 31077 Toulouse, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Additional experimental procedures, additional data of synthesis and characterization of MNCs. See DOI: 10.1039/c3tb20949k

Nowadays, different techniques to synthesize iron oxide nanoparticles with a size between 5 and 100 nm have been developed. There are physical (gas-phase deposition and electron beam lithography), wet chemical (sol-gel, oxidation, chemical co-precipitation, hydrothermal reactions, thermal decomposition of organic compounds, *etc.*) and microbial methods.⁵ Most of these methods are complex or need further organic impurity purification that limit their reproducibility and reduce the possibility to reach a scalable process. For potential industrial applications, the synthesis process should be as easy, clean and cost effective as possible, ruling out methods in non-aqueous media. Co-precipitation of iron(II), iron(III) salts (*i.e.* chlorides, sulphates, nitrates) in aqueous solution^{3,17} is the standard technique due to its reproducibility and yield but shows a non-complete control of particle size distribution and certain atomic disorder due to the low synthesis temperature.^{15,18} Unfortunately nanoparticles larger than 15 nm are unattainable by this method. Recently, based on Sugimoto's work,¹⁹ our group has obtained highly crystalline and monodispersed MNCs with core sizes between 35 and 100 nm by precipitation of an iron(II) salt in water.^{20,21} Preliminary results showed that as-synthesized magnetic nanoparticles of 35 nm showed specific absorption rate values (SAR) two fold higher than 10 nm particles.²² This has encouraged us to explore the possibilities of a further reduction in particle size, scaling of the synthesis process and the stabilization of these particles in water by polymer coating which constitute the main subject of this work.

The coating material should satisfy some key requirements such as (i) stabilization of magnetic colloids under physiological conditions, (ii) low or no toxicity, (iii) site-specific targeting ability and (iv) presence of different functional groups allowing subsequent conjugation of biomolecules (*i.e.* antibodies, drugs, peptides, enzymes or nucleotides).²³ A wide set of coatings have been studied including amphiphilic micelles, inorganic and organic compounds, and polymers.^{13,23} Among them, dextran (a polysaccharide composed of α -D-glucopyranosyl units) is preferred due to its extremely low toxicity by the intravenous route, enhancement of blood circulation time and the presence

of chemical groups for further functionalization.^{24,25} Some problems can be associated with the nanoparticle coating strategy, such as an inhomogeneous surface coverage and a low binding strength.²³ If dextran is attached to the nanoparticle surface by weak interactions such as physical adsorption, less control of coupled functional groups and, more importantly, the loss of coating in particular conditions (*i.e.* the physiological medium) could occur^{25,26} with consequent nanoparticle aggregation and possible cytotoxicity.²⁷ So a strong binding between the polymer and the nanoparticle surface is preferred.

In this paper, we describe the synthesis of uniform magnetic nanocrystals with particle diameters ranging from 20 to 30 nm (close to the superparamagnetic–ferrimagnetic limit). The synthesis process has been successfully scaled up by 10 times (20 g per batch) compared to previous reports without appreciable loss of homogeneity and magnetic properties. The optimized conditions allow high reproducibility from batch to batch, making this synthetic method potentially exploitable at the industrial level. A suitable coating strategy of these relatively large magnetic nanocrystals was developed by successive coating layer upon layer of negatively and positively charged molecules to reduce the hydrodynamic size and increase the number of active sites to strongly bind a biocompatible polymer (carboxymethyl dextran, D) (Fig. 1). Finally the performance of such colloids for hyperthermia applications was evaluated as a function of particle size and under different alternating magnetic field conditions. Thus, the possibility to generate stable colloids using magnetic nanoparticles with high magnetization was demonstrated. It should be noted that the particles prepared in this work have application not only in biomedicine but also in catalysis and environment areas (impurity removal of water and food quality control for example).²⁸

Experimental section

Magnetic nanocrystal synthesis

Fe₃O₄ nanocrystals were synthesized by a direct method in aqueous medium.²⁰ Briefly, a FeSO₄ solution was quickly added

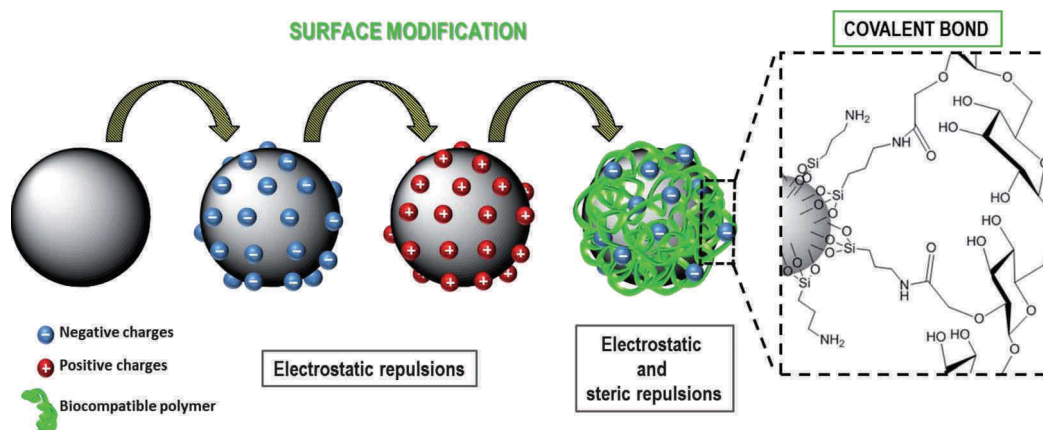


Fig. 1 General strategy for magnetic nanocrystal coating. Negatively charged blue dots represent –OH groups after MNC surface modification with TEOS; positively charged red dots indicate the presence of –NH₂ groups on the MNC surface after APTS linkage. Finally D was covalently bonded.

to the basic solution in the presence of potassium nitrate (acting as an oxidant) under stirring and nitrogen flow in a three-necked round bottom flask. The precipitate was then placed in an oil bath at 90 °C with mechanical stirring for 15 min and left tightly closed for 24 h without agitation. Before salt precipitation, nitrogen was bubbled for 2 hours through different solutions, one containing 20 ml of FeSO₄ in 10⁻² M H₂SO₄ (to prevent uncontrolled hydrolysis) and the second one with 80 ml of water and 100 ml of ethanol (EtOH) containing sodium hydroxide (NaOH) and potassium nitrate (KNO₃). In this work FeSO₄ concentration was increased from 0.025 M to 0.2 M, the base concentration from 0.07 M to 0.2 M and the oxidant concentration from 0.05 M to 0.2 M, keeping the excess hydroxyl ion concentration in the reaction media constant at 0.018 M (as calculated by applying the following equation: $[\text{OH}^-]_{\text{excess}} = [\text{NaOH}] - 2[\text{FeSO}_4]$).¹⁹ A similar procedure was carried out using FeCl₂ as the precursor salt. The precipitation was carried out in water and in water–EtOH 50/50 v/v, keeping the same excess (0.025–0.2 M Fe salt; 0.07–0.23 M NaOH; and 0.05–0.1 M KNO₃). At the end of the synthesis the system was cooled down and the nanocrystals were separated by magnetic decantation followed by five washings with distilled water. The yield of the reaction was nearly 100%, obtaining between 400 mg and 4 grams on each batch depending on the initial Fe salt concentration.

The process has been scaled up by 10 times with respect to the quantity of reactants mentioned above.²⁰ The reaction was carried out in a 2.4 liter double-walled reactor heated by means of a thermostated fluid set to 90 °C using a thermostat. The whole process was performed in a glove box under nitrogen. A very important point to consider during this synthesis is to avoid air contact. A small leak in the apparatus leads to the formation of lepidocrocite and goethite as secondary phases, resulting in nanoparticles heterogeneous in size and shape (Fig. S1, ESI†).

Nanocrystal characterization

Particle size and shape were studied by transmission electron microscopy (TEM) using a 200 keV JEOL-2000FXII microscope. TEM samples were prepared by placing one drop of a dilute suspension of magnetite nanocrystals in water on a carbon coated copper grid and allowing the solvent to evaporate slowly at room temperature. The mean particle size (D_{TEM}) and distribution were evaluated by measuring at least 200 particles and fitting the data to a log-normal distribution. For the highest resolution images, a 200 keV Philips Tecnai 20 microscope was used.

Colloidal properties of the samples were studied using a Zetasizer Nano ZS TM, from Malvern Instruments. The hydrodynamic size of the particles in suspension was measured by Dynamic Light Scattering (DLS) diluting the sample in ultrapure water and the electrophoretic mobility was measured as a function of pH at 25 °C, using 10⁻² M KNO₃ as the electrolyte and HNO₃ and KOH to change the pH of the suspension. Hydrodynamic size calculated by DLS (based on intensity data) was compared to the aggregate size observed by TEM. To avoid

agglomeration during drying of the coated dispersions, they were highly diluted and nebulized onto the microscope grid during the preparation of the samples. The size measured by electron microscopy corresponds to the magnetic core of the aggregates.

Functionalization of the nanoparticle surface was followed by Fourier transform infrared measurements (FT-IR), carried out using a Nicolet 20SXC FT-IR spectrometer. Samples were dispersed in KBr at 2 wt% and pressed in a pellet. The IR spectra were registered between 4000 and 400 cm⁻¹. Thermogravimetry (TG) and differential thermal analysis (DTA) of the magnetite powders were carried out using a Seiko TG/ATD 320 U, SSC 5200. The analysis was performed from room temperature up to 900 °C at a heating rate of 10 °C min⁻¹ in an air flow.

The magnetic characterization of the powders was carried out using a vibrating sample magnetometer (MLVSM9 MagLab 9T, Oxford Instruments). Coercive field and saturation magnetization values were obtained from the hysteresis loops recorded at room temperature and at 5 K after applying a magnetic field of ±3T. Saturation magnetization values were evaluated by extrapolating to infinite field the experimental results obtained in the high field range where the magnetization linearly decreases with 1/H. The same measurements were carried out for aqueous suspensions (100 μl). Magnetization curves were recorded at 250 and 5 K by first saturating the sample in a field of 5 T. ZFC/FC data were obtained by first cooling the sample in zero or 10 mT applied field (ZFC and FC process, respectively) from room temperature to 5 K. Then, a field of 100 Oe was applied and the variation of magnetization was measured while increasing the temperature up to 250 K. Magnetization values are given in A m² kg⁻¹ of MNCs for the dry samples and the dispersions.

Magnetic hyperthermia (MH) properties have been characterized through measurements of temperature rise or by measuring high-frequency hysteresis loops. Temperature measurements were performed on a specially designed frequency-adjustable electromagnet using differential measurements between a sample containing MNPs and a reference sample containing only water.²⁹ A typical example of a temperature rise curve during the field application is included in Fig. S2 (ESI†) (denoted AMF ON). The magnetic field application time was 100 s. After the magnetic field is switched off, the sample is shaken for temperature homogenization, which is checked by putting two probes at the top and the bottom of the calorimeter. The temperature rise ΔT_{final} used for SAR calculation is shown as a double-ended arrow and it is calculated from the mean slope of the temperature rise using a standard formula. SAR is also directly related to the high-frequency area A of the hysteresis loop through the equation $\text{SAR} = A \cdot f$.³⁰ Measuring A was thus used as an alternative method to access the SAR, using a home-made setup described elsewhere.³¹

Nanocrystal surface modification

A22-T. In an ultrasound bath, 57 ml of iso-propanol, 25.5 ml of ultrapure water and 5.7 ml of ammonium hydroxide

(NH₄OH) 25% were added to 3 ml of a magnetite nanocrystal suspension containing 57 mg of iron. Later 57 μ l of tetraethylorthosilicate (TEOS) was added dropwise to the suspension (different amounts of TEOS have been tested, data reported in the ESI, Fig. S3†).³² The dispersion was sonicated for 15 minutes at room temperature and then centrifuged at 9000 RCF for 10 minutes. Subsequent 3–4 washings with iso-propanol and the last one with ethanol were done before re-suspending the nanocrystals in water.

A22-TA. Sample A22-T was functionalized with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS) with APTS/nanocrystals in the ratio of 50 : 1 (w/w) (A22-TA). For the APTS coating, 1 ml of a nanocrystal suspension containing 10 mg of A22-T was dispersed in 4 ml of ultrapure water in the presence of 0.3 M nitric acid in an ultrasonic bath. Subsequently 5 ml of methanol was added to the aqueous suspension and sonicated for five more minutes. Later 529 μ l of APTS was added dropwise (different volumes of APTS were tested, Fig. S4, ESI†).³³ The suspension was left for 15 hours at room temperature with mild mechanical agitation. After this time the sample was washed 3–4 times with ethanol by centrifugation (9000 RCF, 25 °C) with removal of the supernatant. After the last washing the residual ethanol was evaporated from the pellet with compressed air and A22-TA was resuspended in distilled water. The A22 sample was also directly coated with APTS for comparison, following a similar protocol to that described above.

A22-TAD. Sample A22-TA was subsequently coated with carboxymethyl dextran (D, 12 kDa) through amide formation by using carbodiimide (CDI). D was activated by CDI (20 mM) in the presence of *N*-hydroxysuccinimide (NHS, 100 mM). The activation process of the 1 mg ml⁻¹ D dispersion was done in water at pH 5 under mild agitation for 2 hours. After this time, a suspension of 1 mg ml⁻¹ of APTS-TEOS coated magnetic nanocrystals (2 moles of D per mole of MNCs) was added to D solution and the pH was increased to 7.8 to facilitate the reaction of amino groups of nanocrystals with the activated carboxylic groups of the dextran. After 15 hours of mild mechanical agitation, the suspension was washed 3 times with distilled water.

Results and discussion

Characterization of synthesized MNCs and evaluation of their magnetic and heating capacity

Uniform and highly crystalline MNCs with sizes between 20 and 30 nm have been obtained in water–ethanol 1 : 1 (v/v) medium using different iron salt concentrations and keeping constant the hydroxyl ion excess ([OH⁻]_{excess} = 0.018 M). By increasing the iron(II) salt concentration from 0.025 to 0.2 M we cause a massive and instantaneous nucleation that results in smaller crystals (Table 1). In the case of sulphate salt, the average nanocrystal core size decreases from 34 to 22 nm and the particle becomes spheroidal, as can be seen from TEM micrographs (Fig. 2). A further increase in FeSO₄ concentration led to the formation of nanoparticles with a broad size and shape distribution. When iron(II) chloride salt was used as an Fe precursor, the presence of water–ethanol in 1 : 1 ratio (v/v) as

Table 1 Particle size and shape for MNCs obtained with different reaction conditions (water–ethanol ratio 1 : 1 = (v/v); [OH⁻]_{excess} = 0.018 M; [KNO₃] = 0.05 M)

Sample name	Salt type	[Fe(II)]	[OH]	Size (nm) (σ)	Shape
A34	FeSO ₄	0.025	0.07	34 (0.11)	Cubic
A26		0.1	0.22	26 (0.17)	Cubic
A22		0.2	0.42	22 (0.21)	Cubic and spheric
A31	FeCl ₂	0.025	0.07	31 (0.13)	Cubic
A30		0.1	0.22	30 (0.30)	Irregular
A27		0.2	0.42	27 (0.34)	Irregular

reaction media led to a reduction in nanocrystal size from 46 to 31 nm with a very narrow size distribution and cubic shape (Fig. S5, ESI†), in a similar way to that when sulphate salt was used.²⁰ However, when the iron(II) chloride concentration was increased to 0.1 and 0.2 M (keeping constant the [OH⁻]_{excess} = 0.018 M), polydispersed nanocrystals were obtained (Table 1 and Fig. 2). The method was reproducible and a mass production of 20 g of MNCs in one batch was achieved by using a 2 l reactor and 0.2 M FeSO₄. The prepared MNCs appear uniform in size with a narrow size distribution of 20%, as shown in the low magnification TEM and SEM micrographs (Fig. S6A and B, ESI†).

The variation in particle shape from octahedral to spherical as particle size decreases was previously observed for magnetite particles prepared by different methods.³⁴ It has been reported that in general for a given material, the resulting crystal morphology depends upon solution conditions such as supersaturation.³⁵ At low supersaturation levels, polyhedral crystals are favoured due to the low driving force and extended growth that lead to well-ordered crystallographic (100) and (111) faces. At high supersaturation levels there is abundant nucleation and the rate of growth is limited by the rate of diffusion of new material to the crystal surface; the growing surface tends to become rougher and the particles become spherical as is the case with sample A22.

The formation of crystalline magnetite nanoparticles independently on the iron salt precursor was confirmed by X-ray analysis (Fig. 3). All peaks were assigned to a spinel structure similar to magnetite (JCPDS 89-0691) with crystal sizes of 23 and 30 nm, respectively. The presence of crystalline planes in the high resolution TEM micrographs of A22 and A31 samples, both with an interlayer spacing of 0.48 nm corresponding to (111) planes typical of magnetite, also confirmed the crystalline nature of these MNCs. Infrared spectra for MNCs prepared using the same reactant concentrations but from different iron salts (A34 and A31) show similar features: two main peaks at low frequency due to magnetite (around 400 and 600 cm⁻¹),³⁵ a broad peak at around 1000 cm⁻¹ due to surface impurities coming from the iron salts (SO₄²⁻) and/or silica coming from the reaction vessel, and a broad band at 3000 cm⁻¹ due to water (Fig. S7†). The magnetic behavior of these nanocrystals in powder form was investigated at room temperature (RT). Values of saturation magnetization (M_s) and coercivity (H_c) as a function of particle size are given in Fig. 4(a). Particles with sizes

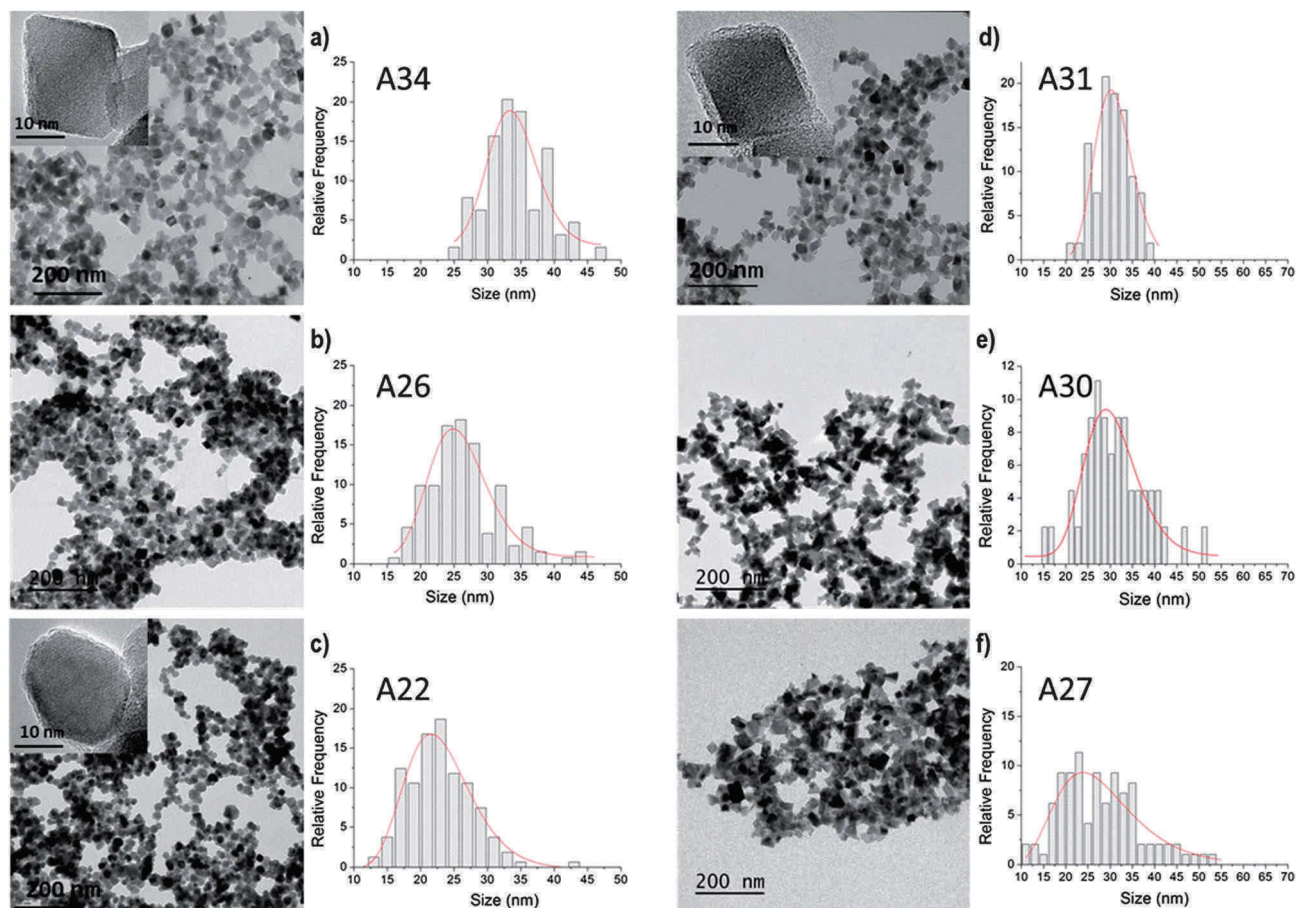


Fig. 2 TEM micrographs and size distribution (log-normal fit) of nanocrystals synthesized with increasing sulphate iron(II) salt concentrations (a–c) and chloride iron(II) salt concentrations (d–f). High resolution TEM micrographs of A34 (a), A22 (c) and A31 (d) are reported. (The external layers observed on A22 and A31 samples are artifacts due to contamination from the TEM grid.)

larger than 35 nm showed saturation magnetization values close to $90 \text{ A m}^2 \text{ kg}^{-1}$ and coercivity values of around 10 mT, which agree well with the theoretical values reported for bulk magnetite.³⁶ As particle size decreases down to 22 nm, the saturation magnetization value decreases to $82 \text{ A m}^2 \text{ kg}^{-1}$ probably as a consequence of surface spin canting. Coercivity also decreases to 3 mT, indicating that these nanocrystals are close to the superparamagnetic limit (Fig. 4(b)). To check the heating properties of the as-synthesized samples, SAR and high-frequency measurements were performed under two different conditions: 70 kHz/44 mT and 102 kHz/20 mT. The first one is expected to lead to large hysteresis areas (A) by favouring the magnetic saturation of the MNPs whereas the second one is closer to clinical conditions.^{7,9} For applications in medicine, frequencies in the range of 50–1200 kHz and field strengths in the range of 0–20 mT are used, while keeping the value of $f \cdot H$ smaller than $5 \times 10^9 \text{ A m}^{-1} \text{ s}^{-1}$, calculated as the discomfort limit.³⁷ However, it is clear that the clinical tolerability of a therapeutic administration of hyperthermia to counteract cancer is likely to be higher than that of a healthy volunteer's experience of discomfort after prolonged periods.³⁸ Data as a function of MNC size obtained are shown in Fig. 5. All samples are much more efficient at a large magnetic field.

The high-frequency hysteresis loops measured on these samples (Fig. 5(b) and (c)) evidence that, at 20 mT, MNCs are not saturated at all and display a much closed minor loop, which explains their low SAR value. On the contrary, at 44 mT, hysteresis loops show that MNCs are closer to saturation and display a more open ferromagnetic-like hysteresis loop. The effective “saturation” magnetization observed in high-frequency measurements is a combination of the saturation magnetization and the coercive field of the nanoparticles. Basically, a smaller coercive field will induce a larger effective “saturation” magnetization in high-frequency measurements as is the case for sample A22. Limitations in the field amplitude do not allow utilization of the complete hysteresis loop but based on these results we expect a huge loss power at higher magnetic fields, in particular for the smallest nanocrystals that present the highest magnetisation value. For instance, it has been reported that for a sample that gives a SAR value of only 3 W g^{-1} for a reasonable field amplitude of 14 kA m^{-1} , one may estimate a loss power of 2.4 kW g^{-1} for the full hysteresis loop (100 kA m^{-1}).³⁹

Among the studied samples, A22 displays at 44 mT a hysteresis area $A = 1.83 \text{ mJ g}^{-1}$, which is a very good value for iron oxide magnetic nanoparticles,^{40,41} and consequently, this

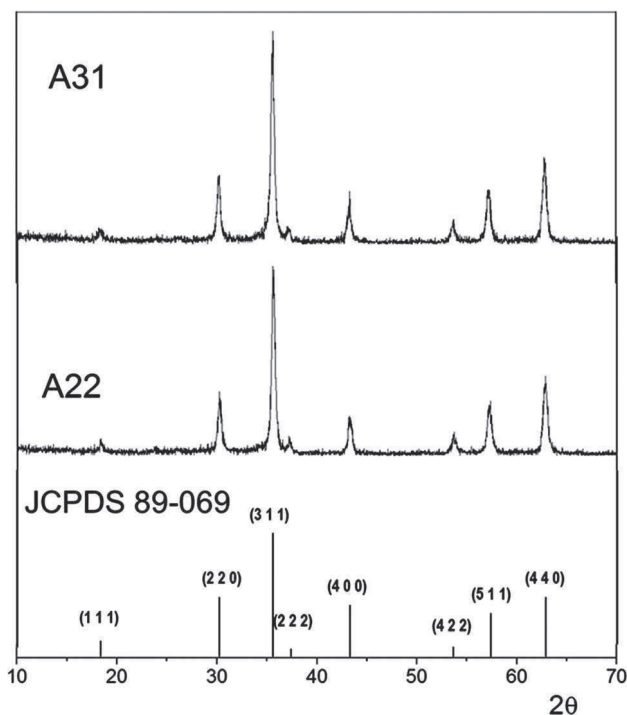


Fig. 3 X-ray diffraction patterns for magnetite nanocrystals synthesized from different iron salts (A22 from FeSO_4 and A31 from FeCl_2) compared with standard profiles of magnetite (JCPDS 89-0691).

sample was selected for dextran coating and evaluating the effect of coating on magnetic and heating properties.

Characterization of surface modified MNCs

The coating strategy followed in this work consists of three steps: (1) activation of the MNC surface with hydroxyl groups by means of tetraethylorthosilicate (TEOS); (2) supplying amino groups by means of strongly coupled APTS; (3) formation of an amide bond with carboxylic groups of the carboxymethyl dextran by carbodiimide reaction (Fig. 1). Surface modification of the MNCs with D by the formation of a strong bond and the presence of carboxylic groups at the surface are expected to be sufficient to overcome the strong magnetic interaction between these large particles and to achieve colloidal stability. Naked

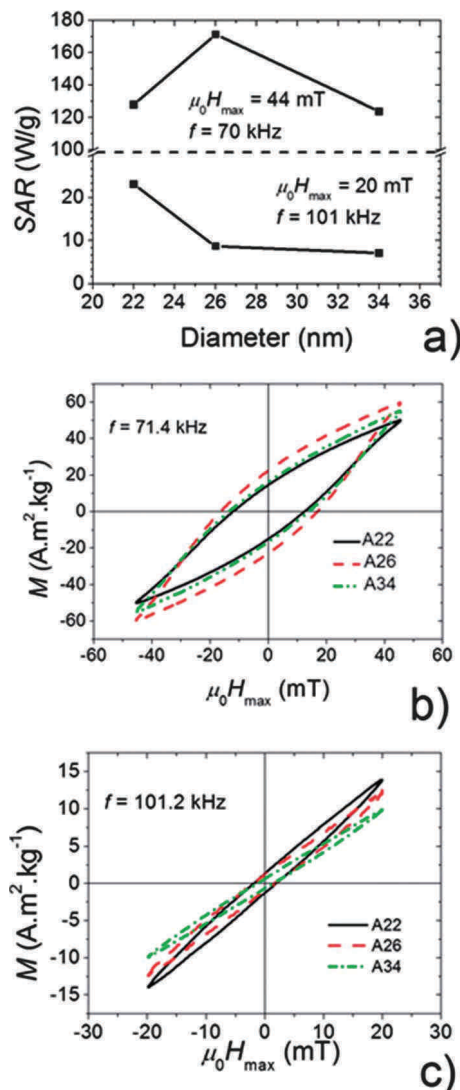


Fig. 5 SAR of samples A22, A26 and A34 under two experimental conditions (44 mT/70 kHz and 20 mT/101 kHz); (a) SAR deduced from temperature measurements as a function of the MNC diameter; (b and c) hysteresis loop measurements for the three samples at both frequencies.

MNCs have a relatively low reactivity that makes essential the formation of a first TEOS layer to increase the amount of dextran molecules bonded to the MNC surface.

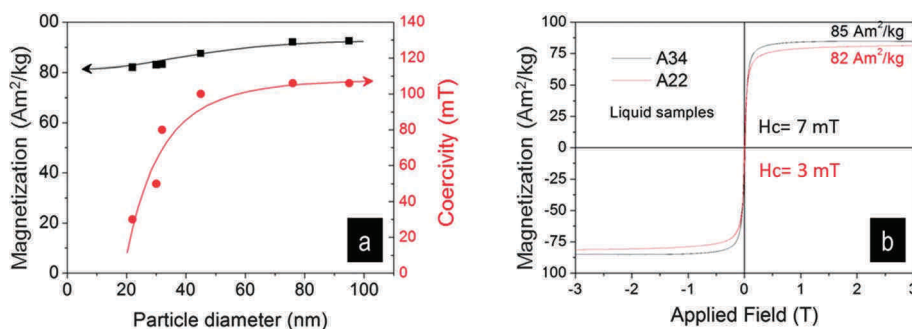


Fig. 4 (a) Saturation magnetization and coercivity values at room temperature for uncoated MNCs with different sizes. Values for the largest particles were obtained from Vergés *et al.*²⁰ (b) Magnetization curves at 250 K for colloidal suspensions of uncoated nanocrystals.

Surface modification was followed by FT-IR spectroscopy and surface charge (Z-potential) as a function of pH (Fig. 6 and 7). The presence of silica on MNCs is evidenced by the band at 1084 cm^{-1} in the IR spectrum for A22-T (Fig. 6A(b)) assigned to the Si-OH bond stretching. The isoelectric point in comparison to uncoated MNCs was shifted from pH 7 to pH 3 indicating the presence of hydroxyl groups on the A22-T surface (Fig. 7A). After surface modification with APTS (A22-TA) IR spectra show the appearance of a small peak at 1638 cm^{-1} indicating the presence of amino groups on the MNC surface and another peak at 1100 cm^{-1} corresponding to silane groups from the stretching band Si-O-Si (Fig. 6A(c)). The isoelectric point is shifted from pH 3 for A22-T to pH 6.5 for A22-TA, confirming the presence of aminopropyl groups in the outermost layer (Fig. 7A). Finally, D was linked to the aminopropylsilane coated magnetic nanocrystals (A22-TA) through carbodiimide/*N*-hydroxysuccinimide chemistry. Fig. 6A(d) shows the FT-IR spectrum for this sample with the appearance of a peak at 1600 cm^{-1} characteristic of the formed $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}-\text{H}$ secondary amide bond, confirming the covalent bond formation. The band at 1419 cm^{-1} could be assigned to asymmetric and symmetric stretching vibrations of COO^- groups. A slight increase in peak intensity at 3400 cm^{-1} indicates the presence of $-\text{OH}$ groups. The isoelectric point of A22-TAD was shifted to lower pH values compared to A22-TA (from 7 to 4), which agrees with the presence of hydroxyl- and

carboxy-groups on the particle surface (Fig. 7A). At pH 7.4 (physiological pH) the surface charge of these dextran coated magnetic nanocrystals was around -40 mV , conferring colloidal stability to these large nanoparticles.

Quantification of the coatings was done by thermogravimetric analysis (Fig. 6B). TG analysis of the coated sample A22-TAD confirmed the presence of 8 wt % organic matter on the nanoparticle surface. A rapid weight loss was observed between 160 and $300\text{ }^\circ\text{C}$ due to the thermal decomposition of the polymer. The total weight loss over the full temperature range ($0\text{--}900\text{ }^\circ\text{C}$) was estimated to be 1% for the uncoated sample A22, 2.6% for A22-T and 3% for the amino functionalized A22-TA. It should be noted that when MNCs were directly coated with APTS and D (A22-AD), a small amount of amino groups were bonded to the MNCs as confirmed by the slight shift of the isoelectric point from pH 6.5 to 7.5 (Fig. S8, ESI[†]) and from the TG analysis showing the presence of a smaller amount of dextran at around 4%. In conclusion, polymer coating is more effective when silica is deposited before the treatment with APTS. It is interesting to note the suppression of the unexpected weight gain in the $120\text{--}210\text{ }^\circ\text{C}$ temperature range in the coated samples, which is attributable to the oxidation of magnetite to maghemite present in the naked sample A22. This means that coated particles are completely oxidized to maghemite (Fig. S9, ESI[†]) and the Fenton reaction responsible for oxidative stress with high health risk is

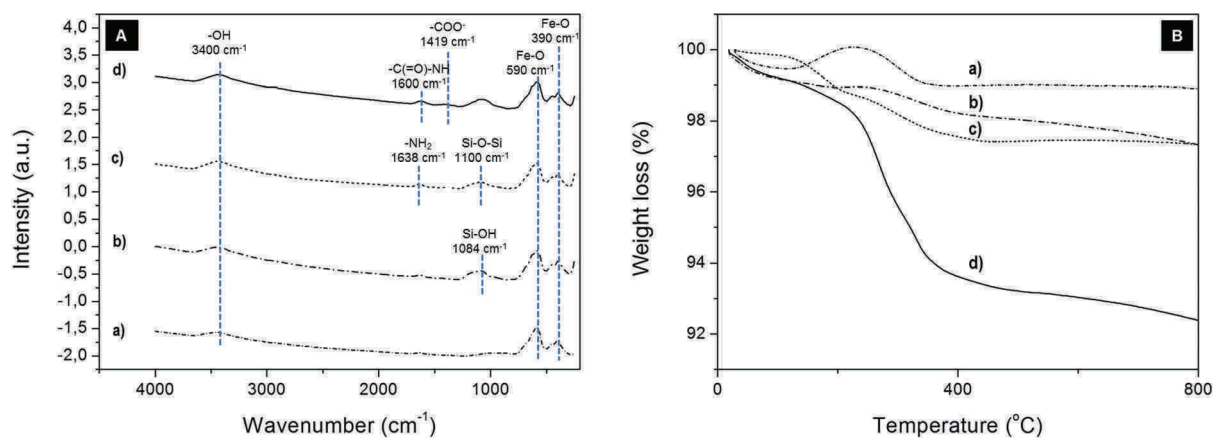


Fig. 6 IR spectra (A) and TG curves (B) of (a) uncoated (A22) and coated MNCs: (b) A22-T, (c) A22-TA and (d) A22-TAD.

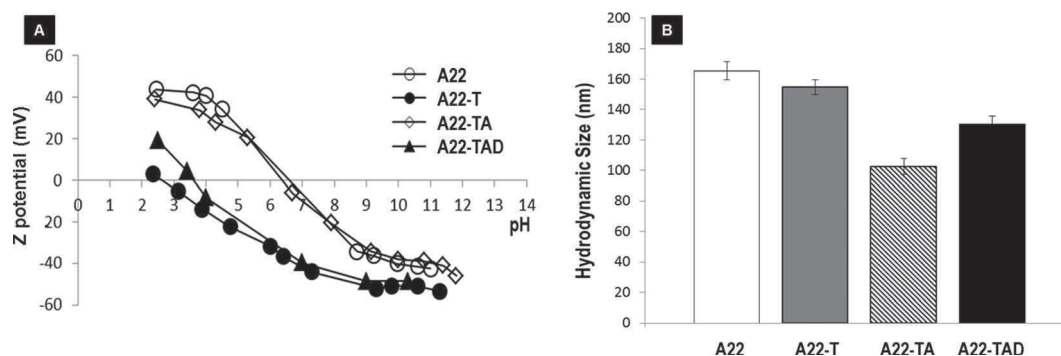


Fig. 7 Surface charge variation as a function of pH (A) and hydrodynamic size (B) for coated magnetic nanocrystals (A22-T, A22-TA, A22-TAD) compared with the uncoated ones (A22).

not expected to occur in this case.^{38,42} Furthermore, coating molecules will also limit the reactivity of the MNC surface with the environment in comparison to other uncoated nanoparticles.

The evolution of the hydrodynamic size during the successive coating steps is shown in Fig. 7B. As a rule coating reduces the hydrodynamic size compared to the naked sample due to the increased electrostatic and steric repulsions among MNCs. A stronger reduction occurs after anchoring organic groups revealing the predominance of the steric effect over the electrostatic effect on the stabilization of the MNCs in aqueous dispersions. The examination of the evolution of the Z-potential at neutral pH (Fig. 7A) reinforces the previous statement because the strong reduction of the Z potential of samples A22-T and A22-TA (reduction of electrostatic repulsions) should lead to an increase of the hydrodynamic size instead of a reduction as observed. It must be stressed that the reduction of the hydrodynamic size from 170 nm for uncoated nanocrystals to the final 130 nm for D coated ones represents an important decrease in the number of nanocrystals per aggregate from 460 to 200 (calculated by dividing the volume of the aggregate from the hydrodynamic size by the volume of one particle measured by TEM). A TEM micrograph of the aggregates formed in suspension is shown in Fig. 8. Even if the aggregates are not formed by individual coated MNCs entities, our dispersions are stable at physiological pH and have a hydrodynamic size that permits sterilization by filtration through 0.22 μm pore size membrane for safe intravenous administration. These results are comparable, for example, with polyethylene glycol (PEG) coated 10 nm nanoparticles used for enhanced magnetic tumor targeting.⁴³ In fact, after silanization with APTS, they obtained PEG coated nanoparticles with hydrodynamic sizes of 150 nm and 190 nm using 5 and 20 kDa polymers respectively and with a Z potential at neutral pH of +25 mV. In this work, larger particles are colloidal stabilized with smaller hydrodynamic sizes, using 4.4 nmol D per mg Fe attached to the MNC surface. This amount compares well with the results of other surface coating strategies based on amide bond formation with polymers such as polyethylene glycol which gave 5 and 1.3 nmol PEG per mg Fe for PEG 5000 and 20 000 Da respectively.⁴³

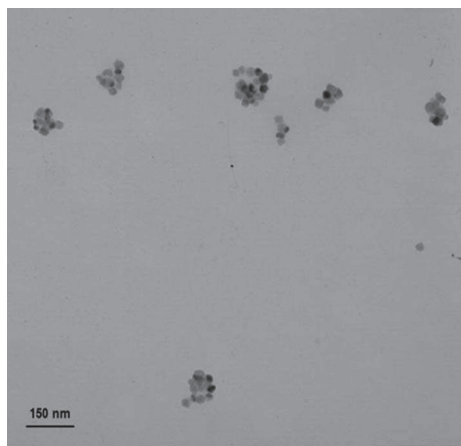


Fig. 8 TEM micrograph of aggregates of D coated magnetic nanocrystals.

The covalent strength of the D bound to the nanocrystal surface was tested by increasing the ionic strength of the medium containing the coated MNCs.²⁵ Miles *et al.* described that phosphate salts are responsible for desorption of dextran molecules from the nanoparticle surface when they are not covalently bound.⁴⁴ Hence, D coated nanocrystals were incubated with PBS buffer at pH 7.4 for 24 and 48 hours, and subsequently analyzed by TG. As clearly shown in Fig. 9, the TG curve is the same for both samples indicating that polymer desorption did not take place under the relatively strong conditions of the test. In our opinion this confirms the robustness of the bond formation between D and the MNC surface. Preliminary studies of A22-TAD stability in PBS buffer have been done (data reported in ESI, Table S1†). The surface modification of these large iron oxide nanoparticles is not sufficient to achieve colloidal stability at pH 7 in high salinity buffers for longer times (the hydrodynamic size increases up to 500 nm after 2 days), but it is enough to permit further functionalization with biomolecules using standard methods.

Magnetic characterization of functionalized MNCs

Saturation magnetization values of uncoated MNCs, A22 sample, reached 82 and 85 $\text{A m}^2 \text{kg}^{-1}$ and the coercivity increased from 2 to 30 mT as the temperature decreased from RT to 5 K (Table 2). Magnetite nanoparticles of similar size (22 nm) prepared by the thermal decomposition of an organic precursor in organic media showed M_s values of 69 and 72 $\text{A m}^2 \text{kg}^{-1}$ at 250 and 5 K, respectively, and 34 mT of coercivity at 5 K.³⁴ Saturation magnetization values of coated MNCs were reduced to 71 and 75 $\text{A m}^2 \text{kg}^{-1}$ at 250 K and 5 K, respectively, while coercivity values remained similar to those of uncoated MNCs at 7 mT and 25 mT as the temperature decreased. The 10% decrease in M_s accounts for the transformation of the magnetite core into maghemite due to the oxidation conditions of the coating process (as observed in the TG analysis). A great reduction in M_s values was reported for much smaller magnetic nanoparticles covalently coated with dextran probably due to

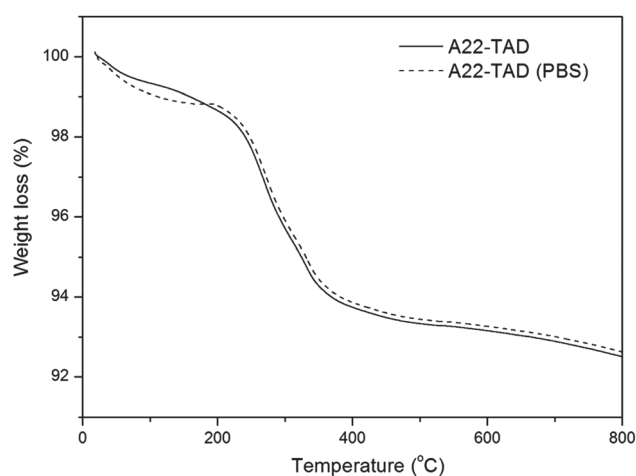


Fig. 9 TG curves of A22-TAD nanocrystals after 24 h in PBS buffer compared with A22-TAD nanocrystals in water.

Table 2 Magnetic properties of the smallest magnetite nanoparticles (A22) before and after coating with TEOS (A22-T), APTS (A22-TA) and carboxymethyl dextran (A22-TAD)

Sample	M_s , 250 K (A m ² kg ⁻¹)	H_c , 250 K (mT)	M_s , 5 K (A m ² kg ⁻¹)	H_c , 5 K (mT)
A22	82	2	85	30.0
A22-T	68	7.5	72	27.5
A22-TA	66	9.0	73	26.0
A22-TAD	71	7.0	75	25.0

surface effects.²⁵ In all cases, functionalised magnetite nanocrystals are not strictly superparamagnetic at room temperature but close to the superparamagnetic transition (Fig. 10).

In vitro magnetic fluid hyperthermia

Temperature measurements were performed on the A22 series with the different coatings to study the influence of the various external layers on the hyperthermia properties of MNCs. SAR values are shown in Table 3. These values, at a large magnetic field, are only slightly reduced and sometimes enhanced compared to the raw sample and remain rather large. On the contrary, at 20 mT, SAR values of the coated samples are reduced compared to the raw one. Coating, hydrodynamic sizes, saturation magnetization values and concentration vary along the series. All of these parameters have influence and it is difficult to explain with certainty the origin of SAR variation within the series. For instance, it was reported that concentration has a strong influence on SAR values through dipolar interactions^{45–47} and it seems to partly correlate with SAR variations in our set of data.

More detailed experimental investigations consisting of temperature and hysteresis loop measurements as a function of the magnetic field amplitude were performed on sample A22-A (Fig. S10, ESI†) indicating that these MNCs are closer to the superparamagnetic regime than the ferromagnetic one³¹ and display a low anisotropy, which is a very good explanation for their hyperthermia properties, even in the presence of magnetic interactions.⁴⁶ Further work is in progress to optimize the

Table 3 Specific absorption rate (SAR) under different field conditions for uncoated and coated magnetite nanocrystals (A22). Each sample was measured at the highest Fe concentration for colloidal stability

Name	Concentration (mg Fe per ml)	SAR (W g ⁻¹), 44 mT/70 kHz	SAR (W g ⁻¹), 20 mT/102 kHz
A22	18	128	23
A22-T	4	142	10
A22-TA	1.6	99	~0
A22-TAD	5	75	7

heating efficiency under appropriate field conditions that will require higher magnetic fields.

