HAL
open science

Destruction de cellules cancéreuses par vibrations magnéto-mécaniques de micro/nano particules magnétiques : Elaboration des particules par approche top-down, biofonctionnalisation et tests in-vitro

Selma Leulmi-Pichot

▶ **To cite this version:**

Selma Leulmi-Pichot. Destruction de cellules cancéreuses par vibrations magnéto-mécaniques de micro/nano particules magnétiques : Elaboration des particules par approche top-down, biofonctionnalisation et tests in-vitro. Physique [physics]. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENY063 . tel-01466737

HAL Id: tel-01466737

https://theses.hal.science/tel-01466737v1

Submitted on 13 Feb 2017

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 DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physique pour les sciences du vivant**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

« Selma LEULMI- PICHOT»

Thèse dirigée par « **Bernard DIENY** »
codirigée par « **Hélène JOISTEN** »

Préparé au sein du laboratoire SPINTEC
Dans l'école doctorale de physique

Destruction de cellules cancéreuses par vibrations magnéto-mécaniques de micro/nano particules magnétiques: Elaboration des particules par approche top-down, biofonctionnalisation et tests in vitro.

Thèse soutenue publiquement le « **06 octobre 2014** »,
devant le jury composé de :

M, Franz, BRUCKERT
Professeur Grenoble INP, Président
M, Igor, CHOURPA
Professeur Université François Rabelais, Tours, Rapporteur
M, Julian, CARREY
Directeur de recherche INSA, Toulouse, Rapporteur
Mme, Véronique, DUPUIS
Directrice de recherche Université Claude Bernard, Lyon, Examinateur
M, Bernard, DIENY
Ingénieur Chercheur CEA, Directeur de thèse.
Mme, Hélène, JOISTEN
Ingénieur Chercheur CEA, Co-Directrice de thèse.

Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France /
Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes ayant contribué à la réalisation de cette thèse.

Merci aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer les travaux menés au cours de cette thèse, le président du jury Mr Bruckert, Mr Chourpa et Mr Carrey en tant que rapporteurs et Mme Dupuis en tant qu'examinatrice.

Bonne lecture !

Résumé

Dans les prochaines années, le traitement des maladies graves (cancer, pathologies du cerveau, etc) pourrait fortement bénéficier des progrès en science des matériaux et des nanotechnologies. Du point de vue médical, il est bien connu que les cellules cancéreuses ont tendance à développer des résistances aux chimiothérapies dont les effets secondaires limitent considérablement l'efficacité des traitements. Pour ces raisons, la recherche de thérapies alternatives ciblant les cellules cancéreuses sans affecter les tissus sains est actuellement l'un des domaines les plus actifs de recherche sur le cancer. Dans ce contexte, les nanoparticules magnétiques reçoivent un intérêt croissant pour diverses applications biomédicales allant du diagnostic au traitement ciblé. Grâce à leur possibilité d'actionnement contrôlé à distance par des champs magnétiques externes, les particules magnétiques ont la capacité d'exercer des forces ou couples localisés sur des espèces biologiques ciblées.

Ce travail de thèse décrit une approche basée sur l'action mécanique de particules magnétiques bio-fonctionnalisés sur des cellules cancéreuses. Lorsque ces particules sont liées aux cellules cancéreuses, l'application d'un champ magnétique alternatif externe induit l'oscillation des particules, qui transmet alors une force mécanique aux cellules cancéreuses.

Les particules magnétiques utilisées pour cette application ont fait l'objet d'un long développement. Contrairement aux particules magnétiques conventionnelles synthétisées par des voies chimiques (« bottom-up »), les particules étudiées dans cette thèse ont été spécialement conçues par des techniques développées pour la micro/nanoélectronique (« top-down »). Ainsi, deux types de particules magnétiques ont été comparés ; des particules antiferromagnétiques synthétiques (SAF) constituées d'empilements de couches magnétiques minces et des microparticules constituées d'une couche magnétique unique avec une configuration de vortex magnétique.

Une fois ces particules mises en solution, les phénomènes d'auto-polarisation qui contribuent à l'agglomération / dispersion de ces particules par les interactions magnétostatiques ont été comparés, ainsi que les couples mécaniques que ces deux types de particules magnétiques peuvent générer sur les cellules cancéreuses lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique externe. Bien que les particules SAF génèrent de plus grands couples, remplacer les constituants de l'empilement magnétique par des matériaux biocompatibles reste délicat, ce qui n'est pas le cas de leurs homologues en vortex magnétique, facilement réalisables avec des oxydes de fer.

En exploitant les propriétés des vortex magnétiques en NiFe, nous avons développé une approche pour la destruction ciblée des cellules cancéreuses du carcinome rénal humain. Les tests menés *in-vitro* montrent que ce stimulus magnéto-mécanique induit une diminution significative du taux de cellules cancéreuses vivantes, et ce, en appliquant de faibles valeurs de champs (30mT) à de très faibles fréquences (~ 20 Hz). Des études pour la quantification et la caractérisation de la mort cellulaire par la cytométrie en flux ont été menées. Les résultats déjà obtenus bien qu'au stade « preuve de concept » sont très encourageants pour le futur des nouvelles thérapies du cancer.

Abstract

In the coming years, the treatment of serious diseases (cancer, brain diseases, etc.) could benefit more intensely from advances in materials science and nanotechnology. From the medical point of view, it is well known that cancer cells tend to develop resistance to chemotherapy, and the side effects encountered seriously limit the effectiveness of treatments. For these reasons, the search for alternative therapies that target cancer cells without affecting healthy tissues is currently one of the most active areas of research on cancer. In this context, magnetic nanoparticles are receiving an increasing interest in a variety of applications ranging from biomedical diagnostic to targeted treatments. Indeed, due to their remote actuation by external magnetic fields, the magnetic particles have the ability to locally perform actuations on targeted biological species.

This thesis describes an approach based on interfacing cancer cells with bio-functionalized magnetic particles. When these particles are bound to the cancer cells, applying an external alternating magnetic field induces the particles oscillations, which then transmits a mechanical stress to the cancer cells.

For this application, specific magnetic particles were prepared. Unlike conventional magnetic particles made by chemical routes ("bottom-up"), the particles studied in this thesis have been specially designed by techniques used in micro / nanoelectronics ("top-down"). Thus, two types of magnetic particles were compared; synthetic antiferromagnetic particles (SAF) consisting of magnetic multilayer stacks and microparticles consisting of a single magnetic layer with a magnetic vortex configuration.

Once these particles released in a solution, the self-polarization phenomenon that contributes to the agglomeration / dispersion of these particles by magnetostatic interactions were compared for both types of particles as well as the mechanical torques that they can exert on cancer cells when subjected to an external magnetic field.

Although SAF particles generate higher torques, finding biocompatible materials that may replace the constituents of the magnetic stack remains difficult, while vortex-particles would be easier to make in magnetic iron oxides.

By exploiting the properties of NiFe magnetic vortices, we have developed an approach for the targeted destruction of the human renal carcinoma cells. The tests launched in vitro show that the magneto-mechanical stimulus creates two dramatic effects: a significant decrease in the rate of alive cancer cells, and the initiation of the apoptosis (programmed cell death). These results were achieved by applying low field values (~30mT) at low frequencies (~ 20 Hz). Studies for the quantification of cell death by flow cytometry were conducted. The results already obtained even at the stage of "proof of Concept" are very encouraging for new perspectives of cancer therapies.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE **8**

CHAPITRE 1. GENERALITES SUR LES PARTICULES MAGNETIQUES POUR APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES **15**

1.1 ETAT DE L'ART 15
1.2 PARTICULES MAGNETIQUES PREPAREES PAR APPROCHE « TOP-DOWN » 18
1.2.1 Particules antiferromagnétiques synthétiques *20*
1.2.2 Particules en vortex magnétique. *23*
1.3 BIOFONCTIONNALISATION DE SURFACE DES PARTICULES MAGNETIQUES 27
1.3.1 Stratégies de modifications chimiques des surfaces des particules magnétiques *28*
1.4 UTILISATION DES PARTICULES MAGNETIQUES DANS LE TRAITEMENT DES TUMEURS 30
1.4.1 Généralités sur les cellules cancéreuses *33*
1.4.2 Traitement des tumeurs par l'hyperthermie magnétique *35*
1.4.2.1 Technologie de l'hyperthermie induite 36
1.4.3 Traitement des tumeurs par vibrations magnéto-mécaniques *38*

CHAPITRE 2. SYNTHESE ET CARACTERISATION DES PARTICULES VORTEX ET ANTIFERROMAGNETIQUES SYNTHETIQUES, ETUDE COMPARATIVE LEURS PROPRIETES MAGNETIQUES. **42**

2.1 PROCEDES DE FABRICATION DEVELOPPES EN SALLE BLANCHE 42
2.1.1 Procédé par bi-couche de résine *42*
2.1.2 Procédé par tri-couches de résines (2 résines sacrificielles) *46*
2.1.3 Procédé de fabrication des particules au sommet des plots de résine *47*
2.1.4 Procédé de fabrication des particules SAF par gravure ionique (IBE) *50*
2.1.5 Procédé de réalisation des particules SAF par gravure isotrope du silicium *51*
2.2 NATURES DES PARTICULES MAGNETIQUES RETENUES POUR LE RESTE DE L'ETUDE AVEC LE PROCEDE DE FABRICATION CORRESPONDANT 52
2.3 COMPARAISON DES PROPRIETES DES PARTICULES SYNTHETIQUES ANTIFERROMAGNETIQUES ET EN VORTEX 55
2.3.1 Caractérisation magnétique *55*
2.3.2 Etude comparative des susceptibilités seuil en relation avec le phénomène d'agglomération des particules SAF et vortex. *59*
2.3.3 Comparaison des couples générés par les particules SAF et vortex. *62*
2.4 CONCLUSION 65

CHAPITRE 3 : FONCTIONNALISATION DES PARTICULES MAGNETIQUES **68**

3.1 AUTO-ASSEMBLAGE DES THIOLS SUR LES SURFACES D'OR 68
3.2 ACTIVATION DES GROUPEMENTS CARBOXYLIQUES DE SAMS 71
3.3 CARACTERISATION DE LA FORMATION DU SAM PAR LA MICROSCOPIE A FLUORESCENCE 73
3.4 L'IMMOBILISATION DES ANTICORPS 75
3.4.1 Mise en évidence de l'immobilisation des anticorps sur SAM *75*
3.4.2 Maintien de la fonction de reconnaissance des anticorps *77*