Conclusions

An efficient and large-scale method to obtain high-quality magnetite nanocrystals with core sizes between 20 and 30 nm *via* green chemistry is described. Reproducible scale-up of the synthesis up to 20 g per batch was successfully achieved. Considering a dose similar to the commercial NMR contrast agents based on iron oxide nanoparticles, ~60 mg Fe per dose (about 1% (w/w) of normal whole-body iron content), in a one liter batch reactor we can prepare nearly 250 doses. The synthesized iron oxide nanocrystals, with core sizes in the region close to the superparamagnetic–ferromagnetic transition, present crystalline structure, high saturation magnetization and competitive SAR values. A chemically well-designed biocompatible shell was obtained. Despite the small amount of hydroxyl groups on their surface, stabilization of these MNCs at physiological pH has been achieved by subsequent deposition of tetraethoxysilane, aminopropyltriethoxysilane and finally carboxymethyl dextran coatings, keeping the hydrodynamic size at around 130 nm, small enough to enable sterilization by filtration before *i.v.* administration. Coated MNCs do not show the presence of Fe(II) avoiding possible toxicity due to oxidative stress and preserve their magnetic and heating behavior making these large magnetic nanocrystals very interesting in the biomedical field, in particular in cancer treatment by magnetic hyperthermia. Moreover the presence of carboxylic groups on the MNC surface facilitates further functionalization

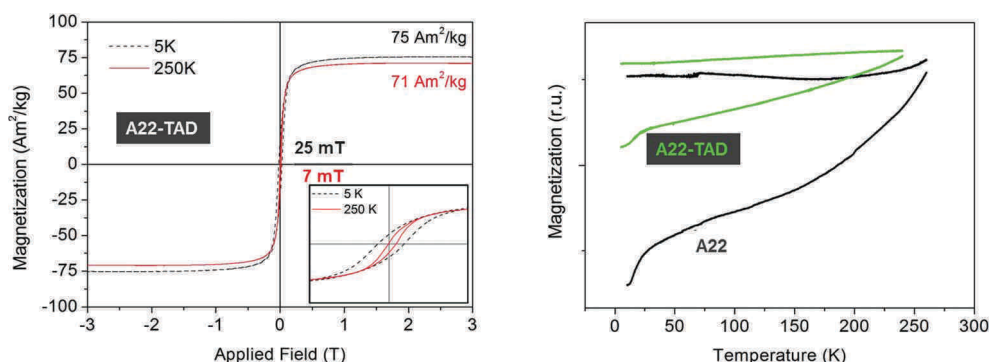


Fig. 10 (a) Magnetization curves at 250 K and 5 K (left), and (b) ZFC/FC curves for coated (A22-TAD) and uncoated (A22) MNCs (right) in liquid form.

(as the linkage of enzymes, antibodies, specific ligands, drugs or other biomolecules), a crucial feature for the creation of multimodal or multifunctional nanocrystals.

Acknowledgements

We would like to thank Jesus Gonzalez Casablanca, TEM technician at the CAT, URJC (Madrid, Spain), for his assistance with the high resolution TEM images. This work was partially supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MAT2011-23641 and CSD2007-00010 to MPM), the Madrid regional government (S009/MAT-1726 to MPM) and the EU-FP7 MULTIFUN project (NMP-Large ref. 246479).

References

- 1 J. E. Kim, J. Y. Shin and M. H. Cho, *Arch. Toxicol.*, 2012, **86**, 685.
- 2 K. Riehemann, S. W. Schneider, T. A. Luger, B. Godin, M. Ferrari and H. Fuchs, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 872.
- 3 M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent and T. Sen, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2011, **63**, 24.
- 4 C. Plank, O. Zelphati and O. Mykhaylyk, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2011, **63**, 1300.
- 5 L. H. Reddy, J. L. Arias, J. Nicolas and P. Couvreur, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 5818.
- 6 P. Guardia, R. Di Corato, L. Lartigue, C. Wilhelm, A. Espinosa, M. Garcia-Hernandez, F. Gazeau, L. Manna and T. Pellegrino, *ACS Nano*, 2012, **6**, 3080.
- 7 I. Hilger and W. A. Kaiser, *Nanomedicine*, 2012, **7**, 1443.
- 8 C. S. S. R. Kumar and F. Mohammad, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2011, **63**, 789.
- 9 B. Thiesen and A. Jordan, *Int. J. Hyperthermia*, 2008, **24**, 467.
- 10 B. Mehdaoui, A. Meffre, J. Carrey, S. Lachaize, L.-M. Lacroix, M. Gougeon, B. Chaudret and M. Respaud, *Adv. Funct. Mater.*, 2011, **21**, 4573.
- 11 A. P. Khandhar, R. M. Ferguson, J. A. Simon and K. M. Krishnan, *J. Appl. Phys.*, 2012, **111**, 07B306.
- 12 N. A. Usov, *J. Appl. Phys.*, 2010, **107**, 123909.
- 13 O. Mykhaylyk, N. Dudchenko and A. Dudchenko, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2005, **293**, 473.
- 14 O. Mykhaylyk, *WO Pat.* 2006/042724, 2006.
- 15 T. D. Schaladt, K. Schneider, H. Schild and W. Tremel, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 6315.
- 16 X. Duan and Y. Li, *Small*, 2013, **9**, 1521.
- 17 R. Massart, *IEEE Trans. Magn.*, 1981, **17**, 1247.
- 18 D. Ling and T. Hyeon, *Small*, 2013, **9**, 1450.
- 19 T. Sugimoto and E. Matijevic, *J. Colloid Interface Sci.*, 1980, **74**, 227.
- 20 M. Andrés Vergés, R. Costo, A. G. Roca, J. F. Marco, G. F. Goya, C. J. Serna and M. P. Morales, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2008, **41**, 1.
- 21 F. Vereda, J. de Vicente, M. P. Morales, F. Rull and R. Hidalgo-Alvarez, *J. Phys. Chem. C*, 2008, **112**, 5843.
- 22 M. A. Gonzalez-Fernandez, T. E. Torres, M. Andrés Vergés, R. Costo, P. de la Presa, C. J. Serna, M. P. Morales, C. Marquina, M. R. Ibarra and G. F. Goya, *J. Solid State Chem.*, 2009, **182**, 2779.
- 23 X. Yang, W. Jiang, L. Liu, B. Chen, S. Wu, D. Sun and F. Li, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2012, **324**, 2249.
- 24 A. M. G. C. Dias, A. Hussain, A. S. Marcos and A. C. A. Roque, *Biotechnol. Adv.*, 2011, **29**, 142.
- 25 M. Creixell, A. P. Herrera, M. Latorre-Esteves, V. Ayala, M. Torres-Lugo and C. Rinaldi, *J. Mater. Chem.*, 2010, **20**, 8539.
- 26 M. C. Bautista, O. Bomati-Miguel, X. Q. Zhao, M. P. Morales, T. Gonzalez Carreño, R. Pérez de Alejo, J. Ruiz Cabello and S. Veintemillas-Verdaguer, *Nanotechnology*, 2004, **15**, S154.
- 27 H. L. Rodríguez-Luccioni, A. P. Herrera, C. Barrera, C. Rinaldi and M. Torres-Lugo, Proceedings of NSTI NANOTECH, Houston, TX, 2009.
- 28 M. M. Ling, T.-S. Chung and X. Lu, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 10788.
- 29 L. M. Lacroix, J. Carrey and M. Respaud, *Rev. Sci. Instrum.*, 2008, **79**, 093909.
- 30 J. Carrey, B. Mehdaoui and M. Respaud, *J. Appl. Phys.*, 2011, **109**, 083921.
- 31 B. Mehdaoui, J. Carrey, M. Stadler, A. Cornejo, C. Nayral, F. Delpech, B. Chaudret and M. Respaud, *Appl. Phys. Lett.*, 2012, **100**, 052403.
- 32 M. Ohmori and E. Matijevic, *J. Colloid Interface Sci.*, 1992, **150**, 594.
- 33 S. Mornet, J. Portier and E. Duguet, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2005, **293**, 127.
- 34 G. Salas, C. Casado, F. J. Teran, R. Miranda, C. J. Serna and M. P. Morales, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 21065.
- 35 R. M. Cornell and U. Schwertmann, in *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*, Wiley VCH, 2nd edn, 2003, ch.7, p. 128.
- 36 B. D. Cullity and C. D. Graham, in *Introduction to Magnetic Materials*, Wiley, 2nd edn, 2009.
- 37 R. Hergt and S. Dutz, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2007, **311**, 187.
- 38 D. Ortega and Q. A. Pankhurst, *Nanoscience*, 2013, **1**, 60.
- 39 R. Hergt, W. Andra, C. G. d'Ambly, I. Hilger, W. A. Kaiser, U. Richter and H.-G. Schmidt, *IEEE Trans. Magn.*, 1998, **34**, 3745.
- 40 R. Hergt, R. Hiergeist, M. Zeisberger, G. Glöckl, W. Weitschies, L. P. Ramirez, I. Hilger and W. A. Kaiser, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2004, **280**, 358.
- 41 M. Ma, Y. Wu, J. Zhou, Y. Sun, Y. Zhang and N. Gu, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2004, **268**, 33.
- 42 S. Sharifi, S. Behzadi, S. Laurent, M. L. Forrest, P. Stroeve and M. Mahmoudi, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 2323.
- 43 A. J. Cole, A. E. David, J. Wang, C. J. Galbán, H. L. Hill and V. C. Yang, *Biomaterials*, 2011, **32**, 2183.
- 44 W. C. Miles, J. D. Goff, P. P. Huffstetler, C. M. Reinholz, N. Pothayee, B. L. Caba, J. S. Boyd, R. M. Davis and J. S. Riffle, *Langmuir*, 2009, **25**, 803.
- 45 A. S. Eggeman, S. A. Majetich, D. Farrell and Q. A. Pankhurst, *IEEE Trans. Magn.*, 2007, **43**, 2451.
- 46 B. Mehdaoui, R. P. Tan, A. Maffree, J. Carrey, S. Lachaize, B. Chaudret and M. Respaud, *Phys. Rev. B*, 2013, **87**, 174419.
- 47 C. Martinez-Boubeta, K. Simeonidis, D. Serantes, I. Conde-Leborán, I. Kazakis, G. Stefanou, L. Peña, R. Galceran, L. Balcells, C. Monty, D. Baldomir, M. Mitrakas and M. Angelakeris, *Adv. Funct. Mater.*, 2012, **22**, 3737.

Chapitre III

*Hyperthermie magnétique in vitro:
induction de mort cellulaire et
observations en temps réel*

<i>1</i>	<i>Traitement d'hyperthermie magnétique sur cellules adhérentes.....</i>	<i>III-1</i>
1.1	Propriétés magnétiques et mesures de concentrations de nanoparticules internalisées.....	III-2
1.2	Installation expérimentale	III-4
1.3	Présentation des résultats obtenus	III-5
<i>2</i>	<i>Visualisation de cellules cancéreuses pendant le traitement hyperthermique.....</i>	<i>III-6</i>
2.1	Développement d'un électroaimant miniaturisé	III-7
2.2	Présentation des résultats obtenus	III-15
<i>3</i>	<i>Conclusion.....</i>	<i>III-17</i>

Article III-1

Article III-2

En 2005, le début de l'investissement du LPCNO dans le domaine de l'hyperthermie magnétique s'est principalement construit autour d'une forte collaboration entre physique et chimie. Depuis 2011, le LPCNO a débuté une collaboration avec le Laboratoire de Réceptologie et Ciblage Thérapeutique en Cancérologie (RCTC), à Toulouse, qui avait développé une expertise sur le ciblage thérapeutique de cellules cancéreuses à l'aide de nanoparticules magnétiques vectorisées [1]. Ce chapitre retrace les différents résultats obtenus jusqu'ici dans le cadre de cette collaboration.

Dans un premier temps, nous exposons les résultats obtenus lors de l'application de traitements hyperthermiques *in vitro* sur des cellules tumorales adhérentes. Cela a nécessité l'adaptation et le développement de protocoles expérimentaux à partir d'un équipement standard de four à induction industriel. Par la suite, nous présentons les travaux qui nous ont permis d'observer les cellules en temps réel pendant application du champ magnétique afin d'étudier des mécanismes susceptibles d'être responsable de la mort de la cellule.

1 Traitement d'hyperthermie magnétique sur cellules adhérentes

Comme exposé précédemment en I-2.2, de nombreux travaux rapportent des effets de l'hyperthermie magnétique sur cellules. Nous adoptons dans ces travaux une stratégie de thérapie ciblée, en internalisant des nanoparticules magnétiques vectorisées spécifiquement dans des cellules cancéreuses. Les nanoparticules d'oxydes de Fer utilisées (GENOVIS) sont initialement synthétisées pour des propriétés d'agents de contraste en IRM. Nous constaterons de fait qu'elles ne sont pas optimisées pour l'utilisation en hyperthermie magnétique et présentent des puissances de chauffe extrêmement modestes. Durant la thèse de Claire Sanchez [1], une étude complète a été menée pour assurer la fonctionnalisation de leur surface. L'expertise en ciblage thérapeutique du RCTC nous permet de plus, comme nous le verrons dans l'**Article III-1**, de travailler sur des cellules dans lesquelles les nanoparticules sont principalement localisées dans les lysosomes après 24 h d'incubation. Nous avons caractérisé la concentration de nanoparticules dans les cellules par une méthode basée sur des mesures magnétiques. Avant de présenter l'ensemble des résultats en **Article III-1**, nous développerons les études de propriétés magnétiques des nanoparticules, ainsi que la méthode

de calcul de concentration intracellulaire au moyen de mesures magnétiques. Enfin, nous présenterons l'installation expérimentale que nous avons adaptée, et qui permet d'appliquer le traitement sur des cellules tumorales adhérentes. Nous constaterons enfin que, même avec de très faibles puissances de chauffe, nous obtenons des résultats de mort cellulaire significatifs.

1.1 Propriétés magnétiques et mesures de concentrations de nanoparticules internalisées

Les nanoparticules commerciales d'oxydes de fer utilisées ont une taille de $8,7 \pm 1,6$ nm (dédit d'images TEM), et sont donc plutôt petites par rapport à celles étudiées précédemment (II.3) pour des applications en hyperthermie magnétique. Les données fournies par Genovis sont présentées en *Figure III. 1*. Nous avons caractérisé le SAR de ces particules à la fréquence de 275 kHz, qui est celle utilisée lors des expériences *in vitro* (*Figure III. 1*). Le protocole utilisé est décrit dans la section "Materials and methods" de l'**Article III-1**. Comme nous pouvons le constater, l'augmentation du SAR est quasiment linéaire en fonction de l'amplitude du champ magnétique appliqué et les valeurs mesurées sont très faibles (≈ 10 W/g). Nous précisons de plus que les mesures d'élévation de température correspondantes étaient dans la limite de la sensibilité de notre installation. Ces résultats nous confirment que ces nanoparticules ne sont pas optimisées pour obtenir de fortes puissances de chauffe.

NIMT FeOdot PEG-Amine (Produc numbers N1-FA1-020, N1-FA1-050)	
Iron concentration	1.5 mg·mL ⁻¹
Iron oxide (Fe ₃ O ₄) concentration	2.0 mg·mL ⁻¹
Number of particles in 1 mL of solution	$\sim 5 \cdot 10^{14}$
Molar concentration of particles	$\sim 0.75 \mu\text{M}$
Number of Amino groups / particle	~ 700
Core diameter (TEM)	11 ± 1 nm
Particle diameter including coating (TEM)	18 ± 2 nm
Hydrodynamic particle diameter including coating (DLS)	30 nm
Magnetic Susceptibility	80 emu·g ⁻¹
r2 relaxivity	$\sim 300 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$

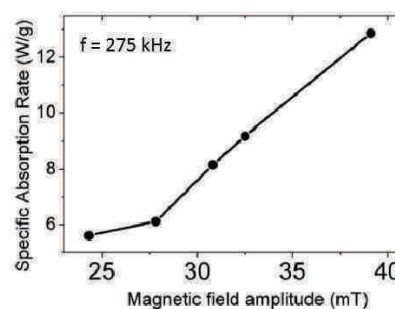


Figure III. 1 (gauche) Caractéristiques des nanoparticules données par le fournisseur. (droite) Mesures de SAR à $f = 275$ kHz pour différentes amplitudes de champ.

Par la suite nous avons effectué des vérifications de valeurs de M_s et de concentrations de la solution de nanoparticules au moyen d'un VSM (*Vibrating Sample Magnetometer*), et ce pour affiner nos mesures de concentrations en fer intracellulaires. Les capsules de mesure sont remplies de 5 μL de solution mère que l'on laisse évaporer complètement pour éviter toute dégradation de l'appareil dues à de potentielles fuites d'eau. Nous avons donc mesuré le cycle

d'aimantation statique $M(H)$ à 270 K d'une capsule pour une amplitude de champ maximum de 5 T. Un fit numérique de la distribution en taille obtenue en TEM est d'abord calculé (*Figure III. 2 (a)*). Ensuite, le cycle d'aimantation brut est redressé en soustrayant la composante diamagnétique de l'échantillon. Le cycle d'aimantation obtenu est montré en *Figure III. 2(b)*. Le cycle d'hysteresis est ensuite ajusté à l'aide d'une somme de fonctions de Langevin, en utilisant les paramètres de distributions de tailles déduits des images TEM. Les paramètres laissés libres pour l'ajustement sont la concentration et M_s . Le résultat du meilleur ajustement est montré Fig. III 1(b) ; les valeurs obtenues sont $2,1 \pm 0,2$ mg/mL pour la concentration et 73 ± 10 Am²/kg Fe₃O₄ pour l'aimantation à saturation. Les données du fournisseur (*Figure III. 1*) rentrant dans les barres d'erreurs de ces deux valeurs, nous choisissons de les conserver pour nos calculs.

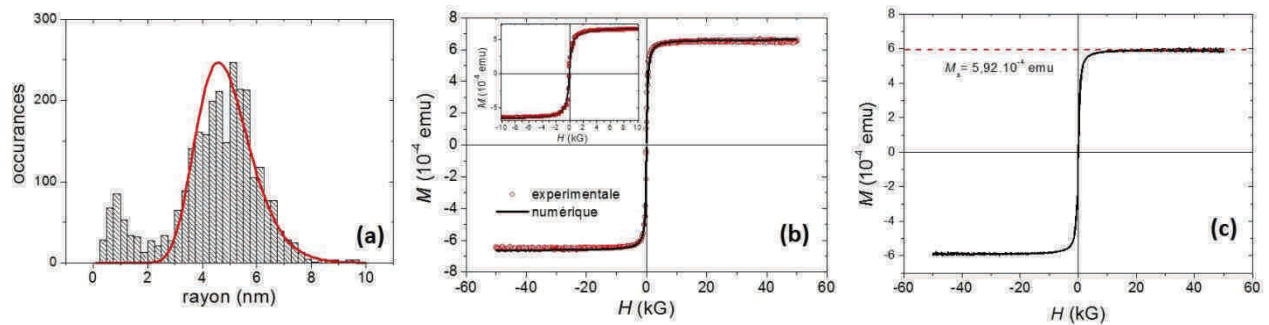


Figure III. 2 (a) Distribution en taille de l'échantillon déduit des images TEM. La courbe rouge représente l'ajustement. On obtient un rayon moyen de 4,8 nm avec $\sigma = 0,21$. (b) Cycle d'aimantation de l'échantillon séché mesuré au VSM. L'ajustement conduit à $M_s = 76,9$ A.m²/kg Fe₃O₄ et $C_{Fe_3O_4} = 2,29$ mg/mL. (c) Cycle d'aimantation de $(2,5 \pm 0,2) \cdot 10^6$ cellules lyophilisées après incubation 24h en présence de nanoparticules MG-IONP-DY647. On relève la valeur du M_s (trait rouge) pour calculer la concentration en fer dans les cellules.

Afin de connaître la concentration intracellulaire en matériel magnétique, nous avons effectué les mêmes mesures de cycles $M(H)$ sur des populations de cellules ayant internalisées des nanoparticules durant 24h. Les cellules au bout de 24h ont été décollées puis lyophilisées pour être ensuite intégrés à nos capsules de mesures VSM. Environ $2,5 \cdot 10^6$ cellules sont nécessaires pour une mesure pour obtenir un signal suffisant par rapport à la limite de détection du VSM ($\approx 10^{-6}$ emu/g). Le cycle correspondant est visible en *Figure III. 2(c)*. La valeur d'aimantation à saturation de ce cycle, $5,92 \cdot 10^{-4}$ emu, est divisée par l'aimantation à saturation des nanoparticules par masse de fer (107 Am²/kg Fe). Ceci nous permet de calculer

la masse totale en fer contenu dans la capsule. On redivise ce résultat par le nombre de cellules lyophilisées pour obtenir une concentration de $2,2 \pm 0,2$ pg Fer / cellule.

1.2 Installation expérimentale

Pour assurer l'application d'un champ magnétique alternatif sur des cellules tumorales adhérentes, il nous a fallu adapter un four à induction industriel (Fives Celes) aux contraintes expérimentales biologiques. L'installation complète en cours d'expérience est présentée ci-dessous en *Figure III. 3*. L'inducteur est refroidi par une circulation d'eau en circuit fermé dans les spires de cuivre. Comme on peut le constater, l'inducteur est placé de manière à produire un champ horizontal sur la boîte de culture contenant les cellules tumorales. Ce choix vient du fait qu'un champ vertical entraîne la création de courants de Foucault dans la section normale au champ. Ceux-ci peuvent rendre inhomogène la température des cellules, en créant des gradients de 2°C à 4°C entre le centre et le bord de la boîte de culture. En se plaçant dans cette configuration de champ horizontal, on s'assure de la diminution des courants de Foucault puisque ceux-ci dépendent de fait de l'épaisseur de milieu physiologique placé dans la boîte (de l'ordre du millimètre). Néanmoins, pour ces deux géométries de champ, une augmentation de la température du milieu est observée lors de l'application du champ magnétique.

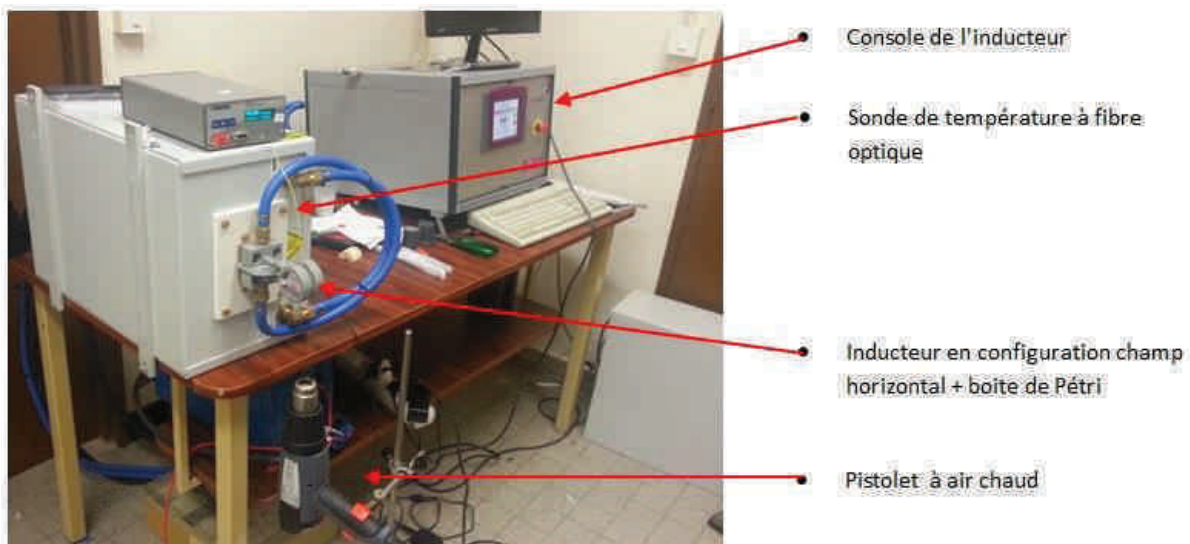


Figure III. 3 Installation expérimentale permettant l'application d'un champ magnétique alternatif in vitro.

Les cellules tumorales ayant ou non internalisées des nanoparticules sont incubées dans un milieu dont la température est amenée aux alentours de 34°C grâce à un pistolet à air chaud (HG 2310 LCD, STEINEL) monté sur un statif de laboratoire sous l'inducteur (voir *Figure III. 3*). L'allumage du champ permet ensuite d'élever la température à 37°C. Le débit et la température de l'air en sortie de pistolet, ainsi que la distance par rapport à la boîte de culture sont ensuite réglés pendant l'expérience. On contrôle *in situ* la température grâce à une sonde de température à fibre optique (Neoptics, Reflex4) plongée dans le milieu d'incubation des cellules. La boîte de culture est fermée d'une couche de Parafilm pour minimiser l'évaporation du milieu d'incubation ainsi que les fluctuations de température pendant la durée de l'expérience. Ce dispositif a tout d'abord été mis en place sur une boîte "test" ne contenant pas de cellules pour ajuster ce réglage de température avant de l'appliquer sur la boîte contenant les cellules. Le LPCNO s'est également muni d'un incubateur biologique (Midi 40 Small Capacity CO₂ Incubator, Thermo Scientific) pour garder les cellules en conditions optimales avant et après application du traitement hyperthermique.

1.3 Présentation des résultats obtenus (*Article III-1*)

L'**Article III-1** présente tout d'abord les travaux de conception des nano-objets ainsi que les résultats de ciblage thérapeutique et d'internalisation spécifique conduits au RCTC préalablement à ma thèse (voir [1]). La fonctionnalisation de la surface des nanoparticules à l'aide d'un analogue de la gastrine, ligand spécifique du RCCK2, et l'optimisation de cette fonctionnalisation ont permis d'obtenir un ciblage efficace et spécifique des cellules tumorales surexprimant le RCCK2 pour atteindre une concentration en fer de 2,2 pg / cellule. De plus, une étude du suivi intracellulaire des nanoparticules a permis de conclure que les nanoparticules s'internalisaient par endocytose, selon un mécanisme suivant la pharmacologie du récepteur ciblé à la surface des cellules tumorales (RCCK2), puis s'accumulaient dans les lysosomes. Par la suite, sont présentés les résultats d'applications de traitements d'hyperthermie magnétique sur les cellules tumorales adhérentes conduits pendant ma thèse. L'application d'un champ magnétique alternatif a permis d'obtenir des niveaux de mort cellulaire significatifs de manière reproductible. Cependant, la quantité de fer présente dans les lysosomes ne permet pas d'expliquer la mort cellulaire par élévation de température globale du milieu, ni même par l'élévation de température de toute la cellule. Nos travaux

s'inscrivent donc dans la lignée des résultats d'hyperthermie *in vitro* sans élévation de température globale.

Nous avons également cherché à caractériser le type de mort engendré par les nanoparticules et le champ magnétique : apoptotique ou nécrotique en relation avec deux conditions d'amplitudes de champ appliquées. Il apparaît qu'à plus fort champ, un nombre plus important de cellules meurent par nécrose, ce qui pourrait causer des inflammations en conditions réelles de traitements. Nous avons ensuite constaté un lien entre déstabilisation lysosomale, visualisée par la fuite d'un agent fluorescent LysoTracker préalablement accumulé dans les lysosomes des cellules tumorales avant l'application du champ magnétique, et mort cellulaire. Il se pourrait que la perméabilisation lysosomale entraînant une fuite des cathepsines B soit à l'origine de la mort cellulaire observée dans ces travaux.

2 Analyse en temps réel des effets du champ magnétiques sur cellules vivantes

Bien que l'intérêt du traitement par hyperthermie magnétique ait déjà été souligné, de nombreux points clés restent à éclaircir. Parmi ceux-ci, un important champ d'investigation est l'observation et la compréhension des mécanismes entraînant la mort de la cellule tumorale. En effet, la nécessité d'une hyperthermie macroscopique (c'est-à-dire une augmentation de la température du milieu), est aujourd'hui remise en question (voir I.2.2). Expliquer l'origine de ces mécanismes au niveau cellulaire et moléculaire pourrait aider à optimiser l'ensemble du traitement, depuis la synthèse des nano-objets jusqu'à la dose à appliquer au patient.

Dans cette optique nous avons donc décidé de concevoir un dispositif permettant de suivre en temps réel un traitement d'hyperthermie magnétique *in vitro*. Nous avons choisi la technologie d'un électroaimant pour appliquer le champ magnétique. Cette fois, l'inducteur a dû être adapté à un microscope confocal, qui est l'instrument standard permettant de suivre les mécanismes cellulaires en temps réel. Le problème potentiel majeur est que certaines parties du microscope à proximité de la boîte de culture sont constituées de métaux ferromagnétiques et que le moindre champ de fuite est susceptible de les détériorer. Notamment, l'objectif (dont certaines pièces sont métalliques) est situé à environ 2 mm sous la boîte de culture, ce qui rend hasardeux l'application d'un magnétique alternatif sur l'ensemble de l'échantillon. De plus, l'échauffement de l'électroaimant est d'autant plus important que l'entrefer est large. Un

entrefer trop large risquerait donc de conduire à un échauffement des cellules au-delà de 37°C. Ces considérations nous ont conduites à diminuer la largeur de l'entrefer et à construire un système s'insérant directement dans la boîte de culture. Nous développons dans cette section les étapes de construction d'un électroaimant miniaturisé ainsi que son protocole d'utilisation. Enfin nous verrons des exemples d'applications par quelques résultats obtenus.

2.1 Développement d'un électroaimant miniaturisé

Nous présentons ci-dessous en *Figure III. 4* une schématisation de l'électroaimant miniaturisé et monté dans une boîte de culture. Le tout est placé au-dessus d'un objectif de microscope confocal. On peut remarquer que l'entrefer est en contact avec le fond en verre de la boîte de culture, et que le fil de bobinage est concentré à l'opposé du cœur de ferrite. Nous détaillons ces choix plus loin dans cette section II.2.



Figure III. 4 Représentation de l'électroaimant complet dans une boîte de culture, le tout monté sur un objectif de microscope confocal.

Le but est de pouvoir faire fonctionner cet appareil dans des conditions similaires aux expériences d'hyperthermies présentées précédemment en II.1, soit pendant plusieurs heures pour des amplitudes de champ d'environ 50 mT et une fréquence d'environ 300 kHz.

2.1.1 Conception

Le choix des matériaux constitue encore une fois une partie cruciale de la conception. Avec un électroaimant au plus près du dépôt cellulaire, il est primordial de minimiser l'échauffement de l'ensemble de la ferrite et du fil de Litz. Le tore en ferrite sélectionné (TN29/19/7.5-3C90, Ferroxcube) rentre dans une boîte de culture (diamètre 35 mm) et est composé de la même ferrite 3C90 que l'électroaimant à large entrefer présenté en II.1. Il pèse

seulement 13,5 g et ses dimensions sont précisées en *Figure III. 5*. Le cœur de ferrite est protégé par une fine couche ($\approx 0,3$ mm) de polymère thermoplastique isolant (Polyamide 11 ou PA11) ce qui permet de ne pas craindre d'arc électrique au cours des expériences.

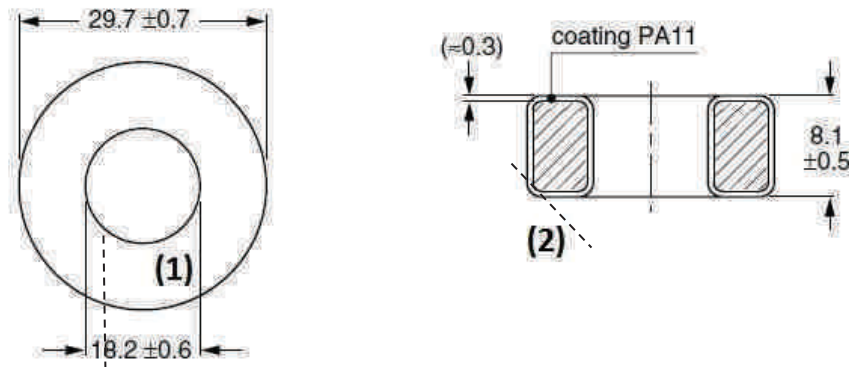


Figure III. 5 Schémas techniques du tore TN29/19/7.5-3C90 fourni par Ferroxcube avec les côtes associées. Les tracés (1) et (2) représentent respectivement la coupe de l'entrefer et le polissage du plan de contact.

La première étape de fabrication consiste à créer un entrefer. On commence par dégager la zone de l'entrefer de la couche de PA11, en utilisant un cutter, qui sera en contact avec le milieu d'incubation des cellules. Puis on utilise une tronçonneuse de précision avec contrepoids montée avec un disque diamant de 200 μm pour couper la ferrite dans sa section droite (voir tracée (1) sur la *Figure III. 5*). La ferrite étant un matériau très cassant, la découpe totale prend environ 15 minutes avec une progression lente pour préserver la netteté de l'entrefer.

Par la suite, il faut ajuster une surface de contact plane avec la lamelle en verre de la boîte de culture. Pour ce faire, on utilise une polisseuse mécanique montée avec un disque à grains 1 μm . La ferrite est collé sur un talon en équerre qui permet un polissage du plan à 45°C du plan de l'électroaimant (voir tracée (2) sur la *Figure III. 5*).

Pour éviter le problème d'ombrage lorsque l'électroaimant est placé dans le microscope confocal, nous devons également élargir l'entrefer sur toute la section qui n'est pas en contact avec le milieu d'incubation. On ouvre ainsi l'entrefer en forme de "V" à l'aide d'un mini-outil Dremel sur quasiment toute la section, en prenant bien soin de ne pas endommager la partie de l'entrefer qui est sur le plan de contact. L'ouverture maximale au sommet du "V" est comprise entre 1 mm et 2 mm. Cette ouverture a de plus l'avantage de

concentrer les lignes de champs à proximité de l'entrefer (voir **Article III-2**, Figure 1(b)). Cette étape est la dernière concernant la formation de l'entrefer.

Les cellules adhérentes, ensemencées préalablement dans une boîte de culture, ont une taille moyenne de $10\ \mu\text{m}$. Par conséquent, il faut être extrêmement précis pour assurer une surface de contact maximale entre la partie plate de l'entrefer et la lamelle en verre composant le fond de la boîte de culture. Afin de régler cette planéité avec une précision micrométrique, nous collons dans l'anneau un support en PVC pourvu de deux vis plastiques à pas très fin (visible en *Figure III. 6(b) et (c)*). Ensuite, nous montons l'ensemble dans une boîte CELLView, et plaçons cette dernière sur une table de microscope métallurgique inversé. Nous faisons ensuite la mise au point sur la surface de la lame de verre à l'aide d'une marque, en notant la position en hauteur de l'objectif. En déplaçant la platine dans le plan de la table de microscopie nous avons ainsi un visuel de l'inclinaison de l'inducteur, que nous réglons avec les deux vis plastiques. Nous contrôlons ensuite la planéité tout le long de l'entrefer. Le microscope inversé nous permet également de mesurer la largeur de l'entrefer comme sur le cliché montré en *Figure III. 6(a)*.

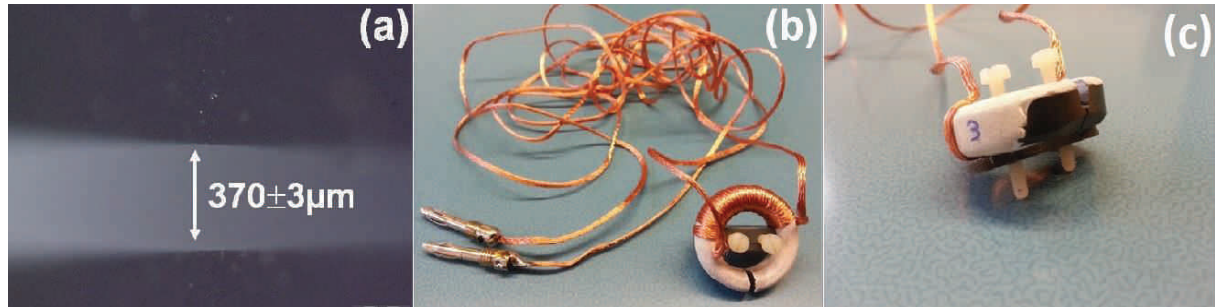


Figure III. 6 (a) Cliché de l'entrefer en microscopie inversée pour déterminer sa largeur. (b) et (c) Photographies de l'inducteur prêt à être utilisé.

Le bobinage est réalisé par la suite avec du fil de Litz ($24 \times 10 \times 0.05$, Connect systems, France) sélectionné pour sa souplesse indispensable pour une si petite section. Le choix du nombre de tours est discuté par la suite. Pour plus de commodité, le bobinage est ensuite collé en quelques points au tore de ferrite, à l'opposé de l'entrefer pour limiter l'échauffement dans cette zone. L'inducteur après toutes les étapes de fabrication est photographié en *Figure III. 6(b) et (c)*.

L'inducteur est ensuite alimenté par un amplificateur de courant HSA 4201 en série avec un boîtier à capacité ajustable (voir [2]).

2.1.2 Caractérisation

Avant d'intégrer notre inducteur au microscope confocal pour les tests *in vitro*, nous avons d'abord cherché à caractériser les conditions optimales d'utilisations en fonction de la fréquence de travail et des amplitudes de champ atteignables. De même que pour l'étude décrite en II.1, nous avons étudié l'influence du nombre de spires sur les paramètres de champ de l'électroaimant. Contrairement aux autres inducteurs conçus par le LPCNO, celui-ci à l'avantage de fonctionner avec des valeurs de courants assez faibles de 3 A maximum (correspondant au maximum de la plage d'utilisation de notre amplificateur de courant). Cela nous permet donc de nous affranchir de l'utilisation d'un transformateur résonant ; seule une boîte de capacité variable est placée en série avec l'électroaimant. Nous réglons la fréquence de travail puis adaptons ensuite la capacité pour atteindre la résonance du circuit. Les résultats correspondants à cette étude sont résumés ci-dessous dans le *Tableau III. 1*.

Nous nous intéressons principalement aux caractéristiques de l'inducteur à 100 kHz et 300 kHz. La première est la fréquence utilisée lors des traitements de patients à l'université Charité-Universitätsmedizin Berlin, utilisant l'inducteur MagForce. [3] et la deuxième correspond à nos travaux *in vitro* précédents (**Article III-1**). Dans les deux cas, l'ensemble des résultats n'est pas détaillé pour 10 spires mais le ratio champ magnétique / courant est trop faible pour pouvoir atteindre des amplitudes de champ suffisamment élevées sans échauffer l'électroaimant.

A 300 kHz, la valeur cible d'amplitude de champ est d'environ 50 mT, soit dans des conditions proches de nos précédentes expériences *in vitro*. On compare alors les Essais (8) et (15) (lignes grisées) correspondants à 12 et 15 spires. Le principal problème est qu'à 15 spires, la puissance dissipée est plus importante. A ce stade de l'étude nous voulions à tout prix minimiser l'échauffement de l'inducteur, et particulièrement au niveau de l'entrefer puisque celui-ci devait ensuite plonger dans le milieu d'incubation comportant les cellules tumorales. Le bobinage à 12 spires nous semblait donc plus logique pour entamer les essais.

Cependant, si par la suite l'équipe envisage de changer la fréquence de travail à 100 kHz, il semble que la configuration 15 spires soit plus efficace avec une puissance dissipée légèrement inférieure. Le *Tableau III. 1* peut donc être utile pour de futures études. Les études en température qui suivent dans la prochaine section n'ont cependant été effectuées que dans la configuration 12 spires et 300 kHz.

Essai n°	N spires	f (kHz)	I (A)	Z (Ω)	B (mT)	P (W)
(1)	10	120	3	0,83	75	7,5
(2)		300	1	0,9	26	1,7
(3)			3	3	75	27
(4)	12	100	1,5	0,8	53	1,8
(5)			3	0,8	106	7,0
(6)		200	1,5	0,9	53	2,0
(7)			2	1,0	71	3,8
(8)		300	1,5	1,8	53	4,1
(9)			2	2,1	71	8,3
(10)			2,5	2,2	88	14
(11)	15	100	1,5	0,8	60	2
(12)			2	0,8	80	3,2
(13)			2,5	0,8	100	5
(14)		300	1	2	40	2
(15)			1,5	2,3	60	5,3
(16)			2	2,7	80	24

Tableau III. 1 Récapitulatif des principales caractéristiques de l'inducteur en fonction des différentes conditions testées. Recherche de paramètres optimaux.

2.1.3 Fonctionnement

En parallèle, nous avons voulu clarifier un point crucial pour la suite du projet: les champs de fuite de l'électroaimant peuvent-ils endommager les parties métalliques d'un

objectif ? Pour information, l'objectif du confocal se situe à quelques μm de la lame de verre composant le fond de la boîte de culture CellView. Nous avons donc intégré l'électroaimant (en configuration 10 spires) dans une boîte de culture et posé le tout sur un objectif de microscopie confocale. Un courant de 1,5 A (37 mT) a ensuite été injecté dans la bobine par l'amplificateur de courant pendant 30 minutes. La *Figure III. 7* présente les images thermiques de l'objectif avant et après application du champ. On relève également la température sur l'électroaimant en fin d'expérience. Nous constatons que la température de l'objectif s'élève légèrement à l'endroit où l'entrefer est en contact avec la CellView. Nous présumons donc que cette hausse de température a été provoquée par conduction et non par induction. Pour corroborer ce résultat, nous pouvons nous référer aux simulations FEMM de distribution de champ magnétique exposé dans l'**Article III-2** (Figure 1(b) et (c)). Le zoom sur la région de l'entrefer nous montre très clairement que pour une amplitude de champ d'environ 50 mT dans l'entrefer, de très faibles champs de fuite de l'ordre de 2 mT apparaissent à environ un millimètre en dehors de la ferrite. Ces deux résultats d'expérimentation et de simulation s'accordent à nous confirmer que les risques d'endommager un objectif de microscope confocal par induction avec notre dispositif sont mineurs.

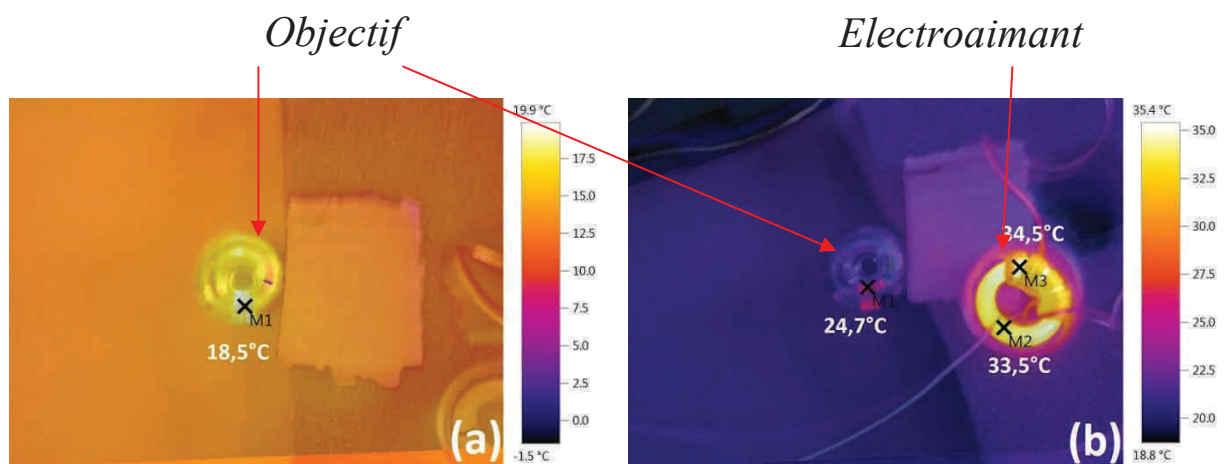


Figure III. 7 Test d'échauffement d'un objectif de microscope confocal Zeiss $\times 10$. Un champ de 300 kHz et 37 mT est produit dans la configuration 10 spires. (a) image thermique prise avant application du champ et (b) après 30 minutes d'application.

Par la suite, nous assemblons l'inducteur au complet (électroaimant avec 12 spires + support avec vis) dans une boîte CellView remplie de sérum physiologique sur environ 1-2 mm d'épaisseur. Un champ de 300 kHz et 53 mT est appliqué durant une heure. La *Figure III. 8(a)* montre les clichés infrarouges correspondants à différents temps d'application. Pour

chaque cliché, nous avons relevé la température aux endroits clés du système: le bobinage, le tore de ferrite et le milieu. L'évolution en température de ces points est résumée en *Figure III. 8(b)*.

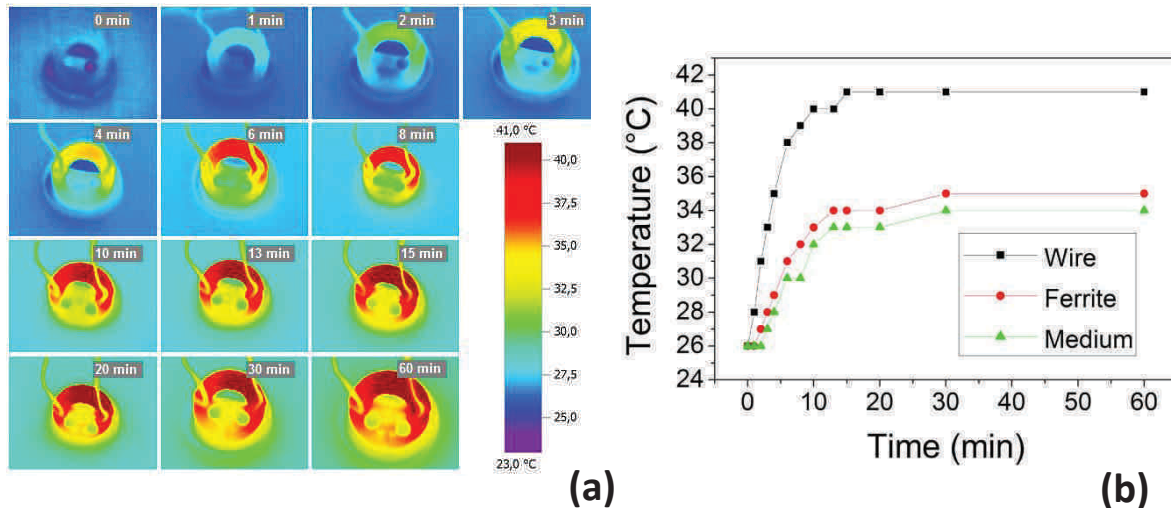


Figure III. 8 Evolution du système en température en fonction du temps d'application d'un champ magnétique de 300 kHz et 53 mT. (a) Clichés thermiques de l'ensemble du système aux différents temps de mesures. (b) Evolution de la température aux points d'intérêts mesurée à partir des clichés thermiques.

Nous constatons tout d'abord que le fil voit sa température augmenter de manière plus importante que le reste du système. Le choix de bobinage à l'opposé de l'entrefer s'avère judicieux, car la ferrite et le milieu à proximité s'échauffent à moins de 37°C. La bonne nouvelle est que le système se trouve en équilibre à ces valeurs de température à partir d'environ 20 minutes de fonctionnement et se stabilise. On précise de plus que les paramètres électriques restent constants au long de l'expérience, le système est donc fiable pour une heure de fonctionnement voir plus au besoin des expériences.

2.1.4 Intégration du mini-électroaimant au microscope confocal

Par la suite nous avons intégré notre électroaimant miniaturisé à une platine de microscopie confocale en conditions réelles. La photographie ci-dessous *Figure III. 9* montre l'ensemble du montage expérimental.

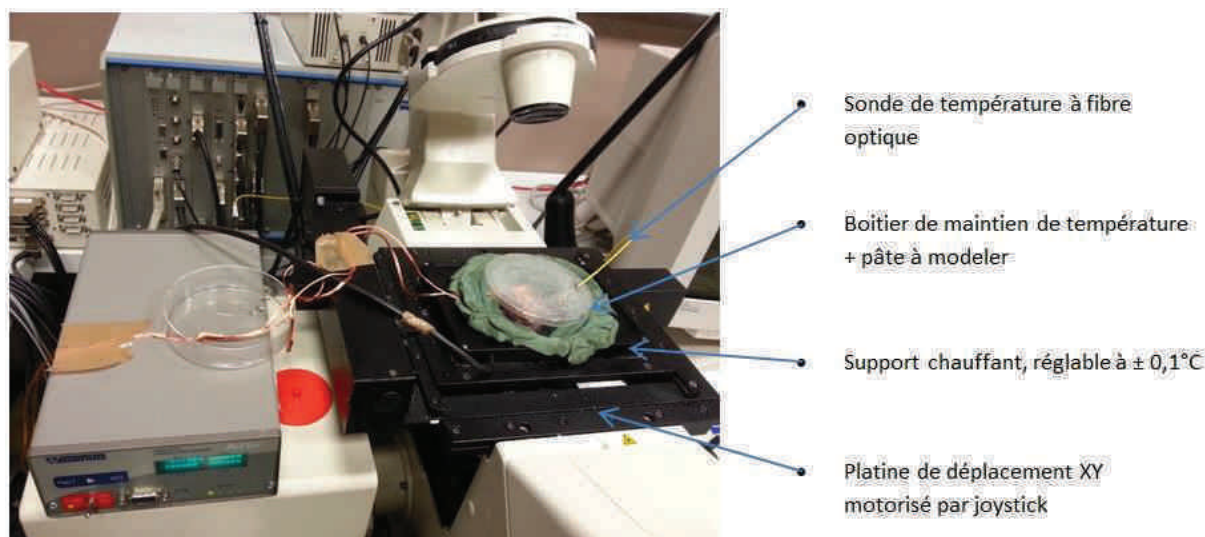


Figure III. 9 Photographie de l'intégration de l'électroaimant au montage complet. Un boîtier de maintien de température est placé sur le support chauffant de la platine pour aider à réguler la température de la chambre.

Grâce à ses dimensions réduites, l'inducteur est très facilement adaptable à une chambre de microscopie. Les faibles valeurs d'intensités de courant de fonctionnement nous permettent de travailler en sécurité et cela même avec les fils non protégés.

La maîtrise de la température a par contre nécessité quelques ajustements. Dans une pièce climatisée aux alentours de 22°C , le milieu d'incubation des cellules doit être maintenu à 37°C tout au long de l'expérience. Pour ce faire la première source de chaleur est l'électroaimant lui-même. Mais comme constaté en *Figure III. 8(b)*, cela ne permet pas d'élever suffisamment la température du milieu. Nous utilisons donc la platine XY thermostatée dont le réglage de la température de consigne est possible à $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Pour éviter les fluctuations au cours des expérimentations, nous avons conçu une chambre avec un couvercle recouvrant l'ensemble CellView + inducteur, jointé au support par de la pâte à modeler. Le contrôle de la température s'effectue à l'aide d'une sonde de température à fibre optique placée au plus près de la zone d'observation, à l'entrée de l'entrefer. De cette manière, il nous a été possible à chaque essai de maintenir le système à $37 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$.

On montre en

Figure III. 10 des clichés de microscopie confocale pris pendant une expérience. Les bords de l'entrefer sont volontairement visibles. On voit ainsi la netteté de la découpe d'une précision micrométrique. On aperçoit également quelques cellules en suspension dans un gel.

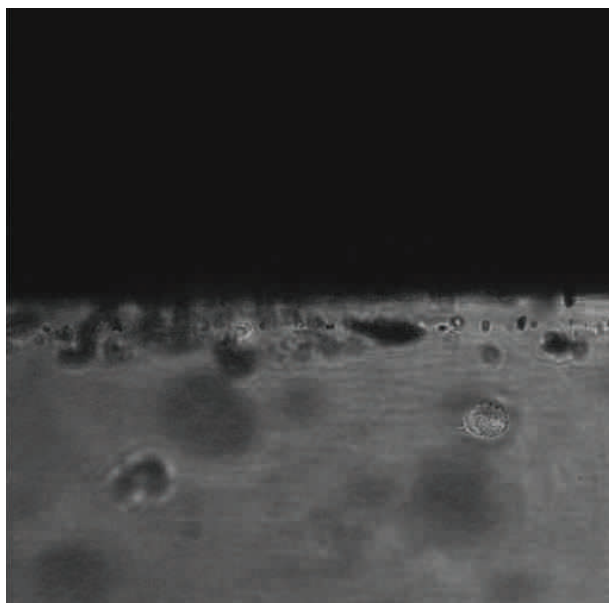


Figure III. 10 Cliché de microscopie confocale en transmission avec un objectif Zeiss $\times 25$. L'image est de dimensions $245,7 \mu\text{m} \times 245,7 \mu\text{m}$. On remarque la délimitation de l'entrefer sur le haut de l'image.

2.2 Présentation des résultats obtenus (Article III-2)

Nous présentons maintenant les travaux effectués jusqu'ici utilisant notre électroaimant miniaturisé. Nous avons souhaité nous placer dans les mêmes conditions de champs que précédemment (**Article III-1**), avec donc une fréquence d'environ 300 kHz et un champ d'environ 50 mT. Cependant, dû probablement à l'imprécision du réglage de la planéité de l'entrefer sur la lamelle de verre composant le fond de la boîte CellView lors de nos premiers essais, les expériences préliminaires sur cellules adhérentes n'avait pas donné de résultats satisfaisants. Les cellules ont donc été incorporées dans un gel d'agarose, coulé directement au niveau de l'entrefer juste avant l'application du champ magnétique. Le travail sur cellules non adhérentes en gel nous a également permis de pouvoir mélanger dans une même suspension des cellules ayant ou pas internalisées des nanoparticules. De cette manière, nous avons pu observer la sélectivité du traitement sur les cellules avec nanoparticules. La plupart des expériences ont donc été conduites avec ce protocole. Néanmoins, des études sur cellules adhérentes ont conduit à des résultats reproductibles lorsque la planéité de l'électroaimant était correctement ajustée.

L'utilisation de la microscopie confocale en fluorescence nous permet également de suivre des mécanismes cellulaires au cours du traitement. Comme nous le savions, les nanoparticules s'accumulent très majoritairement dans les lysosomes dont la perméabilisation

est soupçonnée d'être à l'origine d'une réponse cellulaire entraînant l'apoptose. Pour suivre ce phénomène, nous avons utilisé un fluorochrome s'accumulant spécifiquement dans les lysosomes, le LysoTracker. L'étude de la colocalisation entre le signal du LysoTracker et celui des nanoparticules contenues dans les lysosomes nous a permis de constater l'apparition d'une fuite lysosomale au cours du traitement, se traduisant par une diminution du coefficient de Pearson révélant la colocalisation des nanoparticules et du fluorochrome LysoTracker dans les lysosomes. La perméabilisation lysosomale pouvant être reliée à la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS dans le texte en anglais pour *Reactive Oxygen Species*), nous avons également quantifié cette production au cours de l'exposition des cellules au champ magnétique alternatif.

L'ensemble des résultats correspondants est disponible en **Article III-2**

Compte tenu des résultats obtenus, plusieurs enseignements peuvent être formulés. L'observation dynamique du traitement d'hyperthermie magnétique *in vitro* a été rendu possible par la conception de l'électroaimant miniaturisé. Les niveaux de mort cellulaire sont légèrement plus élevés à conditions de champs équivalentes que dans des traitements d'hyperthermie conduits à l'aide du four à induction (**Article III-1**). Précisons tout de même que pour ce cas-ci, nos expériences étaient réalisées sur des cellules dans un gel et non pas adhérentes; ceci peut engendrer de fait une différence de réponse. De plus, compte tenu de l'entrefer réduit, l'estimation de l'amplitude du champ se révèle imprécise et nous ne pouvons donner qu'une fourchette d'amplitude. De plus, l'estimation du champ magnétique se révélait plus difficile avec un entrefer réduit, et nous donnons une fourchette d'amplitude de champ. Il est donc également possible que la valeur réelle se trouve dans la partie haute de cette estimation.

Les suivis de la perméabilisation de la membrane lysosomale et de la production de ERO en dynamique a permis d'ouvrir la voie à l'étude de la cinétique de ces mécanismes. Nous avons également constaté par le biais du mélange de cellules avec et sans nanoparticules que le traitement avait une sélectivité à l'échelle cellulaire. Ces études préliminaires constituent bien sûr un premier pas vers la compréhension de la réponse métabolique des cellules au traitement. Des études plus approfondies sont en cours pour affiner notre compréhension de ces mécanismes.

La température de l'entrefefer étant volontairement maintenue à 37°C, aucun phénomène d'hyperthermie macroscopique ne permet d'expliquer ces résultats de mort cellulaire. L'explication de l'hyperthermie localisée à l'échelle de la nanoparticule ou du lysosome, compartiment subcellulaire d'accumulation des nanoparticules, est donc privilégiée ici. Pour poursuivre dans cette investigation, l'utilisation de thermomètres thermosensibles moléculaires [4] pourrait permettre de cartographier la température au sein du lysosome ou à la surface des nanoparticules tout au long de l'application.

De manière plus exploratoire, l'observation d'aiguilles magnétiques, probablement dues à des alignements de lysosomes sous l'effet du champ, est très intéressante. Elle illustre le fait que, si les forces magnétiques agissant sur les nanoparticules magnétiques individuelles dans des expériences d'hyperthermie magnétique sont petites, celles agissant sur des ensembles de particules sont non-négligeables. Des déformations de lysosomes ainsi que l'auto-assemblage d'endosomes avait déjà été mises en évidence [5] dans des expériences impliquant des champs statiques de fortes amplitudes (660 mT). L'observation d'interactions magnétiques entre lysosomes suffisantes pour conduire à un alignement de lysosomes pour les champs alternatifs de faibles amplitudes utilisés en hyperthermie magnétique est par contre nouvelle. Ceci étant dit, le fait que ce phénomène n'ait été observé distinctement que dans quelques cellules laisse à penser qu'il n'existe pas de lien entre lui et la mort cellulaire.

Enfin pour d'autres champs d'investigations comme par exemple la libération d'agents thérapeutiques ou le déclenchement de réactions par application d'un champ magnétique externe [6]–[9], ce protocole d'observation *in situ* pourrait être utilisé pour le suivi dynamique d'événements intracellulaires.

3 Conclusion

L'ensemble des travaux réalisés nous a permis d'induire spécifiquement la mort de cellules tumorales ayant internalisé des nanoparticules magnétiques par application de traitement hyperthermique. Cependant la quantité de fer internalisée ne permet pas d'élever la température globale des cellules. La poursuite de la recherche sur l'origine des mécanismes de mort intracellulaire est donc indispensable pour la compréhension et l'optimisation de toutes les étapes de réalisation du traitement, de la synthèse chimique au traitement *in vivo*.

Nous avons obtenu de bons résultats de mort cellulaire au moyen de nanoparticules à très faibles SAR. Il serait intéressant de comparer l'effet sur le traitement de nanoparticules présentant des puissances de chauffe plus élevées pour rendre compte de l'influence de ce facteur. Il faudrait donc fonctionnaliser et internaliser de la même manière des nano-objets de natures différentes, comme par exemple des nanoparticules de fer ou de carbures de fer ([10], [11]) à SAR bien plus élevées, synthétisées au LPCNO. L'observation du traitement sous microscopie confocale couplée à un greffage de fluorochromes thermosensibles à la surface des nanoparticules pourrait également nous permettre de mieux rendre compte de l'élévation de température dans l'environnement proche des nanoparticules dans les lysosomes. De cette manière, il serait possible de situer la gamme de températures optimales entraînant la mort cellulaire et y associer des explications biochimiques.

Nos différents inducteurs permettent de générer des champs d'amplitude et de fréquence variable. Une étude plus fine de l'incidence de ces paramètres serait également un bon moyen de poursuivre l'optimisation du traitement. De plus, il est difficile de statuer sur la configuration magnétique réelle (formation en aiguilles par exemple) des nanoparticules au sein des lysosomes.

Par la suite, il sera indispensable de varier nos modèles expérimentaux. En effet, les cellules adhérentes ou en suspensions sont souvent utilisées pour les études préliminaires. Il serait intéressant de pouvoir travailler sur des sphéroïdes et commencer ainsi à observer l'efficacité du traitement sur de petites structures en volume, modèle *in vitro* plus proche de la configuration d'une tumeur. Nos installations permettent également de travailler *in vivo* sur des modèles de type souris pour différentes conditions de champs.

- [1] C. Sanchez, “Le récepteur CCK2 dans les cancers: ciblage diagnostique et thérapeutique grâce à la vectorisation de nanoparticules magnétiques,” Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier, 2012.
- [2] L.-M. Lacroix, J. Carrey, and M. Respaud, “A frequency-adjustable electromagnet for hyperthermia measurements on magnetic nanoparticles,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 79, no. 9, p. 093909, Sep. 2008.
- [3] A. Jordan, R. Scholz, K. Maier-Hauff, M. Johannsen, P. Wust, J. Nadobny, H. Schirra, H. Schmidt, S. Deger, S. Loening, W. Lanksch, and R. Felix, “Presentation of a new magnetic field therapy system for the treatment of human solid tumors with magnetic fluid hyperthermia,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 225, no. 1–2, pp. 118–126, 2001.
- [4] A. Riedinger, P. Guardia, A. Curcio, M. A. Garcia, R. Cingolani, L. Manna, and T. Pellegrino, “Subnanometer Local Temperature Probing and Remotely Controlled Drug Release Based on Azo-Functionalized Iron Oxide Nanoparticles,” *Nano Lett.*, vol. 13, no. 6, pp. 2399–2406, Jun. 2013.
- [5] C. Wilhelm and F. Gazeau, “Magnetic nanoparticles: Internal probes and heaters within living cells,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 321, no. 7, pp. 671–674, avril 2009.
- [6] S. Brulé, M. Levy, C. Wilhelm, D. Letourneur, F. Gazeau, C. Ménager, and C. Le Visage, “Doxorubicin Release Triggered by Alginate Embedded Magnetic Nanoheaters: A Combined Therapy,” *Adv. Mater.*, vol. 23, no. 6, pp. 787–790, février 2011.
- [7] M. Pernia Leal, A. Torti, A. Riedinger, R. La Fleur, D. Petti, R. Cingolani, R. Bertacco, and T. Pellegrino, “Controlled release of doxorubicin loaded within magnetic thermo-responsive nanocarriers under magnetic and thermal actuation in a microfluidic channel,” *ACS Nano*, vol. 6, no. 12, pp. 10535–10545, Dec. 2012.
- [8] C. Sanson, O. Diou, J. Thévenot, E. Ibarboure, A. Soum, A. Brûlet, S. Miraux, E. Thiaudière, S. Tan, A. Brisson, V. Dupuis, O. Sandre, and S. Lecommandoux, “Doxorubicin loaded magnetic polymersomes: theranostic nanocarriers for MR imaging and magneto-chemotherapy,” *ACS Nano*, vol. 5, no. 2, pp. 1122–1140, Feb. 2011.
- [9] Y. Chen, A. Bose, and G. D. Bothun, “Controlled release from bilayer-decorated magnetoliposomes via electromagnetic heating,” *ACS Nano*, vol. 4, no. 6, pp. 3215–3221, Jun. 2010.
- [10] B. Mehdaoui, A. Meffre, J. Carrey, S. Lachaize, L.-M. Lacroix, M. Gougeon, B. Chaudret, and M. Respaud, “Optimal Size of Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia: A Combined Theoretical and Experimental Study,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 21, no. 23, pp. 4573–4581, décembre 2011.
- [11] A. Meffre, B. Mehdaoui, V. Kelsen, P. F. Fazzini, J. Carrey, S. Lachaize, M. Respaud, and B. Chaudret, “A Simple Chemical Route toward Monodisperse Iron Carbide Nanoparticles Displaying Tunable Magnetic and Unprecedented Hyperthermia Properties,” *Nano Lett.*, vol. 12, no. 9, pp. 4722–4728, Sep. 2012.

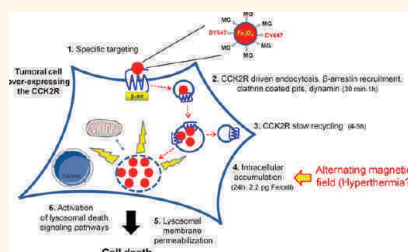
Article III-1

Targeting a G-Protein-Coupled Receptor Overexpressed in Endocrine Tumors by Magnetic Nanoparticles To Induce Cell Death

Claire Sanchez,[†] Darine El Hajj Diab,^{†,‡} Vincent Connord,^{‡,§} Pascal Clerc,[†] Etienne Meunier,[§] Bernard Pipy,[§] Bruno Payré,[‡] Reasmey P. Tan,[‡] Michel Gougeon,^{||} Julian Carrey,[‡] Véronique Gigoux,[†] and Daniel Fourmy^{†,*}

[†]EA 4552, Université de Toulouse 3, Toulouse, France, [‡]Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-Objets, INSA/CNRS, Toulouse, France, [§]EA2405, Université de Toulouse 3, Toulouse, France, [‡]CMEAB, Faculté de Médecine, Université de Toulouse 3, Toulouse, France, and ^{||}CIRIMAT, Université de Toulouse 3/CNRS, Toulouse, France. [‡]D. El Hajj Diab and V. Connord equally contributed to this work.

ABSTRACT Nanotherapy using targeted magnetic nanoparticles grafted with peptidic ligands of receptors overexpressed in cancers is a promising therapeutic strategy. However, nanoconjugation of peptides can dramatically affect their properties with respect to receptor recognition, mechanism of internalization, intracellular trafficking, and fate. Furthermore, investigations are needed to better understand the mechanism whereby application of an alternating magnetic field to cells containing targeted nanoparticles induces cell death. Here, we designed a nanoplatform (termed MG-IONP-DY647) composed of an iron oxide nanocrystal decorated with a ligand of a G-protein coupled receptor, the cholecystokinin-2 receptor (CCK2R) that is overexpressed in several malignant cancers. MG-IONP-DY647 did not stimulate inflammasome of Raw 264.7 macrophages. They recognized cells expressing CCK2R with a high specificity, subsequently internalized *via* a mechanism involving recruitment of β -arrestins, clathrin-coated pits, and dynamin and were directed to lysosomes. Binding and internalization of MG-IONP-DY647 were dependent on the density of the ligand at the nanoparticle surface and were slowed down relative to free ligand. Trafficking of CCK2R internalized with the nanoparticles was slightly modified relative to CCK2R internalized in response to free ligand. Application of an alternating magnetic field to cells containing MG-IONP-DY647 induced apoptosis and cell death through a lysosomal death pathway, demonstrating that cell death is triggered even though nanoparticles of low thermal power are internalized in minute amounts by the cells. Together with pioneer findings using iron oxide nanoparticles targeting tumoral cells expressing epidermal growth factor receptor, these data represent a solid basis for future studies aiming at establishing the proof-of-concept of nanotherapy of cancers using ligand-grafted magnetic nanoparticles specifically internalized *via* cell surface receptors.



KEYWORDS: iron oxide nanoparticles · cholecystokinin-2 receptor · endocrine tumors · internalization · intracellular trafficking · alternating magnetic field · lysosomal cell death pathways

Cancer is a leading cause of death, with millions of new people diagnosed with cancer every year, making the development of new methods for efficient and specific delivery of diagnostic and therapeutic agents to tumors a permanent challenge. Over the past two decades, the introduction of targeted cancer therapeutics in the clinic has been a major breakthrough in cancer therapy. Currently, targeted delivery of diagnosis and/or therapeutic agents to tumoral cells uses biological markers selectively expressed or at least overexpressed in tumors relative to healthy surrounding and distant tissues.^{1,2}

In this context, much attention is focused toward the development of strategies combining molecular targeting and nanoparticle delivery.^{1,3} Among the wide range of available nanoparticles, magnetic nanoparticles have emerged as potential biocompatible systems for cancer detection by magnetic resonance imaging (MRI) and for targeted cancer therapy.^{3–7} Indeed, magnetic nanoparticles offer the theoretical potential to be driven to the tumors by grafting the nanoparticles with ligands or antibodies recognizing receptors or antigens overexpressed in tumors.¹ *In vivo*, targeted magnetic nanoparticles injected intravenously

* Address correspondence to Daniel.Fourmy@inserm.fr.

Received for review September 23, 2013 and accepted January 8, 2014.

Published online January 08, 2014 10.1021/nn404954s

© 2014 American Chemical Society

accumulate within the tumor, where they can act as a thermoablative agent upon application of an alternating magnetic field. In addition, targeted magnetic nanoparticles can serve as nanocarriers of cytotoxic agents through the body, enabling their preferred delivery to primary and metastatic tumors.¹ Interestingly, targeted magnetic nanoparticles offer the opportunity of combining targeted hyperthermia therapy and chemotherapy. Using such therapeutic strategies, exposure of tumoral tissues to therapeutic agents should be optimized, whereas that of healthy tissues should be minimized.

Iron oxide nanoparticles (IONPs), which display low toxicity in humans, are the subject of renewed interest in the perspective of nanotherapy of cancers.⁸ A first field of investigation aims at increasing our knowledge about engineering targeted iron oxide nanoparticles to enhance their ability to efficiently reach solid tumors after systemic administration. Escape of the nanoparticles from the reticuloendothelial system, their extravascular transport to the tumor, and subsequent tumor penetration and accumulation still represent important challenges, although key breakthroughs were recently made.^{9,10} Another important point concerns the specificity of targeted nanoparticles, which is often far from expected, including in cultured cells *in vitro*. In fact, targeting is usually obtained through the chemical grafting of ligands (in the case of receptor targeting) to the surface of the nanoparticles. Yet, this nanoconjugation can dramatically modify properties of the ligands with respect to recognition parameters (kinetics, specificity, affinity), mechanism of internalization, intracellular trafficking, and fate.^{11–13} A second field of active research is related to magnetic hyperthermia and mechanisms at the origin of cancer cell death.^{13–15} *In vivo* studies with transplanted tumors in animals and even clinical trials with prostate cancer or brain tumor patients have provided the proof-of-concept of hyperthermia therapy of cancers with IONPs.^{16,17} However, in most of the *in vivo* investigations so far reported, high amounts of IONPs were injected intravenously or even directly injected into the tumors. Therefore, results obtained in these studies cannot be generalized to targeted IONPs which are actively and specifically internalized in lower amounts by tumoral cells through their cell-surface target.

Interestingly, magnetic iron oxide nanoparticles targeting epidermal growth factor (EGF) receptor were recently shown to be internalized by tumoral cells and to kill the cells upon application of an alternating magnetic field.^{13,14,18} Cell death was achieved without a perceptible temperature rise and occurred through a mechanism involving lysosomal death pathways.^{13,14,18} Such data stimulate research aimed at developing strategies of targeted nanotherapy of cancers overexpressing other cell surface receptors.

The aim of our study was to design and evaluate a hybrid system (termed MG-IONP-DY647) composed of an iron oxide nanocrystal decorated with a peptidic ligand of the cholecystokinin-2 receptor (CCK2R). The CCK2R was chosen as an example of targeted receptor because this seven-transmembrane domain peptide receptor is expressed at high incidence and density in cancers such as medullary thyroid carcinomas, small cell lung cancers (SCLC), gastrointestinal stromal tumors (GIST), and insulinomas.^{19–21} Moreover, CCK2R undergoes rapid internalization and subsequent trafficking to lysosomes following stimulation by its equally potent natural ligands, gastrin and cholecystokinin (CCK).^{22,23} Recently, a number of radiolabeled replicates of CCK or gastrin have been developed, with the indication of receptor-targeted tumor imaging and therapy, on the example of imaging probes that are currently used in the clinic to detect neuroendocrine tumors overexpressing somatostatin receptors.^{19,20} However, so far, none of these CCK or gastrin radiolabels have been approved for clinical use, as their renal retention and expected radiotoxicity remain a major drawback.

We demonstrated the ability of MG-IONP-DY647 to specifically target cells expressing CCK2R, characterized internalization and intracellular trafficking of the nanoparticles, and finally used them as a targeted therapeutic agent to induce tumoral cell death through a cell death lysosomal pathway. Thus, we here confirm that a small amount of nanoparticles displaying a small heating power is sufficient to induce cell death upon an alternating magnetic field. These data are very promising in light of the recent concept that lysosomal membrane permeabilization could be an effective way to kill apoptosis-resistant cancer cells.²⁴

RESULTS

Preparation of Gastrin-Decorated Iron Oxide Nanoparticles (MG-IONP-DY647). In order to selectively target CCK2R with minor cross-recognition of CCK1R, which is also frequently expressed in tumors,¹⁹ gastrin, a selective CCK2R ligand, was chosen as a cross-linked peptide to IONPs. Previous data showing that radiolabeled gastrin injected into animals is abundantly retained by the kidney due to the presence of five glutamic acids in the middle of the peptidic sequence were taken into account for the design of the gastrin replicate (Figure 1a).^{25,26} Thus, a synthetic replicate of gastrin, termed MG, which contains the pharmacophore of natural gastrin but has its Glu-Glu-Glu-Glu-Glu sequence replaced by Cys-Lys-Ser-Ser-Glu was synthesized. Importantly, this peptide shares its C-terminal bioactive sequence with the natural agonist CCK, which is used as reference peptide for CCK2R internalization studies (Figure 1a). Control experiments established that MG bound to CCK2R with only 7.3-fold lower affinity than CCK and stimulated production of

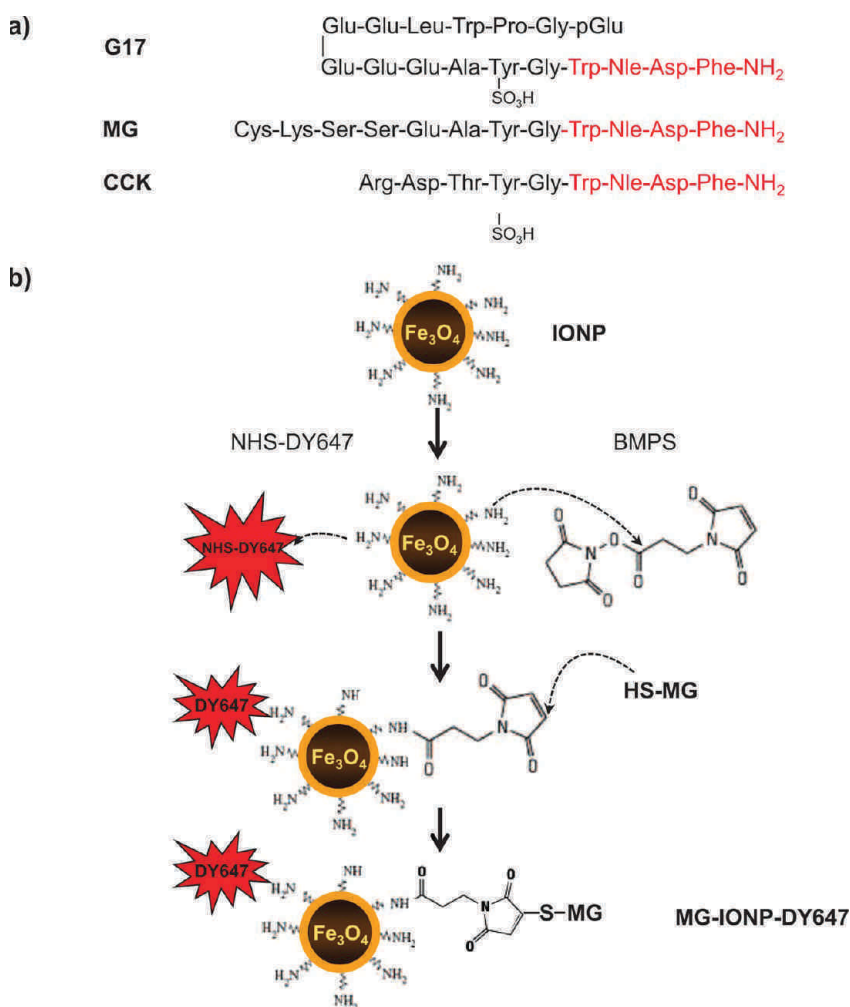


Figure 1. Schematic representation of nanoconjugation method to obtain magnetic iron oxide nanoparticles. (a) Primary structure of gastrin (G17), synthetic replicate of gastrin (MG), and cholecystokinin (CCK) used in the study. Amino acids in red are common to CCK and gastrin (two natural ligands of CCK2R) and correspond to the biologically active region of the two regulatory peptides. (b) Scheme for the conjugation reaction of MG to magnetic iron nanoparticles yielding MG-IONP-DY647. Details of the protocols are given in the Materials and Methods section. The layer colored in yellow represents coating by polyethylene glycol 2000.

inositol phosphates through phospholipase-C activation with the same efficacy as CCK and only 1.3-fold lower potency (Supporting Information, Figure 1a,b). Finally, MG triggered CCK2R internalization as demonstrated by endocytosis of GFP-tagged CCK2R and trapping of MG-DY647 within endocytotic vesicles (Supporting Information, Figure 1c).

The strategy illustrated in Figure 1b was used to obtain magnetic nanoparticles decorated with both gastrin replicate (MG) and fluorescent label (DY647). These were termed MG-IONP-DY647. Batches of MG-IONP-DY647 decorated with 24, 100, or 240 molecules of MG per nanoparticle were routinely prepared.

Starting nanoparticles were commercial iron oxide nanoparticles having characteristics shown in Supporting Information Table 1. Heating properties of these nanoparticles were measured in a magnetic field of frequency 275 kHz, with an amplitude ranging from 24 to 40 mT (Figure 2a). At the largest applied magnetic

field, the specific absorption rate was 13 W/g. The size of MG-IONP-DY647 determined by transmission electron microscopy was 8.7 ± 1.6 nm (Figure 2c), and analysis by dynamic light scattering in a biological medium enriched with 0.5% fetal calf serum showed a distribution around a size of 40 nm, with a significant amount of objects reaching 100 nm size. Size distribution was not significantly affected by the density of MG grafted at the nanoparticle surface (Figure 2b). Hence, in the biological medium MG-IONP-DY647 behaved either as clusters of several individual nanoparticles and/or as likely bound serum proteins.

Absence of Effect of MG-IONP-DY647 Nanoparticles on Macrophage Inflammasome. To evaluate biocompatibility of MG-IONP-DY647, we determined whether the nanoparticles could activate macrophages. Indeed, side-targets of nanoparticles *in vivo* are resident macrophages of liver and spleen as well as monocytes and circulating macrophages involved in the inflammation

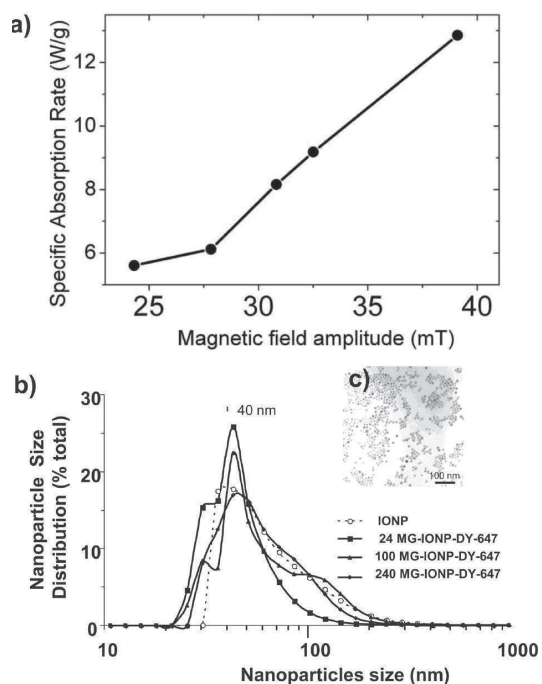


Figure 2. Physicochemical properties of MG-IONP-DY647. (a) Specific absorption rate of a mother solution of magnetic nanoparticles measured at a frequency of 275 kHz as a function of the magnetic field amplitude. Solution concentration was 5.9 mg Fe/mL. (b) Dynamic light scattering analysis of MG-IONP-DY647 in solution (0.1 mg Fe/mL) in RPMI 1640 medium containing 0.5% FBS. The iron nanoparticle suspension was sonicated for 10 min on ice before analysis. (c) Transmission electron microscopy analysis of MG-IONP-DY647 showing size homogeneity of IONP nanoparticles. An average size of 8.7 ± 1.6 nm was calculated.

processes.^{4,27,28} Incubation of MG-IONP-DY647 *in vitro* with Raw 264.7 mouse leukemic monocyte macrophages or with mouse peritoneal macrophages resulted in rapid and abundant uptake of nanoparticles (Figure 3a,b). Then, activation of macrophages was tested on both untreated and LPS-stimulated Raw 264.7 cells by measuring the secretion of the cytokine IL-1 β (Figure 3c). We found that in contrast to nanosilica nanoparticles recognized as potent inducers of inflammasome and which elicit release of the cytokine IL-1 β ,²⁹ MG-IONP-DY647 at concentrations up to 2 mg/mL did not trigger significant release of IL-1 β from both untreated and LPS-primed Raw 264.7 cells (Figure 3c). These first results are in favor of biocompatibility of MG-IONP-DY647.

Specific Targeting of HEK293 Cells Expressing CCK2R by MG-IONP-DY647 and Intracellular Trafficking of the Nanoparticles. Our targeting strategy using MG-IONP-DY647 requires specific recognition of nanoconjugated MG molecules by the CCK2R expressed at the cell surface and internalization of the nanoparticles through the endocytotic machinery usually involved in CCK2R endocytosis. Yet, nanoconjugated MG molecules might modify its pharmacological properties. We therefore characterized binding and internalization of MG-IONP-DY647 in HEK293 cells expressing CCK2R, namely, Flp-In

CCK2R-293, previously used to precisely delineate agonist-induced CCK2R internalization.²²

Confocal microscopy images show slow binding of MG-IONP-DY647 to the membrane of Flp-In CCK2R-293 cells, which were progressively illuminated at their surface upon contact with MG-IONP-DY647 (Figure 4a). This binding of MG-IONP-DY647 to the cell surface was slower than previously appreciated with unconjugated ligands.²² Following binding, MG-IONP-DY647 abundantly internalized over the time (Figure 4a). Only minor nonspecific binding/uptake of red fluorescence was seen on HEK293 cells lacking CCK2R (Figure 4c) or on Flp-In CCK2R-293 cells incubated in the presence of a saturating concentration (1 μ M) of CCK (Figure 4b).

Subcellular localization of MG-IONP-DY647 was assessed by transmission electron microscopy. As illustrated in Figure 4d, MG-IONP-DY647 were located in endocytotic vesicles. The number of nanoparticles in small vesicles, as well as the number of vesicles containing nanoparticles, increased within the first 2–3 h of incubation. Then, the size of vesicles containing MG-IONP-DY647 clearly increased, showing intracellular accumulation and storage of highly concentrated nanoparticles (Figure 4d).

Given that nanoparticles can enter cells through several ways, the initial mechanism of MG-IONP-DY647 internalization was investigated. We previously showed that the molecular mechanism of agonist-induced internalization of CCK2R involves recruitment of nonvisual arrestins, clathrin-coated pits, and dynamin.²² In Figure 5a, confocal microscopy imaging of cells transiently expressing GFP-tagged β -arrestin2 incubated with MG-IONP-DY647 shows fluorescent nanoparticles in intracellular vesicles containing β -arrestin2. Furthermore, internalization of MG-IONP-DY647 was blocked in the presence of chlorpromazine, a clathrin inhibitor, at 75 μ M (Figure 5c; dose–response effect shown in the Supporting Information, Figure 2). In line with this result, incubation of MG-IONP-DY647 with cells transiently expressing eYFP-tagged clathrin polypeptide showed abundant intracellular co-localization (Figure 5d). Furthermore, MG-IONP-DY647 internalization was inhibited in the presence of the dynamin inhibitor dynasore (Figure 5e). The possibility of uptake through caveoles was also examined by testing the effect of filipin, an inhibitor of caveoles. However, abundant internalization of MG-IONP-DY647 in the presence of filipin was still observed, supporting that MG-IONP-DY647 endocytosis did not significantly occur through caveoles in Flp-In CCK2R-293 cells (Figure 5f).

Intracellular trafficking of internalized MG-IONP-DY647 was then investigated. First, co-localization of MG-IONP-DY647 with CCK2R during intracellular trafficking was studied and quantified in cells expressing GFP-tagged CCK2R. As shown in Figure 6a and b, internalized MG-IONP-DY647, as well as CCK-DY647, co-localized with CCK2R in endocytotic vesicles. However,

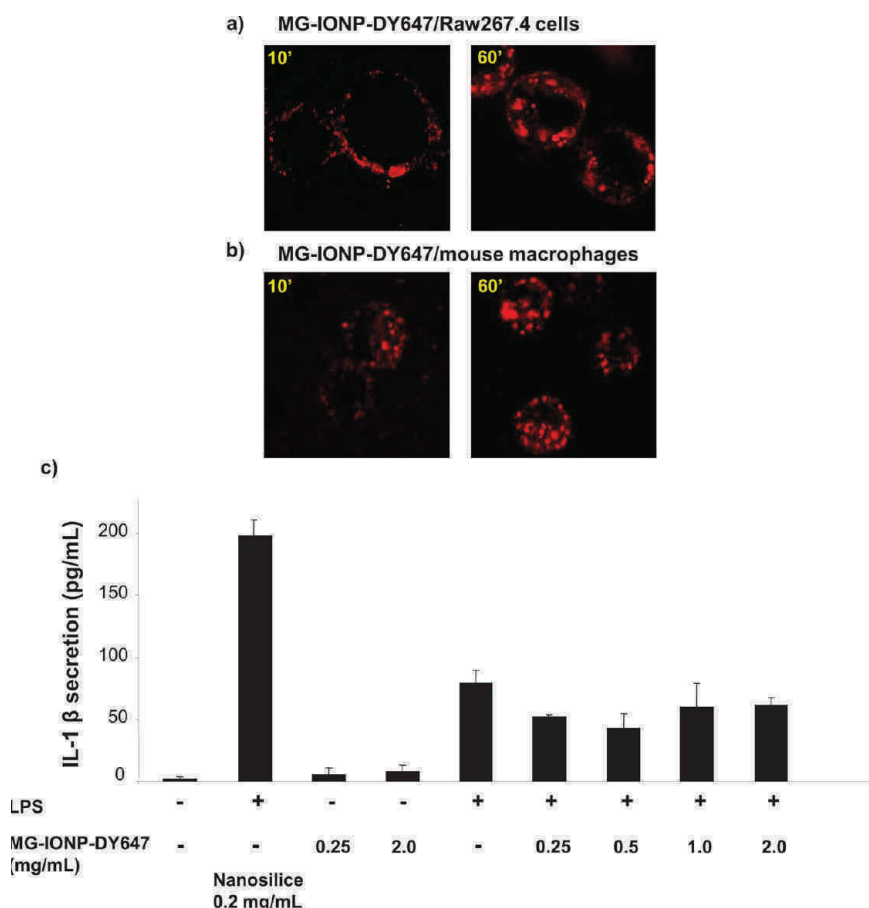


Figure 3. Absence of inflammasome activation of macrophages by MG-IONP-DY647. (a) Uptake of nanoparticles by Raw 264.7 mouse leukemic monocyte macrophages. Confocal microscopy images illustrating Raw 264.7 cells incubated with MG-IONP-DY647 (8 μ g Fe/mL) for indicated times at 37 $^{\circ}$ C. (b) Uptake of nanoparticles by mouse peritoneal macrophages. Resident peritoneal cells were harvested by washing the peritoneal cavity of female Swiss mice with sterile NaCl 0.9%. Two hours after seeding, macrophages were incubated with MG-IONP-DY647 (8 μ g Fe/mL) for indicated times at 37 $^{\circ}$ C. (c) Assay of IL-1 β secretion. Untreated or LPS-primed Raw 264.7 cells were stimulated with increasing concentrations of MG-IONP-DY647 or with nanosilica (0.2 mg/mL) for 6 h at 37 $^{\circ}$ C. IL-1 β release in culture supernatant was assayed with an ELISA kit. Results are mean \pm SEM of three separate experiments.

the time-courses of co-localization differed. Indeed, comparing Figure 6a and b shows that co-localization between CCK-DY647 and CCK2R was persistent, whereas progressive and partial dissociation between MG-IONP-DY647 and GFP-tagged CCK2R was noted at earlier times. These results suggest that nanoconjugation of MG to magnetic nanoparticles affects the trafficking properties of internalized CCK2R and perhaps enables the CCK2R to recycle faster than when stimulated with unconjugated ligand. To examine this possibility, we evaluated co-localization of CCK2R stimulated with MG-IONP-DY647 *versus* CCK-DY647 in vesicles expressing Rab11, a small GTPase of recycling vesicles.³⁰ As represented in Figure 7a, localization of CCK2R-GFP in Rab11-DsRed containing vesicles was maximal after 4 h of incubation with MG-IONP-DY647 and then slightly decreased. When stimulated with CCK-DY647 (or with MG-DY647, not shown), the localization profile of CCK2R in DsRed-tagged Rab-11 positive vesicles was significantly different, with a slower increase to a maximum after 5 h of incubation.

Thus, CCK2R stimulated with MG-IONP-DY647 seems to recycle faster than when stimulated with the non-conjugated ligands; however, the recycling takes several hours, as previously demonstrated.²²

Last, the intracellular fate of MG-IONP-DY647 was analyzed using the lysosome staining reagent LysoTracker and by incubating MG-IONP-DY647 with cells transiently expressing DsRed-tagged Rab7, a small GTPase of late endosomes and lysosomes. As illustrated in Figure 7b, a high proportion of LysoTracker-stained lysosomes contained MG-IONP-DY647 after times longer than 1 h of incubation, and co-localization images between MG-IONP-DY647 and Rab7-Ds-Red were observed in most cells (Figure 7c).

Together, this set of results demonstrates that nanoconjugation of MG to IONPs enables active endocytosis of the nanoparticles, and, by facilitating separation of the receptor from endocytotic vesicles, nanoconjugation slightly accelerates the presence of the targeted receptor in slowly recycling vesicles. Importantly, MG-IONP-DY647 uptake by cells remains fully dependent on CCK2R

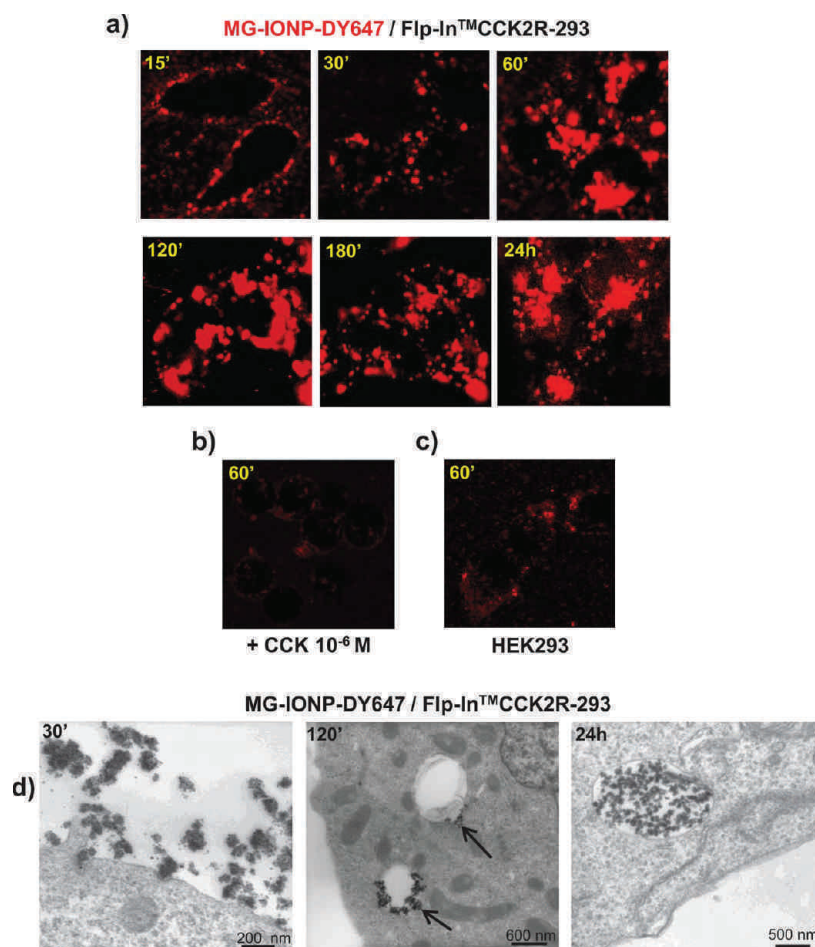


Figure 4. MG-IONP-DY647 specifically bind to Flp-In CCK2R-293 cells and are subsequently internalized and trapped within the cells. (a, b, c) Confocal microscopy images illustrating specificity of uptake of MG-IONP-DY647. (a) HEK293 cells expressing CCK2R (Flp-In CCK2R-293) were incubated at 37 °C with MG-IONP-DY647 alone (8 $\mu\text{g Fe/ml}$) or (b) in the presence of 1 μM CCK. (c) HEK293 lacking CCK2R were incubated with MG-IONP-DY647. (d) Electron microscopy analysis of MG-IONP-DY647 internalization in Flp-In CCK2R-293 cells. Cells were incubated with nanoparticles (8 $\mu\text{g Fe/mL}$) for indicated times at 37 °C. Arrows depict the presence of nanoparticles in endocytotic vesicles.

internalization and involves recruitment of β -arrestin2, clathrin-coated pits, and dynamin. Furthermore, internalized MG-IONP-DY647 are directed to lysosomes, where they are trapped for times up to 24 h.