CHAPITRE 4. TRAITEMENT DES CELLULES CANCEREUSES PAR LES VIBRATIONS MAGNETO-MECANIQUES **80**

4.1 INTRODUCTION 80

4.2 CULTURE CELLULAIRE 80
4.3 PROPRIETES ANTIGENIQUES DE LA LIGNEE CELLULAIRE SKRC-59 82
4.3.1 Anhydrase carbonique IX 82
4.3.2 Mise en évidence de l'AC9 sur les membranes cellulaires 83
4.3.2.1 Immunohistochimie 83
4.3.2.2 Cytométrie en flux 86
4.4 TEST DE CYTOTOXICITE MTT 88
4.5 THERAPIE ANTI-CANCEREUSE PAR LES VIBRATIONS MAGNETO-MECANIQUES DES MICRO-VORTEX FONCTIONNALISES ET CARACTERISATION DE LA MORT CELLULAIRE IN VITRO 89
4.5.1 Principe de marquage des indicateurs de la mort cellulaire 90
4.5.2 Préparation des échantillons 92
4.5.3 Dispositifs d'application du champ magnétique alternatif 93
4.5.4 Mise en vibration des particules liées aux cellules et observation de l'effet du traitement au microscope optique 95
4.5.5 Analyse par cytométrie en flux, adaptation du traitement et résultats statistiques 97
4.5.6 Commentaires et Interprétation 102
4.6 CONCLUSION 103

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 105

REFERENCES 109

ANNEXE 1. DEVELOPPEMENT DES PROCEDES DE FABRICATION DES PARTICULES SAF. 115

ANNEXE 2. ETUDE DES RUGOSITES DE SURFACES LIEES A L'AGGLOMERATION DES PARTICULES SAF 130

ANNEXE 3. OBSERVATIONS PAR MICROSCOPIE A FLUORESCENCE DES CELLULES SOUMISES AU STIMULUS MAGNETO-MECANIQUE. 136

Table des abréviations

AFM : Atomic Force Microscopy

CA9 : Carbonic Anhydrase 9

EDC: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide

FITC : Fluorescein isothiocyanate

IBE: Ion Beam Etching

IP: Iodure de Propidium

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MFM: Magnetic Force Microscopy

NHS: N-Hydroxysuccinimide

NiFe : Nickel Fer (Permalloy)

PBS: phosphate buffered saline

PE: Phycoérythrine

PMMA: poly(méthacrylate de méthyle)

PS : Phosphatidyl sérine

RKKY: Ruderman-Kittel-Kasuya-Yoshida

SAF: Synthetic AntiFerromagnetic

SAM: Self-Assembled Monolayer

SPIONs : Superparamagnetic iron oxydes nanoparticles.

Introduction générale

Les nanoparticules magnétiques sont d'un grand intérêt aujourd'hui dans plusieurs disciplines; le stockage magnétique d'information, la catalyse, l'environnement, les biotechnologies et la médecine. Des générations de nanoparticules se sont succédé au fur et à mesure des avancées technologiques, de multiples voies de synthèse ont été mises au point accompagnées du développement de méthodes pour la modification de la chimie de surface de ces nanoparticules.

Les particules magnétiques sont de plus en plus présentes dans le diagnostic biomédical *in vitro*, ces particules sont utilisées principalement pour la séparation, le transport, et la concentration des biomolécules recherchées dans l'échantillon biologique analysé.

Parmi les applications mettant en œuvre les particules magnétiques dans le diagnostic biomédical, sont référencées dans la littérature : le tri cellulaire basé sur l'utilisation de particules magnétiques fonctionnalisées avec des anticorps spécifiques aux cellules recherchées, le diagnostic moléculaire dont l'objectif principal est d'extraction des acides nucléiques d'un milieu complexe, et la détection des bactéries pathogènes.

En plus du diagnostic *in vitro*, soigner avec le magnétisme suscite beaucoup d'intérêt depuis les temps anciens, mais le magnétisme n'a réellement pris son essor dans le monde médical que depuis l'invention de l'IRM (Imagerie à Résonnance Magnétique) qui exploite et met en relief le magnétisme nucléaire des tissus biologiques pour l'imagerie.

En médecine, l'intérêt d'utiliser les nanoparticules magnétiques réside en la possibilité de les manipuler à distance de façon non invasive par l'application de champs magnétiques extérieurs. Les nanoparticules sont très intéressantes pour la médecine régénérative, en effet, les thérapies cellulaires actuelles se heurtent à une limitation majeure de la migration des cellules à fonctionnalité thérapeutiques du site lésé. L'utilisation du magnétisme par l'intermédiaire de cellules à fonctionnalité thérapeutiques fonctionnalisées avec des particules magnétiques, et d'un champ magnétique permettant leur accumulation apporterait un intérêt considérable au succès de la thérapie. Dans ce cadre, l'attraction magnétique des cellules a été exploitée dans le domaine cardiovasculaire où des cellules progénitrices endothéliales ont été retenues par des champs magnétiques puis implantées avec succès au niveau des lésions présentes dans un tissu cardiaque [1]. Dans la même idée, des stents magnétisables ont été développés pour la régénération cellulaire [2].

Toujours par la même approche en médecine régénérative, des travaux de construction de tissus fonctionnels *in vitro* ont été menés, notamment pour générer des tapis cellulaires utilisables comme substituts de rétine [3].

Les thérapies basées sur la stimulation de nano-éléments magnétiques, peuvent apporter de grands avantages aux traitements actuellement proposés, bénéficiant ainsi pleinement des avancées en sciences des matériaux et des nanotechnologies. Grâce à leurs propriétés uniques, les nanoparticules magnétiques peuvent répondre en partie aux problématiques des thérapies actuelles qui sont le ciblage d'un traitement efficace et la limitation des effets secondaires.

De récentes études ont utilisé l'activation nano-magnétique de récepteurs membranaires dans des applications comme l'ingénierie tissulaire, le contrôle de la différentiation des cellules souches pour la médecine régénérative [4,5], le contrôle de la signalisation calcique intracellulaire [6], ou encore le déclenchement des potentiels d'action par l'activation thermique des canaux ioniques dans les neurones en culture [7]. Dans la plupart des études précédentes, l'actionnement nano-magnétique s'appuie sur des forces de translation générées par des gradients de champs magnétiques élevés, or de nouvelles approches ont démontré que, plutôt que de recourir à la force magnétique du gradient de champ 'tirant' sur les particules qui décroit très rapidement avec la distance de l'aimant, il est possible d'activer efficacement les particules magnétiques avec des sources de champ [8]. Ces techniques permettent d'atteindre des zones beaucoup plus profondes dans le corps et d'actionner les récepteurs à plus grande distance de la source de champ. Les champs magnétiques sont prometteurs pour la stimulation véritablement dite à distance parce qu'ils interagissent faiblement avec des molécules biologiques et peuvent pénétrer profondément dans le corps. Cependant, leur faible interaction avec les molécules biologiques signifie aussi que les champs magnétiques doivent être traduits en un autre stimulus comme une force mécanique, un couple ou encore une agrégation des particules permettant d'agir sur leur cible, par exemple, pour exercer une force ou transmettre de l'énergie aux particules attachées à un récepteur cellulaire de surface.[9]

En plus de l'hyperthermie qui consiste à chauffer localement des SPIONS (*Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles)* par des champs magnétiques alternatifs, une étude [10] a démontré que des champs magnétiques peuvent être utilisés pour induire l'apoptose des cellules du cancer du côlon en culture, et ce, par l'agrégation des particules SPIONS fixées aux récepteurs

de mort DR4 à la surface cellulaire (DR4 est un récepteur qui induit une apoptose lorsque plusieurs récepteurs DR4 à la surface cellulaire sont regroupés). En d'autres termes, l'agrégation à commande magnétique des récepteurs DR4 active une voie de signalisation de l'apoptose biochimique, qui tue les cellules cancéreuses du côlon.

Le phénomène de l'apoptose étant un élément très important dans les thérapies contre le cancer, une seconde étude [11] , que nous évoquerons au cours de cette thèse comme point de départ de notre application biologique, a montré comment conférer cette propriété à des cellules cancéreuses, connues pour avoir perdu la faculté de mourir naturellement. Dans cette approche, des micro-disques magnétiques fonctionnalisés ont été liés aux membranes des cellules d'un glioblastome humain, puis soumis à des champs magnétiques alternatifs qui les font vibrer (osciller) à la surface des cellules cancéreuses. Le stress magnéto-mécanique généré est transformé en signal chimique intracellulaire qui déclenche une des voies de signalisation de l'apoptose. Ce phénomène remarquable a été découvert et étudié au Laboratoire Argonne, publié en 2010[11] pour la première fois. En utilisant d'autres lignées cellulaires, une partie de ce travail de thèse a été consacré à démontrer la possibilité de détruire ces cellules cancéreuses avec une approche similaire, ajoutant une quantification de l'effet antinéoplasique associé.

Concernant les méthodes de fabrication des nanoparticules magnétiques, bien que les méthodes de synthèse chimique soient les plus utilisées pour la production de petites particules sphériques superparamagnétiques appelées SPIONS (super paramagnetic iron oxydes nanoparticles), elles ne permettent pas la création de structures multicouches avec des formes anisotropes. En revanche, les méthodes de synthèses physiques, telles que la photolithographie ou lithographie par faisceau d'électrons, combinées avec un dépôt physique en phase vapeur, permettent d'obtenir une grande variété de structures magnétiques avec des propriétés magnétiques et des géométries parfaitement contrôlées. Ainsi des particules possédant une anisotropie magnétique de forme sont synthétisées pour être actionnées par des champs magnétiques, de manière à agir sur des entités biologiques par des couples magnéto-mécaniques. C'est le cas des particules SAF (antiferromatiques synthétiques) et vortex étudiées dans cette thèse.