Targeting of InR1G9-CCK2R Tumoral Endocrine Cells by MG-IONP-DY647 Nanoparticles. Tumoral cells display profound modifications relative to “normal” cells, which affect the plasma membrane, intracellular trafficking as well as lysosomal volume, composition, and cellular distribution.³¹ Therefore, we next characterized the behavior of MG-IONP-DY647 toward tumoral cells expressing or not CCK2R. Specificity and kinetics of MG-IONP-DY647 binding, accumulation in lysosomes, and dependency on the density of MG at the nanoparticle surface were precisely investigated on the tumoral endocrine cell line expressing CCK2R, namely, InR1G9-CCK2R.³²

Confocal microscopy observations confirmed specific binding of MG-IONP-DY647 to the tumoral cells and subsequent internalization, as no significant uptake was detected in InR1G9 lacking CCK2R or InR1G9-CCK2R incubated in the presence of 1 μM

CCK (Supporting Information, Figure 3a,b,c). MG-IONP-DY647 binding and internalization determined by FACS indicates that the amount of MG-IONP-DY647 taken up by the cells increased with the time of incubation but much slower than that of CCK-DY647, which was maximum between 1 and 3 h of incubation and then decreased (Figure 8). Furthermore, the amount of bound and internalized MG-IONP-DY647 by the cells increased proportionally to MG density at the surface of the nanoparticles. After 24 h of incubation, magnetic measurements showed an amount of 2.2 ± 0.2 pg of iron per cell incubated with nanoparticles grafted with 100 molecules of MG (termed 100MG-IONP-DY647 in Figures 8 and 9). FACS quantifications also confirmed high specificity of targeting since nanoparticles without grafted MG (termed IONP-DY647 in Figure 8) were taken up in very low amounts by InR1G9-CCK2R tumoral cells and MG-IONP-DY647 were poorly taken up by InR1G9 tumoral cells lacking CCK2R at their surface ($9.1 \pm 2.1\%$ of nonspecific binding after 24 h of incubation, not shown). Finally,

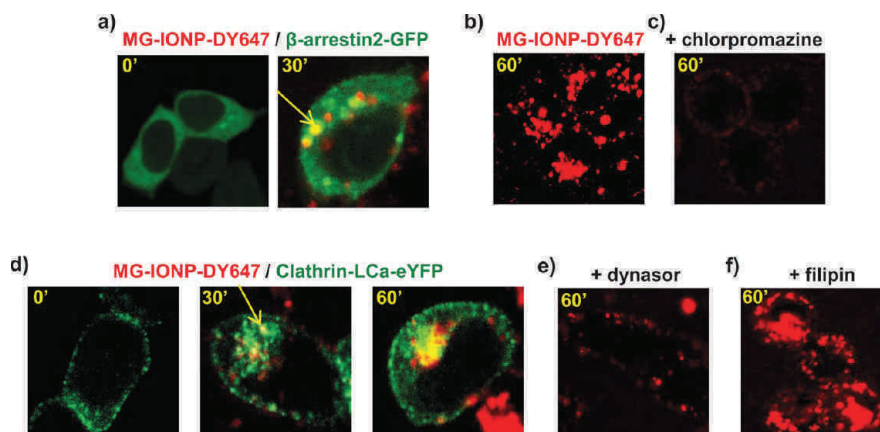


Figure 5. Internalization of MG-IONP-DY647 in Flp-In CCK2R-293 cells occurs through CCK2R endocytotic machinery. (a) MG-IONP-DY647 internalize through recruitment of β -arrestin2. Flp-In CCK2R-293 cells transiently expressing β -arrestin-2-GFP were incubated with MG-IONP-DY647. At initial time, β -arrestin-2 (in green) was uniformly scattered in the cytoplasm, whereas after 30 min of stimulation with nanoparticles, it was also seen in endocytotic vesicles together with MG-IONP-DY647 (in yellow). (b, c, d) MG-IONP-DY647 internalize via clathrin-coated pits. Flp-In CCK2R-293 cells were incubated at 37 °C for 60 min (b) with MG-IONP-DY647 alone or (c) in the presence of the clathrin-coated-pits inhibitor chlorpromazine (75 μ M). Dose–response effect of chlorpromazine is shown in Supporting Information Figure 2. (d) Flp-In CCK2R-293 cells transiently expressing clathrin-LCa-eYFP were incubated with MG-IONP-DY647 at 37 °C. Co-localization between MG-IONP-DY647 and clathrin-LCa-eYFP is seen in yellow. (e) MG-IONP-DY647 internalization requires dynamin. Flp-InCCK2R-293 cells were incubated with MG-IONP-DY647 in the presence of dynasor (160 μ M). Dynasor efficiently inhibited internalization. (f) MG-IONP-DY647 internalization is not sensitive to filipin, an inhibitor of caveoles. Flp-In CCK2R-293 cells were incubated with MG-IONP-DY647 in the presence of filipin (10 μ M). No significant inhibition of internalization could be observed.

lysosome occupancy by MG-IONP-DY647 (illustrated in the Supporting Information, Figure 3d) was quantified by confocal microscopy. Kinetics of accumulation of MG-IONP-DY647 in lysosomes were in agreement with that of binding/internalization (Figure 9). After 24 h of incubation, lysosome occupancy by nanoparticles grafted with 24, 100, or 240 MG molecules reached $31.6 \pm 1.9\%$, $46.8 \pm 0.7\%$, or $49.8 \pm 1.8\%$, respectively. No significant presence of nanoparticles without MG (termed IONP-DY647) could be noticed in lysosomes after 24 h of incubation (Figure 9). On the other hand, lysosome occupancy by unconjugated CCK-DY647 was maximal at 1 and 3 h of incubation and then dramatically decreased to almost disappear at 24 h, suggesting ligand degradation in lysosomes.

Internalized MG-IONP-DY647 by Tumoral Cells Induce Apoptosis and Cause Cell Death upon an Alternating Magnetic Field. Having assessed the ability of MG-IONP-DY647 to specifically target endocrine tumoral cells expressing CCK2R and to abundantly accumulate in lysosomes of these cells, the next step was to test the ability of the nanoparticles to induce cell death upon exposure to an alternating magnetic field. For this purpose, InR1G9-CCK2R tumoral cells incubated with MG-IONP-DY647 for 24 h were maintained at 37 °C and exposed to an alternating magnetic field (275 kHz, 40 or 52 mT for 2 h). Controls were composed of cells having internalized ligand without nanoparticles (CCK-DY647) and cells having internalized MG-IONP-DY647 but that were not exposed to the alternating magnetic field. In preliminary experiments, we also checked that cells incubated with nanoparticles without grafted gastrin and that did not internalize these nanoparticles (Figure 9)

behaved similarly to cells having internalized CCK-DY647 (not illustrated).

The impact of magnetic field treatment was determined by counting cells labeled by FITC-tagged annexin V and/or propidium iodure, which identified early apoptotic, late apoptotic, and necrotic cells, respectively. As shown in Figure 10, application of the alternating magnetic field during 2 h caused the cells to enter into apoptosis. The total number of apoptotic cells reached $17.1 \pm 1.6\%$ at 40 mT amplitude and $36.4 \pm 5.5\%$ at 52 mT amplitude. In control cells having internalized unconjugated CCK-DY647 and exposed to the same magnetic field amplitudes, apoptotic cells represented $3.0 \pm 0.7\%$ and $11.2 \pm 0.4\%$ of the total cell population. The number of necrotic cells, namely, cells that became positive for propidium iodure labeling only, was not significant with a magnetic field of 40 mT, whereas it increased up to 5.9% at 52 mT. Determination of cell survival 24 h after magnetic field exposure using the MTT assay indicated that a magnetic field of 40 or 52 mT killed $26.9 \pm 7.6\%$ and $67.1 \pm 9.9\%$ of tumoral cells, respectively. It is worthy to note that a magnetic field of 52 mT affected the viability of cells that had not accumulated nanoparticles, whereas an amplitude of 40 mT had a minor effect (Figure 10a,b).

Since a recent study with EGF-grafted nanoparticles documented that an alternating magnetic field caused lysosome membrane permeabilization, we determined whether it was also the case with MG-IONP-DY647 nanoparticles. First, the effect of a magnetic field was evaluated on lysosome staining with LysoTracker Red. As evidenced in Figure 10c, exposure of cells containing MG-IONP-DY647 to a magnetic field of 40 or 52 mT

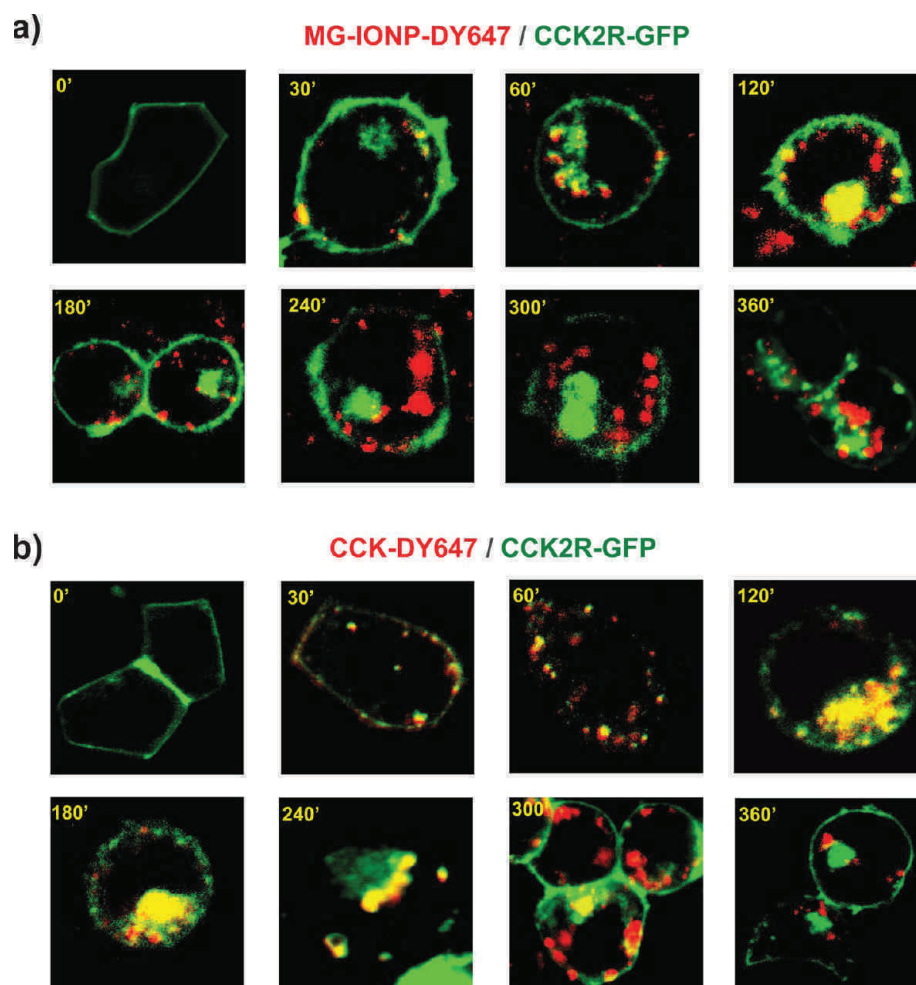


Figure 6. MG-IONP-DY647 dissociate faster from internalized CCK2R than unconjugated fluorescent ligand. Confocal microscopy images illustrating changes in co-localization between MG-IONP-DY647 and CCK2R-GFP over time. HEK293 cells transiently expressing CCK2R-GFP were incubated with (a) MG-IONP-DY647 ($8 \mu\text{g Fe/ml}$) or (b) CCK-DY647 (50 nM). Merged images show that CCK2R-GFP does not co-localize with MG-IONP-DY647 as long as CCK-DY647 does.

induced drops of lysosome stain, suggesting leaking of lysosome content (see Supporting Information, Figure 4 for an illustration). Furthermore, the effect of the magnetic field on apoptosis was almost totally reversed by E64d, an inhibitor of cysteine proteases such as lysosomal cathepsins B, L, C, H, and P (Figure 10a). Pepstatin A, an inhibitor of aspartyl peptidases such as lysosomal cathepsin D, did not reverse cell death (not shown). The effect of the magnetic field on apoptosis was also significantly diminished by chloroquine, a weak base affecting activity of lysosomes and autophagy (at 40 mT , amount of apoptotic cells: $6.8 \pm 0.5\%$ in the presence of chloroquine *versus* $17.1 \pm 1.6\%$ in the absence of chloroquine, not illustrated).

This set of results shows that application of an alternating magnetic field to InR1G9 tumoral cells containing low amounts of MG-IONP-DY647 nanoparticles internalized specifically through cell surface CCK2R causes apoptosis and cell death through a mechanism involving lysosome leaking and lysosomal cysteine proteases.

DISCUSSION

In the context of increasing success of targeted therapy of cancers and accumulation of data showing overexpression of peptide receptors in several types of tumors as well as their contributing role in cancer development,^{33,34} a synthetic analogue of gastrin was conjugated to iron oxide nanoparticles in order to produce a magnetic nanopatform for targeted therapy of tumors overexpressing CCK2R. The synthetic analogue of gastrin (MG) pharmacologically behaved similarly to CCK, the most efficient and potent natural agonist of CCK2R.³⁵

We first showed that MG-IONP-DY647 nanoparticles, even at high concentrations, do not promote inflammation, as evidenced by the absence of $\text{IL-1}\beta$ secretion by cultured macrophages. This result confirms the recognized good biocompatibility of iron oxide nanoparticles. Binding, uptake, and intracellular trafficking of MG-IONP-DY647 nanoparticles and the underlying cellular and molecular mechanisms were characterized on HEK293 cells, a reference cell model for characterization of membrane receptor internalization,

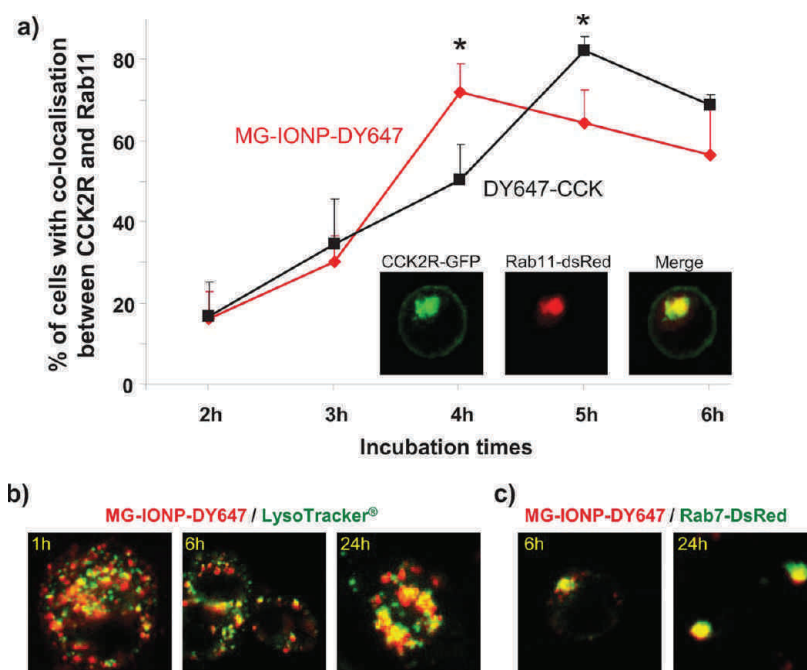


Figure 7. MG-IONP-DY647 accelerate slow recycling of internalized CCK2R and accumulate in lysosomes. (a) MG-IONP-DY647 modulate CCK2R recycling. HEK293 cells transiently coexpressing CCK2R-GFP and Rab11-dsRed were incubated with MG-IONP-DY647 nanoparticles ($8 \mu\text{g Fe/mL}$) or CCK-DY647 (50 nM). Cells expressing both CCK2R-GFP and Rab11-dsRed were counted, and the percentage of cells presenting co-localization between the CCK2R-GFP and Rab11-dsRed was determined. Results are the mean \pm SEM of three distinct experiments with degree of confidence $*0.01 < p < 0.05$. In the inset, an example of confocal microscopy images of co-localization between CCK2R-GFP and Rab-11-DsRed is shown. (b, c) Internalized nanoconjugated MG-IONP-DY647 are directed to lysosomes. (b) Flp-In CCK2R-293 cells were preincubated with $75 \mu\text{M}$ LysoTracker (green) for 30 min before incubation with MG-IONP-DY647. (c) Flp-In CCK2R-293 cells transiently expressing Rab7-DsRed (green) were incubated with MG-IONP-DY647.

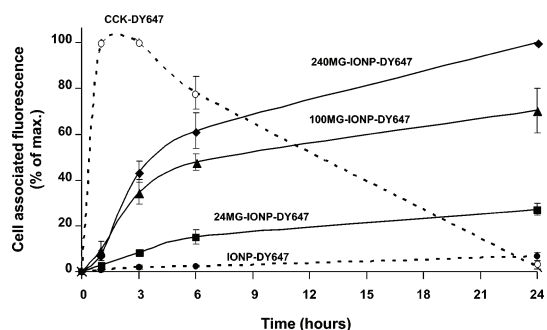


Figure 8. Time-course and specificity of uptake of MG-IONP-DY647 by tumoral endocrine cells InR1G9-CCK2R. InR1G9-CCK2R cells were incubated with MG-IONP-DY647 ($16 \mu\text{g Fe/mL}$) or CCK-DY647 ($0.1 \mu\text{M}$) for indicated times at 37°C . Kinetics are shown for nanoparticles without grafted MG (labeled as IONP-DY647) as well as for nanoparticles grafted with 24, 100, and 240 MG molecules per nanoparticle. Fluorescence was measured by flow cytometry, and results are expressed as % of maximum fluorescence associated with the cells and are the mean \pm SEM of three separate experiments.

as well as on tumoral cell lines (InR1G9) expressing or not CCK2R.³² We found that MG-IONP-DY647 nanoparticles binding and internalization were entirely dependent on the presence of CCK2R at the cell surface. Nevertheless, kinetics of binding and internalization of MG-IONP-DY647 were much slower than that of fluorescent unconjugated CCK (CCK-DY647), although MG-IONP-DY647 nanoparticles internalized together

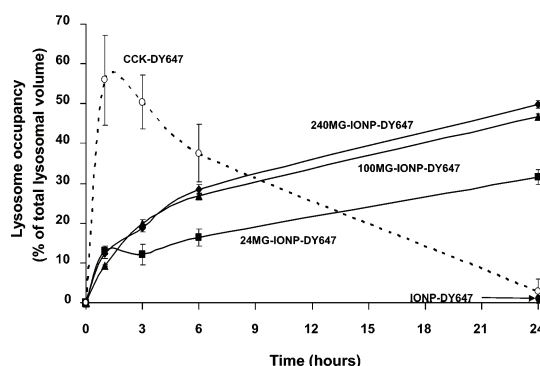


Figure 9. MG-IONP-DY647 trafficking to lysosomes of InR1G9 tumoral endocrine cells. InR1G9-CCK2R cells were incubated at 37°C with MG-IONP-DY647 ($16 \mu\text{g Fe/mL}$), IONP-DY647 ($16 \mu\text{g Fe/mL}$), or CCK-DY647 ($0.1 \mu\text{M}$). LysoTracker (75 nM) was added 30 min before analysis on a confocal microscope. The presence of nanoparticles in lysosomes was quantified on the basis of co-localization between DY-647 and LysoTracker fluorescences using ImageJ software and Jacop Plugin. On average 2–3000 cells/experiment were analyzed. Results are the mean \pm SEM of three separate experiments.

with CCK2R through the initial molecular mechanism described for CCK- or gastrin-induced internalization of CCK2R.²² Indeed, key steps in the internalization process such as β -arrestin2 recruitment and involvement of clathrin-coated pits and of dynamin were observed with both MG-IONP-DY647 (this study) and CCK-DY647.²²

Analysis of CCK2R intracellular trafficking in HEK293 cells expressing either GFP-tagged CCK2R or DsRed-tagged

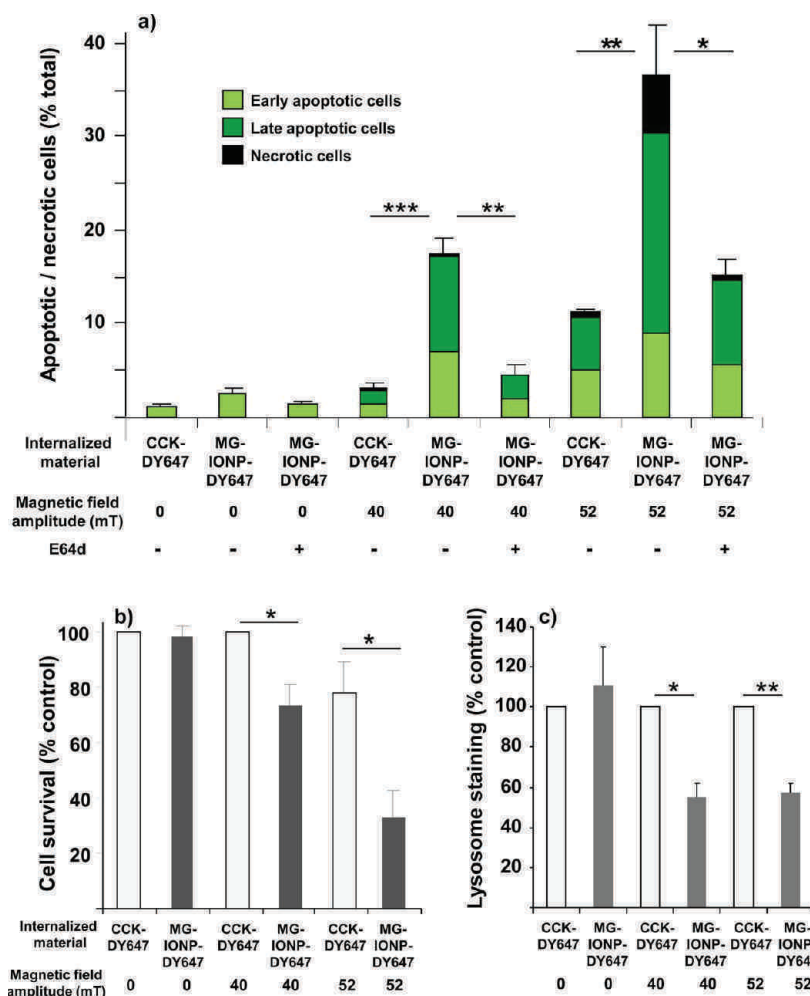


Figure 10. Internalized MG-IONP-DY647 by tumoral cells exposed to an alternating magnetic field induce apoptosis and cause cell death by affecting lysosome integrity. InR1G9-CCK2R cells were incubated with MG-IONP-DY647 (16 $\mu\text{g Fe/mL}$) or CCK-DY647 (0.1 μM) for 24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. When indicated, E64d (10 μM) was added in the medium. Cells were then exposed for 2 h to an alternating magnetic field (275 kHz, 40 or 52 mT) at 37 $^{\circ}\text{C}$. (a) Apoptotic and necrotic cells were counted 4 h after the end of magnetic field exposure by confocal microscopy analysis of cells labeled with FITC-annexin V and/or propidium iodure. Cells labeled only with FITC-annexin V were regarded as early apoptotic cells, those doubled-labeled with FITC-annexin/propidium iodure were regarded as late apoptotic cells, and those labeled only with propidium iodure were necrotic cells. (b) Cell survival was determined using MTT assay 24 h after the end of magnetic field exposure. (c) Lysosome staining with LysoTracker Red was determined 30 min after the end of magnetic field exposure. Results are the mean \pm SEM of three to five separate experiments. *0.01 $< p < 0.05$; **0.001 $< p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Rab11, a small GTPase of slowly recycling vesicles, strongly supports that nanoconjugation of MG affected both the stability of the endocytotic complexes and CCK2R trafficking. Indeed, after stimulation with MG-IONP-DY647, CCK2R was found in vesicles distinct from that containing the nanoparticles and was targeted to recycling vesicles containing Rab11 earlier than CCK2R stimulated with unconjugated CCK or gastrin (Figures 6 and 7). These results are consistent with data showing that internalization and trafficking of a G-protein-coupled receptor are initially dictated by its ligand.^{36,37}

Our data are in agreement with a report showing that nanoconjugation of an antibody directed against EGF receptor modulates antibody-induced internalization of this receptor.¹² Furthermore, it has been also shown that ligand dissociation from G-protein-coupled receptors (GPCRs) and subsequent degradation by

endosomal peptidases control trafficking and endosomal signaling of peptide receptors. For example, endothelin-converting enzyme 1 (ECE-1) rapidly degrades substance P, calcitonin gene-related peptide (CGRP), and somatostatin peptide in endosomes, disrupting the peptide-receptor- β -arrestin complex and then allowing β -arrestins to return to the cytoplasm and receptors, to recycle.^{38–40} For class B GPCRs such as CCK2R, dissociation from β -arrestin in endosomes is necessary for recycling and resensitization.³⁷ As an alternative hypothesis to explain the increased time-course of CCK2R localization in slowly recycling vesicles, CCK2R internalization as oligomers due to simultaneous binding of MG-IONP-DY647 to several receptor molecules at a time must be also considered. Such multiligand binding was described for neuropeptide Y1 receptor when targeted by neuropeptide Y-decorated quantum dots.¹¹

Importantly, besides modifications of CCK2R trafficking, internalized MG-IONP-DY647 nanoparticles are directed to lysosomes, where they accumulate both in HEK293 and InR1G9 tumoral cells. Of interest, internalized MG-IONP-DY647 were much more stable in lysosomes than unconjugated fluorescent CCK, which became almost nondetectable after 24 h of contact with the cells.

Last, we started to explore the opportunity offered by magnetic nanoparticles accumulated into lysosomes of tumoral cells to act as a therapeutic agent inducing cell death upon exposure to an alternating magnetic field. The results that were obtained clearly demonstrate that exposure of tumoral cells containing actively internalized MG-IONP-DY647 to an alternating magnetic field of moderate strength causes apoptosis followed by cell death. Moreover, first data on the mechanisms at the origin of cell death support the involvement of lysosomes and cysteine proteases, since staining of lysosomes with pH-independent LysoTracker Red was diminished by exposure of cells containing targeted nanoparticles to a magnetic field. Moreover, E64d inhibitor was able to reverse the effect of the magnetic field on apoptosis. On this basis, and according to our current knowledge, lysosome membrane permeabilization followed by leaking of cathepsin B is likely at the origin of tumoral cell death. Thus, MG-IONP-DY647 exposed to an alternating magnetic field behaved as a lysosomotropic agent in tumoral endocrine cells. Several other agents have been shown to induce lysosome membrane permeabilization and subsequent activation of lysosomal death pathways.²⁴ EGF-grafted iron nanoparticles internalized by tumoral cells and exposed to an alternating magnetic field were previously reported to cause lysosomal membrane permeabilization, together with production of reactive oxygen species (ROS) and subsequent cell death.¹³ It is worthy to note that ROS formation, lysosomal membrane permeabilization, and cell death occurred in the absence of any perceptible temperature rise in the incubation medium of the cells (refs 13, 14, and 18 and this study). These experimental data, as well as basic calculations,^{41,42} support the view that minute amounts of nanoparticles located in lysosomes are unable to elicit temperature rise, including inside the cells. Alternatively, local temperature increase,^{15,43} nanoparticle rotation,¹³ or nanoparticle high-frequency motion⁴⁴ has been proposed.

Whatever the initial mechanism at the origin of lysosomal membrane permeabilization, data from the

current study highlight the feasibility of cell death induction with very small quantities of actively and specifically internalized nanoparticles. Basic calculation using the model presented in ref 45 indicates that inducing a temperature increase of 5 °C in a 3 mm size tumor with MG-IONP-DY647 would require approximately 165 pg Fe/cell, which is a completely unrealistic objective using targeted nanoparticles which are internalized only *via* cell surface receptors. Here, a maximum of 2.2 pg Fe/cell could be specifically internalized *via* cell surface CCK2R receptors. Although this low amount of nanoparticles was sufficient to induce cell death, it likely explains, together with the low heating power of the iron oxide nanoparticles, the relatively modest level of cell death achieved in this study using a magnetic field of 40 mT. Our results show that increasing the amplitude of the magnetic field from 40 mT to 52 mT augmented the death rate of cells containing nanoparticles. However, such a treatment also caused damage to cells that had not accumulated nanoparticles. Therefore, optimization of the nanoparticles will be required in order to enhance their killing efficiency. Their size and composition could be changed to increase their heating power.

CONCLUSIONS

Grafting of gastrin to iron oxide nanoparticles enabled highly specific targeting of HEK293 and tumoral endocrine cells INR1G9 expressing CCK2R, a G-protein-coupled receptor overexpressed in endocrine tumors. Subsequently, nanoparticles undergo internalization with CCK2R through a mechanism involving β -arrestins, clathrin-coated pits, and dynamin composing the endocytotic machinery of CCK2R. Internalized nanoparticles are then directed to lysosomes, where they accumulate in minute amount (2.2 pg Fe/cell). Application of an alternating magnetic field to cells containing MG-IONP-DY647 induced apoptosis and cell death through a lysosomal death pathway, demonstrating that cell death is triggered even though nanoparticles of low thermal power are internalized in minute amounts by the cells. These data are very promising in light of the recent concept that lysosomal membrane permeabilization could be an effective way to kill apoptosis-resistant cancer cells.²⁴ Together with previous pioneer findings,^{13,14} they represent a solid basis for future studies aimed at establishing the proof-of-concept of nanotherapy of cancers using ligand-grafted magnetic nanoparticles specifically internalized *via* their cell surface receptors.

MATERIALS AND METHODS

Chemical and Biological Materials. Iron oxide nanoparticles were purchased from Genovis (Lund, Sweden). The characteristics of these IONP provided by the manufacturer are given in Supporting Information Table 1. A stable replicate of CCK, sulfated [Thr28,Nle31]-CCK 25-33, was kindly given by Prof. L. Moroder⁴⁶

and is referred to as CCK. ¹²⁵I-Sodium (2000 Ci/mmol) and [myo-3H]inositol (5 μ Ci/mL) were from Perkin-Elmer Life Sciences. CCK was conjugated with Bolton-Hunter reagent, purified, and radioiodinated as described previously⁴⁷ and is referred to as ¹²⁵I-CCK. Gastrin replicate termed MG (Figure 1) was synthesized by Covalab (Villeurbanne, France). DY647-tagged CCK and MG were obtained according to the procedure described for

glucose insulinotropic polypeptide by coupling the peptides to NHS-DY647-PEG1 (Dyomics GmbH, Jena, Germany)⁴⁸ and are referred to as CCK-DY647 and MG-DY647, respectively. The following products were supplied as follows: 3-maleimidopropionic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (Thermo Scientific), magnetic columns (Miltenyi, Berisch, Gladback, Germany), specific inhibitor of dynamin, dynasore (Calbiochem), an inhibitor of clathrin-dependent uptake, chlorpromazine (Sigma-Aldrich), an inhibitor of caveoles, filipin (Sigma), and LysoTracker (Invitrogen).

The cDNA encoding CCK2R was subcloned in pcDNA3 vector, and green fluorescent protein (GFP)-tagged CCK2R was generated by subcloning the CCK2R cDNA in pEGFP-N1 (BD Biosciences Clontech). DsRed-tagged Rab11, DsRed-tagged Rab7, and clathrin-LCa-eYFP were obtained from Addgene (www.addgene.org). GFP-tagged β -arrestin2 was kindly supplied by Robert Lefkowitz (Duke University Medical Center, Durham, NC, USA). The annexin V binding apoptosis assay kit was from AAT Bioquest, Inc. (Sunnyvale, CA, USA). Cell lines were HEK 293 cells stably expressing CCK2R (Flp-In CCK2R-293) obtained using the Flp-In system (HEK293) (Invitrogen) as previously described,²² the glucagon-producing hamster tumoral cell line InR1G9 stably expressing CCK2R obtained as previously described (InR1G9-CCK2R),³² and the Raw 264.7 mouse leukemic monocyte macrophage cell line. Lab-Tek II chambers were from Thermo Fisher (Rochester, NY, USA), and glass-bottom Cellview dishes were from Greiner Bio-one, Courtaboeuf, France.

Preparation of Gastrin-Decorated Magnetic Nanoparticles (MG-IONP-DY647). The protocol used for grafting 100 molecules of MG per IONP was as follows: an aliquot of IONP (80 μ L of IONP at a concentration of 12 mg Fe₃O₄/mL) was added to 120 μ L of sodium phosphate buffer (0.2 M Na₂HPO₄ pH 7.3, 150 mM NaCl) and sonicated for 10 min on melting ice (Bioblock Scientific 88154). NHS-DY647-PEG1 (12 μ g) in solution in dimethyl formamide (24 μ L) was added and allowed to react for 2 h at room temperature. Then, 53 μ g of 3-maleimidopropionic acid *N*-hydroxysuccinimide ester in solution in 10 μ L of DMF was added and incubated at room temperature for 1 h. MG (100 μ L of a solution of 30% DMF, 70% H₂O containing 20 μ g of peptide) was added to IONP and allowed to react for 2 h. Finally, free maleimide functions were saturated by addition of an excess of cystein (62 μ g in 50 μ L of reaction buffer). Grafted nanoparticles were recovered through a magnet column in H₂O. MG-IONP-DY647 were stored at 4 °C. Before use, MG-IONP-DY647 were always sonicated on ice for 10 min. The amount of recovered nanoparticles was determined by magnetic measurement (see below), and the density of grafted MG at the nanoparticle surface was assessed by measuring the ability of different dilutions of MG-IONP-DY647 to stimulate production of inositol phosphates in Flp-In CCK2R-293 cells. The density of MG was calculated from a dose–response curve with free MG (Supplementary Figure 1b).

Dynamic Light Scattering Measurements of Hydrodynamic Diameter. A suspension of iron nanoparticles at 0.1 mg/mL was prepared in RPMI 1640 medium containing 0.5% FBS. The iron nanoparticle suspension was sonicated for 10 min on ice. After temperature equilibrium to 20 °C, the particle size was measured by dynamic light scattering using Nanotracc 250 (Microtrac, York, PA, USA).

Specific Absorption Rate Measurements. A 300 μ L solution of IONPs at 5.9 mg Fe/mL was used for specific absorption rate measurements. The temperature increase of the sample placed in a 275 kHz alternating magnetic field delivered by a commercial magnetic inductor (Fives Celes, Lautenback, France) during 100 s was measured. A blank sample containing water was used in parallel in order to remove the contribution of eddy current to the temperature increase. Temperature measurements were performed using a thermal probe (Reflex, Neoptix, Canada). The specific absorption rate was calculated using standard formula and taking into account the specific heat of water.

Determination of Iron Concentrations and Amounts. Amounts of iron were determined by magnetic measurements using a vibrating sample magnetometer (PPMS, Quantum Design, USA). First, we checked the value of concentration and saturation

magnetization provided by the manufacturer by performing magnetic measurements on a dried powder of MG-IONP-DY647. Hysteresis cycles at 270 K were measured, and the linear slope corresponding to the diamagnetic signal was removed from the raw measurement. The remaining signal was fitted with a distribution of Langevin functions in parallel with a fit of the NP size distribution obtained by TEM. The magnetization and concentration values determined from this fit are 73 ± 10 Am²/kg Fe₃O₄ and 2.1 ± 0.2 mg/mL, respectively, when 80 Am²/kg Fe₃O₄ and 2 mg/mL were expected from manufacturer data. We thus considered manufacturer data as reliable and used them in the following. To determine iron content in cells, a suspension containing a known number of dried cells ($2.5 \pm 0.2 \times 10^6$) was put into a magnetic measurement capsule, the excess of liquid removed, and the remaining liquid allowed to evaporate. Hysteresis loops were measured at 300 K at a magnetic field of 5 T. The obtained magnetization was divided by the saturation magnetization of the nanoparticles provided by the nanoparticle supplier (107 Am²/kg Fe) and the number of cells to obtain the iron content per cell.

Transmission Electron Microscopy. Flp-In CCK2R-293 or HEK293 cells were grown in poly-L-lysine-coated wells and incubated with MG-IONP-DY647 (8 μ g Fe/mL) for indicated times in phosphate-buffered saline (PBS) 0.2% BSA. After two washes, cells were fixed with 4% glutaraldehyde in Sorensen buffer for 4 h at 4 °C. After washes, cells were postfixed in 1% osmium tetroxide (osmium 2%, saccharose 0.25 M, Sorensen 0.05 M) for 1 h at 20 °C, followed by washings with distilled water and uranyl acetate 2% for 12 h at 4 °C. After dehydration, 70 nm sections of cells embedded in EMBED 812 resin were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a TEM (Hitachi HU12A, Japan) operating at 75 kV.

Cell Culture and Transfections. Flp-In CCK2R-293 and HEK293 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FBS and 1% penicillin–streptomycin (Invitrogen). InR1G9 and Raw cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin–streptomycin (Invitrogen). Cells were grown in a humidified atmosphere at 95% air and 5% CO₂. Transfections of HEK293 cells were carried out using polyethylenimine (Polyscience) on 10 cm dishes containing 2.0×10^6 cells, which were seeded 24 h before transfection. Plasmids containing cDNA encoding GFP-tagged CCK2R, β -arrestin2-GFP, Rab7-DsRed, Rab11-DsRed, or clathrin-LCa-eYFP were transfected.

Analysis of Macrophage Inflammasome Activation. To evaluate IL-1 β secretion, Raw 264.7 macrophages were primed with ultrapure lipopolysaccharide (LPS, 500 ng/mL) (Invivogen, Toulouse, France), for 4 h. This step of LPS stimulation triggers synthesis and intracellular accumulation of pro-IL-1 β .⁴⁹ Medium was removed and cells were washed twice with PBS. Then, Raw 264.7 cells were stimulated with IONP-MG-DY647 or silica nanoparticles for 6 h at 37 °C. This second step of stimulation is expected to assemble a multiprotein complex termed an inflammasome, leading to enzymatic cleavage of pro-IL1 β by caspase-1 and release of its active form, IL1 β .⁴⁹ Supernatants were recovered and assayed for IL-1 β secretion with an ELISA kit according to the manufacturer's instructions.

Receptor Binding and Inositol Phosphate Assays. Cells were plated onto 24-well plates and grown for 24 h. Binding assays were performed on attached cells using ¹²⁵I-CCK according to the protocol previously described in detail.⁵⁰ IC₅₀ values were calculated from homologous ¹²⁵I-CCK competition binding experiments using the nonlinear curve-fitting software GraphPad Prism (San Diego, CA, USA). Inositol phosphate production was determined as previously described after 24 h of incubation in DMEM containing 2 μ Ci/mL of myo-[2-³H]inositol (specific activity: 10–25 Ci/mmol).⁵⁰

Quantification of MG-IONP-DY647 Binding and Uptake by Flow Cytometry. Cells were seeded onto poly-L-lysine-coated 12-well plates at a density of 150×10^3 cells/well and grown for 24 h on RPMI 1640 medium containing 2% FBS. MG-IONP-DY647 (4 to 8 μ g of Fe) or CCK-DY647 (0.1 μ M) in 250 μ L of medium were added and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere for the desired times. Then, cells were rinsed twice with ice-cold PBS containing 0.5% BSA and once with PBS alone. Cells were recovered and

transferred to FACS tubes. Cell-associated fluorescence was determined using a BD FACSCalibur flow cytometer. In parallel, samples of cells were collected for magnetic determination of iron.

Internalization and Trafficking Studies. Internalization and trafficking of nanoparticles were characterized using a Zeiss laser scanning microscope (LSM-510). Routinely, cells that had been eventually transfected 24 h earlier were plated ($\sim 80\text{--}100 \times 10^3$ cells/compartiment) onto poly-L-lysine-coated four-compartment Cellview or Lab-Tek chambered coverglass. After overnight growth, cells were rinsed with PBS and incubated with MG-IONP-DY647 (4 to 16 $\mu\text{g Fe/mL}$) or CCK-DY647 (0.1 or 0.01 μM) in 250 μL of PBS containing 0.5% BSA (for HEK cells) or RPMI 1640 medium containing 10% FBS and 1% penicillin–streptomycin (for INR1G9 cells) completed or not with inhibitors. For lysosome staining, cells were incubated for 30 min in the presence of 75 nM LysoTracker Red DND-99 prior to stimulation with nanoparticles or CCK-DY647. Collected images were analyzed using ImageJ software and the Jacop plugin, which provided cytofluorograms and Pearson's and overlap coefficients that account for co-localization.

Cell Treatment by an Alternating Magnetic Field. Cells were seeded 24 h before the experiments onto four-compartment Cellview dishes at a density of $\sim 80 \times 10^3$ cells/compartiment in RPMI 1640 medium containing 10% FBS and 1% penicillin–streptomycin. Cells were rinsed with PBS and incubated with MG-IONP-DY647 (16 $\mu\text{g Fe/mL}$) or DY647 (0.1 μM) for 24 h at 37 °C in RPMI 1640 buffered with 10 mM Hepes buffer pH 7.4 and containing 0.5% FBS and 1% penicillin–streptomycin with or without protease inhibitors E64d (10 μM), pepstatin A (100 μM), or chloroquine (25 μM). Incubation medium was withdrawn, and cells were rinsed twice with incubation medium. Attached cells were exposed to an alternating magnetic field (275 kHz, 40 or 52 mT) delivered by a commercial magnetic inductor (Fives Celes, Lautenback, France) for 2 h. The magnetic field amplitude was measured by a homemade pick-up coil. The latter was calibrated by measuring the high-frequency magnetic field on an electromagnet in which the current/magnetic field relationship was calibrated in dc and the ac current could be accurately measured using a noncontact ac current probe (Tektronix, P6021).⁵¹ The inner diameter of the coil was 3.5 cm so that the Cellview dish fit in its middle. The magnetic field was applied in the plane of the Cellview dish. The temperature of the Cellview dish was controlled using a thermal probe (Reflex, Neoptix, Canada) placed in the incubation medium of the cells. The temperature of the Cellview dish was maintained at 37.0 ± 0.4 °C thanks to an air gun placed below it. Control samples were also maintained out of the cell incubator during hyperthermia experiments, and their temperature was regulated similarly to the assay samples. At the end of the experiments, cells were placed in a humidified atmosphere at 5% CO₂ at 37 °C for 4 h.

Determination of Apoptosis and Cell Death. The effects of magnetic field treatment were investigated as follows: first, apoptotic and necrotic cells labeled with FITC-annexinV and/or propidium iodide (Cell Meter Annexin V apoptosis 832 assay kit, AAT Bioquest) were counted 4 h after the end of magnetic field exposure. Counting of labeled cells was carried out by analyzing confocal microscopy images representing populations of 2–3000 cells/experiment using ImageJ software. Lysosome integrity was determined using LysoTracker Red staining reagent, which was added (at 75 nM) to cells at the beginning of the magnetic field runs. Quantification of staining was performed 30 min later by analyzing 2–3000 cells/experiment using Morpho Expert software (Explora Nova, La Rochelle, France). Cell death was determined 24 h post-magnetic field treatment using a MTT viability assay (MTT: [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), Sigma-Aldrich].

Conflict of Interest: The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgment. We thank Cellular Imaging Facility Ranguel and Flow Cytometry platform of I2MC/INSERM for the excellent technical support. This research was partly funded

by Ligue Nationale Contre le Cancer, the European Community's Seventh Framework Programm under grant agreement no. 262943 "MULTIFUN" and INSERM grant no. PC201310.

Supporting Information Available: Supporting Information including supplementary figures and legends to these figures is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES AND NOTES

- Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 751–760.
- Yoo, D.; Lee, J. H.; Shin, T. H.; Cheon, J. Theranostic Magnetic Nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 863–874.
- Schutz, C. A.; Juillerat-Jeanneret, L.; Mueller, H.; Lynch, I.; Riediker, M. Therapeutic Nanoparticles in Clinics and under Clinical Evaluation. *Nanomedicine (London, U.K.)* **2013**, *8*, 449–467.
- Corot, C.; Robert, P.; Idee, J. M.; Port, M. Recent Advances in Iron Oxide Nanocrystal Technology for Medical Imaging. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 1471–1504.
- Ferrari, M. Cancer Nanotechnology: Opportunities and Challenges. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 161–171.
- Murthy, S. K. Nanoparticles in Modern Medicine: State of the Art and Future Challenges. *Int. J. Nanomed.* **2007**, *2*, 129–141.
- Figuerola, A.; Di Corato, R.; Manna, L.; Pellegrino, T. From Iron Oxide Nanoparticles towards Advanced Iron-Based Inorganic Materials Designed for Biomedical Applications. *Pharmacol. Res.* **2010**, *62*, 126–143.
- Hilger, I.; Kaiser, W. A. Iron Oxide-Based Nanostructures for MRI and Magnetic Hyperthermia. *Nanomedicine (London, U.K.)* **2012**, *7*, 1443–1459.
- Mahon, E.; Salvati, A.; Baldelli Bombelli, F.; Lynch, I.; Dawson, K. A. Designing the Nanoparticle-Biomolecule Interface for "Targeting and Therapeutic Delivery". *J. Controlled Release* **2012**, *161*, 164–174.
- Almeida, J. P.; Chen, A. L.; Foster, A.; Drezek, R. *In Vivo* Biodistribution of Nanoparticles. *Nanomedicine (London, U.K.)* **2011**, *6*, 815–835.
- Hild, W.; Pollinger, K.; Caporale, A.; Cabrele, C.; Keller, M.; Pluym, N.; Buschauer, A.; Rachel, R.; Tessmar, J.; Breunig, M.; *et al.* G Protein-Coupled Receptors Function as Logic Gates for Nanoparticle Binding and Cell Uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 10667–10672.
- Bhattacharyya, S.; Bhattacharya, R.; Curley, S.; McNiven, M. A.; Mukherjee, P. Nanoconjugation Modulates the Trafficking and Mechanism of Antibody Induced Receptor Endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 14541–14546.
- Domenech, M.; Marrero-Berrios, I.; Torres-Lugo, M.; Rinaldi, C. Lysosomal Membrane Permeabilization by Targeted Magnetic Nanoparticles in Alternating Magnetic Fields. *ACS Nano* **2013**, *7*, 5091–5101.
- Creixell, M.; Bohorquez, A. C.; Torres-Lugo, M.; Rinaldi, C. EGFR-Targeted Magnetic Nanoparticle Heaters Kill Cancer Cells without a Perceptible Temperature Rise. *ACS Nano* **2011**, *5*, 7124–7129.
- Riedinger, A.; Guardia, P.; Curcio, A.; Garcia, M. A.; Cingolani, R.; Manna, L.; Pellegrino, T. Subnanometer Local Temperature Probing and Remotely Controlled Drug Release Based on Azo-Functionalized Iron Oxide Nanoparticles. *Nano Lett.* **2013**, *13*, 2399–2406.
- Johannsen, M.; Thiesen, B.; Wust, P.; Jordan, A. Magnetic Nanoparticle Hyperthermia for Prostate Cancer. *Int. J. Hyperthermia* **2010**, *26*, 790–795.
- Silva, A. C.; Oliveira, T. R.; Mamani, J. B.; Malheiros, S. M.; Malavolta, L.; Pavon, L. F.; Sibov, T. T.; Amaro, E., Jr.; Tannus, A.; Vidoto, E. L.; *et al.* Application of Hyperthermia Induced by Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in Glioma Treatment. *Int. J. Nanomed.* **2011**, *6*, 591–603.
- Villanueva, A.; de la Presa, P.; Alonso, J. M.; Rueda, T.; Martinez, A.; Crespo, P.; Morales, M. P.; Gonzalez-Fernandez, M. A.; Valdes, J.; Rivero, G. Hyperthermia HeLa

- Cell Treatment with Silica-Coated Manganese Oxide Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 1976–1981.
19. Reubi, J. C. Targeting CCK Receptors in Human Cancers. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 1239–1242.
 20. Reubi, J. C.; Maecke, H. R. Peptide-Based Probes for Cancer Imaging. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 1735–1738.
 21. Reubi, J. C.; Waser, B. Unexpected High Incidence of Cholecystokinin-B/Gastrin Receptors in Human Medullary Thyroid Carcinomas. *Int. J. Cancer* **1996**, *67*, 644–647.
 22. Magnan, R.; Masri, B.; Escrieut, C.; Foucaud, M.; Cordelier, P.; Fourmy, D. Regulation of Membrane Cholecystokinin-2 Receptor by Agonists Enables Classification of Partial Agonists as Biased Agonists. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 6707–6719.
 23. Magnan, R.; Escrieut, C.; Gigoux, V.; De, K.; Clerc, P.; Niu, F.; Azema, J.; Masri, B.; Cordomi, A.; Baltas, M.; *et al.* Distinct CCK-2 Receptor Conformations Associated with beta-Arrestin-2 Recruitment or Phospholipase-C Activation Revealed by a Biased Antagonist. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2560–2573.
 24. Groth-Pedersen, L.; Jaattela, M. Combating Apoptosis and Multidrug Resistant Cancers by Targeting Lysosomes. *Cancer Lett.* **2010**, *332*, 265–274.
 25. Behe, M.; Kluge, G.; Becker, W.; Gotthardt, M.; Behr, T. M. Use of Polyglutamic Acids to Reduce Uptake of Radiometal-Labeled Minigastrin in the Kidneys. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46*, 1012–1015.
 26. Laverman, P.; Joosten, L.; Eek, A.; Roosenburg, S.; Peitl, P. K.; Maina, T.; Macke, H.; Aloj, L.; von Guggenberg, E.; Sosabowski, J. K.; *et al.* Comparative Biodistribution of 12 (1)(1)In-Labeled Gastrin/CCK2 Receptor-Targeting Peptides. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, *38*, 1410–1416.
 27. Daldrup-Link, H. E.; Golovko, D.; Ruffell, B.; Denardo, D. G.; Castaneda, R.; Ansari, C.; Rao, J.; Tikhomirov, G. A.; Wendland, M. F.; Corot, C.; *et al.* MRI of Tumor-Associated Macrophages with Clinically Applicable Iron Oxide Nanoparticles. *Clin. Cancer Res.* **17**, 5695–5704.
 28. Levy, M.; Luciani, N.; Alloyeau, D.; Elgrabli, D.; Deveaux, V.; Pechoux, C.; Chat, S.; Wang, G.; Vats, N.; Gendron, F.; *et al.* Long Term *in Vivo* Biotransformation of Iron Oxide Nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 3988–3999.
 29. Yazdi, A. S.; Guardia, G.; Riteau, N.; Drexler, S. K.; Tardivel, A.; Couillin, I.; Tschopp, J. Nanoparticles Activate the NLR Pyrin Domain Containing 3 (Nlrp3) Inflammasome and Cause Pulmonary Inflammation through Release of IL-1Alpha and IL-1Beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 19449–19454.
 30. Stenmark, H. Rab GTPases as Coordinators of Vesicle Traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 513–525.
 31. Kallunki, T.; Olsen, O. D.; Jaattela, M. Cancer-Associated Lysosomal Changes: Friends or Foes? *Oncogene* **2013**, *32*, 1995–2004.
 32. Leung-Theung-Long, S.; Roulet, E.; Clerc, P.; Escrieut, C.; Marchal-Victorion, S.; Ritz-Laser, B.; Philippe, J.; Pradayrol, L.; Seva, C.; Fourmy, D.; *et al.* Essential Interaction of Egr-1 at an Islet-Specific Response Element for Basal and Gastrin-Dependent Glucagon Gene Transactivation in Pancreatic Alpha-Cells. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 7976–7984.
 33. Reubi, J. C. Peptide Receptors as Molecular Targets for Cancer Diagnosis and Therapy. *Endocr. Rev.* **2003**, *24*, 389–427.
 34. Dorsam, R. T.; Gutkind, J. S. G-Protein-Coupled Receptors and Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 79–94.
 35. Dufresne, M.; Seva, C.; Fourmy, D. Cholecystokinin and Gastrin Receptors. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 805–847.
 36. Violin, J. D.; Lefkowitz, R. J. Beta-Arrestin-Biased Ligands at Seven-Transmembrane Receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, *28*, 416–422.
 37. Murphy, J. E.; Padilla, B. E.; Hasdemir, B.; Cottrell, G. S.; Bunnett, N. W. Endosomes: A Legitimate Platform for the Signaling Train. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 17615–17622.
 38. Padilla, B. E.; Cottrell, G. S.; Roosterman, D.; Pikiros, S.; Muller, L.; Steinhoff, M.; Bunnett, N. W. Endothelin-Converting Enzyme-1 Regulates Endosomal Sorting of Calcitonin Receptor-Like Receptor and Beta-Arrestins. *J. Cell Biol.* **2007**, *179*, 981–997.
 39. Roosterman, D.; Cottrell, G. S.; Padilla, B. E.; Muller, L.; Eckman, C. B.; Bunnett, N. W.; Steinhoff, M. Endothelin-Converting Enzyme 1 Degrades Neuropeptides in Endosomes to Control Receptor Recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 11838–11843.
 40. Roosterman, D.; Kempkes, C.; Cottrell, G. S.; Padilla, B. E.; Bunnett, N. W.; Turck, C. W.; Steinhoff, M. Endothelin-Converting Enzyme-1 Degrades Internalized Somatostatin-14. *Endocrinology* **2008**, *149*, 2200–2207.
 41. Carrey, J.; Mehdaoui, B.; Respaud, M. Simple Models for Dynamic Hysteresis Loop Calculations of Magnetic Single-Domain Nanoparticles: Application to Magnetic Hyperthermia Optimization. *J. Appl. Phys.* **2011**, *110*, 039902–039902-1.
 42. Mehdaoui, B.; Meffre, A.; Carrey, J.; Lachaize, S.; Lacroix, L. M.; Gougeon, M.; Chaudret, B.; Respaud, M. Optimal Size of Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia: A Combined Theoretical and Experimental Study. *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 4573–4581.
 43. Huang, H.; Delikanli, S.; Zeng, H.; Ferkey, D. M.; Pralle, A. Remote Control of Ion Channels and Neurons through Magnetic-Field Heating of Nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 602–606.
 44. Carrey, J.; Connord, V.; Respaud, M. Ultrasound Generation and High-Frequency Motion of Magnetic Nanoparticles in an Alternating Magnetic Field: Toward Intracellular Ultrasound Therapy? *Appl. Phys. Lett.* **2013**, *102*, 232404-1–232404-5.
 45. Hergt, R.; Dutz, S. Magnetic Particle Hyperthermia-Biophysical Limitations of a Visionary Tumour Therapy. *J. Magn. Mater.* **2007**, *311*, 187–192.
 46. Moroder, L.; Wilschowitz, L.; Gemeiner, M.; Gohring, W.; Knof, S.; Scharf, R.; Thamm, P.; Gardner, J. D.; Solomon, T. E.; Wunsch, E. [Cholecystokinin-Pancreozymin Synthesis. Synthesis of [28-Threonine,31-Norleucine]- and [28-Threonine,31-Leucine]Cholecystokinin-Pancreozymin-(25–33)-Nonapeptide]. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **1981**, *362*, 929–942.
 47. Fourmy, D.; Lopez, P.; Poirot, S.; Jimenez, J.; Dufresne, M.; Moroder, L.; Powers, S. P.; Vaysse, N. A New Probe for Affinity Labelling Pancreatic Cholecystokinin Receptor with Minor Modification of its Structure. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *185*, 397–403.
 48. Yaqub, T.; Tikhonova, I. G.; Lattig, J.; Magnan, R.; Laval, M.; Escrieut, C.; Boulegue, C.; Hewage, C.; Fourmy, D. Identification of Determinants of Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Receptor that Interact with N-Terminal Biologically Active Region of the Natural Ligand. *Mol. Pharmacol.* **2010**, *77*, 547–58.
 49. Martinon, F.; Mayor, A.; Tschopp, J. The Inflammasomes: Guardians of the Body. *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, *27*, 229–265.
 50. Foucaud, M.; Marco, E.; Escrieut, C.; Low, C.; Kalindjian, B.; Fourmy, D. Linking Non-Peptide Ligand Binding Mode to Activity at the Human Cholecystokinin-2 Receptor. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 35860–35868.
 51. Lacroix, L. M.; Carrey, J.; Respaud, M. A Frequency-Adjustable Electromagnet for Hyperthermia Measurements on Magnetic Nanoparticles. *Rev. Sci. Instrum.* **2008**, *79*, 093909-1–5.

Article III-2

SMLL201402669(201402669)

Author Proof

small NANO MICRO

XXXX

Real-Time Analysis of Magnetic Hyperthermia Experiments on Living Cells under Confocal Microscope

Vincent Connord, Pascal Clerc, Nicolas Hallali, Darine El Hajj Diab, Daniel Fourmy, Véronique Gigoux, * and Julian Carrey*

ABSTRACT: Combining high-frequency alternating magnetic fields (AMF) and magnetic nanoparticles (MNPs) is an efficient way to induce biological responses through several approaches: magnetic hyperthermia, drug release, controls of gene expression and neurons, or activation of chemical reactions. So far, these experiments cannot be analyzed in real-time during the AMF application. A miniaturized electromagnet fitting under a confocal microscope is built, which produces an AMF of frequency and amplitude similar to the ones used in magnetic hyperthermia. AMF application induces massive damages to tumoral cells having incorporated nanoparticles into their lysosomes without affecting the others. Using this setup, real-time analyses of molecular events occurring during AMF application are performed. Lysosome membrane permeabilization and reactive oxygen species production are detected after only 30 min of AMF application, demonstrating they occur at an early stage in the cascade of events leading eventually to cell death. Additionally, lysosomes self-assembling into needle-shaped organization under the influence of AMF is observed in real-time. This experimental approach will permit to get a deeper insight into the physical, molecular, and biological process occurring in several innovative techniques used in nanomedicine based on the combined use of MNPs and high-frequency magnetic fields.

1. Introduction

Magnetic hyperthermia has been the subject of an active research activity in the past decade and tremendous progresses have been made in basic research on this promising cancer treatment.^[1] Very large heating powers have been reached using magnetic nanoparticles (MNPs) which are either chemically synthesized^[2,3] or extracted from bacteria,^[4] driven by a better understanding of the way to optimize heat generation.^[5] Receptor–ligand grafted nanoparticles which

are able to bind specifically to receptors overexpressed at tumoral cell surface and then internalize through receptor-dependent pathway have been developed.^[6–8] The combination of MNPs and alternating magnetic field (AMF) application has been shown to induce cell death in many in vitro experiments^[6–10] and to induce tumor regression of xenografted tumors in mice.^[4,11–13] It has been shown that efficient targeting of tumors in mice could be accomplished after intravenous injection, which constitutes a real milestone.^[12,13] Finally, accumulation and degradation mechanisms of MNPs once in cells or biological tissues have been studied in details.^[14,15] In spite of these successes, the basic mechanisms leading to cell death in AMF treatments is still unclear. Indeed, several experiments have reported that cells die in spite that there is no perceptible temperature rise during experiment.^[6–10,16] This finding brings a lot of hope for the future of this treatment since it makes possible to induce cell death with a very low amount of MNPs^[8,17] and, interestingly, makes possible to envisage eradicating small metastatic tumors or circulating tumoral cells in addition to large primary tumors. Elucidating the cellular and molecular

V. Connord, N. Hallali, Dr. J. Carrey, Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-Objets (LPCNO), Université de Toulouse, INSA, UPS, F-31077, Toulouse, France and CNRS, UMR 5215, F-31077 Toulouse, France
(E-mail: julian.carrey@insa-toulouse.fr)

P. Clerc, D. El Hajj Diab, Dr. D. Fourmy, Dr. V. Gigoux, Université de Toulouse 3, EA 4552 Toulouse, France
(E-mail: Veronique.Gigoux@inserm.fr)

Correspondence to: J. Carrey (E-mail: julian.carrey@insa-toulouse.fr); V. Gigoux (E-mail: Veronique.Gigoux@inserm.fr)
10.1002/sml.201402669

Q1

Q2

mechanisms at the origin of cell death in these experiments is one major quest in this therapeutic approach.

The standard instrument in cell biology to analyze cellular and molecular mechanisms during *in vitro* experiments is the fluorescence confocal microscope. Combined with the numerous available fluorescence probes, pharmacological agents of signaling pathways, it permits to gain a deep insight into the cell machinery. In particular, during AMF treatments, the capacity of fluorescence confocal microscopes to image cell behavior in real-time could be used to detect *in situ* several physical, chemical, and biological events which are associated at the origin of cell death: temperature increase,^[18] pH variations, lysosomal membrane permeabilization, reactive oxygen species (ROS) generation, membrane fluidity modifications,^[19] molecule motion, and activation of cell death signaling pathways could thus be spatially and temporally detected.

Unfortunately, so far, confocal microscope has not been used at its full capacity in magnetic hyperthermia studies. It has been mainly used before AMF treatment to measure MNPs internalization, perform postendocytotic trafficking studies and as a posttreatment characterization tool. In fact, the time period of AMF application in itself has always stayed so far inaccessible to confocal microscope imaging. The two main reasons for this are that (i) most AMF inductors used in laboratories are bulky coils which cannot fit under a microscope due to the small space available and (ii) even if a way was found to do so, the presence of the high-frequency magnetic field could heat the ferromagnetic parts of the microscope in the vicinity of the sample.

In the present article, we describe a successful approach to achieve real-time cell imaging during AMF treatments of tumoral cells. It is based on the application of a localized high-frequency magnetic field using a miniaturized electromagnet. The potentialities of the new setup are illustrated by (i) data showing that the rate of cell damage, leading eventually to cell death, achieved *in situ* using this device are similar to the previous ones obtained on the same tumoral cells using standard coils, (ii) evidence that cell damage is an event occurring at the single-cell level and is dependent on the presence of internalized MNPs in lysosomes, (iii) data showing a dynamical study of the lysosome membrane permeabilization and ROS formation during AMF treatment, and (iv) dynamical experiments of lysosome alignments which form inside certain cells when the AMF is applied. This AMF inductor will certainly enable to quickly get key informations on the mechanisms at the origin of the death of cells containing minute amounts of receptor-driven internalized MNPs. More generally, it should give a new start to all topics in biology and nanomedicine where high-frequency AMF are used.

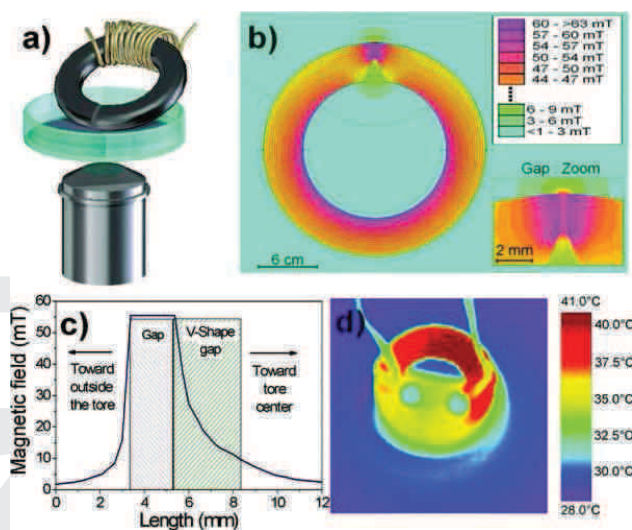


Figure 1. Description of the miniaturized electromagnet. a) Schematic of the setup. b) Magnetic field intensity map calculated using FEMM software. Inset shows an enlargement of the gap. c) Magnetic field intensity as a function of the position inside the gap deduced from FEMM software. The 400 μm width gap zone where the cells are located is labeled as “gap.” The V-shape zone enlarged to avoid shadowing of the gap is labeled as “V-shape gap.” d) Infrared camera picture of the electromagnet and of a CELLview containing some medium taken after one hour of AMF application.

Q3

2. Results

2.1. Fabrication and Characterization of the Miniaturized Electromagnet

The electromagnet is a miniaturized version of the setup described by Lacroix et al.^[20] It has been elaborated by machining a small commercial ferrite core. 3D schematics and picture of the electromagnet are shown in **Figures 1a** and S1, Supporting Information. It is composed of a 400 μm gap with a V-shape enlargement permitting to avoid the shadowing of the gap during experiments under microscope. To define a flat working area, a plane was polished at $\approx 45^\circ$ of the core plane. A system of screws was added inside the ferrite core to adjust the planarity of the working area. The driving coil is composed of 12 turns of Litz wire. An adjustable capacitor is placed in series with the electromagnet to reduce its high frequency impedance which equals 0.66 Ω at 300 kHz.

A standard way of evaluating the AMF produced by the electromagnet could have been to measure it using a Hall probe when a dc current is injected into the coil. Then, measuring the ac current during AMF application would have been sufficient to know the AMF amplitude. This method has proven to be very reliable for large gap electromagnets^[20] but cannot be applied here due to the small width of the gap compared to the Hall probe thickness. To evaluate the magnetic field amplitude $\mu_0 H_{\text{max}}$, three complementary approaches

were used. Evaluation was done when a peak current $I_{\max} = 1.5$ A was sent into the coil, since these are the conditions of the AMF treatment (see below). The first method uses the following equation, valid when the relative permittivity inside the gap equals 1:

$$\mu_0 H_{\max} = \frac{\mu_0 N I_{\max}}{\frac{S_{\text{gap}} L_{\text{core}}}{S_{\text{core}} \mu_{\text{core}}} + L_{\text{gap}}} \quad (1)$$

where N is the number of turns of the coil, μ_{core} is the relative permittivity of the ferrite, L_{core} (L_{gap}) is the length/width of the ferrite (gap), and S_{core} (S_{gap}) is the section of the ferrite (gap). Due to the large permittivity of the ferrite, the first term at the denominator of the equation is small and leads to only a small correction compared to the standard equation $\mu_0 H_{\max} = \mu_0 N I_{\max} / L_{\text{gap}}$. For $I_{\max} = 1.5$ A, the calculated magnetic field is $\mu_0 H_{\max} = 60 \pm 4$ mT. The second one consists in using a home-made miniaturized pick-up coil of diameter 3.5 mm to measure directly the ac magnetic field amplitude (see Figure S2, Supporting Information). Its diameter is such that it completely fits into the gap. An AMF $\mu_0 H_{\max} = 46 \pm 3$ mT is thus measured at $f = 300$ kHz and $I_{\max} = 1.5$ A. The third method consisted in using finite elements simulations to calculate the magnetic field using the exact gap geometry. A map of the magnetic field is shown in Figure 1b. A profile of the magnetic field into the gap is also shown in Figure 1c. The magnetic field amplitude is homogeneous on all the gap section with a value of 58.0 ± 0.5 mT. Measured and calculated values of AMF amplitude are of the same order of magnitude, and the AMF amplitude is likely to be in the range 46–60 mT. In the remaining, we will use the mean value in this range $\mu_0 H_{\max} = 53$ mT.

2.2. AMF Application to Living Cells Under a Confocal Microscope

The nanoplatform used in magnetic hyperthermia experiments (termed DY647-MNP-gastrin) is composed of commercial iron oxide nanoparticles coated with PEG-Amine and decorated with (i) a synthetic replicate of gastrin, which binds specifically to the cholecystokinin-2 receptor (CCK2R), a receptor overexpressed in endocrine tumors, and allows specific MNPs internalization in cells overexpressing the CCK2R and (ii) a fluorescent label (DY647).^[5] All experiments were performed on living cells in a CELLview (see below). To apply the AMF under the confocal microscope, the electromagnet is placed so its polished part is in contact with the CELLview. The whole is put under the fluorescence confocal microscope, which is equipped with a heating plate. An environmental chamber is then built around the CELLview to maintain a homogeneous temperature during the experiments. A picture of the complete setup is shown in Figure S1c, Supporting Information. In these conditions, generating an ac current of 1.5 A in the driving coil, corresponding to an AMF of 53 mT in the electromagnet gap, requires a power of 1.5 W and rises the chamber temperature to ≈ 34 °C. A 37 °C temperature is maintained during the

experiments by manually adjusting the heating power of the plate. Figure 1d shows an infrared picture of the electromagnet and of the medium taken during dedicated experiments performed outside the microscope. These experiments are more detailed in the Experimental Section and in Figure S3, Supporting Information. There is no significant temperature gradient in the medium. Moreover, the temperature difference between the medium and the ferrite near the gap is ≈ 1 °C. Infrared observations of the setup at the end of typical experiments under the microscope confirm the results obtained in air. It can be safely concluded that the temperature is quite homogeneous in the CELLview during AMF treatments.

2.3. Selective Damage to Cells Having Internalized Targeted MNPs

For these experiments, cells having or not internalized DY647-MNP-gastrin were harvested, mixed, and suspended in agar gel. The gel containing the mixture of cells was poured into the CELLview once the electromagnet was in place. A magnetic field of 53 mT was applied during 2 h. The CELLview was then put back into an incubator during 4 h, and the impact of magnetic field treatment was then determined by counting cells labeled with prodidium iodide, corresponding to cells with a damaged membrane.^[5] Typical pictures of cells inside and outside the gap are shown in Figure 2a. As shown in Figure 2b, applying the AMF during 2 h selectively caused damages to cells having internalized MNPs. Indeed, inside the gap, $72.1 \pm 9.5\%$ of cells having internalized targeted MNPs were damaged comparatively to $18.4 \pm 6.3\%$ of cells devoid of MNP ($p < 0.001$). Of note, outside the gap, $20.0 \pm 1.7\%$ and $12.5 \pm 4.1\%$ of cells containing or not targeted MNPs were damaged ($p = 0.23$). Two important conclusions can be drawn from these experiments. First, the fact that the same damage rate was observed for tumoral cells devoid of MNPs inside the gap ($p = 0.21$) or containing MNPs outside the gap ($p = 0.11$) comparatively to control cells (without MNPs and outside the gap) confirms that the miniaturized electromagnet does not cause significant cell damage due to eventual temperature rise or to other unpredictable reasons. Second, the fact that, in an intimate mix of cells containing targeted MNPs or not, only the ones containing DY647-MNP-gastrin were damaged when submitted to an AMF is a clear proof that cell damages are in no case related to a global temperature rise, but to mechanism(s) occurring at the single cell level, dependant on both presence of MNPs inside the cells and delivery of the AMF to these cells. This supports the conclusion that this mechanism(s), whatever it is, can be used to destroy individual cells without being harmful to their neighbors, at the condition that the targeted cell contains MNPs. Finally, percentage of cells positive to prodidium iodide obtained with the miniaturized electromagnet is slightly higher than the previous ones obtained on the same tumoral cells using a 52 mT AMF treatment applied with a standard coil.^[6] This might indicate that the AMF amplitude is in the upper part of the range [46–60] mT of estimated values rather than its middle.

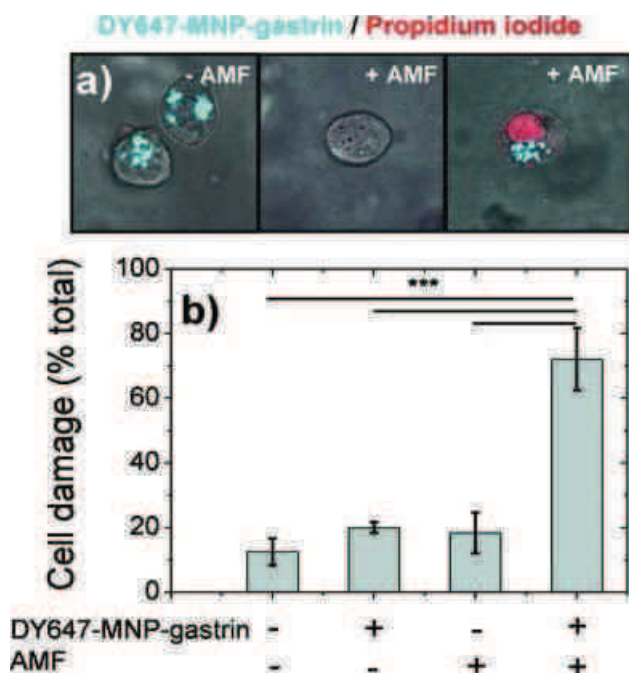


Figure 2. AMF induces specifically damage to cells having internalized MNPs. INR1G9-RCCK2 cells having or not internalized DY647-MNP-gastrin were included in agarose gel containing $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ propidium iodide and poured in the gap of the electromagnet. Cells were exposed to the AMF (53 mT, 300 kHz) for 120 mn. After AMF application, CELLview was maintained in an incubator with humidified atmosphere at 37°C for 4 h. a) Confocal microscopy images illustrate the propidium iodide labeling of cells submitted (+AMF) or not (-AMF) to the magnetic field: cells with a damaged membrane were labeled by propidium iodide. b) Cells having a damaged membrane were counted 4 h after the end of AMF exposure by confocal microscopy analysis of cells labeled with propidium iodide. The distinction is made between cells inside and outside the gap as well as cells having or not internalized DY647-MNP-gastrin. Results are mean \pm SEM of four separate experiments. Statistical analysis performed using ANOVA; *** $p < 0.001$.

2.4. Real Time Capture of Lysosomal Membrane Permeabilization

Following first biological experiments which confirmed that our electromagnet enables to kill tumoral cells having internalized gastrin-grafted MNPs, we pursued the study by analyzing magnetic field-induced lysosomal membrane permeabilization, which is an event likely to play an important role in cell death.^[6,7] For this purpose, a gel containing cells having internalized DY647-MNP-gastrin and accumulated the lysosomal fluorescent probe LysoTracker was used. The effect of magnetic field was evaluated by recording the lysosome staining intensity by confocal microscopy and by image analysis of colocalization between LysoTracker and DY647-MNP-gastrin, provided by Pearson's coefficient. During each

experiment, series of pictures were taken every 30 min in predefined zones inside and outside the gap corresponding to cells treated or not by the AMF, respectively. **Figure 3** shows typical pictures of the experiments as well as the evolution of Pearson's coefficient over the time. In absence of AMF, Pearson's coefficient reflecting DY647-MNP-gastrin and LysoTracker colocalization was 0.59 ± 0.03 and 0.55 ± 0.04 in cells outside and inside the gap, respectively [see Figure 3a]. During AMF application, DY647-MNP-gastrin and LysoTracker colocalization decreases significantly in cells inside the gap unlike cells outside the gap. After only 30 min of AMF treatment, the difference is statistically significant (0.55 ± 0.03 outside and 0.45 ± 0.03 inside the gap, $p = 0.039$). This reveals that lysosome membrane permeabilization is an early phenomenon in the events induced by the AMF treatment and leading eventually to cell death. After 90 mn of AMF treatment, Pearson's coefficient values are 0.46 ± 0.05 outside the gap and 0.26 ± 0.07 inside ($p = 0.021$), indicating that AMF treatment induced specifically leaking of lysosome content of cells having internalized MNPs.

2.5. Imaging of ROS Production

Lysosomal membrane permeabilization induced by an AMF is correlated with the production of ROS.^[7] We performed assays to record AMF-induced production of ROS in cells having incorporated DY647-MNP-gastrin using CellRox green reagent by fluorescence confocal microscopy. ROS production was analyzed on adherent cells inside and outside the gap as the AMF was applied during 120 min. Typical micrographs of cells inside and outside the gap are shown in **Figure 4a**. The time evolution of ROS production is shown in **Figure 4b**. Fluorescence intensity increased significantly in cells submitted to the AMF compared to the cells outside the gap. The fluorescence intensity ratio after 30 min of AMF treatment is significantly different (2.9 ± 1.4 higher comparatively to control cells), indicating that ROS production is early phenomenon in the events induced by the AMF treatment. It occurs concurrently with lysosomal membrane permeabilization and leads eventually to cell death. After 100 min of AMF treatment, ROS production ratio reaches a maximum value with 3.9 ± 1.3 -fold higher production comparatively to control cells. Although it has been shown previously that ROS production increased during AMF treatment,^[7] it is the first time that its dynamic of production could be measured.

2.6. Lysosome Alignments Under AMF

During experiments described in the previous sections, we observed in some cells fluorescent needles which are aligned in the direction of the applied magnetic field. They correspond to lysosomes which self-assembled due to magnetic dipolar interactions. **Figure 5** illustrates dynamical experiments in which the AMF was successively switched on and off while observing such a cell. These needles scatter into small individual fluorescent dots when the AMF is off and self-assemble again when the AMF is on (Figure 5). Assembling and disassembling occurs within a few minutes, although as-

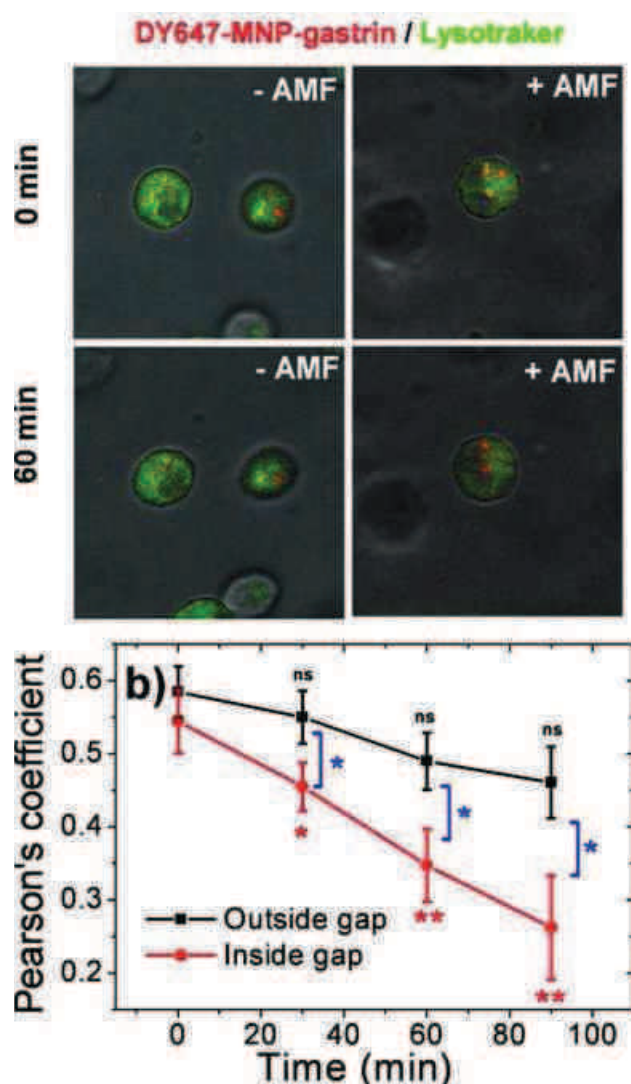


Figure 3. Application of AMF affected lysosome integrity of cells having internalized DY647-MNP-gastrin. INR1G9-RCCK2 cells having internalized DY647-MNP-gastrin and accumulated LysoTracker Red were rinsed, included in agarose gel and poured in the gap of the electromagnet. Different positions presenting cells having incorporated MNPs were marked inside and outside the gap. a) Confocal microscopy images illustrate the lysosome integrity of cells outside (-AMF) and inside (+AMF) the gap of electromagnet. b) Before and during AMF application (53 mT, 300 kHz) for 90 min, lysosome integrity was monitored by analyzing the colocalization between DY647-MNP-gastrin and LysoTracker Red labeling of the confocal microscopy images of the marked positions using Pearson's coefficient (ImageJ software). Twenty to thirty cells/experiment were analyzed of four independent experiments. Statistical analysis performed using ANOVA: in red and black, versus $t = 0$; in blue, inside versus outside the gap; * $p < 0.05$, ** $0.01 < p < 0.05$.

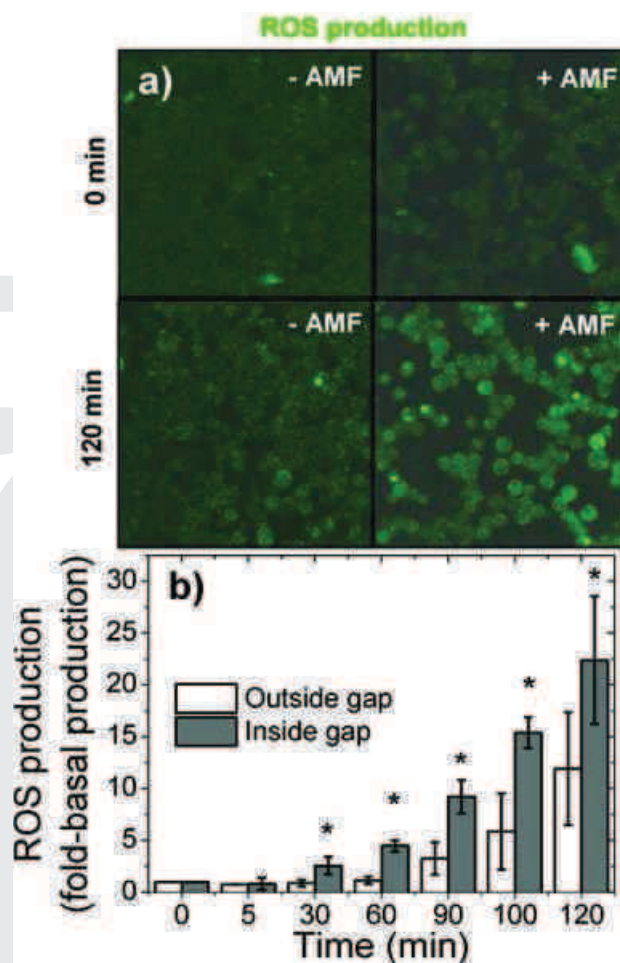


Figure 4. Applying a magnetic field on adherent cells containing DY647-MNP-gastrin increases ROS production. INR1G9-RCCK2 cells having internalized DY647-MNP-gastrin were rinsed and incubated with CellROX Green reagent. Different positions presenting cells having incorporated MNPs were marked inside (+AMF) and outside (-AMF) the gap. a) Confocal microscopy images illustrate the ROS production before and at the end of AMF treatment. b) Before and during application of AMF, ROS production was measured by analyzing the intensity of CellROX Green reagent labeling of confocal microscopy images of the marked positions. Statistical analysis performed using Student's t -test; $p < 0.05$, ** $0.01 < p < 0.05$.

sembling seems faster. The fact that these needles are not observed in all cells is not understood so far. Possible explanation might be that, in cells where needles are observed, lysosomes could move more easily due to a loss of cytoskeleton organization and/or that these cells are the ones where lysosomes contain more targeted MNPs. These unexpected results illustrate the interest of real-time imaging to get access to events which could not be observed otherwise. These observations will also make possible to evaluate the degree of magnetic interactions between lysosomes and to take them

Author Proof

Full Paper

V. Connord et al.

into account when calculating the heating power of MNPs once inside cells.

3. Discussion

Elucidating the cascade of events leading in the end to cell death in magnetic hyperthermia is a major task in this field, especially since it is known that, in many experiments, global temperature increase is not at the origin of cell death.^[6-10,16] Important results have been obtained toward this goal: (i) Evidence of ROS generation during application of AMF has been previously reported using flow cytometry performed at the end of the AMF application.^[7,21] (ii) Membrane permeabilization was previously evidenced by the decrease of lysosomal acridine orange intensity and the release of lysosomal cathepsin B into the cytosol.^[7] We show here that using a miniaturized electromagnet, such events can be monitored dynamically under a confocal microscope during AMF treatment. It is shown that these two processes occur at the very first stage of the AMF treatment well before cell death could be detected. The fact that membrane permeabilization revealed by LysoTracker occurs early is thus a supplementary indication that the cell death triggering signal may be initiated in the lysosome compartment, where the targeted MNPs were accumulated. On one other hand, the role of the ROS production during AMF treatment is more complex to state and two hypotheses can be formulated: (i) membrane permeabilization of lysosomes could be initially caused by the formation of ROS into the lysosomes though the well-known Fenton reaction.^[22] In our experiments, possible ROS generation into lysosomes could not be detected using the present method which was based on cell accumulation of ROS-sensitive fluorescent probe. (ii) ROS production might be a consequence of lysosome permeabilization. This hypothesis is compatible with the multiple sources of ROS formation in cells, including mitochondria, peroxyzome, or endoplasmic reticulum. As an alternative cause of lysosome membrane permeabilization, mechanical forces exerted by MNPs must be considered, in particular in the light of a recent report showing that lysosomal membrane-bound MNPs cause lysosome disruption under a slowly rotating magnetic field^[23] or that MNPs might vibrate at high-frequency during AMF application.^[24] Future experiments will address this important question of subcellular localization of ROS production during AMF treatment of tumoral cells containing MNPs, which could permit to clarify the pathways leading to cell death. The miniaturized electromagnet presented here will be a precious tool for elucidating these basic mechanisms.

An important additional issue in AMF treatment concerns temperature measurements. Several progresses on real-time or indirect measurements of temperature at the surface of magnetically heated nanoparticles have been done in the past few years.^[25-28] The present setup is compatible with the use of molecular thermometers based on fluorescence emission intensity and could make possible intracellular temperature

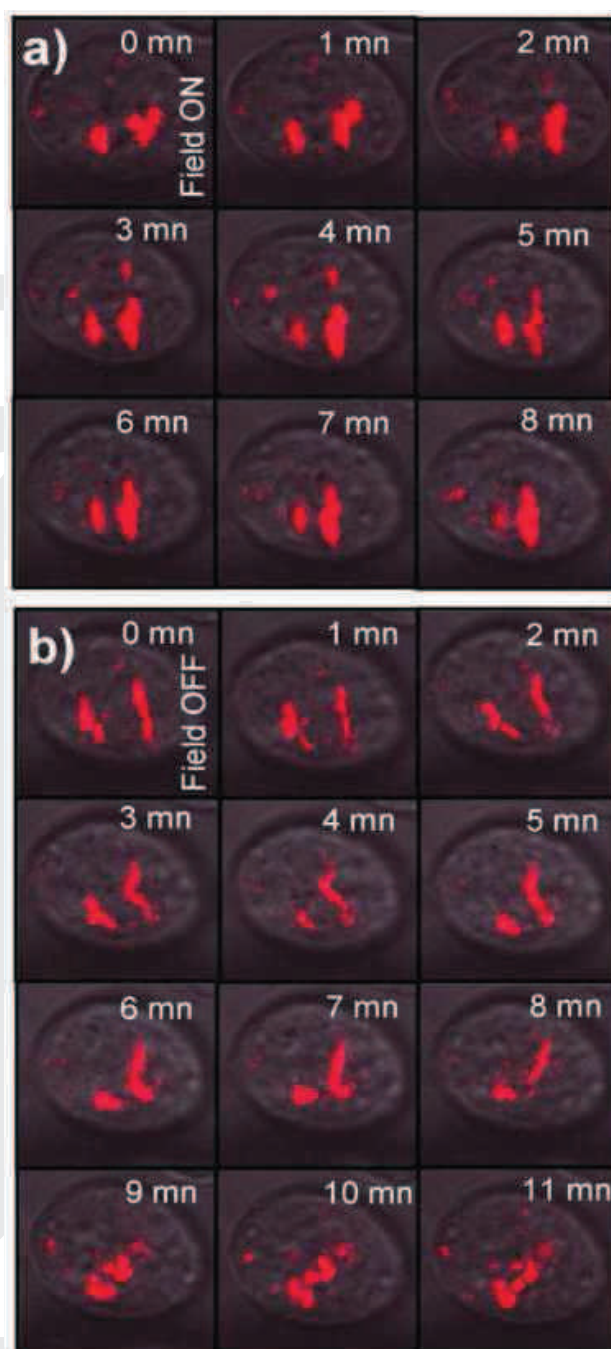


Figure 5. Applying a magnetic field to some cells containing DY647-MNP-gastrin induces alignment of the lysosomes. Evolution of the spatial repartition of DY647-MNP-gastrin inside a single cell when AMF is switched on and off. A z-stack acquisition containing seven or eight pictures was taken every minute on the cell, with a total acquisition time of 34 s. To draw this figure, a single picture was chosen from the z-stack to ensure a good visualization of DY647-MNP-gastrin. The field is switched (a) ON (b) OFF between the first and the second picture.

measurements during AMF application, which has not been realized so far.

Finally, the combination of MNPs and high-frequency AMF has been used to trigger the release of drugs from liposomes or polymer nanobeads,^[29–32] control gene expression,^[33] activate enzyme reactions,^[34] or activate neurons.^[25] Here again, real-time monitoring could lead to several advances in these promising fields related to magnetic hyperthermia.

4. Conclusion

We have successfully developed a way to submit cancer cells to a high frequency AMF under a confocal microscope. The magnetic field frequency and amplitude are in the range of the ones used in classical magnetic hyperthermia experiments and other related topics where high-frequency AMF are used to induce biological responses. Using this setup, an AMF was applied on a gel containing tumoral cells having or not internalized MNPs, which did not induce a global temperature increase. The fact that cell damage was seen exclusively in the cells containing targeted MNPs validates the setup; it also shows that cell damage occurs at a single-cell level and is dependent on both AMF and presence of the MNPs in the cells. Real-time capture of two events suspected to play a key role in cell death induced by the magnetic field treatment were performed: lysosomal membrane permeabilization and ROS generation. These two phenomena are detected after 30 mn of AMF treatment only and thus occur at an early stage in the cascade of events leading eventually to cell death. We have also observed that, in some cells, lysosomes having accumulated MNPs could self-organize into needles under the influence of the AMF. This novel experimental approach is simple to develop and widely opens the field of experiments which could be undertaken to get an insight into the cellular and molecular mechanisms occurring during AMF application on living cells.