Ce travail de thèse s'est inscrit dans la suite d'une première étude menée dans le cadre du nouvel axe de recherche du laboratoire SPINTEC, consacré au développement et à l'étude des

micro/nano particules magnétiques élaborées par approche « top-down » pour des applications biotechnologiques et biomédicales. Cette précédente étude a été consacrée à la mise au point de procédés de fabrication de ces particules, à leur caractérisation magnétiques, et à l'étude du comportement de ces particules une fois libérées en solution. Une attention particulière a été portée à la réalisation de particules dites synthétiques antiférromagnétiques (SAF) constituées de couches ferromagnétiques couplées antiferromagnétiquement entre elles à travers des couches séparatrices de ruthenium. L'intérêt de ces particules résident dans le fait que leur propriété magnétique imitent celles de particules superparamagnétiques [12].

Il est ressorti de cette étude la possibilité de contrôler l'état d'agglomération ou de dispersion des particules SAF en solution, et l'établissement d'un modèle d'autopolarisation permettant de déterminer un seuil de susceptibilité en dessous duquel les particules passent d'un état aggloméré à un état dispersé.

A la suite de ces travaux, nous avons plus récemment été confrontés à des changements de composition des résines photosensibles utilisées pour la fabrication des particules SAF. Ces modifications ont été à l'origine de l'apparition d'une forte rugosité sur la surface devant recevoir le dépôt magnétique, cette rugosité conduisant à une forte agglomération des particules SAF du fait de l'altération du couplage antiferromagnétique entre les couches magnétiques conduisant à l'existence d'un moment rémanent des particules en champ nul. Après avoir développé divers procédés alternatifs pour la fabrication des particules SAF avec en parallèle une caractérisation des rugosités, nous avons estimé que le procédé permettant d'éliminer la rugosité nécessitait une longue période de développement, non compatible avec les objectifs fixés durant les trois années de thèse. Pour mener à bien notre étude, nous nous sommes intéressés à la fabrication d'autres particules magnétiques monodisperses : les particules en vortex magnétiques.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit constitue l'amorçage de ce nouveau thème de recherche au laboratoire, qui est de développer un nouveau traitement pour la destruction des cellules malignes en utilisant les stimuli magnéto-mécaniques des particules magnétiques. Les objectifs que nous nous sommes fixés dans le cadre de cette thèse ont été la synthèse de particules magnétiques monodisperses par la voie «top-down» et leur caractérisation magnétique, la définition de la lignée cellulaire à expérimenter, la mise en place d'un schéma de biofonctionnalisation des particules magnétiques avec l'anticorps adéquat, et le développement du protocole de traitement des cellules malignes par les vibrations magnéto-

mécaniques des micro-vortex, avec la mise en évidence et la quantification de l'action antinéoplasique du stimulus magnéto-mécanique.

Ce mémoire résume un travail de thèse pluridisciplinaire et transversal en physique-chimie-biologie. Afin de décrire au mieux les résultats obtenus suivants les différents objectifs visés, ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres:

- Le premier chapitre présente l'état de l'art sur les travaux référencés dans la littérature sur la synthèse des particules magnétiques, par la voie chimique conventionnelle et par les nouvelles méthodes « top-down », les propriétés magnétiques des particules élaborées par les différentes voies de synthèse. Sera abordé aussi l'état de l'art des différentes stratégies de fonctionnalisation de surface des particules et enfin, leur utilisation dans le domaine biomédical et particulièrement dans le traitement des tumeurs.
- Le second chapitre est centré sur les particules antiferromagnétiques synthétiques et en vortex élaborées par la voie « top-down ». En premier lieu, nous détaillerons les procédés de fabrication développés en salle blanche pour la réalisation de ces particules, ces procédés de fabrication étant modifiés ou ajustés en fonction des contraintes liées aux configurations magnétiques des particules. Ensuite, après l'étude des propriétés des deux types de particules SAF et vortex, nous présenterons une étude comparative entre ces deux types de particules, notamment concernant les phénomènes de dispersion en solution, ainsi que les couples magnétiques que peuvent générer ces particules pour la destruction des cellules cancéreuses [13].
- Les nanoparticules magnétiques en suspension utilisées dans le domaine biomédical sont en règle générale fonctionnalisées, la présence des fonctions chimiques (—NH_2 , —COOH, —SH, —CHO....) à la surface des nanoparticules permet la fixation d'une grande variété de ligands (enzymes, anticorps…). La fonctionnalisation des micro-vortex magnétiques par des ligands spécifiques au biomarqueur tumoral ciblé est détaillée dans le troisième chapitre. Nous décrirons l'étude menée *in vitro* pour la mise en évidence des différentes étapes de fonctionnalisation ainsi que la reconnaissance des micro-vortex magnétiques fonctionnalisés avec les cellules cancéreuses exprimant ce marqueur.
- Le quatrième et dernier chapitre est consacré à l'étude de la destruction des cellules cancéreuses par les vibrations magnéto-mécaniques des micro-vortex fonctionnalisés.

Après avoir détaillé les caractéristiques de la lignée cellulaire cancéreuse utilisée, nous avons décrit le protocole expérimental pour l'interfaçage des particules magnétiques avec les cellules cancéreuses et la mise en place du traitement menant à leur destruction. Les premiers résultats biologiques de l'action antinéoplasique obtenue sont présentés et discutés dans ce chapitre.

- Enfin une synthèse des résultats importants obtenus durant cette thèse est présentée dans la conclusion ainsi que les perspectives à court et long terme à envisager pour la progression des travaux.

A la fin de ce manuscrit sont présentées deux annexes :

La première annexe décrit tous les détails du développement technologique développé pour la fabrication des particules SAF et vortex.

La seconde annexe est consacrée à l'étude menée pour l'élimination de la rugosité apparue au niveau de la résine sacrificielle avant le dépôt magnétique, les divers tests et mesures y sont détaillés. Enfin, les protocoles expérimentaux mis au point pour les tests d'apoptose des cellules cancéreuses par les vibrations magnéto-mécaniques sur les cellules cancéreuses et des résultats additionnels sont détaillés et expliqués dans la troisième annexe.

Cette thèse a été menée au laboratoire SPINTEC spécialisé dans le domaine de la spintronique dont le but est de faire un pont entre la recherche fondamentale et les technologies avancées tournées vers de nouveaux dispositifs dans le champ émergent de l'électronique de Spin. Une grande proportion des travaux ont été menés dans ce laboratoire en particulier la synthèse et la caractérisation magnétique des particules magnétiques. Ce travail de thèse pluridisciplinaire a permis aussi d'initier différentes collaborations, notamment avec des laboratoires du département de l'INAC (Institut Nanosciences et Cryogénie) du CEA de Grenoble présentées ci-dessous :

- Le laboratoire CREAB (Chimie de reconnaissance et des assemblages biologiques) faisant partie du service SPRAM (Structure et propriétés d'architectures moléculaires) où a été développée et réalisée toute la biofonctionnalisation des particules magnétiques.
- Le Laboratoire LAN (Lésions des Acides Nucléiques) faisant partie du service SCIB (Service de Chimie Inorganique et Biologique) où ont été réalisées la culture cellulaire, les expériences d'immunohistochimie et la préparation des échantillons pour la cytométrie

en flux et en général toutes les expériences impliquant l'utilisation des cellules cancéreuses.

Une autre collaboration a aussi été initiée avec le centre hospitalo-universitaire CHU de Grenoble (Laboratoire TIMC-TheREx (UMR 5525 CNRS-UJF), UFR de médecine), en particulier pour la mise à disposition de la lignée cellulaire du carcinome rénal humain et pour les expériences de caractérisation de l'expression de l'antigène membranaire.

Chapitre 1. Généralités sur les particules magnétiques pour applications biotechnologiques

1.1 Etat de l'art

Les nanoparticules présentent des propriétés particulièrement intéressantes en raison de leur rapport d'aspect surface/volume élevé et des effets de taille finie voire quantiques qui apparaissent en réduisant leurs dimensions à des valeurs nanométriques.

Les nanoparticules magnétiques sont d'un grand intérêt aujourd'hui dans plusieurs disciplines; le stockage magnétique d'information, la catalyse, l'environnement, les biotechnologies et la médecine. Des générations de nanoparticules se sont succédé au fur et à mesure des avancées des études, de multiples voies de synthèse ont été mises au point, ainsi que des méthodes de modification de la surface de ces nanoparticules.

Parmi les applications actuelles, le domaine de la nano-médecine attire beaucoup d'attention en raison de la possibilité, grâce aux nanoparticules magnétiques, de cibler les organites ou les cellules à traiter et de ne délivrer le médicament qu'à cet endroit précis.

Bien que la nature du cœur magnétique des particules soit l'élément principal motivant l'utilisation des nanoparticules magnétiques, il est indispensable de savoir que la taille et la morphologie des nanoparticules ont une grande influence sur les propriétés magnétiques de ces dernières. Le contrôle de ces deux paramètres fait depuis longtemps l'objet de très nombreuses recherches menant au développement de nombreuses techniques de synthèse.

Il existe deux grandes voies de synthèse des particules magnétiques ; « bottom-up » et « top-down »

Les méthodes de synthèse bottom-up mettent en œuvre des processus de nucléation et de croissance à partir d'atomes isolés, en transformant chimiquement un précurseur en particules métalliques. Ces techniques sont décrites brièvement dans le paragraphe suivant.

Une des premières méthodes de synthèse est la méthode de co-précipitation, [14]. Elle consiste à faire précipiter en phase aqueuse un mélange stœchiométrique de Fe2+ et Fe3+ par une base. La taille des particules varie en fonction de la cinétique de réaction et varie généralement entre 5 et 20 nm. L'inconvénient majeur de cette technique est l'agrégation des

particules en fin de synthèse même si des améliorations à cette technique ont été rapportées en effectuant la réaction dans des milieux confinés [15] .

Un certain nombre de techniques sont basées sur la décomposition thermique d'un précurseur organométallique. La synthèse a alors lieu dans un solvant organique porté à une haute température d'ébullition. Les nanoparticules obtenues par cette voie sont moins agglomérées que par la co-précipitation du fait de la présence d'une couche organique permettant d'assurer une stabilité de la suspension dans les solvants organiques.

Enfin, à partir de la synthèse de toutes les méthodes de fabrication des nanoparticules magnétiques par la voie bottom up [16], il ressort que la co-précipitation est une méthode simple, mais qui ne permet qu'un faible contrôle de la composition et de la morphologie des nanoparticules. En revanche, la décomposition thermique semble offrir un meilleur contrôle de ces paramètres. Les microémulsions permettent la synthèse de nanoparticules monodisperses mais cette méthode exige une grande quantité de solvant. Finalement peu de bibliographie est disponible sur la synthèse hydrothermale qui reste une méthode relativement peu explorée pour la synthèse de nanoparticules magnétiques.