5. Experimental Section

Electromagnet Fabrication: A commercial ferrite core with an internal (external) diameter of 19 (29) mm and a thickness of 7.5 mm was used as starting point for the electromagnet elaboration (TN29/19/7.5-3C90, Ferroxcube). A thin slit was first created using a diamond saw, leading to a gap of ≈ 400 μm . Starting from the midheight of this slit, a V-shape enlargement of the gap was machined using a rotating grinding wheel. Then, a plane at $\approx 45^\circ$ with respect to the core plane was polished at the gap level to define a flat working area. A system of plastic screws was added inside the ferrite core so the planarity of the electromagnet can be adjusted. The electromagnet was wound with 12 turns of Litz wire ($24 \times 10 \times 0.05$, Connect systemes). An adjustable capacitor was built by replacing the capacitors of a standard decade box (DC05, ELC) by high-voltage ceramic disk capacitors (Panasonic,

MDU series; Murata, DE series; Epcos, B81123 series). The electromagnet and the capacitor box were put in series. The high-frequency current was produced by a voltage amplifier (HSA 4052, NP Corporation) driven by a function generator (MTX 3240, Metrix). The current in the setup was measured with an AC current probe (3274 clamp probe, Hioki) connected to an oscilloscope (TDS 2022B, Tektronix). The applied voltage was measured at the output of the amplifier using the same oscilloscope. At a working frequency of 300 kHz, the capacitor values required to bring the electromagnet to resonance equals 12 nF.

Magnetic Field Evaluation: To calculate the AMF value and its incertitude using Equation (1), the following parameters were used: $\mu_{\text{core}} = 3000 \pm 300$ was extracted from the ferrite constructor datasheet, $L_{\text{core}} = 75.1 \pm 0.5$ mm, $L_{\text{gap}} = 370 \pm 3$ μm , $S_{\text{core}} = 41 \pm 3$ mm², $S_{\text{gap}} = 13.7 \pm 1.0$ mm² and $I = 1.5 \pm 0.1$ A. The pick-up coil was elaborated by winding two turns of a 200 μm in diameter wire on a 2.7 mm in diameter cylinder rod in order to form a flat spiral. A picture of the coil is shown in Figure S2, Supporting Information. The peak voltage appearing at the coil terminals ε was measured using an oscilloscope (TDS 2022B, Tektronix). Peak magnetic field $\mu_0 H_{\text{max}}$ was evaluated using the formula $\mu_0 H_{\text{max}} = \varepsilon / n S_{\text{coil}} \pi f$, where n and S_{coil} are the number of turns and surface of the pick-up coil and f the magnetic field frequency. The value of the product $n S_{\text{coil}}$ was deduced from a calibration experiment, during which the pick-up coil was used to measure a high-frequency AMF of known value, measured using a gaussmeter (GM08, Hirst Magnetics). Magnetic simulations were performed using FEMM software. The magnetization curve of the ferrite core was introduced into the software using the constructor datasheet. It has been checked that simulation results weakly depend on the exact geometry and position of the coil and on the angle of the V-shape enlargement.

Electromagnet Heating: In preliminary experiments performed in ambient air, temperature of medium, and electromagnet during magnetic field operation were measured using an infrared camera (Thermal imager 885, Testo). A current $I = 1.5$ A was sent through the coil, similarly to experiments under microscope. Thermal images as a function of time in these conditions are shown in Figure S3a, Supporting Information. The thermal image after one hour of magnetic field application is shown in Figure 1d. Thermal image shows that electromagnet heating is mainly localized to the wires. The evolution of temperature with time is displayed in Figure S3b, Supporting Information for three points: (i) medium, (ii) wires, and (iii) ferrite close to the gap. The temperature difference between the ferrite near the gap and the medium does not exceed 1 $^\circ\text{C}$.

Nanoparticles Synthesis and Cell Culture: The synthesis method and characterization of the magnetic nanoplat-form used in the present article have been described in details in Sanchez et al.^[8] The nanoplat-form (DY647-MNP-gastrin) is composed of commercial iron oxide nanoparticles coated with PEG-Amine (Gecco Dots, Sweden) and decorated with 100 molecules of a synthetic replicate of gastrin (Covalab) and 20 molecules of the fluorescent label NHS-

Q4

Author Proof

Full Paper

V. Connord et al.

DY647-PEG1 (Dyomics GmbH, Jena, Germany). The size of the magnetic core determined by transmission electron microscopy was 8.7 ± 1.6 nm. The specific absorption rate of these MNPs is 13 W g^{-1} at 275 kHz and 40 mT. The glucagon-producing hamster tumoral cell line INR1G9 stably expressing CCK2R (INR1G9-RCCK2) obtained as previously described^[35] was cultured in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 units mL^{-1} penicillin/streptomycin (Life technologies). Cells were grown in a humidified atmosphere at 95% air and 5% CO_2 at 37 °C. INR1G9-RCCK2 cells (0.5×10^6) were seeded in six-wells plates or in 35 mm diameter CELLview dishes (Greiner Bio-One) and grown overnight, incubated with DY647-MNP-gastrin ($16 \mu\text{g Fe mL}^{-1}$) for 24 h at 37 °C in RPMI 1640 buffered with 10 mM HEPES buffer pH 7.4 containing 0.5% FBS and 100 units mL^{-1} penicillin/streptomycin (incubation medium) to allow MNPs internalization and accumulation in lysosomes. Incubation medium was withdrawn and cells were rinsed twice with incubation medium. At this stage, magnetic measurements have shown that cells contain in average 2.2 pg of iron per cell which is actively targeted and accumulated into lysosomes.^[8]

Q5

Protocol for Electromagnet Operation under Microscope: When performing experiments on adherent cells, the planarity of the gap is a crucial parameter and was adjusted by putting the electromagnet on an inverted reflected light microscope and by focusing on the gap bottom. Screws were then adjusted so the gap image is clearly defined on a width as large as possible, which is a sign of its planarity. The electromagnet was then put inside a CELLview dish (Greiner Bio-One) containing attached cells having incorporated MNPs. To perform experiments on cells included in soft agarose gel, cells having or not internalized MNPs during 24 h were scrapped, rinsed with incubation medium, and mixed with agarose at a final concentration of 0.5%, then poured into the gap of electromagnet in a 35 mm diameter CELLview dish. After gel solidification, the CELLview dish was completed with incubation medium. For all types of experiments, CELLview dish was then placed above the heating plate of the confocal microscope and a home-made environmental chamber was built using a thin glass plate for the top cover and play-dough for the walls. Small diameter glass tubes were used as go throughs for the Litz wires inside play-dough. A thermal probe (Reflex, Neoptix) was put inside the medium, as close as possible from the gap. In this configuration, applying a current of 1.5 A inside the driving coil brought the temperature of the medium to 34 °C. The temperature was rose to 37 °C and maintained at this temperature by adjusting the heating power of the hot plate. AMF of amplitude 53 mT and frequency 300 kHz was applied for 90–120 min.

Determination of Cell Damage: INR1G9-RCCK2 cells having or not internalized DY647-MNP-gastrin were included in agarose gel containing $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ propidium iodide and poured into the electromagnet placed in a CELLview dish, as previously described. Cells were exposed to the AMF (53 mT, 300 kHz) for 120 min. After magnetic field application, CELLview was maintained in an incubator with

humidified atmosphere at 95% air and 5% CO_2 at 37 °C for 4 h. Counting of propidium iodide-labeled cells (excitation wavelength: 543 nm) was carried out by analyzing confocal microscopy images of 200–400 cells/experiment using ImageJ software.

Lysosomal Membrane Permeabilization: INR1G9-RCCK2 cells having internalized DY647-MNP-gastrin were incubated with RPMI 1640 0.5% FBS containing 75×10^{-9} M LysoTraker Red (Molecular probes, excitation wavelength: 543 nm) for 15 min, rinsed with incubation medium, included in agarose gel and poured into the gap of electromagnet, as previously described. Different positions presenting cells having incorporated MNPs were marked inside and outside the gap. Before and during application of AMF (53 mT, 300 kHz) for 90 min, lysosome integrity was monitored by analyzing the colocalization between DY647-MNP-gastrin and LysoTraker Red labeling of confocal microscopy images of the marked positions using Pearson's coefficient (ImageJ software). Twenty to thirty cells/experiment were analyzed of four independent experiments.

Dynamic of ROS production: INR1G9-RCCK2 cells (0.5×10^6) were seeded in 35 mm diameter CELLview dishes (Greiner), grown overnight, and incubated with DY647-MNP-gastrin ($16 \mu\text{g Fe mL}^{-1}$) for 24 h at 37 °C in incubation medium. Cells were rinsed with incubation medium, incubated with CellROX Green reagent (Molecular probes, Excitation wavelength: 488 nm) in incubation medium according to manufacturer's instructions. Different positions presenting cells having incorporated MNPs were marked inside and outside the gap. Before and during application of AMF (53 mT, 300 kHz) for 120 min, ROS production was monitored by analyzing the intensity of CellROX Green reagent labeling of confocal microscopy images of the marked positions using Morpho expert software (Explora Nova, la Rochelle, France). Two thousand to three thousand cells/experiment were analyzed of four independent experiments.

Q6

Statistical Analysis: Results are expressed as the mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test or ANOVA. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

V.C., P.C., J.C., and V.G. contributed equally to this work. This work was partly supported by the ITMO Cancer during the "Plan cancer 2009–2013," by Ligue Nationale Contre le Cancer and by the European Community's Seventh Framework Program under Grant Agreement No. 262943 "MULTIFUN." D.E.H.D. is supported by grants from Association pour la Recherche contre le Cancer and Club Français du

Pancréas. We thank Renaud Mathevet for his help in building and calibrating the pick-up coil.

Received: September 4, 2014

Revised: October 29, 2014

Published Online: MM DD, YYYY

- [1] I. Hilger, *Int. J. Hyp.* **2014**, *29*, 828.
- [2] A. Meffre, B. Mehdaoui, V. Kelsen, P. F. Fazzini, J. Carrey, S. Lachaize, M. Respaud, B. Chaudret, *Nanoletters* **2012**, *12*, 4722.
- [3] P. Guardia, R. Di Corato, L. Lartigue, C. Wilhelm, A. Espinosa, M. Garcia-Hernandez, F. Gazeau, L. Manna, T. Pellegrino, *ACS Nano* **2012**, *6*, 3080.
- [4] E. Alphandéry, S. Faure, O. Seksek, F. Guyot, I. Chebbi, *ACS Nano* **2011**, *5*, 6279.
- [5] J. Carrey, B. Mehdaoui, M. Respaud, *J. Appl. Phys.* **2011**, *109*, 083921.
- [6] M. Creixell, A. C. Bohorquez, M. Torres-Lugo, C. Rinaldi, *ACS Nano* **2011**, *5*, 7124.
- [7] M. Domenech, I. Marrero-Berrios, M. Torres-Lugo, C. Rinaldi, *ACS Nano* **2013**, *7*, 5091.
- [8] C. Sanchez, D. El Hajj Diab, V. Connord, P. Clerc, E. Meunier, B. Pipy, B. Payré, J. Carrey, V. Gigoux, D. Fourmy, *ACS Nano* **2014**, *8*, 1350.
- [9] A. Villanueva, P. de la Presa, J. M. Alonso, T. Rueda, A. Martínez, P. Crespo, M. P. Morales, M. A. Gonzalez-Fernandez, J. Valdes, G. Rivero, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 1976.
- [10] G. F. Goya, L. Asín, M. R. Ibarra, *Int. J. Hyperthermia* **2013**, *29*, 810.
- [11] C. L. Dennis, A. J. Jackson, J. A. Borchers, P. J. Hoopes, R. Strawbridge, A. R. Foreman, J. van Lierop, C. Grüttner, R. Ivkov, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 395103.
- [12] T.-J. Li, C.-C. Huang, P.-W. Ruan, K.-Y. Chuang, K.-J. Huang, D.-B. Shieh, C.-S. Yeh, *Biomaterials* **2013**, *34*, 7873.
- [13] H.-Y. Tseng, G.-B. Lee, C.-Y. Lee, Y.-H. Shih, X.-Z. Lin, *IET Nanobiotechnol.* **2009**, *3*, 46.
- [14] M. Kettering, H. Richter, F. Wiekhorst, S. Bremer-Streck, L. Trahms, W. A. Kaiser, I. Hilger, *Nanotechnology* **2011**, *22*, 505102.
- [15] L. Lartigue, D. Alloyeau, J. Kolosnjaj-Tabi, Y. Javed, P. Guardia, A. Riedinger, C. Péchoux, T. Pellegrino, C. Wilhelm, F. Gazeau, *ACS Nano* **2013**, *7*, 3939.
- [16] G. Grazú, A. M. Silber, M. Moros, L. Asín, T. E. Torres, C. Marquina, M. R. Ibarra, G. F. Goya, *Int. J. Nanomed.* **2012**, 5351.
- [17] B. Kozissnik, A. C. Bohorquez, J. Dobson, C. Rinaldi, *Int. J. Hyperthermia* **2013**, *29*, 706.
- [18] F. Vetrone, R. Naccache, A. Zamarrón, A. Juarranz de la Fuente, F. Sanz-Rodríguez, L. Martínez Maestro, E. Martín Rodríguez, D. Jaque, J. Garcí'a Sole', J. A. Capobianco, *ACS Nano* **2010**, *4*, 3254.
- [19] M. P. Alvarez-Berrios, A. Castillo, J. Mendez, O. Soto, C. Rinaldi, M. Torres-Lugo, *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 1003.
- [20] L.-M. Lacroix, J. Carrey, M. Respaud, *Rev. Sci. Instrum.* **2008**, *79*, 093909.
- [21] T. Sadhukha, L. Niu, T. S. Wiedmann, J. Panyam, *Mol. Pharmaceutics* **2013**, *10*, 1432.
- [22] M. A. Voinov, J. O. Sosa Pagán, E. Morrison, T. I. Smirnova, A. I. Smirnov, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 35.
- [23] E. Zhang, M. F. Kircher, M. Koch, L. Eliasson, S. N. Goldberg, E. Renström, *ACS Nano* **2014**, *8*, 3192.
- [24] J. Carrey, V. Connord, M. Respaud, *Appl. Phys. Lett.* **2013**, *102*, 232404.
- [25] H. Huang, S. Delikanli, H. Zeng, D. M. Ferkey, A. Pralle, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 602.
- [26] L. Polo-Corrales, C. Rinaldi, *J. Appl. Phys.* **2012**, *111*, 07B334.
- [27] A. Riedinger, P. Guardia, A. Curcio, M. A. Garcia, R. Cingolani, L. Manna, T. Pellegrino, *Nano Lett.* **2013**, *13*, 2399.
- [28] J. Dong, J. I. Zink, *ACS Nano* **2014**, *8*, 5199.
- [29] Y. Chen, A. Bose, G. D. Bothun, *ACS Nano* **2010**, *4*, 3215.
- [30] M. Pernia Leal, A. Torti, A. Riedinger, R. La Fleur, D. Petti, R. Cingolani, R. Bertacco, T. Pellegrino, *ACS Nano* **2012**, *6*, 10535.
- [31] C. Sanson, O. Diou, J. Thévenot, E. Ibarboure, A. Soum, A. Bru`let, S. Miraux, E. Thiaudie`re, S. Tan, A. Brisson, V. Dupuis, O. Sandre, S. Lecommandoux, *ACS Nano* **2011**, *5*, 1122.
- [32] S. Brulé, M. Levy, C. Wilhelm, D. Letourneur, F. Gazeau, C. Ménager, C. Le Visage, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 787.
- [33] M. Yamaguchi, A. Ito, A. Ono, Y. Kawabe, M. Kamihira, *ACS Synth. Biol.* **2014**, *3*, 273.
- [34] N. L. Klyachko, M. Sokolsky-Papkov, N. Pothayee, M. V. Efre-mova, D. A. Gulin, N. Pothayee, A. A. Kuznetsov, A. G. Majouga, J. S. Riffle, Y. I. Golovin, A. V. Kabanov, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12016.
- [35] S. Leung-Theung-Long, E. Roulet, P. Clerc, C. Escricuet, S. Marchal-Victorion, B. Ritz-Laser, J. Philippe, L. Pradayrol, C. Seva, D. Fourmy, M. Dufresne, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 7976.

Chapitre IV

*Catalyse de réaction Fisher-Tropsch par
échauffement de nanoparticules soumises à
un champ magnétique haute fréquence*

1	<i>Synthèses et caractérisations des catalyseurs</i>	IV-3
2	<i>Propriétés magnétiques des catalyseurs</i>	IV-9
3	<i>Propriétés catalytiques des nanoparticules durant la synthèse Fischer-Tropsch</i>	IV-14
4	<i>Discussion et conclusion</i>	IV-26

La pénurie inévitable d'énergies fossiles implique une volonté de promouvoir l'utilisation des énergies renouvelables, ainsi que le développement de nouvelles approches pour réduire la consommation d'énergie. La plupart des énergies renouvelables étant intermittentes, leur stockage reste un problème important, même si plusieurs options (telles que le stockage électrochimique par des batteries, la production d'hydrogène, la production de chaleur, etc. [1]) sont actuellement étudiées. Stocker ces énergies sous forme d'hydrocarbures constitue une option attractive, en raison de leurs compatibilités avec les usages actuels et de leur densité d'énergie élevée. La principale voie de synthèse artificielle d'hydrocarbures, du nom de synthèse Fischer-Tropsch, implique l'hydrogénation du CO. Typiquement, ce procédé implique une réaction catalytique au moyen de nanoparticules de fer dispersées sur un support (en général de la poudre d'alumine) que l'on chauffe de l'extérieur [2] du réacteur à des températures de 200 °C à 500 °C [2]–[8].

L'exploitation de catalyseurs chauffés par induction magnétique apparaît comme une alternative prometteuse pour apporter l'énergie nécessaire au déclenchement des réactions. Des résultats pionniers en matière de catalyse de réactions chimiques par induction magnétique sur des nanoparticules magnétiques synthétisées par voie chimique ont été obtenues par le groupe d'Andreas Kirschning [9]–[12]. Leurs travaux démontrent que de nombreuses réactions chimiques en phase liquide peuvent être déclenchées au moyen d'un apport de chaleur induit par échauffement de nanoparticules d'oxydes de fer soumises à un champ magnétique haute fréquence. Pour ce faire, ils ont conçu un réacteur à flux continu leur permettant d'effectuer par exemple des synthèses à multiples étapes et des catalyses hétérogènes en phase liquide en utilisant du MagSilica® fonctionnalisé avec des nanoparticules de palladium [11]. Pour l'heure, les températures de réactions obtenues sont en deçà de la limite des 200 °C, et cela en raison de la puissance de chauffe limitée des nanoparticules d'oxydes de fer utilisées. Il semblerait que l'induction magnétique n'ait encore jamais été utilisée dans le cadre de catalyses hétérogènes en phase gazeuse. L'utilisation de catalyseurs chauffés par un champ magnétique externe pourrait présenter plusieurs avantages: i) à l'échelle nanométrique, la production de chaleur par induction magnétique est quasiment instantanée ; le processus de conversion pourrait donc être initié et éteint de manière instantanée pour suivre les productions intermittentes d'énergie ii) le support de catalyseur (si il y en a un) et le réacteur entier n'auraient pas besoin d'être chauffés, ce qui peut représenter une économie d'énergie importante iii) le transfert d'énergie aux réactifs par induction pourrait être bien meilleur que par conduction puisque l'apport de chaleur provient du catalyseur lui-même et non plus de l'extérieur du réacteur. A la lumière de ces différents avantages, il n'est

pas irraisonnable d'imaginer le développement d'une "catalyse froide", où une quantité minimale d'énergie serait injectée dans le réacteur pour induire la réaction catalytique.

L'utilisation de la chaleur induite par des nanoparticules pour effectuer des conversions d'électricité en hydrocarbures représente cependant un véritable défi scientifique. En effet, il n'existe pas à ce jour de nano-objets présentant à la fois de fortes puissances de chauffe et de bonnes propriétés catalytiques pour l'activation du CO ou du CO₂ sous H₂. De plus, étant donné que la réaction Fischer-Tropsch est effective à des températures supérieures à 200°C, une conception spécifique des catalyseurs, ayant des propriétés de chauffe et de catalyse stable dans le temps, est nécessaire. A ce jour, les catalyseurs les plus efficaces pour ces procédés sont composés de ruthénium métallique [13]–[15]. Leur principal désavantage est leur coût très élevé. De ce fait, les procédés commerciaux utilisent préférentiellement des catalyseurs à base de fer [16], [17] et de cobalt [18]. La recherche de nano-objets spécifiquement dédiés pour une catalyse Fischer-Tropsch induite par des champs magnétiques externes peut consister à synthétiser de nouveaux matériaux catalytiques, combinant un cœur ferromagnétique possédant de fortes puissances de chauffe et une surface aux propriétés catalytiques optimisées. Ces travaux représentent un défi de taille car la réaction n'est effective que pour une plage de température restreinte. En effet, aucune réaction ne se produit à trop basse température tandis que l'on obtient seulement du carbone à de trop fortes températures. Il est de plus établi dans les procédés actuels que les catalyseurs de fer ont tendance à coalescer et que leurs compositions chimiques évoluent vers des carbures de fer.

Durant la dernière décennie, notre laboratoire a développé des synthèses et des protocoles de caractérisation de nanoparticules Fe(0) très monodisperses, de taille ajustable, d'un état de surface contrôlé et présentant de bonnes propriétés magnétiques, en particulier avec des M_s proches du fer massif. Un contrôle fin de la taille de ces objets nous permet entre autre d'atteindre de fortes puissances de chauffe par induction magnétique [19]–[21]. Dans le but de répondre aux besoins de cette nouvelle application, nous avons cherché à combiner de bonnes propriétés d'échauffement et de catalyse. Nous sommes donc partis de nanoparticules de Fer (0) de taille variable dont nous avons sélectivement dopé la surface avec du cobalt ou du ruthénium, deux métaux reconnus pour leur efficacité en tant que catalyseurs Fischer-Tropsch. Nos travaux présentés ci-dessous démontrent la possibilité de combiner à la fois des capacités de chauffes et de catalyses pour l'hydrogénation du CO au moyen de nanoparticules de type cœur / coquille. Nous présenterons en premier lieu le détail de ces synthèses ainsi qu'une caractérisation structurale et magnétique des différentes nanoparticules produites. Nous évaluerons ensuite les capacités de chauffe de ces catalyseurs en nous appuyant sur des

mesures de SAR et de cycles d'hystérésis effectuées sur les échantillons dilués et en poudre. L'activité catalytique des différents lots de nanoparticules sera ensuite présentée. Nous couplerons également ces résultats aux évolutions structurales des catalyseurs ainsi qu'aux changements de leurs potentiels de chauffe respectifs durant la catalyse.

1 Synthèses et caractérisations des catalyseurs

Nous nous sommes inspirés de nos précédents travaux sur la croissance de nanoparticules de carbures de fer [21] pour la synthèse de ces nano-objets bimétalliques. Ainsi, la synthèse des objets comprend deux étapes: a) la synthèse des nanoparticules de Fer (0) et b) la décomposition d'un dérivé carbonylé de Co ou de Ru sur les nanoparticules de Fer (0) préformées (voir *Figure IV. 1(a)*).

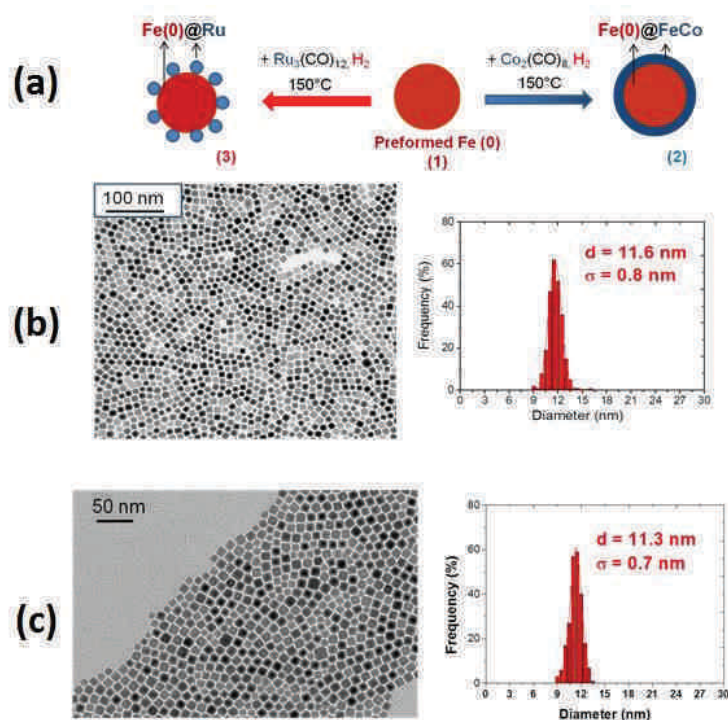


Figure IV. 1 (a) Schéma de synthèse de nanoparticules Fe@FeCo (2) et Fe@Ru (3) à partir de nanoparticules de Fe (0) (1). (b) Nanoparticules de Fe (0) préformées pour la synthèse de (2). (c) Nanoparticules de Fe (0) préformées pour la synthèse de (3)

Les nanoparticules de Fer (0) sont tout d'abord obtenues avec de très bons rendements par une décomposition d'un complexe organométallique de $\{\text{Fe}[\text{N}(\text{SiMe}_3)_2]_2\}_2$ en présence d'hexadécylamine (HDA) et de l'ammonium chloré correspondant (HDAHCl) dans du mésitylène. En variant les conditions de réactions, nous obtenons des nanoparticules

métalliques de Fe (0) (*Figure IV. 1(b)* et *(c)*) de tailles comprises entre 8 et 12 nm [22]. A partir de nanoparticules Fe (0) de 11 nm de diamètre (**1**), nous avons ajouté 0,2 équivalent de $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ ou 0,2 équivalent de $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$. Cette étape de réaction est menée à 150 °C sous 3 bars de H_2 durant 24h. Après 24h sous agitation magnétique vigoureuse, une masse de matériau sombre est agglutinée au barreau magnétique. Cette solution noire est ensuite lavée 5 fois dans 15 mL de toluène distillé et dégazé, pour être enfin séchée sous vide.

Les nanoparticules ont ensuite été analysées par une série de techniques de caractérisations. Comme on peut le constater sur les clichés TEM *Figure IV. 2(a)* et *Figure IV. 3(a)*, ce protocole entraîne la formation de nanoparticules Fe@FeCo (**2**) et Fe@Ru (**3**), de tailles respectives 12,2 nm et 12,4 nm, homogènes en formes et en tailles ($\sigma = 0,9$ nm pour (**2**) et 0,6 nm pour (**3**)). Ces images TEM montrent clairement une augmentation de 1 nm de la taille pour les deux lots de particules finales (*Figure IV. 2(a)* et *Figure IV. 3(a)*). Dans les deux cas, la diffraction de rayons X (DRX) ne permet de détecter que du Fer bcc, qui ne peut pas être différencié d'un alliage FeCo bcc dans le cas de nanoparticules de Fe@FeCo (*Figure IV. 2(d)* et *Figure IV. 3(d)*).

Les particules Fe@FeCo et Fe@Ru ont également été analysées par la combinaison d'images de microscopie électronique à haute résolution (HRTEM), d'analyse dispersive en énergie (EDX) (*Figure IV. 2(b)(c)* et *Figure IV. 3(b)(c)*) et par spectroscopie Mössbauer (*Figure IV. 2(e)* et en *Figure IV. 3(e)*). Les images fournies par EDX pour les deux structures Fe@FeCo et Fe@Ru rendent compte de la présence de Fe et Co d'une part et de Fe et Ru de l'autre avec des quantités relatives de 14,5 % de Co dans Fe@FeCo et de 6,7% de Ru dans Fe@Ru. Ces ratios sont en accord avec des micro-analyses élémentaires réalisées sur les nanoparticules séchées. Les études de microscopie électronique en HRTEM et en HAADF (*High Angle Annular Dark Field*) confirment la présence de cœurs de Fe (0) et d'ilots de Ru à leur surface dans le cas des nanoparticules de Fe@Ru. Concernant le Fe@FeCo, les contrastes similaires entre Fe et Co et les structures similaires de Fe et de FeCo ne nous permettent pas de différencier les métaux.

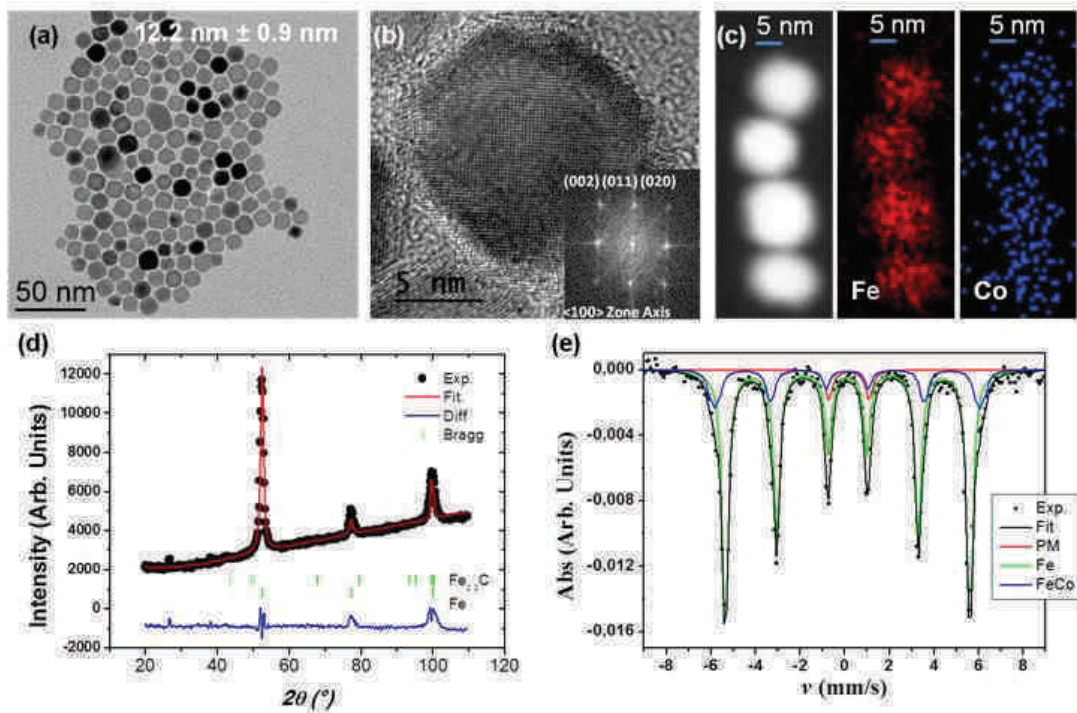


Figure IV. 2 Analyse structurale des nano-cristaux (2) de Fe@FeCo d'environ 12,2 nm. (a) Cliché TEM de (b) Cliché HRTEM (c) Cartographie EDX (d) Spectre DRX (e) Spectre Mössbauer

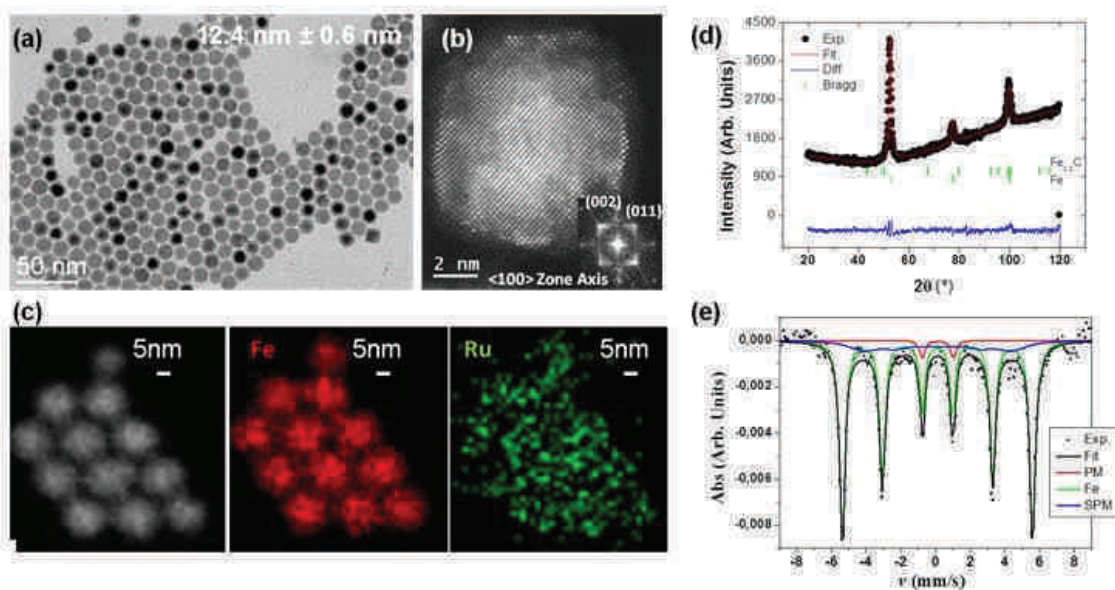


Figure IV. 3 Analyse structurale des nano-cristaux (3) de Fe@Ru d'environ 12,4 nm. (a) Cliché TEM de (b) Cliché HRTEM (c) Cartographie EDX (d) Spectre DRX (e) Spectre Mössbauer

L'analyse des spectres Mössbauer révèle la présence de Co et de Ru, par la contribution d'un champ hyperfin élevé correspondant à un alliage FeCo et d'un champ hyperfin réduit, correspondant à une interface FeRu. Les paramètres ayant permis l'ajustement des spectres sont résumés dans le *Tableau IV. 1*). Dans toutes ces mesures, aucune

trace de carburation n'est détectée, à l'inverse de ce qui se passe lors de l'addition de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ à des nanoparticules de $\text{Fe} (0)$. Dans ce dernier cas, on obtient des nanoparticules de carbures de fer [21]. Dans le cas présent, le cœur de $\text{Fe} (0)$ est donc préservé après décomposition de $\text{Co}(\text{CO})_8$ et $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$ (*Figure IV. 2(e)* et *Figure IV. 3(e)*).

Echantillon	Diamètre	Contribution	IS (mm/s) (± 0.02)	Q (mm/s) (± 0.2)	$\mu_0 H_{\text{Hyp}}$ (T) (± 0.2)	γ (mm/s) (± 0.02)	Fraction (%) (± 2)
Fe@FeCo	10.3 nm	Fe^{2+}	0.18	1.8	0	0.4	2
		$\alpha \text{ Fe - core}$	0.12	0	33.1	0.34	68
		$\alpha \text{ FeCo}$	0.12	0	35.9	0.34	30
Fe@FeCo	12 nm	Fe^{2+}	0.18	1.8	0	0.4	5
		$\alpha \text{ Fe - core}$	0.12	0	33	0.34	77
		$\alpha \text{ FeCo}$	0.12	0	35.9	0.34	18
Fe@Ru	11.7 nm	Fe^{2+}	0.12	1.8	0	0.35	3
		$\alpha \text{ Fe - core}$	0.12	0	33.1	0.37	82
		Fe/Ru	0.12	0	25.8	2	15
Fe@Ru	12.4 nm	Fe^{2+}	0.14	1.8	0	0.5	3
		$\alpha \text{ Fe - core}$	0.12	0	33.1	0.37	80
		Fe/Ru	0.12	0	25.8	2	17

Tableau IV. 1 Paramètres ayant permis d'ajuster les spectres Mössbauer pour deux échantillons de tailles différentes issus des deux synthèses de nanoparticules bimétalliques: Fe@FeCo et Fe@Ru. Pour chaque spectre collecté à 4,2 K, sont présentés: les décalages isomériques (IS), les scissions quadripolaires (Q), le champ hyperfin ($\mu_0 H_{\text{Hyp}}$), la largeur de bande (γ) et la quantification de chaque contribution.

Les gaz présents dans le schlenck à l'issue de la synthèse ont été analysés par spectrométrie de masse. Cette analyse met en évidence dans les deux cas la formation de méthane et d'infimes quantités d'éthane et de propane (voir *Figure IV. 4*) durant la synthèse des nano-objets. Nous interprétons ce résultat de la manière suivante : la décomposition des précurseurs $\text{Co}(\text{CO})_8$ et $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$ en présence de H_2 mène à de fins dépôts de Co et de Ru à la surface des $\text{Fe} (0)$. Ces dépôts protègent de la carburation des cœurs de $\text{Fe} (0)$, grâce à leurs fortes propriétés catalytiques. Cela permet de recycler le carbone en méthane ainsi qu'en d'autres hydrocarbures plus lourds. Nous pouvons également noter qu'après addition de CO dans les schlenck de synthèse, les particules de Fe@Ru présentent clairement dans leurs spectre IR des bandes associées à la coordination du CO sur le ruthénium à la fois en mode terminal (2052 cm^{-1}) et en mode pontant ($1976, 1929 \text{ cm}^{-1}$). En comparaison, aucun étirement du CO n'est à noter après un traitement similaire sur des nanoparticules pures de $\text{Fe} (0)$ (voir *Figure IV. 5*).

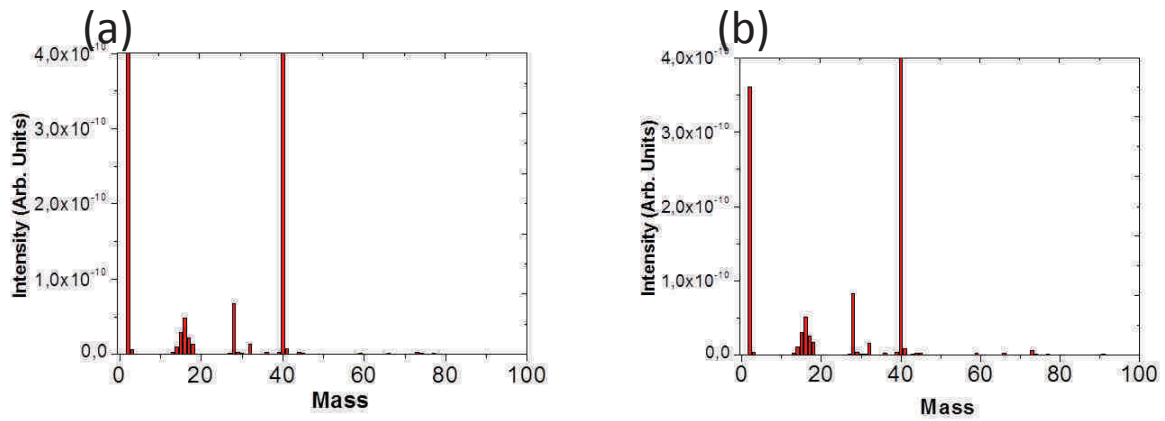


Figure IV. 4 : Spectres de masses des gaz provenant des synthèses (a) de Fe@FeCo et (b) de Fe@Ru.

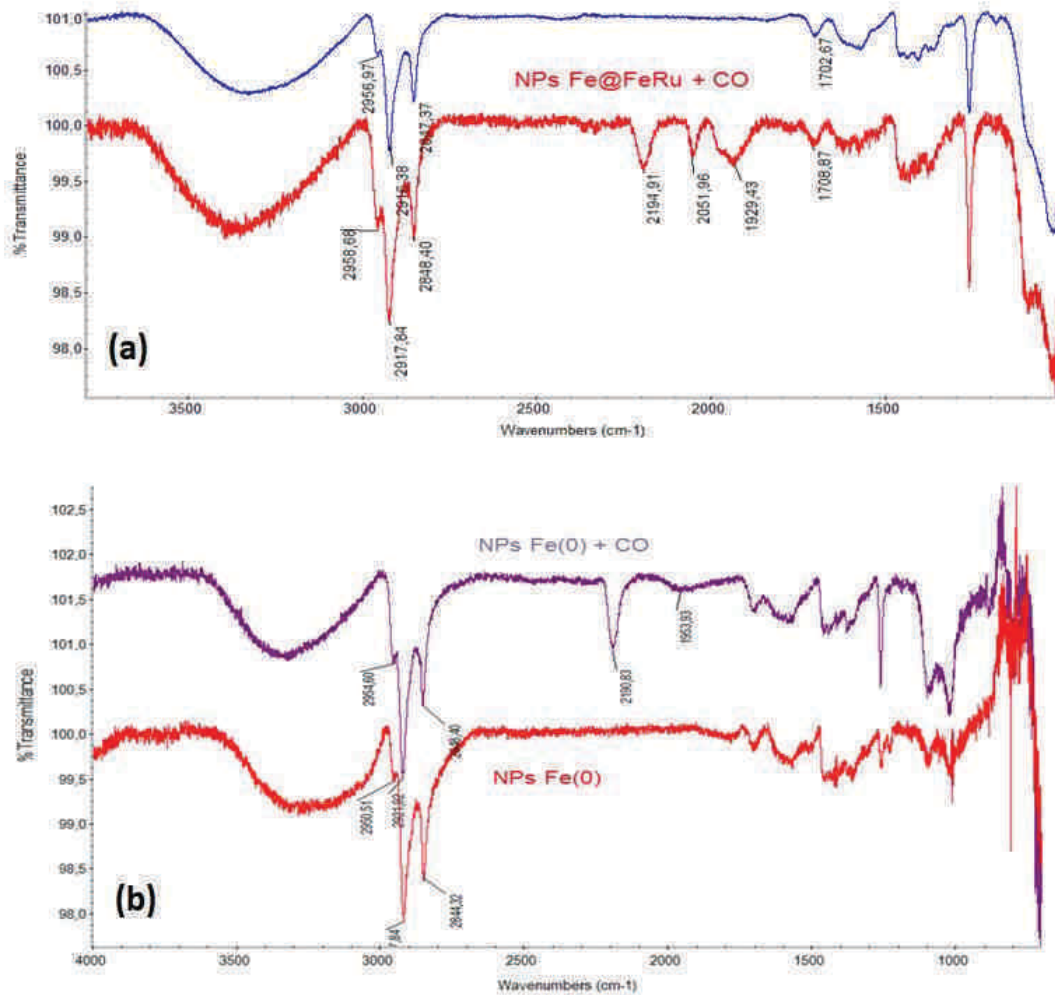


Figure IV. 5 : Spectres IR de (a) nanoparticules de Fe@Ru avant et après addition de CO; (b) nanoparticules de Fe(0) avant et après addition de CO.

Par le biais de ces protocoles de synthèse, les tailles finales de nano-objets peuvent être contrôlées en variant la taille moyenne des cristaux de Fer (0) initiaux, tout en gardant

tous les autres paramètres constants. Des nanoparticules de Fe@FeCo et de Fe@Ru peuvent ainsi être obtenues avec des tailles comprises entre 10,0 et 13,0 nm. Nous présentons en *Figure IV. 6* et en *Figure IV. 7* les mêmes analyses structurales dans le cas d'échantillons **(2)** et **(3)** de plus petites tailles (respectivement 10,3 et 11,7 nm). De la même manière que précédemment, les particules obtenues sont monodisperses. L'analyse des spectres Mössbauer correspondants (et dont les paramètres d'ajustement sont également résumés dans le *Tableau IV. 1*) indique des concentrations atomiques finales de Co et de Ru de même ordre que précédemment dans le cas de plus grosses particules. Ces concentrations, qui sont donc stables en fonction de la taille des nanoparticules de fer de départ peuvent atteindre environ 20%, ce qui témoigne de la formation d'une fine couche "dopée" en surface.