Des nanoparticules ayant un fort moment magnétique sont d'un grand intérêt pour diverses applications. En effet les particules hautement magnétiques génèrent de forts signaux magnétiques facilement détectables par des capteurs biomagnétiques, et facilitent la manipulation des particules magnétiques par de faibles champs magnétiques extérieurs, notamment pour la séparation par le tri magnétique.

Certains travaux sont consacrés à l'élaboration de sphères magnétiques de volumes plus importants, par l'intégration de nombreuses particules superparamagnétiques dans de grandes matrices [17] de liguant. Cependant cette approche présente des limitations associées au contrôle de la dispersion, des propriétés magnétiques et du nombre de nanoparticules incluses dans une matrice.

L'utilisation des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques dans le domaine biomédical est détaillée dans le paragraphe 1.4.

Les méthodes de synthèse top-down ont récemment vu le jour, basées sur de nouvelles méthodes d'élaboration des particules magnétiques. Ces méthodes sont issues des techniques développées pour la microélectronique, issues de la technologie CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor). Cette voie de synthèse est appelée « top-down » car fondée sur le dépôt de matériaux magnétiques en couches minces recouvrant toute la surface d'un

substrat, sur lequel vont se succéder diverses étapes technologiques conduisant à la formation des nanoparticules. Cette approche « top-down » implique l'utilisation de différentes techniques de lithographie, de pulvérisation cathodique de matériaux, lift-off, etc.

Ainsi, de nouvelles générations de particules magnétiques ont été développées, avec des compositions et des propriétés magnétiques différentes de celles des oxydes de fer communément obtenues par voies chimiques.

L'approche top-down répond aux nouvelles exigences biotechnologiques. En effet, de récents travaux ont démontré la possibilité de fabriquer des nanoparticules de fortes aimantations, sans rémanence, monodisperses, et avec des propriétés magnétiques adaptables, en utilisant les techniques de lithographie [18] ou de nanoimpression [19]. Des empilements de couches ferromagnétiques sont déposés, nanostructurés, suivis de la libération des nanoparticules en solution [18].

Au laboratoire Spintec, ainsi qu'à l'Argonne National Laboratory[6], les études en cours utilisent les techniques de photolithographie - lithographie optique - pour la nanostructuration des particules. Technique bien connue en microélectronique, les formes des particules sont transférées depuis un masque vers le substrat par la création de motifs dans une résine photosensible insolée et développée. Une autre approche de fabrication des particules magnétique a été développée en utilisant la lithographie par faisceau d'ion AAL (Ion beam aperture array lithography) [20]. Dans cette technique, un large faisceau d'ions d'hélium traverse un masque en métal comportant un réseau d'ouvertures circulaires correspondant aux motifs répétés des particules. L'échantillon est insolé par le large faisceau d'ions énergétiques (5-8 keV) servant à écrire les réseaux de motifs répétitifs des particules. Ensuite, les particules sont formées en évaporant du matériau magnétique sur l'échantillon structuré.

Cette approche top-down permet la fabrication d'un premier type de particules, appelées antiferromagnétiques synthétiques (SAF), constituées de couches ferromagnétiques séparées par un matériau non magnétique induisant un couplage antiparallèle entre aimantations des couches ferromagnétiques adjacentes. Ces particules ont une rémanence nulle, et des susceptibilités et moments magnétiques largement plus élevés que ceux des particules superparamagnétiques (susceptibilités des centaines de fois plus grandes).

Un second type de particules magnétiques a été fabriqué. Ces particules possèdent aussi une aimantation à saturation élevée et zéro rémanence, grâce à une configuration en vortex magnétique [21]. Ces particules peuvent également être élaborées par lithographie optique, et

sont composées d'une couche ferromagnétique unique. Elles ont en général une forme de disque dont les dimensions (diamètre et épaisseur) sont choisies pour favoriser la formation du vortex magnétique.

De plus, grâce à l'approche top-down, les particules magnétiques peuvent posséder une anisotropie magnétique importante, en particulier anisotropie de forme due à leur faibles épaisseurs conservant leur aimantation dans le plan, leur permettant d'osciller efficacement sous des champs magnétiques alternatifs de faibles amplitudes [22]. Ceci a ouvert la voie à de nouveaux essais de thérapies anti-cancéreuses [11].

1.2 Particules magnétiques préparées par approche « top-down »

Les particules magnétiques utilisées dans cette thèse ont été élaborées au laboratoire SPINTEC. La fabrication des particules magnétiques a été réalisée dans une des salles blanches du CEA de Grenoble appelée la plateforme technologique amont (PTA). Ci-dessous, nous allons donner un aperçu et des notions générales des techniques utilisées pour l'élaboration des particules.

- **Lithographie:**

La lithographie est utilisée pour reproduire le dessin d'un motif sur un substrat à travers une résine. Il existe des lithographies optiques, électroniques ou par nanoimpression.

Concernant la lithographie optique, un rayonnement lumineux irradie une résine photosensible, traversant un masque portant le modèle des structures que l'on souhaite produire. Cette technique est couramment adaptée à la réalisation de motifs de dimensions minimales de l'ordre du micron ou 0.8 µm.

La lithographie électronique est une lithographie sans masque où un faisceau électronique programmé balaye directement la surface d'une résine électrosensible, et y dessine les motifs souhaités. Cette technique permet d'atteindre des résolutions de l'ordre du nanomètre, mais avec des vitesses d'écriture très lentes.

Une autre technique existe pour lithographier une résine, il s'agit de la nanoimpression [23]. Celle-ci requiert la production non pas d'un masque, mais d'un moule comprenant en relief le motif que l'on cherche à transférer sur le substrat par la pression du relief dans une résine

thermoplastique chauffée. Les résolutions atteintes par cette technique sont fixées par la résolution du moule et il serait possible d'atteindre des dimensions nanométriques.

- **Dépôt de matériaux:**

Les dépôts métalliques sont utilisés dans tous les procédés de réalisation de composants électroniques, de dispositifs microfluidiques et aussi pour des réalisations destinées aux applications biomédicales telles que les biopuces, les biocapteurs ou encore les micro/nanoparticules. Bien qu'il existe une multitude de techniques pour le dépôt des matériaux sur les substrats structurés, nous nous intéresserons dans ce manuscrit aux techniques utilisées pour le dépôt des couches minces utilisées pour l'élaboration des particules magnétiques, à savoir la pulvérisation cathodique et l'évaporation thermique.

La pulvérisation cathodique est basée sur la création d'un plasma d'argon, entre la cible formée du matériau à déposer et située sur la cathode, et le substrat sur l'anode. Les particules énergétiques produites (Ar+) servent à pulvériser la cible sur laquelle se trouve le matériau à déposer. Les ions Ar+ arrachent des atomes de la surface de la cible, dont une partie se condense à la surface du substrat sur l'anode. Le matériau à déposer peut être un alliage, un métal, ou un matériau isolant.

La deuxième technique mise en œuvre pour le dépôt des couches minces est l'évaporation. Elle est réalisée dans une enceinte distincte de celle de pulvérisation cathodique. Le dépôt par évaporation consiste à chauffer par un canon à électron un matériau placé dans un creuset créant ainsi une vapeur atomique. Cette vapeur se condense à la surface du substrat ayant une température moins élevée. Il est possible d'évaporer des métaux, des alliages, des isolants et des matériaux magnétiques.

- **Lift-off**

Ce procédé consiste à immerger l'échantillon dans un solvant afin de dissoudre la résine préalablement structurée, éliminant de ce fait le matériau indésirable déposé sur cette résine, pour ne conserver que les motifs de matériau déposé sur le substrat. Le procédé de fabrication peut également impliquer plusieurs étapes de lift-offs réalisées avec des couches de différentes résines sensibles à différents solvants.

Le procédé que nous avons utilisé comprend deux lift-offs, l'un destiné à structurer les nanoparticules, l'autre destiné à libérer les nanoparticules ainsi formées en solution. Cette

méthode permet de détacher complétement les structures réalisées de leur substrat. Nous reviendrons plus en détail sur notre procédé de fabrication des nanoparticules plus loin dans ce manuscrit.

- **Gravure**

Une des étapes importantes de tout procédé technologique est la gravure, celle-ci consiste à enlever du matériau de l'échantillon. Pour ce faire, deux approches existent ; la gravure humide qui se fait par l'utilisation d'un bain de réactifs chimiques attaquant le matériau à graver. La gravure sèche met en œuvre des plasmas.

Concernant la gravure sèche, celle-ci peut être purement physique comme dans une gravure IBE (Ion Beam Etching) où le matériau à graver est arraché de l'échantillon par l'effet physique du bombardement d'ions fortement énergétiques. Mais souvent, la gravure fait intervenir deux effets complémentaires ; l'interaction entre le matériau à graver avec les espèces réactives générées dans un plasma, et la pulvérisation du matériau par bombardement ionique. Cette gravure est appelée R.I.E. (Reactive Ion Etching en anglais). Les profils de gravure obtenus par RIE peuvent être isotropes (profile semi sphérique résultat d'une gravure dans toutes les directions) ou anisotropes (profils verticaux).

Toutes ces technologies ont été utilisées pour mettre en place le procédé de réalisation des particules magnétiques par voie top-down. Le détail de ces procédés est expliqué dans le deuxième chapitre et en annexe.

1.2.1 Particules antiferromagnétiques synthétiques

Les particules antiferromagnétiques synthétiques (SAF) ont été réalisées à partir d'empilements de couches magnétiques destinés au préalable à des applications très différentes de la biologie et de la médecine. En effet, ces matériaux étaient utilisés dans différents dispositifs d'électronique de spin utilisés notamment dans les technologies de l'enregistrement magnétique, en particulier dans les têtes de lectures pour les disques durs magnétiques ou dans les mémoires magnétiques.

- Généralités sur les matériaux ferromagnétiques et antiferromagnétiques :

Dans un matériau ferromagnétique, des interactions purement quantiques dues aux spins des électrons tendent à aligner les moments magnétiques dans une même direction. Cet arrangement peut se faire spontanément en l'absence d'un champ extérieur H.