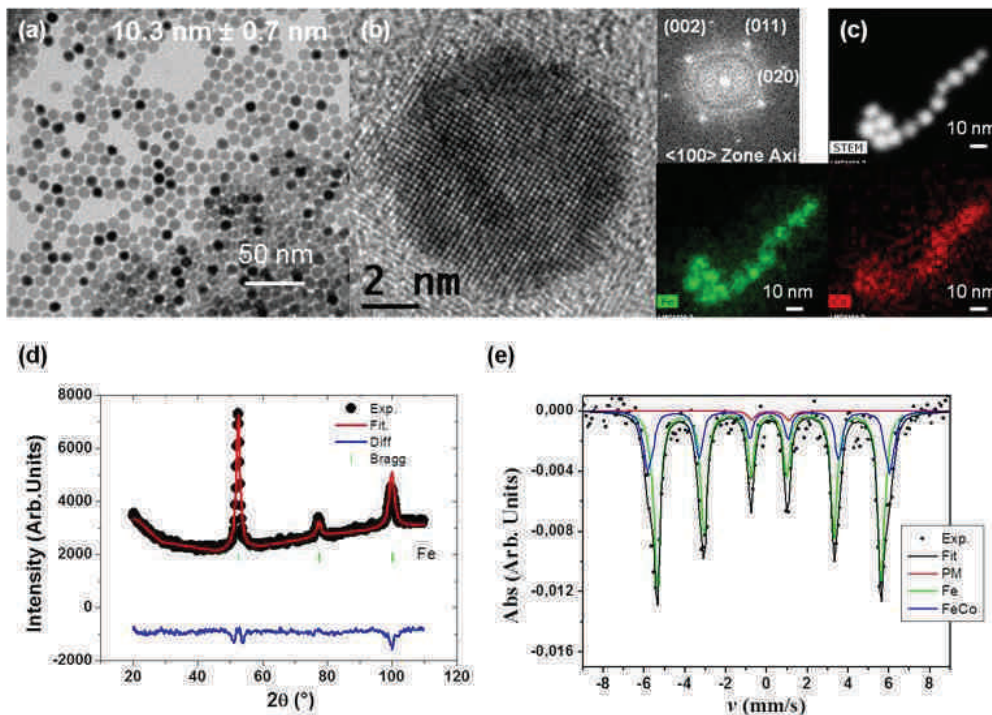


Figure IV. 6 Analyse structurale des nano-cristaux **(2)** de Fe@FeCo d'environ 10,3 nm. (a) Cliché TEM de (b) Cliché HRTEM (c) Cartographie EDX (d) Spectre DRX (e) Spectre Mössbauer

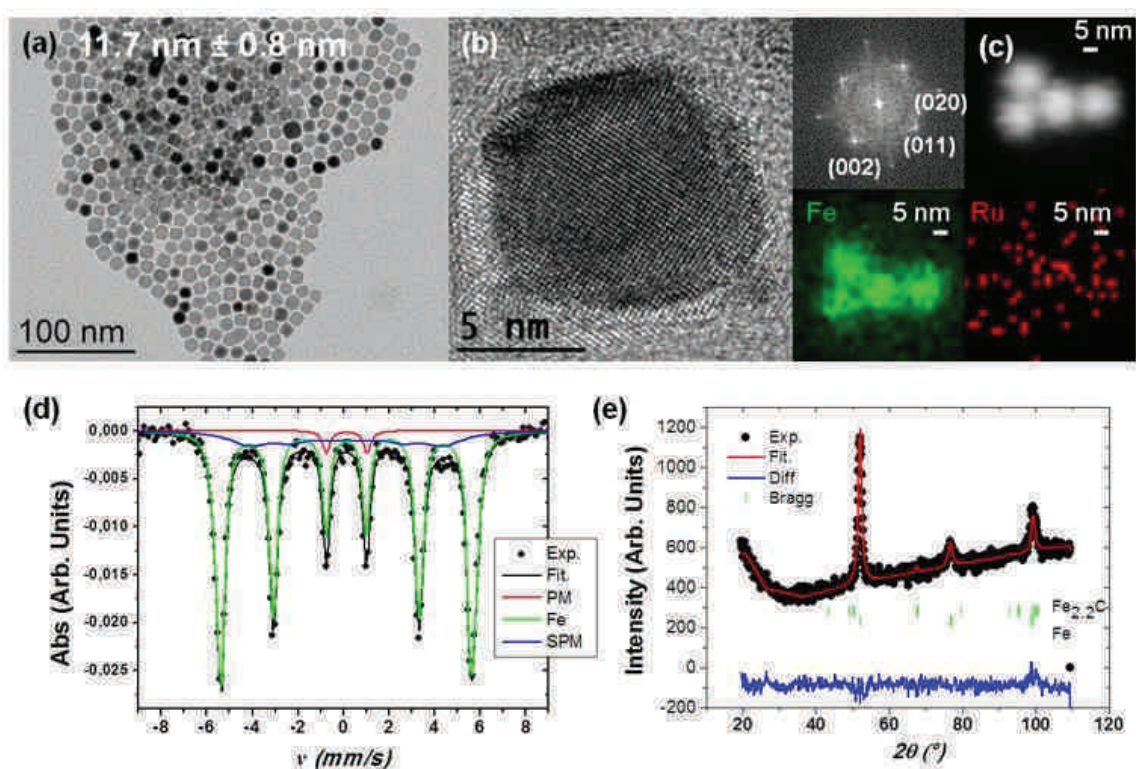


Figure IV. 7 Analyse structurale des nano-cristaux (2) de Fe@Ru d'environ 11,7 nm. (a) Cliché TEM de (b) Cliché HRTEM (c) Cartographie EDX (d) Spectre Mössbauer (e) Spectre DRX

2 Propriétés magnétiques des catalyseurs

Afin d'évaluer les propriétés magnétiques des nanoparticules de Fe(0) (1), de Fe@FeCo (2) et de Fe@Ru (3), leurs cycles statiques ont été mesurés à 2 K et à 300 K, avec un magnétomètre SQUID (*Superconducting Quantum Interference Device*, modèle MPMS 5.5). Les mesures ont été effectuées sur des échantillons de poudres cristallines séchées, préparés et scellés sous atmosphère d'argon (en boîte à gants) afin de les protéger d'une quelconque oxydation indésirable. L'aimantation absolue a été dans chaque cas calculée à partir de la quantité de métal (0) déduite de la microanalyse (soit Fe dans les cas (1) et (3) et [Fe+Co] dans le cas (2)). La Figure IV. 8(a) nous montre comme attendu que l'aimantation à saturation (M_s) des nanoparticules de Fer(0) préformées est très proche du fer massif: 210 ($\pm 10\%$) Am^2/kg à 2 K et 198 ($\pm 10\%$) Am^2/kg at 300 K. L'aimantation à saturation du (2) reste également proche celui du fer massif 210 ($\pm 10\%$) Am^2/kg à 2 K et 206 ($\pm 10\%$) Am^2/kg à 300 K (Figure IV. 8(b)). A l'inverse du (2), dans l'échantillon (3), la présence du Ru en surface conduit à une baisse de l'aimantation à saturation: 170 ($\pm 10\%$) Am^2/kg à 2 K et 165 ($\pm 10\%$) Am^2/kg at 300 K (Figure IV. 8(c)). Il est intéressant de noter que les nanoparticules (1) et (2)

présentent un comportement ferromagnétique doux à température ambiante, tandis que celui de **(3)** est proche d'un matériau superparamagnétique. Dans ce dernier cas et contrairement au Co, qui induit normalement une hausse locale de l'aimantation, la coquille de Ru a tendance à perturber le magnétisme local du Fe(0). En conséquence, la "taille magnétique effective" est réduite, entraînant des valeurs d'aimantation à saturation et de champ coercitif réduits pour l'échantillon **(3)**, par rapport à **(1)** et **(2)**.

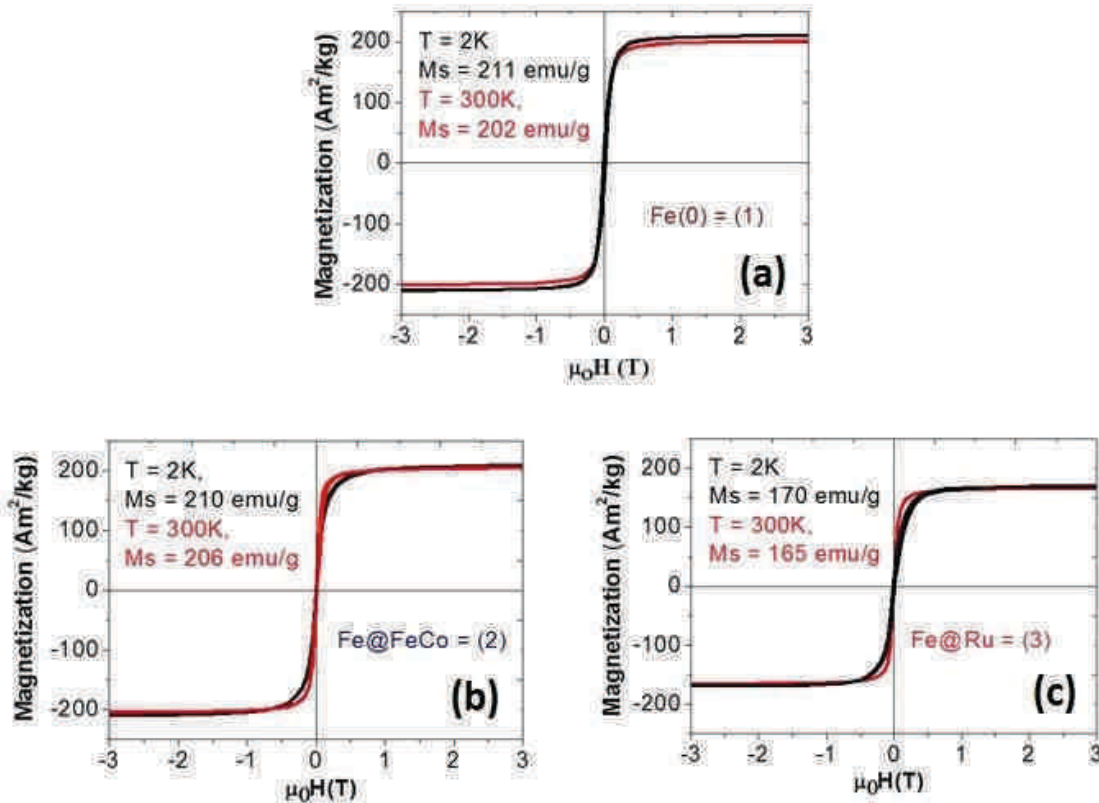


Figure IV. 8 Mesures magnétiques des échantillons au moyen d'un magnétomètre SQUID à deux températures: 2 K et 300 K pour les échantillons (a) Fe(0) **(1)**, (b) Fe@FeCo **(2)** et (c) Fe@Ru **(3)**

Nous nous intéressons maintenant à la puissance de chauffe générée par ces nano-objets soumis à un champ alternatif haute fréquence. Elle a été déterminée en combinant, comme précédemment dans le Chapitre II, des mesures de SAR par élévation de température au moyen de notre électroaimant (voir II.1.1), et des mesures de cycles d'hystérésis haute fréquence grâce à notre bobine de mesures (voir II-2). L'évolution du SAR en fonction de l'amplitude du champ appliqué à $f = 54$ kHz est présentée en Figure IV. 9 pour deux échantillons représentatifs de chaque type de catalyseurs **(2)** et **(3)** et d'un échantillon **(1)**. Les mesures de SAR ont été effectuées à la fois sur les échantillons dilués dans du mésitylène et en poudre séchée. Nous présentons ensuite en Figure IV. 10 la description des cycles

d'hystérésis correspondants. Dans le cas des mesures de cycles d'hystérésis en poudre, nous ne pouvons pas avoir accès à l'aimantation massique des nanoparticules, car notre analyse quantitative est basée sur l'hypothèse que la bobine pick-up est complètement remplie d'un matériau magnétique homogène de concentration volumique connue (*cf.* équation (2) de l'Article II-1), ce qui n'est pas du tout le cas lorsque les échantillons sont sous forme de poudre. Nous présenterons donc les cycles bruts, avec des échelles d'aimantations en unité de flux de densité magnétique (mT). De plus, les cycles d'hystérésis des nanoparticules en solution présentent, dans cette série de mesures, des valeurs d'aimantation massique bien trop élevées, et non compatibles avec les mesures d'augmentation de température, pour une raison que nous ne comprenons actuellement pas. La seule hypothèse que nous émettons est que les nanoparticules seraient bien plus concentrées au niveau des bobines pick-up. Les aimantations correspondantes seront donc elles aussi exprimées en Tesla. Les comparaisons entre cycles pourront donc être effectuées uniquement sur la base de leur forme, et non pas sur la valeur quantitative de leur aire.

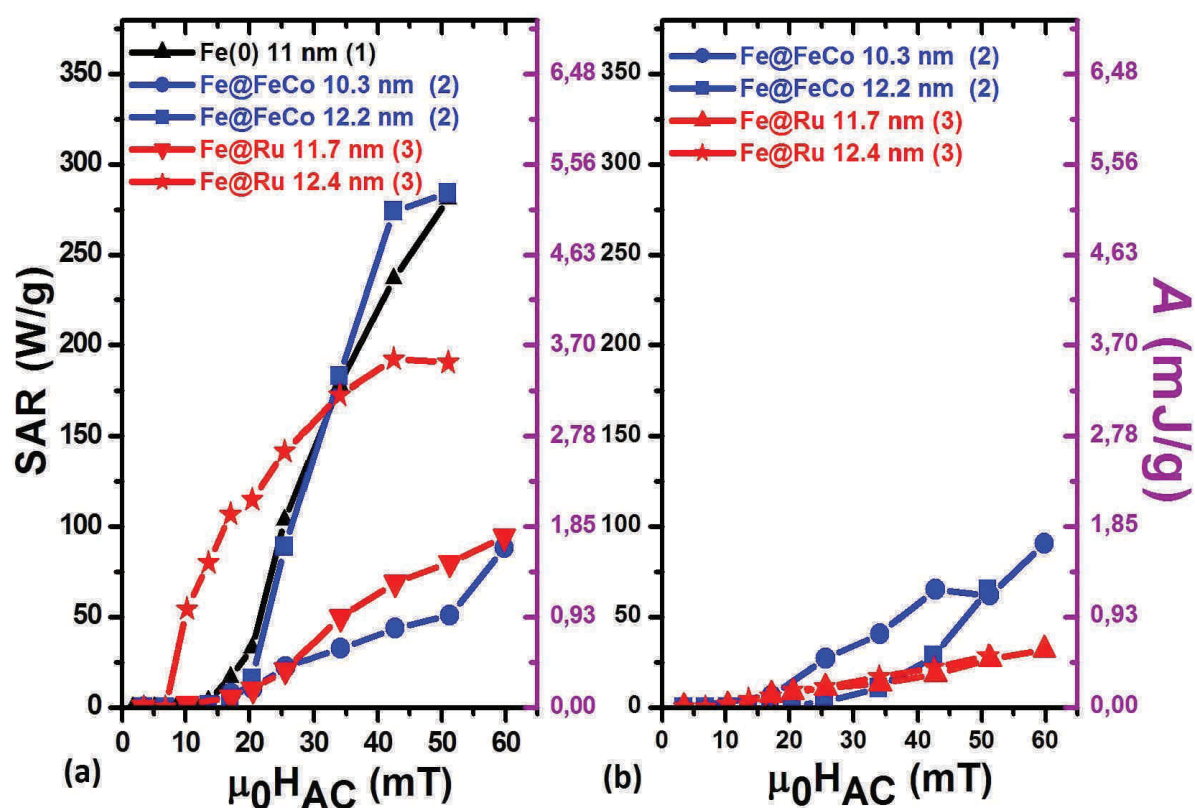


Figure IV. 9 Evolution du SAR (W/g) en fonction de l'amplitude de champ appliqué pour un échantillon de nanoparticules de Fe (0) (1), deux échantillons de (2) et deux de (3) de tailles variables. La fréquence de mesure est de 54 kHz. Mesures effectuées sur des échantillons dilués dans du mésitylène (a) pour en poudre séchées (b). On donne pour les deux graphes l'échelle en aire d'hystérésis (mJ/g)

Les mesures de SAR de nanoparticules initiales de Fe (0) **(1)** sont également montrées à titre de comparaison. De manière générale, comme nous pouvions l'observer dans le cas de nanoparticules métalliques de Fer (0) [20], les échantillons bimétalliques présentent des comportements typiques de nanoparticules dans un régime ferromagnétique, comme en témoigne l'augmentation abrupte de SAR à partir d'un champ critique ($\mu_0 H_{crit}$) et pouvant être suivi d'une saturation. Le même comportement est observé *Figure IV. 10* dans laquelle les cycles d'hystérésis correspondants deviennent carrés à partir d'une amplitude de champ appliqué critique. Cette évolution des cycles est caractéristique d'une réorganisation spatiale des nanoparticules dans le solvant. Comme précédemment expliqué (en I.1.2.2), le réarrangement en chaînes a pour effet direct d'augmenter la rectitude des cycles d'hystérésis en favorisant une augmentation abrupte du SAR à partir d'une amplitude de champ critique. Toujours dans le cas des nanoparticules bimétalliques, on constate que les valeurs de SAR augmentent avec la taille. Ainsi, les particules de Fe@FeCo 12,2 nm **(2)** décrivent un comportement comparable à celui des particules de Fe (0) 11 nm **(1)**, avec une augmentation abrupte du SAR pour un champ critique d'environ 20 mT. La même constatation peut être formulée au regard de l'évolution des cycles d'hystérésis correspondants (*Figure IV. 10(c)*) Dans le cas des particules de Fe@Ru 12,4 nm **(3)**, la combinaison de puissances de chauffe intéressantes et d'un faible champ critique $\mu_0 H_{crit}$ (observé à la fois *Figure IV. 9* et *Figure IV. 10(e)*) pourrait se révéler indispensable dans les cas où l'amplitude de champ applicable serait limitée. Les valeurs de SAR plus faibles des nanoparticules Fe@Ru 12,4 nm **(3)** sont corrélées avec l'évolution de l'aimantation spontanée qui est réduite dans le cas des particules de Fe@Ru. En effet, l'ajout de ruthénium en surface des nanoparticules a pour effet de perturber le magnétisme des atomes de Fer voisins. L'interface Fe / Ru est donc néfaste aux propriétés d'échauffement de ces particules. Des valeurs de SAR intéressantes sont néanmoins obtenues. Pour les plus petites particules, la puissance de chauffe est plus limitée.

Penchons-nous maintenant sur les potentiels d'échauffement des nanoparticules en poudre séchées, c'est-à-dire dans les conditions réelles d'une catalyse hétérogène. Les valeurs de SAR obtenues sur les mêmes échantillons que précédemment mais sous forme de poudre sont systématiquement très inférieures à celles mesurées en solution, d'environ un ordre de grandeur (*Figure IV. 9(b)*). Ces baisses drastiques sont corrélées à des évolutions de cycles d'hystérésis bien plus fermées que celles présentées précédemment (*Figure IV. 10(b), (d)* et *(f)*). La fermeture des cycles est provoquée ici par l'interaction entre particules rapprochées, l'absence de solvant ne permettant pas aux nanoparticules de s'organiser en fines chaînes. L'allure générale des cycles d'hystérésis mesurés en poudre nous paraît donc correcte par

rapport aux changements que l'absence de solvant implique. Nous remarquons également que les champs critiques sont plus élevés que précédemment. Ces différences proviennent du fait que l'organisation des nanoparticules durant la mesure influe fortement le résultat final : les nanoparticules sont condensées et statiques dans le cas d'échantillons en poudre, bien moins mobile qu'en présence d'un solvant. Il est intéressant de constater que la puissance de chauffe semble cette fois-ci être corrélée à la nature des matériaux tandis que la taille n'a qu'une influence marginale.

Le point essentiel reste néanmoins que les puissances de chauffe des échantillons en poudre soient mesurables et concordantes avec la théorie. Suivant le métal catalytique en surface, les valeurs de SAR sont comprises entre 65 W/g pour les particules de Fe@FeCo et 28 W/g pour celles de Fe@Ru pour une fréquence de $f = 54$ kHz et une amplitude de 50 mT. Les SAR des Fe@Ru sont probablement réduits par rapport à ceux des Fe (0) initiaux en raison de l'influence néfaste du Ru sur le magnétisme du Fe. Les mêmes protocoles de mesures des SAR et cycles d'hystérésis seront exploités pour caractériser l'évolution de la puissance de chauffe des catalyseurs

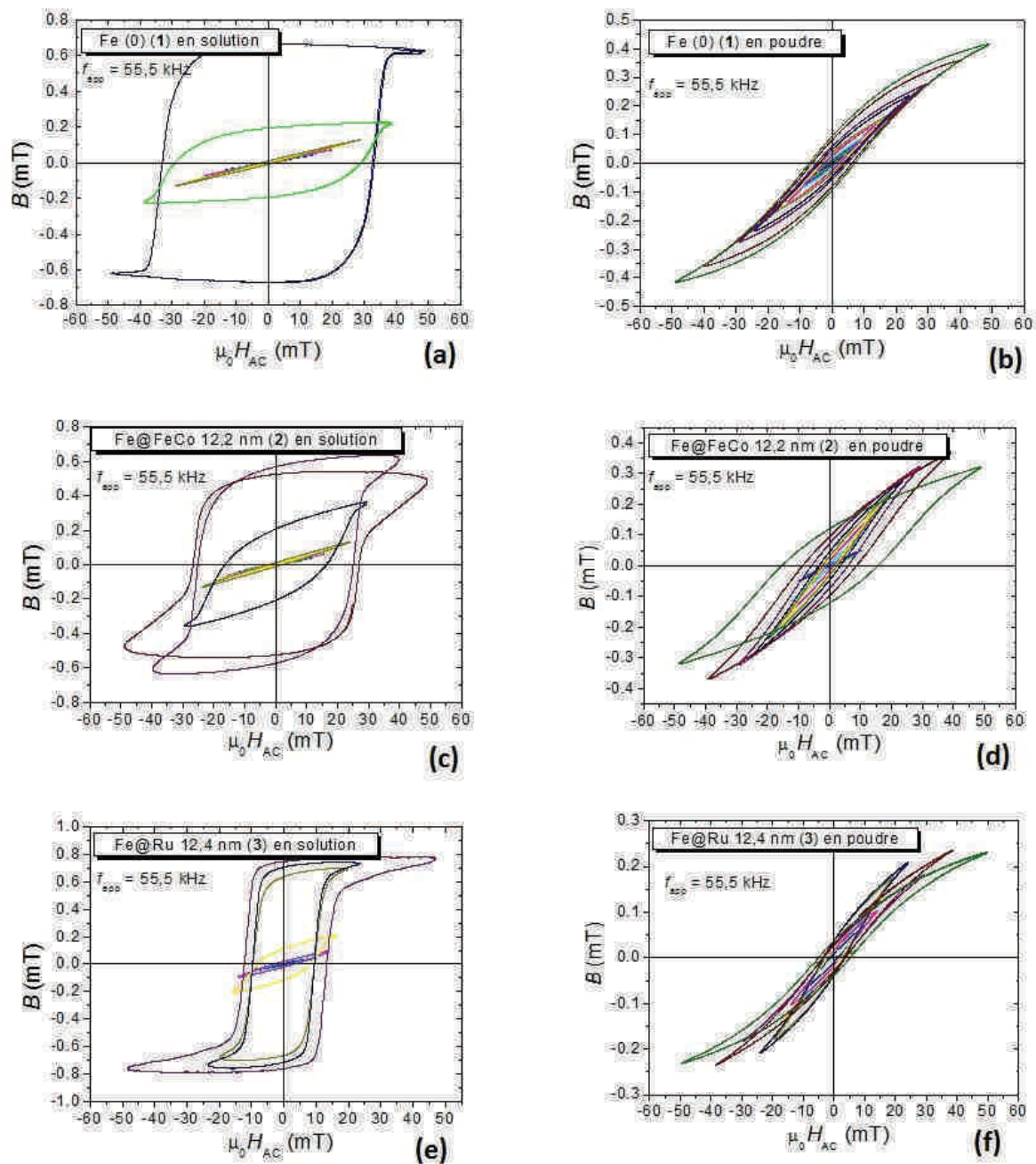


Figure IV. 10 Comparaison de mesures de cycles d'hystérésis des échantillons (a)-(b) de Fe (0) (1), (c)-(d) de Fe@FeCo 12,2 nm (2) et (e)-(f) Fe@FeRu 12,4 nm (3) en solution et en poudre.

3 Propriétés catalytiques des nanoparticules durant la synthèse Fischer-Tropsch

L'étape suivante a consisté à tester ces nanoparticules bimétalliques en tant que catalyseurs de l'hydrogénation de CO. L'activité catalytique a été testée dans un champ

magnétique alternatif de fréquence 54 kHz et d'amplitude 50 mT. Les questions fondamentales dès lors étaient: i) Les températures atteintes seront-elles suffisantes? ii) Les nanoparticules seront-elles stables au cours du temps de catalyse? Une réaction de catalyse typique consiste à mettre 10 mg de poudre de nanoparticules contenant environ 80 % en masse de métal, dans une ampoule Fischer-Porter de 4 mL, avant sa pressurisation à 4 bars par un ratio de $H_2 / ^{13}CO = 4$ en l'absence de tout support ou solvant. La poudre de nanoparticules exposée au champ magnétique reste donc dans le fond de l'ampoule. Le ^{13}CO a été utilisé dans le but de: i) pouvoir contrôler la réaction en RMN à phase gazeuse et ii) s'assurer que les produits observés en phase gazeuse proviennent bien de la décomposition du CO ajouté et non pas par exemple d'une décomposition de ligands résiduels ou encore de C dans les particules.

3.1 Analyse des produits de réaction

Dès l'application du champ magnétique alternatif, la pression du mélange gazeux chute. Après 4 heures de réaction, le taux de conversion du CO et la sélectivité des produits de réaction des trois catalyseurs ont été étudiés en combinant la RMN en phase gazeuse de 1H et de ^{13}C avec la spectroscopie de masse. Pour ce faire, le mélange gazeux produit a été transféré dans un tube RMN Quick Pressure (QPV, 0,77 mm d'épaisseur de paroi) fermé avec une valve à aiguille en Teflon, pour être ensuite analysé.

Tout d'abord, l'activité catalytique relative à l'hydrogénation du CO au moyen d'un champ magnétique haute fréquence pour des particules de Fe (0) a été testée. De faibles taux de conversion ont été atteints, comme en témoignent les spectres de masses et de RMN du ^{13}C en phase gazeuse (voir *Figure IV. 11(a)* et *Figure IV. 12(a)*). Ces résultats ont ensuite été comparés à ceux obtenus pour les nanoparticules de (Fe@FeCo **(2)**) et de Fe@Ru **(3)**) de plus larges diamètres, ayant des valeurs de SAR comparables en solution. Par rapport à l'échantillon **(1)**, le taux de conversion est bien plus important dans le cas de l'échantillon Fe@FeCo 12,2 nm **(2)** et quasiment complet pour le Fe@Ru 12,4 nm **(3)** (*Figure IV. 11(b)* et *(c)*).

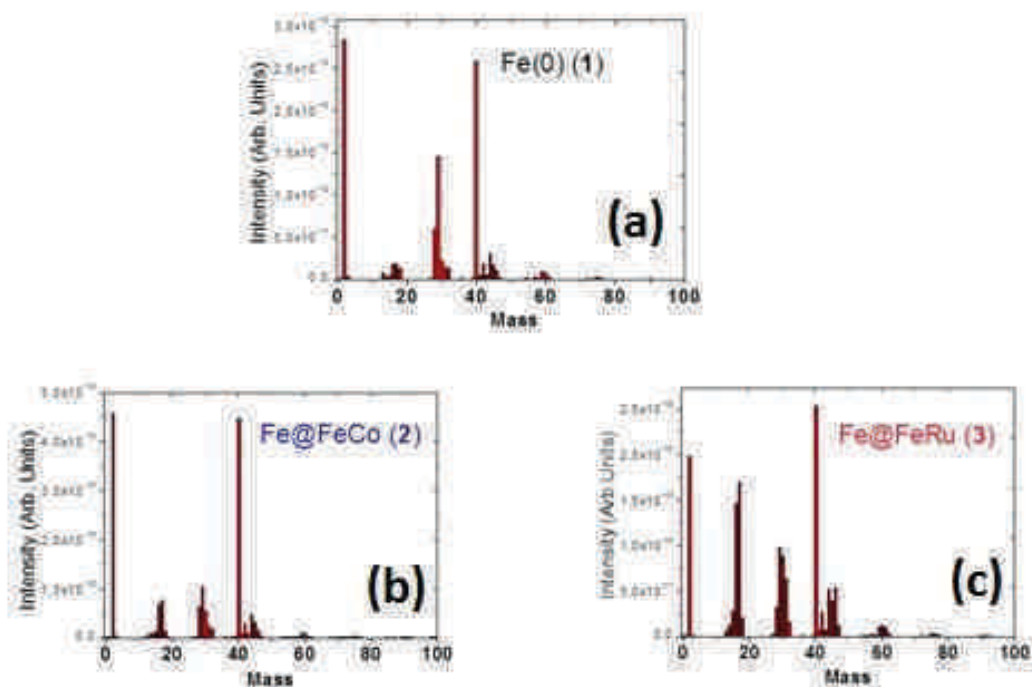


Figure IV. 11: Spectres de masse en phase gazeuse après synthèse Fischer-Tropsch utilisant: (a) **(1)**, (b) **(2)** et (c) **(3)**

Concernant la sélectivité des produits formés, la RMN en phase gazeuse des ^1H nous permet de facilement distinguer les $^{13}\text{CH}_4$ qui apparaissent par un doublet à 0,2 ppm des groupes $^{13}\text{CH}_3$ - et CH_2 - provenant d'hydrocarbures saturés plus longs (éthane, propane et butane essentiellement) et qui présentent des doublets à respectivement 0,8 et 1,3 ppm (Figure IV. 12 (a)). Le spectre obtenu pour **(3)** (Figure IV. 12 (a)) ne montre quasiment que ces derniers doublets alors que la spectroscopie de masse indique la présence d'hydrocarbures de C1 à C6 (Figure IV. 11 (c)). Ce résultat peut donc être interprété comme une formation de produits essentiellement composés d'hydrocarbures légers saturés. L'échantillon **(2)** nous montre un motif plus complexe entre 1 et 2,5 ppm ajouté à des pics additionnels entre 4,5 et 6,6 ppm, indiquant la présence d'oléfines. Le spectre de masse met en évidence dans le cas de **(3)** la présence d'hydrocarbures C1 à C6 tandis que des hydrocarbures plus légers sont observés pour **(2)** ainsi que pour le fer pur (Figure IV. 11 (b) et (c)). Dans le cas du fer pur enfin, quelques pics d'oléfines sont masqués par le large signal de H_2 centré à 4,6 ppm. L'ensemble de ces données nous montre que la réactivité observée ainsi que la sélectivité est comparable qualitativement à ce qui est observable dans les synthèses Fischer-Tropsch couramment utilisées: le Ru est le plus actif des catalyseurs et favorise une croissance de chaîne carbonée couplée à une saturation des hydrocarbures tandis que le fer seul mène à la formation d'oléfines.

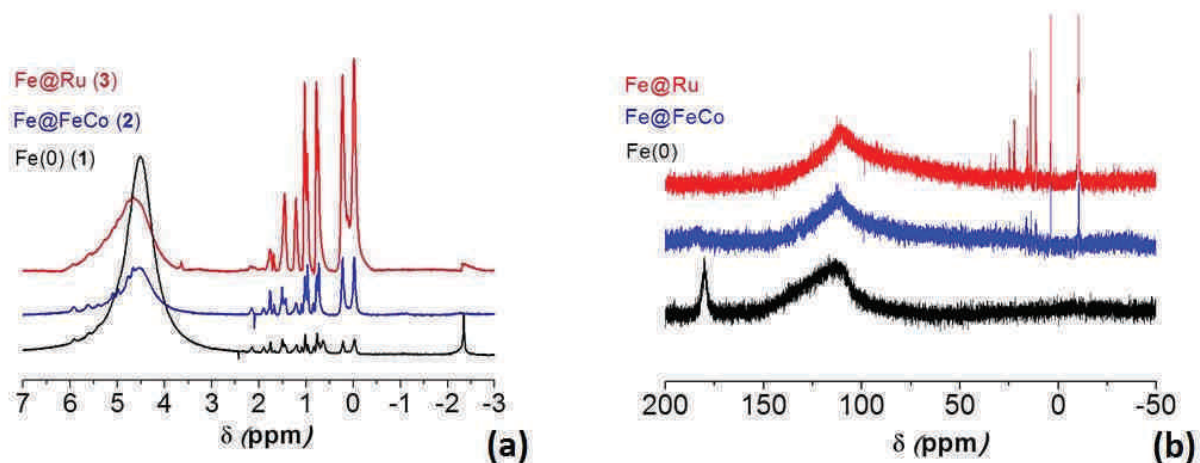


Figure IV. 12 Spectres RMN des (a) ^1H et des (b) ^{13}C des mélanges gazeux produit après synthèse Fischer-Tropsch utilisant (1), (2) et (3).

Les mêmes tendances peuvent être observées dans le cas de plus petites particules, qui présentent également des propriétés catalytiques mais avec des conversions incomplètes pour les deux catalyseurs de Fe@FeCo et de Fe@Ru (voir Figure IV. 13).

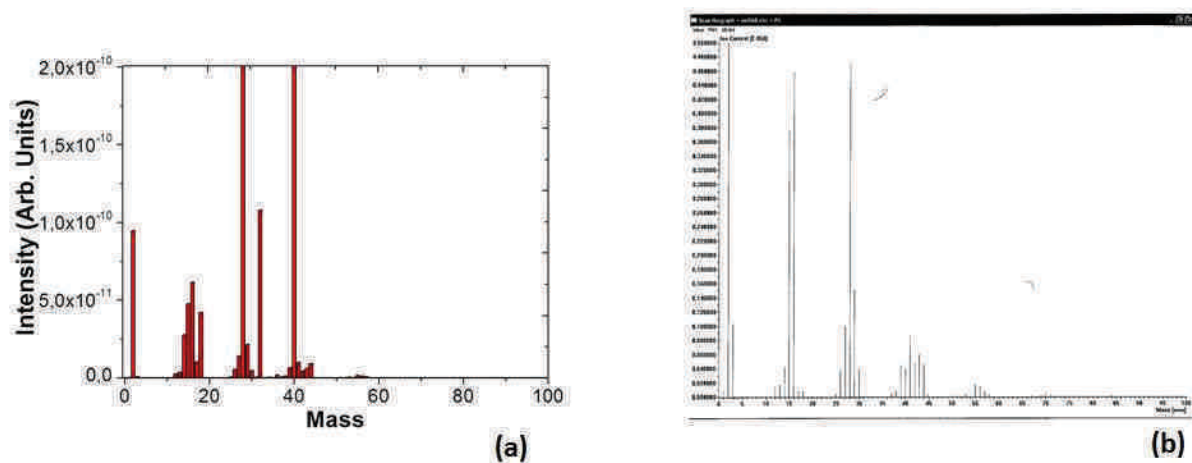


Figure IV. 13 Spectres de masses en phases gazeuses après synthèse Fischer-Tropsch utilisant (a) des nanoparticules de Fe@Ru d'environ 11,7 nm et (b) des nanoparticules de Fe@FeCo d'environ 10,3 nm

Les deux raisons principales pouvant expliquer ces différences de conversion sont: i) la cinétique de réaction et ii) la dégradation des nanoparticules pendant la catalyse. Nous allons maintenant nous intéresser à l'état des catalyseurs après synthèse Fischer-Tropsch.

3.2 Etats finaux des catalyseurs après synthèse Fischer-Tropsch

Dans le but d'évaluer l'évolution des catalyseurs pendant la catalyse, les propriétés structurales des 5 échantillons ont été étudiées après réaction en utilisant les techniques de caractérisations suivantes: le HRTEM, l'EDX et la DRX. Les principales caractérisations structurales pré- et post-catalyse ainsi que les puissances de chauffe des catalyseurs étudiées sont résumées dans le *Tableau IV. 2*. Nous avons de plus comparé les évolutions de SAR et les cycles d'hystérésis des catalyseurs entre avant et après catalyse.

La *Figure IV. 14* présente le cas de nanoparticules de Fe (0). On constate des changements morphologiques dus à la synthèse Fischer-Tropsch. Les catalyseurs présentent en effet une agrégation partielle en fin de réaction, avec une augmentation concomitante de la taille des particules. La *Figure IV. 14* nous montre qu'une carburation a lieu, conduisant à la formation d'une coquille de $\text{Fe}_{2,2}\text{C}$ autour des nanoparticules. Pour les deux systèmes de Fe@Ru, aucune évolution majeure des tailles des particules ou de morphologie globale n'est observée, comme on peut le constater *Figure IV. 15*. On détecte cependant une carburation complète (Fe \Rightarrow 100% $\epsilon\text{-Fe}_{2,2}\text{C}$, voir *Tableau IV. 2*) à la fois de la coquille et du cœur des particules de plus larges diamètres (12,4 nm, *Figure IV. 15(d)*). Les plus petites particules (11,7 nm) sont quant à elles préservées, comme le révèlent les clichés TEM et HRTEM *Figure IV. 15(a)* et leur carburation est moins importante (67% of Fe(0) et 33% of $\epsilon\text{-Fe}_{2,2}\text{C}$, voir *Tableau IV. 2*) Elles apparaissent en effet dissociées et demeurent monodisperses. L'évolution des particules de Fe@FeCo est intermédiaire, avec un changement important de leur morphologie et une augmentation en taille, mais pas d'agrégation massive (*Figure IV. 16*). Cependant, une coquille de carbure ainsi qu'une carburation du cœur en $\text{Fe}_{2,2}\text{C}$, de plus faible contribution que dans le cas des Fe@Ru, sont observées (57% de Fe(0) et 43% de $\epsilon\text{-Fe}_{2,2}\text{C}$ pour les particules de tailles 10,3nm ; 41% de Fe(0) et 59% of $\epsilon\text{-Fe}_{2,2}\text{C}$ pour les particules de tailles 12 nm, voir *Tableau IV. 2*).

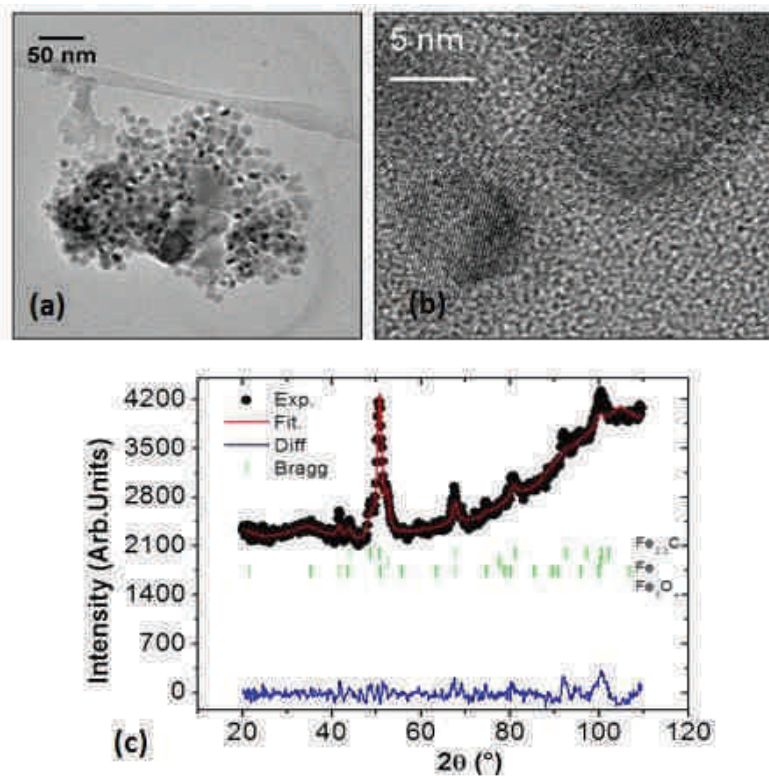


Figure IV. 14 Echantillon de Fe (0) après catalyse (a) cliché TEM (b) cliché HRTEM et (c) Spectre DRX

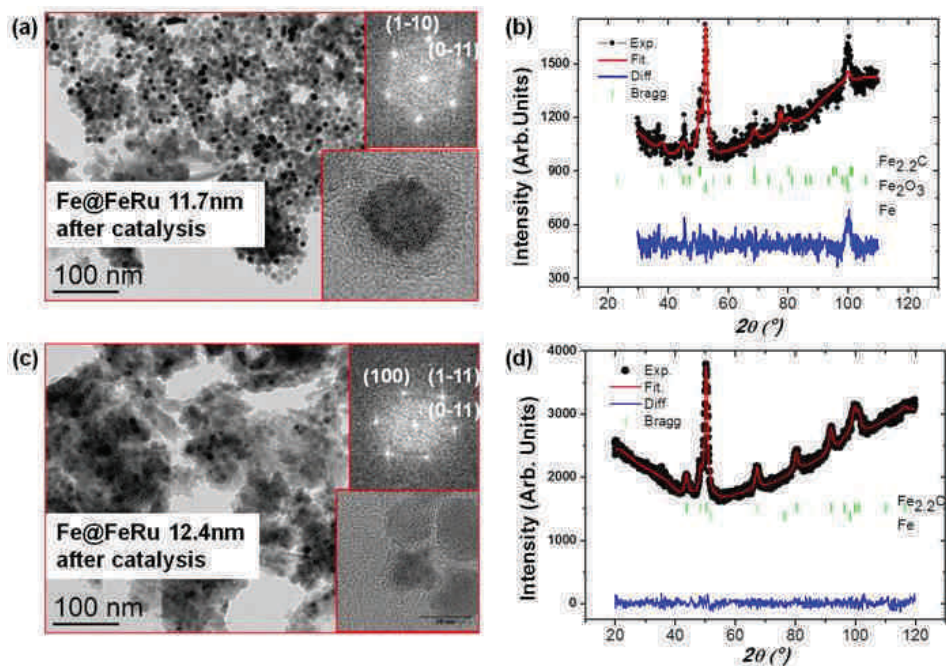


Figure IV. 15 Deux échantillons de nanoparticules de Fe@Ru après catalyses: (a) Clichés TEM et HRTEM de Fe@Ru (3) d'environ 11,7 nm après synthèse Fischer-Tropsch, (b) Spectre DRX de Fe@Ru (3) d'environ 11,7 nm après synthèse Fischer-Tropsch; (c) Clichés TEM et HRTEM de Fe@Ru (3) d'environ 12,4 nm après synthèse Fischer-Tropsch et (d) Spectre DRX de Fe@Ru (3) d'environ 12,4 nm après synthèse Fischer-Tropsch

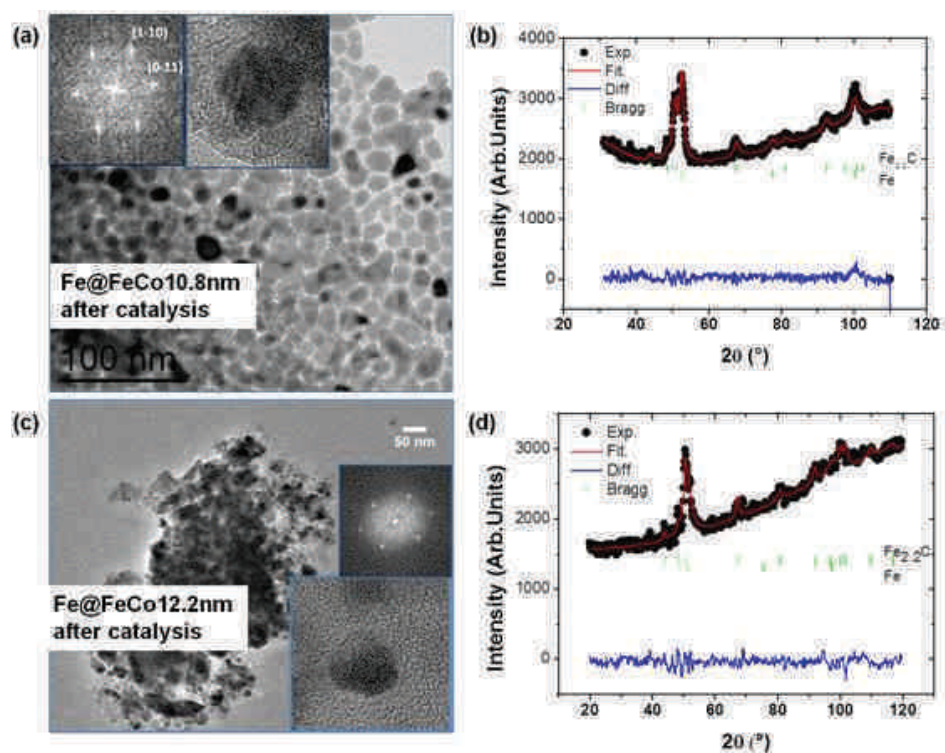


Figure IV. 16 Deux échantillons de nanoparticules de Fe@FeCo après catalyses: (a) Clichés TEM et HRTEM de Fe@FeCo (2) d'environ 10,8 nm après synthèse Fischer-Tropsch, (b) Spectre DRX de Fe@FeCo (2) d'environ 10,8 nm après synthèse Fischer-Tropsch; (c) Clichés TEM et HRTEM de Fe@FeCo (3) d'environ 12,2 nm après synthèse Fischer-Tropsch et (d) Spectre DRX de Fe@FeCo (3) d'environ 12,2 nm après synthèse Fischer-Tropsch

Echantillon	Diamètre (TEM) (± 0.2)	Structure HRTEM	Co or Ru % EDX Atomique (± 1)	SAR (W/g) (54 kHz, 50mT)		Hydrogénation du CO Reaction Complète	Catalyseur après hydrogénation du CO	
				L (± 5)	P (± 10)		TEM aspect général	DRX (± 3)
Fe@FeCo	10,3 nm	bcc Fe(0)	12%	64	48	Non	Individuel	bcc Fe(0) : 57% ϵ -Fe _{2,2} C : 43%
Fe@FeCo	12 nm	bcc Fe(0)	7.1%	284	64	Non	Agrégé	bcc Fe(0) : 41% ϵ -Fe _{2,2} C : 59%
Fe@Ru	11,7 nm	bcc Fe(0)	4.7%	80	28	Oui	Individuel	bcc Fe(0) : 67% ϵ -Fe _{2,2} C : 33%
Fe@Ru	12,4 nm	bcc Fe(0)	6.7%	190	29	Oui	Individuel	ϵ -Fe _{2,2} C : 100%

Tableau IV. 2 Principaux paramètres d'intérêts pour les échantillons de Fe@FeCo et Fe@Ru utilisés en catalyse de synthèse Fischer-Tropsch : la taille et la structure déduits des clichés TEM et HRTEM, le pourcentage atomique de métal catalytique relevé en EDX, les SAR des nanoparticules avant catalyse en liquide (L) et en poudre (P), l'état d'hydrogénation du CO, les aspects morphologiques tirées des observations TEM après catalyse et les pourcentage des phases de Fe (0) bcc et ϵ -Fe_{2,2}C

La *Figure IV. 17* présente maintenant l'évolution du SAR et des cycles d'hystérésis haute fréquence entre avant et après la catalyse pour deux échantillons (un échantillon de Fe@FeCo **(2)** de 12,2 nm et un échantillon de Fe@Ru **(3)** de 12,4 nm). Ces deux exemples présentent de nombreux points communs. Dans les deux cas, les cycles d'hystérésis apparaissent beaucoup plus fermés après catalyse (*Figure IV. 17 (b) et (f)*). On peut également noter une baisse significative des amplitudes de densité de flux, d'un ordre de grandeur environ pour l'échantillon **(2)** et d'un facteur 5 environ pour l'échantillon **(3)**. Les signaux d'aimantation correspondants, enregistrés par la bobine pick-up d'aimantation (décrit en **Article II-1**) sont très proches de la résolution du système de détection. Ceci pourrait expliquer les formes de cycles incohérentes calculées après catalyse sur la *Figure IV. 17 (b)*. Par ailleurs, les valeurs de SAR de l'échantillon **(2)** ont diminué d'un facteur 4 sur toute la gamme d'amplitude de champ appliqué (*Figure IV. 17(d)*). L'échantillon **(3)** présente une évolution de SAR plus complexe: à bas champ, les valeurs sont drastiquement diminuées, mais elles remontent à fort champ jusqu'à atteindre une valeur équivalente à celle mesurée avant catalyse. Ce dernier point n'est pas vérifié donc les cycles, pour une raison que nous ne comprenons pas pour l'instant.