Concernant les matériaux antiferromagnétiques, des sous-réseaux de spins sont orientés de manière antiparallèle. Quand la somme des moments parallèles et antiparallèles est nulle, on parle d'antiferromagnétisme. Là encore, il s'agit de matériaux magnétiquement ordonnés, consistant en des réseaux d'aimantation égale, mais de direction opposée. Ces deux configurations sont illustrées sur la Figure 1.

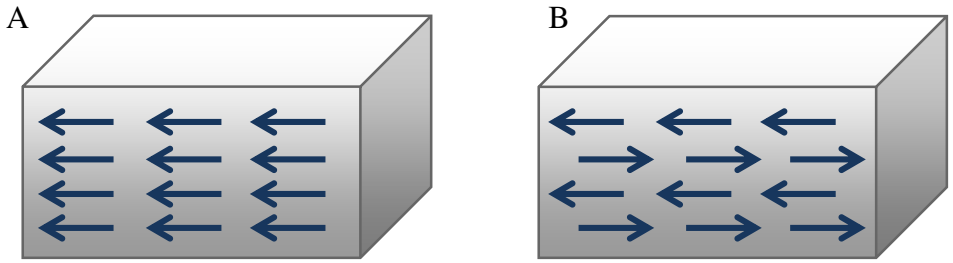


Figure 1. Schéma représentant l'orientation des spins dans (A) un matériau ferromagnétique, ici en configuration monodomaine et (B) un matériau antiferromagnétique.

Les particules SAF sont basées sur des empilements de couches ferromagnétiques [FM] minces séparées par une fine couche de matériau non magnétique [NM] apte à induire un couplage antiparallèle entre les aimantations des couches FM adjacentes. Cette configuration crée artificiellement un matériau antiferromagnétique synthétique. Ces interactions entre couches FM à travers les couches NM sont dues à des phénomènes de polarisation des électrons dans la couche NM au contact des couches FM induisant un couplage de type échange. Plusieurs types de couplage peuvent exister entre deux couches ferromagnétiques séparées par une couche non magnétique. Il s'agit ici d'un couplage de type RKKY (Ruderman-Kittel-Kasuya-Yoshida) [24].

- Couplage RKKY :

Le couplage RKKY est un effet purement quantique. Au contact des couches ferromagnétiques, les électrons de la couche séparatrice non magnétique acquièrent une polarisation en spin. Cette polarisation favorise un alignement des spins des couches

magnétiques en interaction ferromagnétique ou antiferromagnétique. Cette interaction est dépendante de l'épaisseur de la couche séparatrice non magnétique comme montré sur la figure 3 et oscille en décroissant entre ferromagnétique (favorisant un alignement parallèle des aimantations) et antiferromagnétique (favorisant un alignement antiparallèle des aimantations).

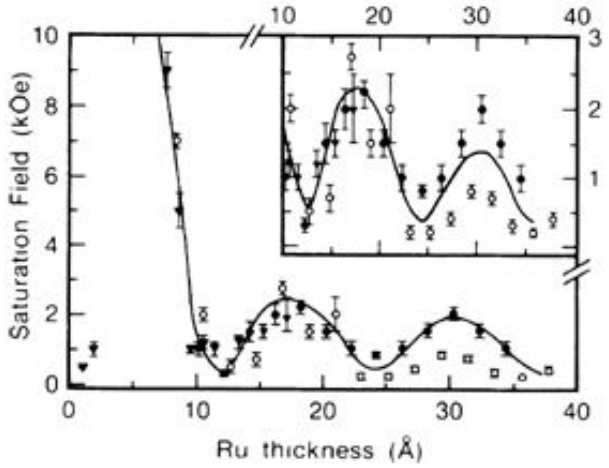


Figure 2. Interaction d'échange RKKY entre deux couches magnétiques de cobalt séparées par une couche non magnétique: le ruthenium. Figure extraite de la référence [25].

Une étude préliminaire réalisée au laboratoire SPINTEC a visé à réaliser des particules SAF, et étudier le phénomène d'agglomération et de dispersion de ces particules SAF, selon leur susceptibilité magnétique [12]. Tout en gardant une sensibilité beaucoup plus élevée que celle des nanoparticules conventionnelles, les phénomènes d'agglomération peuvent être évités en champ magnétique nul.

Une étude, détaillée dans le deuxième chapitre, a montré que le procédé de fabrication des particules SAF est très sensible aux variations de rugosité des surfaces de départ. En effet, une rugosité trop importante peut contrarier la maîtrise de l'épaisseur de l'espaceur [NM] Ru, pouvant affecter le couplage RKKY entre les couches [FM] de NiFe, et provoquer l'apparition d'une aimantation rémanente non nulle qui entraine l'agglomération des particules libérées en solution.

Pour s'affranchir de l'agglomération des particules induite par la forte rugosité, nous avons réalisé des particules avec une configuration en vortex magnétique. Ces nouvelles particules sont constituées d'une couche unique de NiFe relativement moins sensible à cette rugosité,

et de ce fait, les conditions de dispersion de ces particules sont moins drastiques que pour les particules SAF.

1.2.2 Particules en vortex magnétique.

Cette partie a pour objectif la définition des vortex magnétiques, la description de leurs dimensions caractéristiques, leurs propriétés physiques en particulier leur réponse aux champs magnétiques extérieurs.

- **Configurations magnétiques possibles de micro/nanocylindres magnétiques :**

Dans un matériau magnétique doux (à faible champ coercitif), les spins peuvent se disposer de façon à avoir des configurations non uniformes permettant de minimiser l'énergie magnétique totale du système, par une réduction de l'énergie magnétostatique en bouclant le flux magnétique, sans coût trop important en énergie d'échange. Dans des cas de formes et dimensions favorables de la particule magnétique, décrits ci-dessous, ces configurations magnétiques s'agencent en «tourbillons magnétiques» appelés vortex magnétique.
Pour cela, les particules magnétiques sont tout d'abord de dimensions suffisamment petites (par exemple surfaces microniques ou submicroniques), pour ne pas engendrer les configurations en « multidomaines magnétiques » - séparés par des parois-, bien connues pour les échantillons ferromagnétiques.
La visualisation d'un vortex dans des plots circulaires a été observée pour la première fois en l'an 2000 par T.Shinjo [26]. Dans cette étude, l'imagerie MFM (Microscope à Force Magnétique) visualise la structure en vortex de disques minces de permalloy, de diamètres 300 nm à 1 µm et d'épaisseur 50 nm, montrant en leurs centres les cœurs de vortex. En effet dans une structure en vortex, la distribution des spins est en rotation dans le plan avec une fermeture du flux magnétique [27], sauf au centre, où l'aimantation pointe hors du plan. Cette région, appelée cœur du vortex, a un diamètre donné par la longueur d'échange du matériau (longueur caractérisant l'équilibre entre l'énergie d'échange et l'énergie démagnétisante) typiquement de 5 à 10 nm environ pour des matériaux comme le NiFe. L'aimantation macroscopique globale des vortex est quasiment nulle en champ nul, et l'application d'un champ magnétique extérieur n'engendre pas d'hystérésis, tout au moins dans toute une région de champs modérés dans laquelle le vortex se déforme réversiblement sans s'annihiler.

La forme et les dimensions de l'échantillon magnétique sont importantes pour la formation des vortex à champ nul. Le cylindre ou « disque » est la forme propice. Elle est caractérisée par deux dimensions : le rayon et l'épaisseur. Dans le cas d'un disque de rayon R et d'épaisseur L, l'état magnétique stable du disque présente plusieurs configurations magnétiques possibles bien distinctes selon le choix des dimensions et de la géométrie, comme le montre la Figure 3 avec des zones limites où deux configurations cohabitent pour une même géométrie. La configuration en vortex ne se forme pas dans les plus petites dimensions du disque, c'est-à-dire si l'une est inférieure à la longueur d'échange R_0, caractéristique du matériau ferromagnétique. Dans ce cas où $R < R_0$ ou $L < R_0$, correspondant aux disques magnétiques les plus petits, où l'énergie d'échange devient prépondérante, les états magnétiques stables sont des monodomaines magnétiques (aimantation quasi-uniforme) avec deux directions possibles : planaires ou perpendiculaires au plan du disque, selon le rapport d'aspect $\beta=L/R$. Pour ces disques aux plus petites dimensions, l'aimantation uniforme est dans le plan pour $\beta<1.81$ [28] et hors du plan (perpendiculaire au plan du cylindre) pour $\beta>1.81$: $L/R = 1.81$ étant la valeur critique de stabilité de l'aimantation dans le plan, au-delà pour $L/R > 1.81$, l'aimantation s'oriente perpendiculairement au plan du disque. Elle donne lieu en particulier aux états en fleurs (flower states) semblables à des monodomaines perpendiculaires s'évasant sur les bords du cylindre.

Les vortex n'apparaissent que pour des cylindres ou disques aux dimensions plus larges, et lorsque le rayon R devient supérieur à un rayon critique Rc dépendant de l'épaisseur. La configuration en vortex magnétique est alors énergétiquement plus favorable qu'un état en fleur (flower state). Le basculement d'un état à l'autre étant dû à la compétition entre l'énergie d'échange et l'énergie dipolaire, l'énergie d'anisotropie magnétocristalline étant ici négligée. Ces configurations ont été démontrées analytiquement [29] et expérimentalement [21] [30].

Pour des cylindres de petits rayons, proches du rayon du cœur de vortex, Il a été démontré qu'il existe une variation continue de la distribution d'aimantation lorsqu'on décroit le rayon du cylindre, dans la transition de l'état d'aimantation non uniforme du vortex vers un état quasi-uniforme perpendiculaire de l'aimantation [31]. Plus globalement, selon la valeur de ces dimensions, différents arrangements magnétiques peuvent être observés comme montré sur le diagramme ci-dessous extrait de la référence [28].

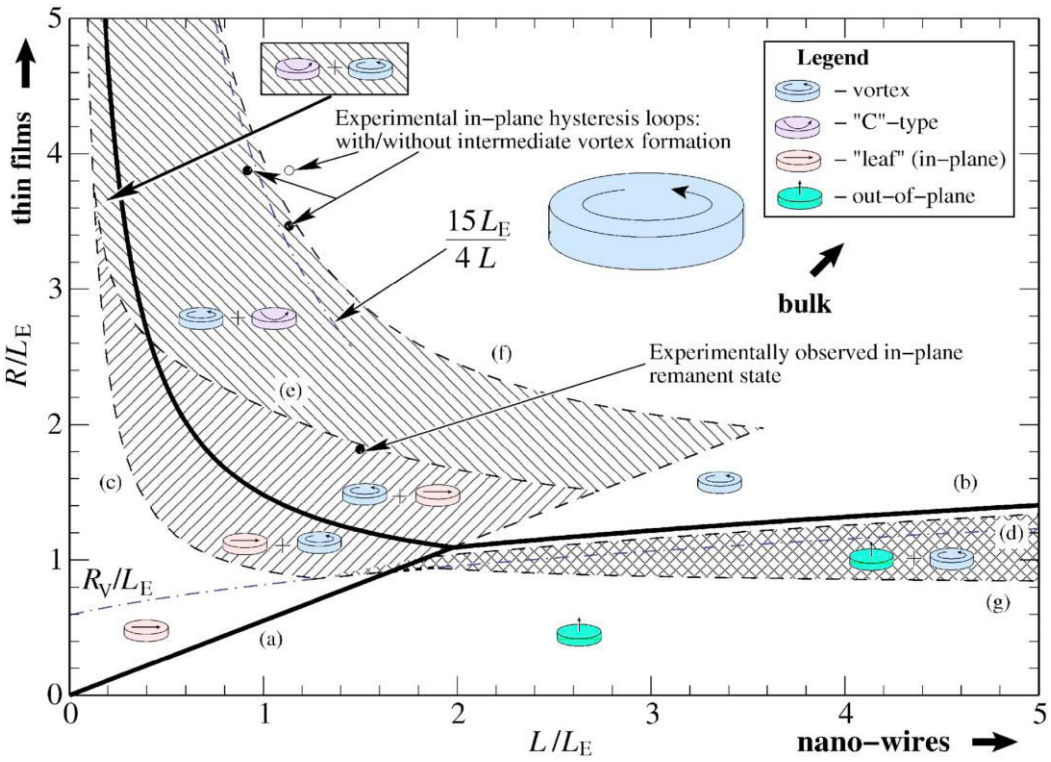


Figure 3. Diagramme représentant les différents états magnétiques métastables observés dans une structure ferromagnétique douce en fonction de son épaisseur et du rayon, figure extraite de la référence [28]

Le diagramme montre trois états magnétiques stables : état vortex, état quasi-uniforme dans le plan, et quasi-uniforme hors du plan. Au-dessus de la zone hachurée, l'état vortex est plus favorable énergétiquement, la région de bi-stabilité entre l'état vortex et les états quasi-uniformes est représenté par la zone hachurée.

En conclusion, un vortex magnétique est défini comme une distribution en tourbillon de l'aimantation contrainte dans le plan d'une structure ferromagnétique douce, avec une région au centre où l'aimantation pointe hors du plan appelée cœur du vortex.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux susceptibilités des vortex magnétiques en fonction de leur rapport d'aspect ainsi qu'à leur réponse aux champs magnétiques extérieurs. Le couple magnétique que peuvent délivrer les particules en vortex magnétique a été calculé analytiquement. Le phénomène d'auto-polarisation relié à l'agglomération des micro-vortex magnétiques en suspension dans une solution aqueuse a aussi été étudié

- **Cycles d'hysteresis de vortex magnétiques :**

Bien que ce soit une structure à base de matériau ferromagnétique, le cycle d'hystérésis d'un vortex magnétique présente des caractéristiques particulières. La réponse d'un vortex aux

champs magnétiques appliqués dans le plan a été caractérisée entre autre par des mesures magnéto-optiques [21]. Dans une structure cylindrique favorisant l'état magnétique vortex à champ nul, l'état magnétique rémanent à champ nul a une symétrie cylindrique, le cœur de vortex étant centré et le vortex n'ayant pas d'aimantation rémanente dans le plan.

Lorsqu'un champ magnétique faible est appliqué, le cœur du vortex se déplace progressivement et perpendiculairement à la direction du champ appliqué. La partie centrale du cycle autour de zéro est linéaire et réversible, ce qui traduit un déplacement du cœur de vortex linéaire et réversible à de faibles champs, dans une direction transverse au champ appliqué. Lorsque le champ magnétique augmente jusqu'à une certaine valeur appelée champ d'annihilation, le vortex est éjecté du bord du disque en même temps que le disque atteint sa saturation. Ensuite, si le champ diminue, le vortex se reforme à une valeur de champ appelée champ de nucléation, qui est inférieur au champ d'annihilation. La courbe d'hystérésis caractéristique des vortex magnétiques est représentée dans le schéma ci-dessous (Figure 4).

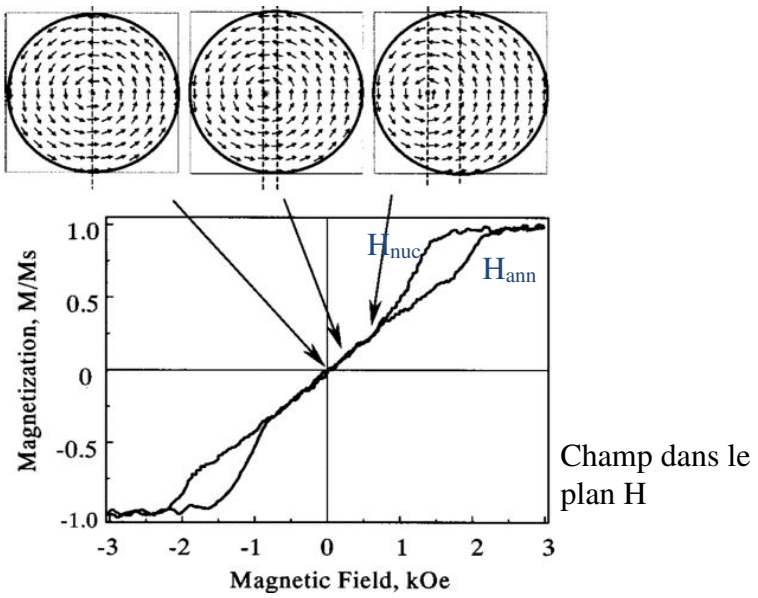


Figure 4. Schéma du processus d'aimantation d'un vortex magnétique en fonction du champ magnétique appliqué : mesure de la courbe d'hystérésis et calcul de l'évolution du champ magnétique d'un vortex magnétique pour un disque en permalloy d'un diamètre e 0.2 mm et une épaisseur de 60nm. Figure extraite de la référence [32]

Les particules en vortex magnétique présentent de nombreux avantages pour des applications en biologie. En effet, grâce à leur aimantation nulle en champ extérieur nul, et leurs susceptibilités magnétiques bien adaptées, les particules en vortex magnétique ne

s'agglomèrent pas en solution, mais répondent bien à l'application d'un champ magnétique extérieur. Leur anisotropie de forme crée une certaine amplitude de mouvement en réponse à des champs magnétiques alternatifs, permettant d'appliquer des couples sur des membranes biologiques. Les particules vortex étant formées d'une couche unique de matériau magnétique, les procédés de fabrication sont simplifiés, comparés à ceux des particules en multicouches antiferromagnétiques synthétiques. Ne nécessitant pas le contrôle d'épaisseur de couches non magnétiques ultra minces telles que le Ru de quelques Angström des SAF, les particules vortex sont moins exigeantes en termes de rugosité. De plus l'avantage de ces particules formées d'une seule couche magnétique, est de pouvoir être réalisées en un matériau magnétique biocompatible, tel que les oxydes de fer, notamment la magnétite, reconnue comme parfaitement non toxique et biocompatible pour les organismes. De telles particules ont été utilisées pour la première fois pour des applications biologiques sur des cellules cancéreuses avec succès [11] cette application est expliquée plus en détail dans le paragraphe **1.4.3**.

Dans notre étude, la présence de vortex magnétiques dans les particules élaborées en permalloy a été confirmée expérimentalement par des caractérisations magnétiques au VSM et par imagerie MFM sur des réseaux de particules fixées au substrat par la résine PMMA. Dans cette étude, nous avons étudié le comportement des particules en vortex magnétiques, en particulier leur agglomération ou leur dispersion une fois en suspension dans une solution aqueuse. Nous avons aussi étudié le couple magnétique que peuvent exercer ces particules sur les membranes biologiques suite à l'application d'un champ magnétique extérieur. Cette étude sera expliquée plus en détail dans le chapitre 2.

1.3 Biofonctionnalisation de surface des particules magnétiques

La fonctionnalisation de surface est définie comme une modification chimique d'une surface ayant pour but de lui conférer des propriétés et des fonctions spécifiques. Ainsi des fonctions organiques peuvent être utilisées pour stabiliser les particules dans leur milieu, ou servir de points d'ancrage aux macromolécules biologiques (anticorps par exemple). Dans le cadre de cette thèse, nous n'aborderons que la fonctionnalisation des particules magnétiques.

Le greffage de molécules organiques à la surface des particules d'oxydes de fer a été étudié au départ pour stabiliser les suspensions colloïdales. Différents polymères tels que le PEG

polyéthylène glycol par exemple [33] ont été utilisés pour augmenter les interactions électrostatiques et l'encombrement stérique interparticules pour la stabilisation des suspensions.

Actuellement, de nouvelles fonctionnalisations orientées vers le domaine biomédical sont activement étudiées et utilisées dans plusieurs laboratoires de recherche. Plusieurs techniques ont été mises au point pour assurer une biocompatibilité et un greffage de molécules de vectorisation. Concernant les particules magnétiques, bien que les propriétés du cœur magnétiques des particules soient l'élément primordial motivant le choix d'un type de particules, les propriétés de surfaces n'en sont pas moins importantes. C'est en effet sur la surface que tout l'habillage moléculaire est conçu permettant les interactions entre les particules, les molécules biologiques et les cellules.

1.3.1 Stratégies de modifications chimiques des surfaces des particules magnétiques

La fonctionnalisation de surface comprend tout traitement entrainant l'adsorption d'un réactif à la surface. On distingue la chimisorption – « chemisorption » en anglais - (liaison du réactif à la surface par des liaisons covalentes) et la physisorption pour tous les autres types de liaisons.