Les fortes diminutions de SAR à bas champ pourraient être expliquées par deux hypothèses. La première est que la diminution des distances entre particules due à l'échauffement augmenterait les interactions dipolaires interparticulaires. Ceci expliquerait les fermetures de cycles et la diminution du SAR [23]. L'autre hypothèse est que, la carburation entraînant une augmentation de l'anisotropie, le champ coercitif deviendrait plus important que le champ appliqué. En effet, Mehdaoui *et al.* [23] et Meffre *et al.* [21] ont montré que l'anisotropie du Fe₂C était supérieure à celle du Fe (0). Dans le cas de l'échantillon **(3)**, cette augmentation d'anisotropie serait moins forte que dans le cas de l'échantillon **(2)**, ce qui expliquerait que, dans ce dernier cas, le SAR remonte fortement lorsque le champ appliqué est supérieur à 35 mT.

Finalement, le fait que le cliché TEM *Figure IV. 15(c)* montre une faible évolution de la morphologie des particules tend à privilégier l'hypothèse de l'augmentation d'anisotropie, au moins dans le cas de l'échantillon **(3)**.

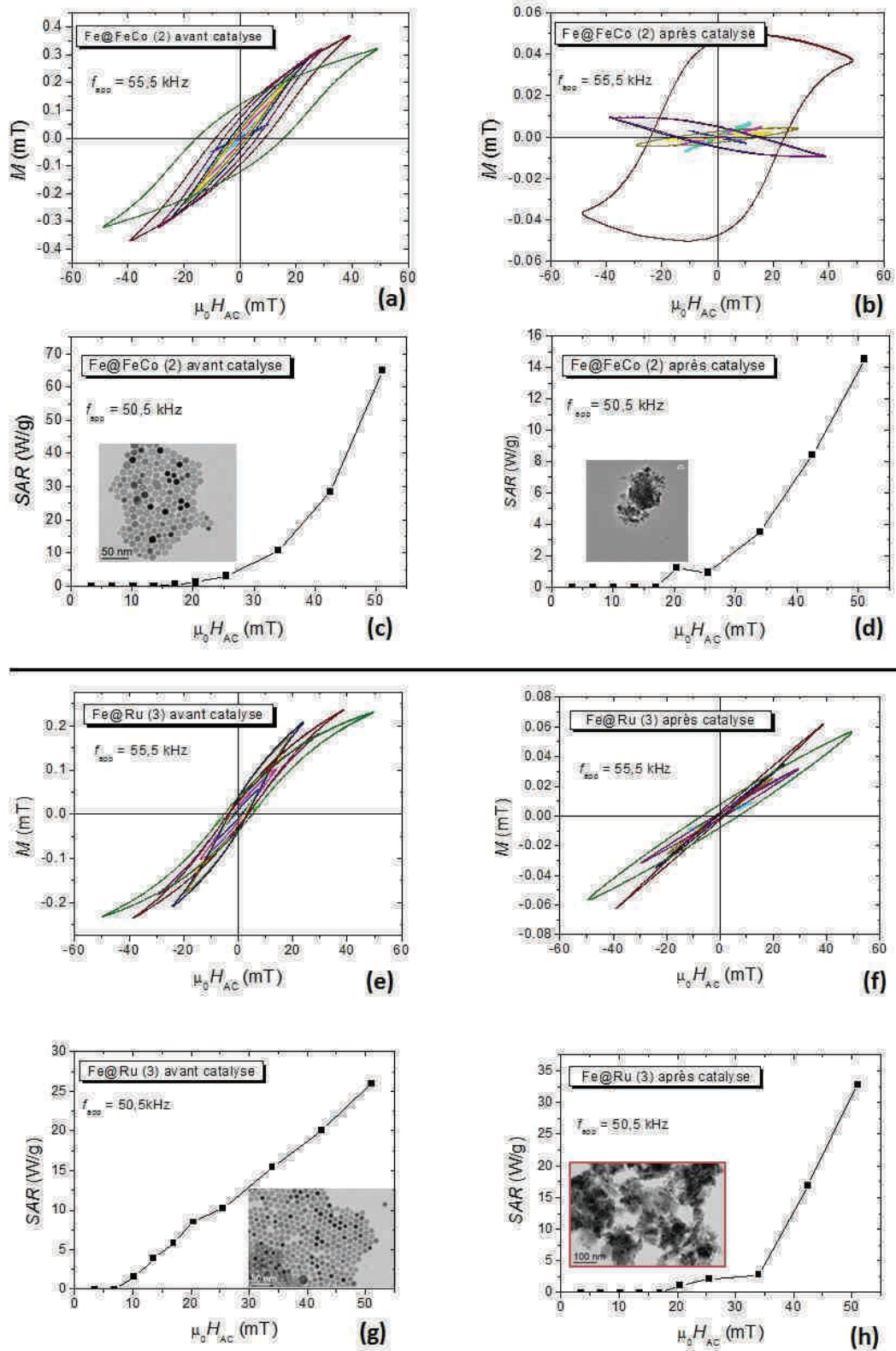


Figure IV. 17 Comparaison de propriétés d'échauffements des catalyseurs entre avant et après catalyse pour l'échantillon (2) de Fe@FeCo 12,2 nm et pour l'échantillon (3) de Fe@Ru 12,4 nm. (a) cycles d'hystérésis de (2) avant catalyse, (b) cycles d'hystérésis de (2) après catalyse, (c) SAR de (2) avant catalyse, (d) SAR de (2) après catalyse (e) cycles d'hystérésis de (3) avant catalyse, (f) cycles d'hystérésis de (3) après catalyse, (g) SAR de (3) avant catalyse et (h) SAR de (2) après catalyse

Nous venons donc de voir qu'il était possible de caractériser les évolutions de puissances de chauffe et les caractéristiques structurales des échantillons entre avant et après catalyse. Ces mesures pourraient être rendues systématiques sur les différents catalyseurs testés. Néanmoins, ces expériences ne renseignent que sur l'état initial et l'état final des catalyseurs. Or les états intermédiaires dans la réaction peuvent fournir des informations précieuses sur la cinétique d'évolution des catalyseurs.

3.3 Evaluation du potentiel de chauffe des catalyseurs pendant la synthèse Fischer-Tropsch

Il serait intéressant de pouvoir analyser l'évolution des propriétés des catalyseurs ou leur dégradation pendant le temps de réaction. Les seules informations que nous puissions récupérer du réacteur sous champ magnétique sont les signaux d'aimantation induits. Nous avons donc utilisé la bobine de mesure de cycles (présentée en II-2) pour effectuer les réactions de catalyse à un champ magnétique d'environ 56 kHz et 50 mT. De cette manière, nous avons pu mesurer le cycle haute fréquence à 50 mT pour différents temps de réaction. Pour comprendre ce que cela implique sur le pouvoir de chauffe des nanoparticules, nous avons intégré les cycles d'hystérésis. Enfin nous avons relevé la pression du réacteur aux temps correspondants pour relier l'évolution du catalyseur à l'efficacité de la réaction. Ces mesures n'ayant pas été faites de manière systématique, elles ne fournissent que des résultats préliminaires à une étude plus approfondie. Néanmoins nous constaterons que quelques enseignements peuvent en être tirés. Nous présentons *Figure IV. 18* les résultats associés à trois réactions Fischer-Tropsch utilisant différents catalyseurs. Les catalyseurs de la première expérience (notés échantillon **(A)**) sont des nanoparticules de Fe@FeCo tandis que les deux suivants (notés respectivement échantillon **(B)** et échantillon **(C)**) sont des nanoparticules de Fe@Ru.

On peut tout d'abord noter que ces trois catalyses ont fonctionné puisque l'on observe une baisse de pression significative dans les trois réacteurs. Nous remarquons que tous les catalyseurs présentent des évolutions de cycles d'hystérésis similaires au cours de la réaction. En effet, leurs valeurs d'aimantation diminuent entre chaque intervalle de temps tandis que le champ coercitif augmente. Dans tous les cas, les changements morphologiques des cycles sont plus importants dans les premières minutes d'application du champ (entre 0 et 15 minutes). Les évolutions d'aires correspondantes diffèrent par contre d'une réaction à l'autre.

La réaction utilisant l'échantillon **(A)** présente une augmentation de l'aire durant les 45 premières minutes puis une baisse constante jusqu'à la fin des mesures (voir *Figure IV. 18 (a)*). Finalement l'aire a diminué de 20% entre le début et la fin de la réaction. La *Figure IV. 18 (b)* montre que la pression du réacteur a diminué de 1 bar de manière linéaire. L'aire d'hystérésis calculée pour la réaction utilisant l'échantillon **(B)** montre une toute autre évolution. En effet, elle commence par diminuer de 0 à 150 minutes d'application de champ pour ensuite rester à peu près constante jusqu'à la fin de la réaction, avec une diminution de l'aire totale de 34%. L'évolution de la baisse de pression associée peut également être scindée en deux parties. Tout d'abord la diminution est rapide jusqu'à environ 150 minutes puis semble plus lente par la suite jusqu'à la fin de la réaction. La similitude des deux points d'inflexion laisse à penser qu'une corrélation positive existe ici entre le potentiel de chauffe des nanoparticules et l'efficacité de la réaction Fisher-Tropsch. La dernière expérience utilisant l'échantillon **(C)** est enfin la seule dont l'aire d'hystérésis est maintenue à sa valeur maximale, après une augmentation pendant les 100 premières minutes. Au cours de l'expérience, l'aire a augmenté de près de 230 %. Ce profil d'aire peut indiquer que le catalyseur n'a pas subi de dégradations majeures affectant son potentiel de chauffe pendant la catalyse. Étonnamment par contre, la baisse de pression associée est plus importante dans la première heure de réaction (quand l'aire est minimum) que pour le reste de l'expérience. On a donc pour cet échantillon une corrélation négative entre le potentiel de chauffe des nanoparticules et l'efficacité de la réaction Fischer-Tropsch.

On pourrait attribuer les évolutions de cycles au cours du temps à la simple augmentation de température dans le réacteur. Ceci permettrait par exemple d'expliquer la diminution de l'aimantation. Néanmoins, cette hypothèse est contradictoire avec la claire augmentation de champ coercitif observée au cours du temps, car une simple augmentation de température devrait se traduire par une diminution du champ coercitif. L'évolution des cycles en fonction du temps peut à notre avis être compatible avec les deux hypothèses évoquées précédemment : l'augmentation de l'anisotropie des nanoparticules ou l'augmentation des interactions dipolaires entre particules. Pour trancher entre ces deux hypothèses, nous pourrions soumettre ces mêmes échantillons au champ magnétique mais en présence d'un gaz inerte (Ar par exemple). De cette manière, nous pourrions éliminer l'influence de la carburation. Les résultats obtenus pour l'échantillon **(C)** sont très encourageants et nous confortent dans l'idée que ces contrôles de cycles d'hystérésis peuvent permettre d'identifier des catalyseurs fiables, et dont les propriétés d'échauffement n'évoluent pas pendant la catalyse.

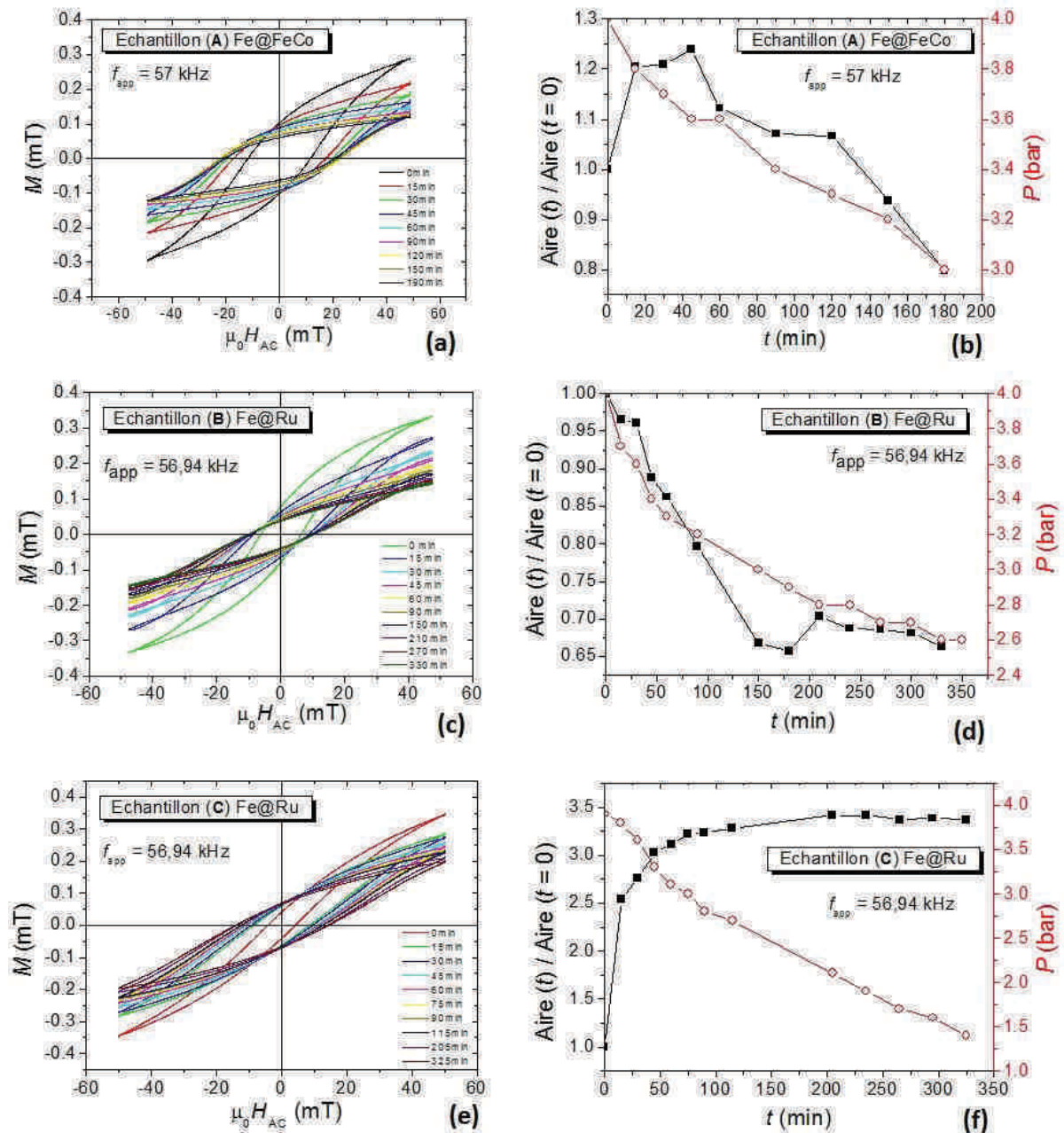


Figure IV. 18 Mesures en temps de catalyse (a)-(c)-(e) Cycles d'hystérésis respectivement des réactions utilisant les échantillons notés respectivement (A), (B) et (C). (b)-(d)-(f) Intégration des cycles et relevés de pression du réacteur en fonction du temps de catalyse respectivement des échantillons (A), (B) et (C).

Nous avons également caractérisé l'évolution de l'aire d'hystérésis en fonction de la baisse de pression dans le réacteur. On a pu observer sur deux échantillons de Fe@Ru différents une corrélation positive et une corrélation négative entre l'augmentation de l'aire et la cinétique de diminution de pression. Il est possible dans le deuxième cas que la température optimale ait été dépassée. La revue de Marc E. Dry [24] renseigne sur les valeurs optimales

température dans les réactions de Fisher-Tropsch. Si l'activité catalytique augmente naturellement avec la température, il précise également que des températures trop hautes peuvent engendrer un dépôt de carbone sur la surface des catalyseurs et bloquent donc leur action. Il est donc possible que les corrélations positives et négatives observées dans deux expériences différentes correspondent à deux cas où la température initiale de réaction était supérieure ou inférieure à la température optimale de réaction.

Ces trois exemples ne constituent bien sûr pas une étude systématique et rigoureuse de l'évolution des cycles en fonction du temps de catalyse. Nous avons néanmoins constaté qu'un suivi des propriétés de chauffe des nanoparticules et de l'état magnétique des catalyseurs était possible et permettait de corréler l'évolution des propriétés de chauffe des catalyseurs avec la cinétique de synthèse Fischer-Tropsch. Cette analyse peut donc se révéler utile pour améliorer notre compréhension de l'évolution des catalyseurs.

4 Discussion et conclusion

En résumé, nous avons développé dans ce chapitre une preuve de concept de catalyse hétérogène à haute température induite magnétiquement et appliquée à la synthèse de Fischer-Tropsch. Le point clé de l'étude a été l'optimisation des nanoparticules, qui devaient combiner de fortes puissances de chauffe et de bonnes propriétés catalytiques. Cela a été rendu possible grâce à une méthode de croissance basée sur une approche organométallique dérivée du mécanisme de Fischer-Tropsch, par la réaction de précurseurs à base carbonylée sur des cœurs de Fe (0). Tout d'abord il est intéressant de relever que, à l'inverse de $\text{Fe}(\text{CO})_5$, l'ajout de $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$ ou de $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ aux nanoparticules de Fer préformées à 150 °C sous H_2 ne conduit pas à une incorporation du carbone et donc à la formation de carbure de fer mais préserve le cœur de Fe (0). Ceci n'est pas dû à un manque de réactivité des nanoparticules avec CO puisque du méthane et des hydrocarbures plus lourds ont été produits. Cela résulte au contraire d'un début rapide de formation catalytique d'hydrocarbures, un processus qui n'entraîne pas d'incorporation de carbone dans le fer.

Nous avons démontré également que les trois matériaux présentaient de fortes valeurs de SAR sous application d'un champ magnétique de 50 mT à une fréquence de 54 kHz. Les composés de Fe@Ru présentent de plus faibles valeurs de SAR à tailles équivalentes, en raison de l'influence négative de l'interface Fe/Ru sur l'aimantation de surface des cœurs de Fer (0). Les trois matériaux sont utilisables, par exposition à un champ magnétique alternatif,

pour catalyser l'hydrogénation du CO. Les conditions utilisées ici ne sont volontairement pas celles des procédés catalytiques habituels mais ont été appliqués seulement pour déterminer le potentiel de ces matériaux à catalyser une réaction et la stopper. De manière assez étonnante au vu de la gamme réduite de températures dans laquelle la réaction se produit, les trois systèmes fonctionnent pour la synthèse Fischer-Tropsch. En augmentant l'activité catalytique du système et en abaissant la température, la présence de ruthénium semble protéger les particules de la dégradation morphologique, du moins dans les conditions expérimentales étudiées ici. Néanmoins, même dans le cas de matériaux en poudre présentant de faibles SAR, la température de surface des nanoparticules dépasse probablement les 200 °C nécessaires au déclenchement de la synthèse Fischer-Tropsch, ce qui explique l'agrégation partielle des nanoparticules observée.

De manière exploratoire, nous avons mis en place des protocoles visant à évaluer l'évolution des capacités de chauffe des catalyseurs durant le temps d'exposition au champ haute-fréquence. En appliquant ces protocoles de manière systématique, nous pourrions corréler l'évolution de l'état du catalyseur à la cinétique de rendement de la réaction.

En conclusion, même si nous sommes encore très loin de l'application à l'échelle industrielle, cette étude nous permet d'ouvrir des champs d'investigations sur: i) les catalyses hétérogènes à haute température magnétiquement induites et ii) un réglage fin des propriétés catalytique et des températures de travail grâce au contrôle du SAR et du « dopage » des surfaces avec un métal catalytique choisi. Cette catalyse magnétique prometteuse va désormais être développée au laboratoire dans des conditions proches des procédés industriels réels.

- [1] Q. Schiermeier, "Renewable power: Germany's energy gamble," *Nature*, vol. 496, no. 7444, pp. 156–158, Apr. 2013.
- [2] G. L. Bezemer, J. H. Bitter, H. P. C. E. Kuipers, H. Oosterbeek, J. E. Holewijn, X. Xu, F. Kapteijn, A. J. van Dillen, and K. P. de Jong, "Cobalt particle size effects in the Fischer-Tropsch reaction studied with carbon nanofiber supported catalysts," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 12, pp. 3956–3964, Mar. 2006.
- [3] A. Y. Khodakov, W. Chu, and P. Fongarland, "Advances in the development of novel cobalt Fischer-Tropsch catalysts for synthesis of long-chain hydrocarbons and clean fuels," *Chem. Rev.*, vol. 107, no. 5, pp. 1692–1744, May 2007.
- [4] W. Chen, Z. Fan, X. Pan, and X. Bao, "Effect of Confinement in Carbon Nanotubes on the Activity of Fischer-Tropsch Iron Catalyst," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 29, pp. 9414–9419, 2008.
- [5] C. Xiao, Z. Cai, T. Wang, Y. Kou, and N. Yan, "Aqueous-Phase Fischer-Tropsch Synthesis with a Ruthenium Nanocluster Catalyst," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 47, no. 4, pp. 746–749, 2008.
- [6] J. Bao, J. He, Y. Zhang, Y. Yoneyama, and N. Tsubaki, "A Core/Shell Catalyst Produces a Spatially Confined Effect and Shape Selectivity in a Consecutive Reaction," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 47, no. 2, pp. 353–356, 2008.
- [7] X.-Y. Quek, Y. Guan, R. A. van Santen, and E. J. M. Hensen, "Unprecedented Oxygenate Selectivity in Aqueous-Phase Fischer-Tropsch Synthesis by Ruthenium Nanoparticles," *ChemCatChem*, vol. 3, no. 11, pp. 1735–1738, 2011.
- [8] J. Liu, Z. Guo, D. Childers, N. Schweitzer, C. L. Marshall, R. F. Klie, J. T. Miller, and R. J. Meyer, "Correlating the degree of metal-promoter interaction to ethanol selectivity over MnRh/CNTs CO hydrogenation catalysts," *J. Catal.*, vol. 313, pp. 149–158, mai 2014.
- [9] S. Ceylan, C. Friese, C. Lammel, K. Mazac, and A. Kirschning, "Inductive Heating for Organic Synthesis by Using Functionalized Magnetic Nanoparticles Inside Microreactors," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 47, no. 46, pp. 8950–8953, Nov. 2008.
- [10] S. Ceylan, L. Coutable, J. Wegner, and A. Kirschning, "Inductive Heating with Magnetic Materials inside Flow Reactors," *Chem. – Eur. J.*, vol. 17, no. 6, pp. 1884–1893, février 2011.
- [11] A. Kirschning, L. Kupracz, and J. Hartwig, "New Synthetic Opportunities in Miniaturized Flow Reactors with Inductive Heating," *Chem. Lett.*, vol. 41, no. 6, pp. 562–570, 2012.
- [12] J. Hartwig, S. Ceylan, L. Kupracz, L. Coutable, and A. Kirschning, "Heating under High-Frequency Inductive Conditions: Application to the Continuous Synthesis of the Neurolepticum Olanzapine (Zyprexa)," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 52, no. 37, pp. 9813–9817, Sep. 2013.
- [13] C. S. Kellner and A. T. Bell, "Effects of dispersion on the activity and selectivity of alumina-supported ruthenium catalysts for carbon monoxide hydrogenation," *J. Catal.*, vol. 75, no. 2, pp. 251–261, juin 1982.
- [14] J. Kang, S. Zhang, Q. Zhang, and Y. Wang, "Ruthenium Nanoparticles Supported on Carbon Nanotubes as Efficient Catalysts for Selective Conversion of Synthesis Gas to Diesel Fuel," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 48, no. 14, pp. 2565–2568, 2009.
- [15] J. M. G. Carballo, J. Yang, A. Holmen, S. García-Rodríguez, S. Rojas, M. Ojeda, and J. L. G. Fierro, "Catalytic effects of ruthenium particle size on the Fischer-Tropsch Synthesis," *J. Catal.*, vol. 284, no. 1, pp. 102–108, Nov. 2011.
- [16] H. M. T. Galvis, J. H. Bitter, C. B. Khare, M. Ruitenbeek, A. I. Dugulan, and K. P. de Jong, "Supported Iron Nanoparticles as Catalysts for Sustainable Production of Lower Olefins," *Science*, vol. 335, no. 6070, pp. 835–838, Feb. 2012.
- [17] H. M. Torres Galvis, J. H. Bitter, T. Davidian, M. Ruitenbeek, A. I. Dugulan, and K. P. de Jong, "Iron Particle Size Effects for Direct Production of Lower Olefins from Synthesis Gas," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 39, pp. 16207–16215, 2012.
- [18] P. D. C. D. Øyvind Borg, "Fischer-Tropsch synthesis: Cobalt particle size and support effects on intrinsic activity and product distribution," *J. Catal.*, vol. 259, no. 2, pp. 161–164, 2008.
- [19] L.-M. Lacroix, R. B. Malaki, J. Carrey, S. Lachaize, G. F. Goya, B. Chaudret, and M. Respaud, "Magnetic hyperthermia in single-domain monodisperse FeCo nanoparticles: Evidences for Stoner-Wohlfarth behaviour and large losses," *J. Appl. Phys.*, vol. 105, no. 2, p. 023911, 2009.

- [20] B. Mehdaoui, A. Meffre, J. Carrey, S. Lachaize, L.-M. Lacroix, M. Gougeon, B. Chaudret, and M. Respaud, "Optimal Size of Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia: A Combined Theoretical and Experimental Study," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 21, no. 23, pp. 4573–4581, décembre 2011.
- [21] A. Meffre, B. Mehdaoui, V. Kelsen, P. F. Fazzini, J. Carrey, S. Lachaize, M. Respaud, and B. Chaudret, "A Simple Chemical Route toward Monodisperse Iron Carbide Nanoparticles Displaying Tunable Magnetic and Unprecedented Hyperthermia Properties," *Nano Lett.*, vol. 12, no. 9, pp. 4722–4728, Sep. 2012.
- [22] A. Meffre, S. Lachaize, C. Gatel, M. Respaud, and B. Chaudret, "Use of long chain amine as a reducing agent for the synthesis of high quality monodisperse iron(0) nanoparticles," *J. Mater. Chem.*, vol. 21, no. 35, pp. 13464–13469, Aug. 2011.
- [23] B. Mehdaoui, R. P. Tan, A. Meffre, J. Carrey, S. Lachaize, B. Chaudret, and M. Respaud, "Increase of magnetic hyperthermia efficiency due to dipolar interactions in low-anisotropy magnetic nanoparticles: Theoretical and experimental results," *Phys. Rev. B*, vol. 87, no. 17, May 2013.
- [24] R. P. Tan, J. Carrey, and M. Respaud, "Magnetic hyperthermia properties of nanoparticles inside lysosomes using kinetic Monte Carlo simulations: Influence of key parameters and dipolar interactions, and evidence for strong spatial variation of heating power," *Phys. Rev. B*, vol. 90, no. 21, p. 214421, décembre 2014.
- [25] C. T. Black, C. B. Murray, R. L. Sandstrom, and S. Sun, "Spin-dependent tunneling in self-assembled cobalt-nanocrystal superlattices," *Science*, vol. 290, no. 5494, pp. 1131–1134, Nov. 2000.
- [26] M. E. Dry, "Practical and theoretical aspects of the catalytic Fischer-Tropsch process," *Appl. Catal. Gen.*, vol. 138, no. 2, pp. 319–344, mai 1996.

Conclusion générale

Les travaux de thèse présentés dans les chapitres précédents traitent de l'étude des propriétés d'échauffement de nanoparticules par induction magnétique. Nos résultats sur l'exploitation de ce phénomène dans les domaines de la cancérologie et de la catalyse de réactions chimiques nous amènent à formuler des conclusions et nous permettent d'ouvrir des perspectives pour la poursuite de ces recherches.

Nous avons constaté qu'il était possible *via* des mesures de SAR et de cycles d'hystérésis d'estimer le potentiel de chauffe des échantillons. La bobine que nous avons développée nous permet d'avoir accès aux cycles d'hystérésis hautes fréquence des échantillons de nanoparticules. Combinés aux mesures de SAR par élévation de température, les cycles à hautes fréquences constituent des données importantes pour comprendre le comportement des échantillons. Cette caractérisation est ensuite bénéfique soit pour optimiser les protocoles de synthèse, soit pour ajuster les paramètres du champ magnétique à appliquer. On peut également noter que ces mesures sont beaucoup plus rapides que des mesures par élévation de température. Les protocoles de mesures développés dans le Chapitre II ont été utiles dans le cadre du projet européen Multifun pour la recherche de tailles optimales de nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées par voie aqueuse (**Article II-2**). Nous avons en effet déterminé que pour cette synthèse, les nanoparticules de 22 nm de diamètre étaient les plus efficaces aux conditions de champ appliqué en traitement sur patients (100 kHz et 20 mT). Ces protocoles d'analyses de propriétés d'échauffement ont également été exploités au profit d'autres travaux qui ont donné lieu à plusieurs publications. Le projet Multifun prévoyant également l'application du traitement d'hyperthermie magnétique *in vivo*, nous avons conçu une installation adaptable pour des traitements sur le petit animal permettant de générer un champ magnétique haute fréquence pour des durées d'une heure et à une amplitude de champ maximum de 23 mT.

Afin de pouvoir réaliser des expériences *in vitro*, nous avons développé un protocole basé sur l'utilisation d'un inducteur commercial permettant d'appliquer un champ magnétique de 300 kHz avec une amplitude variable. Nous avons obtenu des pourcentages de mort cellulaire significatifs au moyen de nanoparticules d'oxydes de fer commerciales à très faibles SAR et sans augmentation perceptible de température. Ces résultats ont soulevé la question des mécanismes réels responsables de la mort cellulaire et il est alors apparu comme nécessaire de pouvoir observer les réponses métaboliques en temps réel pendant le traitement.

Dans cette optique, un électroaimant à entrefer micrométrique, placé directement dans une boîte de culture cellulaire, a été développé. Il est compatible avec l'utilisation d'un microscope confocal à fluorescence. Le large panel de fluorochromes disponibles nous a permis d'effectuer un suivi d'événements intracellulaires pendant et après le temps de traitement. Nous avons ainsi identifié une production de ROS amplifiée dans les cellules cancéreuses contenant des nanoparticules lors de l'application du champ. Il a été également montré grâce à ce suivi dynamique que la perméabilisation lysosomale est un événement précoce survenant dans les 30 min après le début de l'application du champ. La qualité de cet inducteur a également été validée par l'obtention de niveaux de mort cellulaire équivalents aux résultats précédemment obtenus avec l'inducteur commercial.

A la lumière de nos travaux, certains axes d'investigations complémentaires peuvent être envisagés. Premièrement, l'induction de mort cellulaire au moyen de nanoparticules à propriétés d'échauffements très faibles remet en question la hausse de température intracellulaire comme seule possible pour expliquer l'efficacité du traitement. L'objectif de maximisation du SAR pour augmenter l'efficacité du traitement pourrait donc être remis en question. Dans une étude récente, il a été montré que la distribution de puissance dissipée au sein d'un lysosome n'était pas uniforme: il peut en résulter de grandes différences de température entre le centre et les bords du lysosome. Suivant donc que la perméabilisation lysosomale est causée par une hausse de température au plus près de la membrane ou par un phénomène intermédiaire à l'intérieur du lysosome, la tactique d'optimisation du traitement ne sera donc pas la même. De plus, des travaux proposent d'autres explications de nature physique totalement différentes à la mort cellulaire, comme par exemple la génération d'ultrasons par les nanoparticules sous champ magnétique haute fréquence [1]. Il a également été montré que des nanoparticules soumises à des champs magnétiques basse-fréquence génèrent une force mécanique déjà utilisée dans le contrôle de réactions biochimiques (*cf.* les travaux de l'équipe de L. A. Kabanov [2], [3]) ou pouvant détruire des cellules.

Afin de vérifier l'incidence du SAR sur l'efficacité du traitement, il faudrait dans un premier temps varier le type de nanoparticules utilisées pour les expériences *in vitro*. On pourrait ainsi, au même titre que les nanoparticules d'oxydes de fer testées, fonctionnaliser et utiliser des particules de Fer [4] ou de carbure de Fer [5] possédant des valeurs des SAR bien plus importantes.

Il serait également intéressant de coupler l'emploi de différents nano-objets avec des mesures de température dans l'environnement nanométrique des nanoparticules en greffant des fluorochromes thermosensibles à leur surface. En effet, si la mort cellulaire n'est pas provoquée par une élévation de température globale, elle peut être engendrée par une réponse de la cellule à une hyperthermie localisée aux abords des nanoparticules. Une cartographie de la température au sein des lysosomes nous permettrait de relier le potentiel d'échauffement des nanoparticules au taux de mort cellulaire.

Il est indispensable d'approfondir en parallèle nos observations sur l'apparition des mécanismes responsables de l'apoptose cellulaire. Cela permettrait d'optimiser le traitement dans sa globalité, de la synthèse des nano-objets aux conditions d'applications du champ magnétique. Nous pourrions par exemple, au moyen de notre électroaimant miniaturisé, chercher à localiser les sites de production de ROS au niveau intracellulaire. Bien sûr, ces investigations doivent être étendues à tout mécanisme susceptible d'être induit par le traitement d'hyperthermie magnétique et d'entraîner la mort.

Nous avons également montré que des nanoparticules bimétalliques composées d'un cœur de Fe (0) et d'une fine couche de métal catalytique (cobalt ou ruthénium) permettaient de catalyser l'hydrogénation du CO en phase gazeuse lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique alternatif à haute fréquence. Nous avons montré une corrélation entre les valeurs de SAR des échantillons et le rendement des produits de la réaction Fisher-Tropsch. Nous avons également montré l'efficacité supérieure du Ruthénium sur le rendement catalytique. Au cours de l'application du champ, les catalyseurs peuvent subir des dégradations importantes. Nous avons par exemple constaté dans certains cas une diffusion de carbone produit par la décomposition du CO au sein des nanoparticules de fer. Des mesures de cycles d'hystérésis haute-fréquence pendant la réaction ont mis en lumière une nette baisse de l'aire d'hystérésis au cours du temps qui pourrait être liée à cette intrusion de carbone ou à une évolution morphologique du catalyseur, entraînant une modification des propriétés magnétiques des nanoparticules de fer. De plus, les valeurs de SAR relevées après catalyse montrent clairement une baisse du pouvoir d'échauffement. Même si nous sommes encore loin de l'application industrielle, ces travaux montrent que l'utilisation de nanoparticules bimétalliques est prometteuse en tant que catalyseurs de réactions hétérogènes.

Afin de poursuivre cette étude, nous pourrions étudier l'incidence du choix de métal catalytique, et des propriétés intrinsèques des nanoparticules de fer de manière découplée.

Pour cela, il faudrait systématiser la variation du type de catalyseur sur des nanoparticules de fer provenant du même lot, comme cela a été montré pour un exemple. La difficulté est qu'il n'était possible au cours de cette thèse de synthétiser qu'une quantité réduite de nano-objets par lot. Des travaux en cours visent à s'affranchir de cette limitation. Pour se rapprocher des conditions de production industrielle, un réacteur à flux continu couplé à un spectromètre de masse est en cours de conception au laboratoire. Il devrait permettre de rendre systématique le suivi des cycles d'hystérésis *in situ* à différents temps de réaction et ainsi relier l'efficacité de la réaction et la sélectivité des produits aux propriétés des matériaux catalytiques. La mise en place d'un tel dispositif nécessitera bien sûr en amont une optimisation des nanoparticules afin que leurs propriétés catalytiques soient conservées le plus longtemps possible sous application d'un champ magnétique. Un meilleur contrôle du phénomène passe ici par la maîtrise de la température de surface des nanoparticules. Des études théoriques ou expérimentales mettant en lumière la distribution de température aux abords de la surface des catalyseurs nous permettraient d'ajuster les synthèses d'objets et les conditions de champs appliqués pour améliorer le rendement de la réaction.

Ainsi, il apparaît que la compréhension de la diffusion de chaleur à l'échelle nanométrique dans les nanoparticules magnétiques chauffées par un champ magnétique alternatif est un point essentiel pour progresser dans les deux domaines qui ont été abordés au cours de cette thèse.

- [1] J. Carrey, V. Connord, and M. Respaud, "Ultrasound generation and high-frequency motion of magnetic nanoparticles in an alternating magnetic field: Toward intracellular ultrasound therapy?," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 102, no. 23, p. 232404, Jun. 2013.
- [2] Y. I. Golovin, N. L. Klyachko, M. Sokolsky-Papkov, and A. V. Kabanov, "Single-domain magnetic nanoparticles as force generators for the nanomechanical control of biochemical reactions by low-frequency magnetic fields," *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.*, vol. 77, no. 11, pp. 1350–1359, Nov. 2013.
- [3] Y. I. Golovin, N. L. Klyachko, D. Y. Golovin, M. V. Efremova, A. A. Samodurov, M. Sokolski-Papkov, and A. V. Kabanov, "A new approach to the control of biochemical reactions in a magnetic nanosuspension using a low-frequency magnetic field," *Tech. Phys. Lett.*, vol. 39, no. 3, pp. 240–243, Mar. 2013.
- [4] L.-M. Lacroix, "Nanoparticules de fer de taille contrôlée pour l'hyperthermie : Synthèse par voie organométallique, caractérisations magnétiques et mesures de puissance dissipée," INSA Toulouse, LPCNO, 2008.
- [5] A. Meffre, B. Mehdaoui, V. Kelsen, P. F. Fazzini, J. Carrey, S. Lachaize, M. Respaud, and B. Chaudret, "A Simple Chemical Route toward Monodisperse Iron Carbide Nanoparticles Displaying Tunable Magnetic and Unprecedented Hyperthermia Properties," *Nano Lett.*, vol. 12, no. 9, pp. 4722–4728, Sep. 2012.

Heating of nanoparticles under a high frequency magnetic field: Applications in oncology and Fischer-Tropsch reaction catalysis

As partners of Multifun by which this thesis was funded, we have worked with European groups of chemists to provide iron oxide nanoparticles dedicated to the detection and treatment of cancer by magnetic hyperthermia. Usually, the nanoparticles efficiency is determined by the SAR value (Specific Absorption Rate, in W / g), measured by a calorimetric method. We have developed a device for measuring hysteresis loops at the same amplitude and frequency range of magnetic fields than those usually used in magnetic hyperthermia. Hysteresis loops provide more information about the samples and allows for example to assess the importance of inter-particle interactions. Multifun project also included the study of *in vivo* treatments. LPCNO has developed an inductor suitable for experiments on small animals (mice, rats). The electromagnet is air-cooled, displays a gap of 3 cm and operates at a field of 23 mT during one hour.

We also worked with the *Laboratoire de Réceptologie et Ciblage Thérapeutique en Cancérologie*, Toulouse, to perform *in vitro* magnetic hyperthermia experiments using functionalized nanoparticles specifically internalized into lysosomes. The application of a high frequency magnetic field to the cells containing these nanoparticles induces a significant cell death (mainly apoptotic pathways). In these studies, the nanoparticles have low SAR, and are present in small quantities in the cells. Thus no temperature rise is measured during the experiments. The efficacy of treatment in these conditions poses many questions about the actual mechanisms at the origin of cell death. To try to answer these questions, we have designed a setup permitting to apply high frequency magnetic fields under a confocal fluorescence microscope; the latter is commonly used to monitor intracellular mechanisms with fluorochromes. We introduce a miniaturized solenoid (gap width $\approx 400 \mu\text{m}$) directly into a cell culture box. This generates a field of approximately 60 mT at 300 kHz. This method allows us to observe the cells and their organelles during the time of treatment. Infected cell death levels here are equivalent to the previous experiments, which thus validates the use of this reduced gap inductor. For now, we quantified the appearance of ROS (Reactive Oxygen Species) in real time in the cell during the application of the field. We also evidenced the lysosomal permeabilization, which can cause the release of cellular death agents. Finally this tool will serve to continue research on intracellular mechanisms in cells inside an external high-frequency magnetic field.

Nanoparticles subjected to an alternating magnetic field can also be used as catalysts of chemical reactions. We used the nanoparticles synthesized LPCNO as catalysts for the Fischer-Tropsch reaction. This process allows the industrial production of hydrocarbons from carbon monoxide and hydrogen gas. Extensive characterizations of structural, magnetic, heating and catalysis properties were carried out on nanoparticles with an iron core coated with a catalytic metal (ruthenium or cobalt). Evidence that these nanoparticles catalyze the Fischer-Tropsch synthesis when subjected to a high-frequency magnetic field has been established, and a good correlation between their heating power and their catalytic activity has been shown.

Echauffement de nanoparticules par un champ magnétique haute fréquence : Applications en cancérologie et catalyse de réaction Fischer-Tropsch

Dans le cadre du projet MultiFun par lequel cette thèse a été financée, nous avons travaillé en collaboration avec des équipes européennes de synthèse chimique pour proposer des nanoparticules d'oxydes de fer dédiées à la détection et au traitement du cancer par hyperthermie magnétique. Habituellement, l'efficacité des nanoparticules est déterminée par la valeur du SAR (*Specific Absorption Rate*, en W/g), mesurée par élévation de température. Nous avons développé un banc permettant la mesure de cycles d'hystérésis dans les mêmes gammes d'amplitudes et de fréquences de champs magnétiques que celles actuellement utilisées en hyperthermie magnétique. Le cycle d'hystérésis fournit plus d'informations sur l'échantillon et permet par exemple d'évaluer l'importance des interactions inter-particulaires. Le projet MultiFun prévoyait également l'étude du traitement *in vivo*. Le LPCNO a donc développé un inducteur adapté aux expériences sur le petit animal (souris, rats). Cet électroaimant refroidit à l'air à un entrefer de 3 cm et fonctionne à un champ de 23 mT pour des temps de traitements d'une heure.

Nous avons également collaboré avec le Laboratoire de Réceptologie et Ciblage Thérapeutique en Cancérologie pour effectuer des expériences d'hyperthermie magnétique *in vitro* au moyen de nanoparticules fonctionnalisées puis internalisées de manière spécifique dans les lysosomes. L'application d'un champ magnétique haute fréquence aux cellules contenant ces nanoparticules induit de forts pourcentages de mort cellulaire (principalement par voies apoptotiques). Dans ces travaux, les nanoparticules ont de faibles SAR et sont présentes en faibles quantités dans les cellules, ce qui n'engendre pas d'élévations de températures mesurables. L'efficacité du traitement dans ces conditions pose nombre de questions quant aux mécanismes réels entraînant la mort de la cellule. Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons conçu un système permettant d'appliquer des champs magnétiques hautes fréquences *in vitro* sous un microscope confocal à fluorescence couramment utilisé pour suivre des mécanismes intracellulaire à l'aide de fluorochromes. On introduit un électroaimant miniaturisé (largeur d'entrefer $\approx 400 \mu\text{m}$) directement dans une boîte de culture cellulaire. On génère ainsi un champ d'environ 60 mT à 300 kHz. Cette méthode nous permet d'observer les cellules et leurs organites durant le temps de traitement. Les niveaux de mort cellulaire atteints ici sont équivalents aux expériences précédentes, et valident ainsi l'utilisation de cet inducteur à entrefer réduit. Pour l'heure, nous avons quantifié l'apparition en temps réel des ROS (*Reactive Oxygen Species*) dans la cellule lors de l'application du champ. Nous avons également mis en lumière la perméabilisation lysosomale, qui peut engendrer la libération d'agents de mort cellulaires. Enfin cet outil permettra de continuer les recherches de mécanismes intracellulaires pour des échantillons soumis à un champ magnétique extérieur.

Les nanoparticules soumises à un champ magnétique alternatif peuvent également être utilisées comme catalyseurs de réactions chimiques. Nous avons utilisé les nanoparticules synthétisées au LPCNO comme catalyseurs de la réaction Fischer-Tropsch. Ce procédé permet de produire industriellement des hydrocarbures à partir de monoxyde de carbone et de dihydrogène. Des caractérisations poussées des propriétés structurales, magnétiques, d'échauffement et de catalyse ont été menées sur des nanoparticules possédant un cœur de fer recouvert d'un métal catalytique (ruthénium ou cobalt). La preuve que ces nanoparticules peuvent catalyser la réaction de Fischer-Tropsch lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique haute-fréquence a été établie, et une bonne corrélation entre leur puissance de chauffe et leur activité catalytique a été montrée.