Il existe plusieurs voies de fonctionnalisation des particules magnétiques, nous allons en décrire les principales dans le paragraphe ci-dessous :

- Couronne hydrophile :

L'encapsulation dans une couronne de macromolécules hydrophiles permet de stabiliser les particules dans l'eau par le jeu de répulsion stérique et prolonger la durée de vie plasmatique des particules dans la circulation sanguine. Ces macromolécules peuvent être d'origine naturelle (dextran) ou des polymères synthétiques (polyéthylène glycol). Il existe plusieurs techniques permettant de recouvrir des particules par des molécules hydrophiles, les travaux de Lemarchand et al [34] ont permis de répertorier les méthodologies d'élaboration de nanoparticules enrobées de molécules hydrophiles.

- Coquille de silice :

L'enrobage par la silice présente de nombreux avantages. D'une part, la chimie de surface de la silice est plus connue que celle des oxydes de fer, c'est alors la surface de celle-ci qui est

fonctionnalisée [35], de plus la silice présente un grand nombre de groupements OH en surface qui facilitent les interactions avec les molécules organiques. D'autre part, la couche de silice diminue les interactions magnétiques par éloignement des noyaux magnétiques, ainsi que les interactions de Van Der Waals.

- Monocouche auto assemblée :

Les monocouches auto-assemblées de molécules organiques sont des assemblages moléculaires qui s'organisent spontanément sur les surfaces par adsorption. Dans certains cas, les molécules possèdent un groupe fonctionnel qui a une forte affinité pour le substrat, et servent à ancrer d'autres molécules sur cette surface. De telles architectures moléculaires sont appelées SAM (Self-Assembled Monolayer).

Les SAM sont des constructions moléculaires auto-organisées par adsorption spontanée de molécules amphiphiles sur un substrat. Une molécule amphiphile, représentée schématiquement sur la Figure 5, est une molécule possédant à la fois un groupe hydrophile appelé « tête », un groupe hydrophobe, généralement représenté par une longue chaîne carbonée appelée « queue » avec à son extrémité la partie terminale. Les acteurs impliqués dans la formation des SAM sont variés ; des constructions de SAM peuvent être obtenues par l'adsorption d'organosilanes sur des surfaces hydroxylées, les alcanes thiols sur les métaux nobles, et les acides carboxyliques sur les oxydes d'argent ou d'aluminium, cette liste n'étant pas exhaustive. Un grand nombre d'études consacrées à la chimie des SAM sont répertoriées dans la référence [36].

Les molécules thiolées ont la propriété de s'auto-assembler sur des métaux nobles pour former des SAM, comme schématisé dans la Figure 6. L'adsorption des thiols est stable et irréversible. Nous avons ainsi choisi d'utiliser ce mode de fonctionnalisation pour accrocher des biomolécules à la surface des particules magnétiques, après avoir inclus dans le procédé de fabrication une étape d'évaporation d'or autour des particules magnétiques.

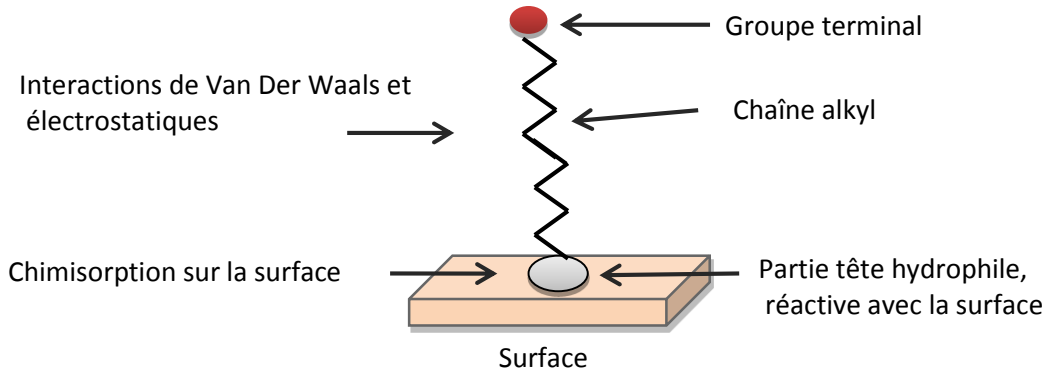


Figure 5. Représentation schématique d'une molécule amphiphile.

La formation des SAM débute par une chimisorption sur la couche atomique supérieure du substrat, suivie par l'organisation des chainons alkyles chimisorbés par des interactions intermoléculaires [37], [36].

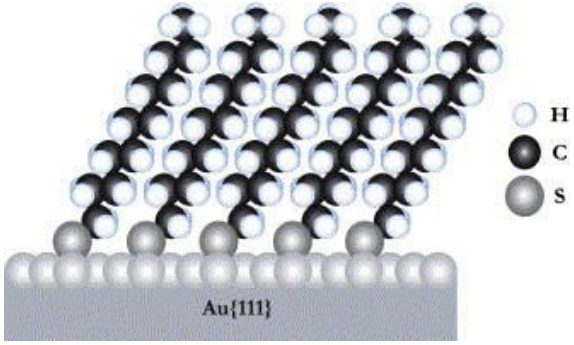


Figure 6. Schéma d'une monocouche auto-assemblée de molécules thiolées sur un substrat d'or. Figure extraite de la référence [36]

Dans le cadre de cette thèse, nous ne détaillerons que les propriétés des SAM d'alkyles thiols immobilisés sur un substrat d'or dans le troisième chapitre de ce manuscrit.

1.4 Utilisation des particules magnétiques dans le traitement des tumeurs

Les nanoparticules magnétiques ont des applications diverses dans les domaines de la biologie et de la médecine. L'intérêt d'utiliser de telles nanoparticules réside en la possibilité de les manipuler à distance de façon non invasive par l'application de champs magnétiques extérieurs. D'importantes applications médicales incluent l'utilisation des particules magnétiques en imagerie en tant qu'agents de contraste pour l'IRM (Imagerie par résonance

magnétique), en clinique comme agents contre les occlusions vasculaires, comme sources de chaleur localisées dans l'hyperthermie, comme vecteurs de molécules thérapeutiques, tels que les agents transfectants (magnétofection), ou les agents de séparation de molécules, etc. Le sujet de notre étude est consacré à l'une des plus récentes applications, ayant pour objectif la destruction ciblée de cellules cancéreuses par vibrations magnétomécaniques. Nous allons tout d'abord détailler les principales applications citées ci-dessus dans les paragraphes suivants.

- **Vectorisation de molécules thérapeutiques :**

Les médicaments anticancéreux sont toxiques [38]. En détruisant les cellules malades ces derniers atteignent aussi des cellules saines. Le challenge des travaux de recherche actuels dans les thérapies anticancéreuses est de pouvoir mettre en place un traitement capable de libérer le médicament uniquement dans la zone malade en épargnant le reste de l'organisme. Le ciblage magnétique permet la concentration des médicaments dans la seule zone à traiter définie à l'aide d'un fort champ magnétique extérieur. Pour cette application, un médicament sélectionné est associé à un élément magnétiquement actif convenable. Typiquement un cœur magnétique en oxyde de fer recouvert par un polymère biocompatible sur lequel sont fixées les molécules thérapeutiques actives. Ces éléments sont inclus dans une formulation pharmacologiquement stable, puis injectés dans l'artère alimentant le tissu tumoral en présence d'un champ magnétique extérieur avec l'intensité du champ et le gradient suffisant pour retenir les particules magnétiques au niveau du site cible, où les molécules actives sont alors libérées.

Plus récemment, des nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_2O_3) superparamagnétiques appelées SPIONS (Superparamagnetic iron oxide nanoparticles) ont été recouvertes d'une membrane de liposomes (phospholipides naturels présents dans les membranes des cellules). Les SPIONs s'échauffent par un principe expliqué dans le paragraphe décrivant l'hyperthermie, la membrane devient alors perméable sous l'effet de la chaleur ce qui permet de libérer le médicament. Les SPIONS étant aussi utilisés comme agents de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM), cela ouvre la possibilité de pouvoir suivre les SPIONs et de n'activer la libération de médicament qu'une fois qu'elles ont atteint leur cible [39].

- **Ingénierie tissulaire :**

L'ingénierie tissulaire semble être une technique très prometteuse en médecine régénérative. Comme les cellules marquées avec des particules magnétiques peuvent être manipulées avec un aimant, une nouvelle méthodologie de synthèse tissulaire mettant en œuvre des forces magnétiques et des particules magnétiques fonctionnalisées a été proposée[40]. Le principe repose sur la culture des cellules d'intérêt en présence de nanoparticules magnétiques dans le milieu environnant afin que les cellules les internalisent au fur et à mesure des divisions. Une fois que les cellules s'organisent en structure multicellulaire, un aimant servira à récolter cet agrégat. Cette technique a déjà été appliquée à des cellules souches mésenchymateuses humaines et à des cellules épithéliales de pigment rétinien, avec des résultats prometteurs pour la médecine régénérative.

- **Hyperthermie :**

L'hyperthermie consiste à chauffer localement une tumeur à une température de l'ordre de 42°C à 46°C afin de la détruire par l'action de la chaleur, ou la rendre plus sensible aux traitements par radios et chimiothérapies. Cet échauffement se fait via l'utilisation de nanoparticules superparamagnétiques et l'application d'un champ magnétique extérieur. Pour une utilisation thérapeutique, les nanoparticules doivent être accumulées dans la zone tumorale, puis excitées par un champ magnétique alternatif, cette technique est expliquée plus en détail dans la partie suivante (Hyperthermie)

- **Magnétofection :**

La magnétofection est définie comme le transport de biomolécules sous l'influence d'un champ magnétique agissant sur les nanoparticules magnétiques portant les vecteurs géniques. Une des principales étapes limitantes dans le transport des acides nucléiques est la mise en contact du vecteur portant l'ADN avec sa cible car il s'agit d'un processus se déroulant par diffusion passive. Pour cette raison, d'autres techniques de transfection ont été développées utilisant des forces magnétiques permettant de concentrer rapidement les séquences d'ADN dans les cellules/organes cibles [41,42]. Avec cette méthode, l'architecture de la membrane reste intacte contrairement à d'autres méthodes physiques de transfection entrainant des dommages tels que l'application des chocs électriques au niveau des membranes cellulaires entrainant la création de trous. Une fois concentrées à la surface des

cellules, les nanoparticules sont internalisées selon différents processus biologiques [43]. Une fois les acides nucléiques libérés dans le cytoplasme, les nanoparticules sont dissociées de l'ADN qui est véhiculé vers le noyau. Les premières expériences de magnétofection étaient réalisées avec des particules colloïdales d'oxydes de fer et de polymères du commerce, élaborées par voie chimique. D'autres particules élaborées par photolithographie en utilisant un moule ont aussi été utilisées pour la transfection avec succès dans les cellules. La magnétofection a pour but d'augmenter le taux de transfection en adressant le gène d'intérêt directement et rapidement en contact avec la membrane cellulaire.

1.4.1 Généralités sur les cellules cancéreuses

Le cancer se développe par des facteurs internes (mutation héréditaire, mutation spontanée), mais aussi par des facteurs externes comme les inductions par des agents infectieux, par exposition à des agents cancérigènes dont font partie certains composés chimiques, ou par exemple les irradiations par les ultraviolets. Le processus de passage d'une cellule normale à une cellule cancéreuse s'appelle « transformation cellulaire ». Cette transformation est due à des déficiences dans les mécanismes contrôlant la croissance et la prolifération cellulaire. Le cycle de vie cellulaire normal est régulé par des mécanismes de contrôle génétique. La perte de cette régulation est le plus souvent la conséquence d'altération de l'ADN au niveau des gènes impliqués dans la régulation proliférative des cellules appelés oncogènes. En général, les deux propriétés importantes des cellules cancéreuses sont l'acquisition d'une capacité proliférative indéfinie et une propension à se disséminer dans des sites autres que leurs sites naturels. Les travaux de Hanahan et Weinberg [44] ont souligné que les cellules cancéreuses présentent en commun au moins cinq caractéristiques acquises. Il s'agit de l'acquisition d'une résistance à l'apoptose (immortalité), l'indépendance vis-à-vis des signaux prolifératifs, une insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, la capacité d'induire l'angiogenèse, et la capacité de dissémination (métastases). Nous allons détailler chacune de ces caractéristiques.

- Résistance à l'apoptose (immortalité)

Les cellules saines ont un nombre de divisions mitotiques limité. Après un certain nombre de générations, elles vieillissent et deviennent incapables de continuer à croitre et se diviser. Dès lors, elles entrent en sénescence et meurent par apoptose. Ce potentiel de division est attribué à une enzyme appelée « télomérase » dont le rôle est de conserver les télomères à

l'extrémité des chromosomes [45]. Une étude [46] a clairement démontré le lien entre le raccourcissement des télomères et le déclenchement du processus d'apoptose. La diminution de la taille des télomères déclenche le mécanisme d'apoptose dans les cellules saines alors que dans les cellules cancéreuses le maintien de la longueur des télomères inhibe le processus de sénescence programmée.

L'absence de l'enzyme télomérase dans les cellules normales est considérée comme une des principales défenses de l'organisme contre la croissance tumorale. En revanche, sa présence dans les cellules cancéreuses leur confère une indépendance vis à vis de l'apoptose en limitant le raccourcissement des télomères en permettant la synthèse de novo de séquences télomériques et le maintien de la longueur des extrémités des chromosomes [47].

- Indépendance vis-à-vis des signaux prolifératifs

La prolifération exagérée des cellules cancéreuses est généralement stimulée de façon non physiologique, alors qu'une cellule normale ne peut proliférer qu'en présence de signaux mitogènes (capables d'induire une mitose). L'indépendance des cellules cancéreuses vis-à-vis de ces signaux est conférée le plus souvent par l'activation des proto-oncogènes, considérés comme des régulateurs positifs de la prolifération.

- Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs

La transformation d'une cellule saine en cellule maligne lui confère plusieurs mécanismes qui lui permettent d'échapper aux protections antiproliférives constituées par les gènes suppresseurs de tumeur qui jouent le rôle de régulateurs négatifs des divisions cellulaires. Contrairement aux proto-oncogènes cités précédemment qui sont activés dans une cellule cancéreuse, les gènes suppresseurs de tumeur perdent leur fonction suite à des altérations génétiques.

- Stimulation de l'angiogenèse

Une fois qu'un ensemble de cellules se structure et atteint une taille minimale, il se constitue en tissu appelé tumeur. Une des caractéristiques d'une tumeur évolutive, est son besoin accru en oxygène et nutriments. Pour ces apports importants et dédiés, les cellules cancéreuses induisent le développement d'un nouveau réseau vasculaire sanguin autour de la tumeur à partir d'un réseau vasculaire préexistant, ce qui permettra de l'irriguer en nutriment et en oxygène. Cette formation est appelée angiogenèse. Cette capacité des cellules cancéreuses est conférée par l'activation des voies de l'angiogenèse et par l'inactivation des inhibiteurs de cette fonction. Néanmoins cette angiogenèse aboutit généralement en la production de

vaisseaux imparfaits impliquant une microcirculation incomplète au sein de la tumeur. Ceci a pour conséquence l'apparition de zones hypoxiques [48]. L'angiogenèse jouant un rôle majeur au cours de la progression tumorale, plusieurs stratégies thérapeutiques sont développées pour mettre en place des traitements anti-angiogéniques. Mais avec l'apparition des thérapies ciblées du cancer, les nouveaux traitements tirent profit d'une des propriétés des vaisseaux créés par angiogenèse qui sont leurs imperfections. Ces derniers permettront l'échappement de composants thérapeutiques vers les tumeurs pour un ciblage passif des cellules cancéreuses.

- Dissémination (métastases)

Les cellules malignes peuvent se détacher de leur site initial, migrer par voie sanguine et créer un nouveau foyer tumoral dans l'organisme, conduisant à la formation de métastases. La métastase définit la malignité d'une tumeur, les tumeurs dites malignes sont celles ayant cette propriété d'invasion tandis que des tumeurs bénignes ne peuvent que grandir à un endroit donné. Cette capacité à envahir les tissus voisins ou, via la circulation systémique, des zones à distance, est la conséquence de nombreux mécanismes : la modification des propriétés d'adhésion des cellules entre elles, et l'expression de protéines particulières comme les métalloprotéases ayant pour fonction la dégradation de la matrice extracellulaire. L'acquisition de ces propriétés favorise la migration des cellules tumorales vers les vaisseaux pour essaimer dans l'organisme [49].

1.4.2 Traitement des tumeurs par l'hyperthermie magnétique

Peu de temps après la découverte de la sensibilité accrue du métabolisme des cellules tumorales aux températures élevées, des études sur l'utilisation de l'hyperthermie pour la thérapie des tumeurs ont émergé [50].

L'hyperthermie abordée dans cet état de l'art est l'hyperthermie magnétique, principalement indiquée comme thérapie adjuvante en oncologie [50]. Cette technique consiste à chauffer localement une tumeur à une température de l'ordre de 42°C à 46°C afin de la rendre plus sensible aux traitements par radio et chimiothérapies. Des essais cliniques avec l'association hyperthermie et radiations ionisantes ont bien établi le potentiel radiosensibilisateur de l'hyperthermie [51]. Pour une utilisation thérapeutique, cet échauffement se fait via l'utilisation de nanoparticules magnétiques, qui une fois accumulées dans la zone tumorale, sont excitées par un champ magnétique extérieur alternatif (amplitude variant de 200 à 400 Oe) à haute

fréquences (quelques 100kHz) [52]. Comme pour une variété de stress, les cellules de mammifères exposées à la chaleur réagissent sur le plan morphostructural et biologique variablement selon le type cellulaire et l'ampleur du stress. L'ampleur d'un stress thermique peut être évaluée en combinant température atteinte et durée d'exposition [53], [54]. les modifications induites par des stress de grande ampleur altéreront souvent irrémédiablement les fonctions cellulaires et nuisent à la survie et à la progression cellulaire[53]. L'augmentation localisée de la chaleur au niveau des membranes cytoplasmiques cause des perturbations au niveau du cytosquelette à 44°C [55], mais une capacité à reconstruire une architecture normale du cytosquelette et une morphologie cellulaire normale suite au choc thermique est possible et est caractéristique des cellules qui ont été rendues thermotolérantes [55].

1.4.2.1 Technologie de l'hyperthermie induite

Des matériaux magnétiques ont été développés spécifiquement pour l'induction par des champs magnétiques alternatifs à basses fréquences[56]. Parmi ces matériaux, certains ont été reconnus biocompatibles ; les oxydes de fer ferro- et ferrimagnétiques[57] (maghémite et magnétite étant ferrimagnétiques). La réponse magnétique de ces matériaux dépend de leur perméabilité magnétique, qui dépend par ailleurs de la température. Pour un matériau ferro- ou ferrimagnétique, au-delà de la température de Curie (ou point de Curie), qui est le seuil d'énergie thermique nécessaire pour vaincre l'énergie d'échange qui organise les spins, la perméabilité magnétique du matériau tombe à une valeur très faible et le cycle d'hystérésis devient complétement réversible. De ce fait, la dissipation de chaleur (proportionnelle à l'aire du cycle d'hystérésis) devient impossible. En dessous du point de Curie, une ouverture apparait dans le cycle d'hystérésis produisant de la dissipation d'énergie et donc un échauffement des particules. Pour certains alliages le point de Curie peut être diminué à plus basse température en fonction de la composition et ajusté pour être de l'ordre de 46°C. Ceci permet de façon avantageuse d'autolimiter le processus d'échauffement des particules de sorte que ces dernières ne puissent pas dépasser la température maximale de 46°C afin de ne pas endommager les cellules saines entourant les cellules cancéreuses ciblées.

Des études ont démontré que le processus de chauffage des nanoparticules magnétiques est dû aux pertes énergétiques par hystérèse, en effet, les propriétés de chauffage des particules magnétiques sont déterminées à partir du cycle d'hystérèse mesuré pour des nanoparticules magnétiques soumises à un champ magnétique alternatif. Les paramètres caractéristiques

d'un cycle d'hystérèse sont l'aimantation rémanente, le champ coercitif et l'aire d'hystérèse. La perte énergétique dissipée sous forme de chaleur est le plus souvent appelée SAR (specific absorption rate) ou taux d'absorption spécifique déterminée par le calcul de l'aire d'hystérèse par la formule SAR= *Af* où *A* est l'aire du cycle d'hystérésis exprimée en J/g et est la perte énergétique, et *f* la fréquence du champ magnétique alternatif.

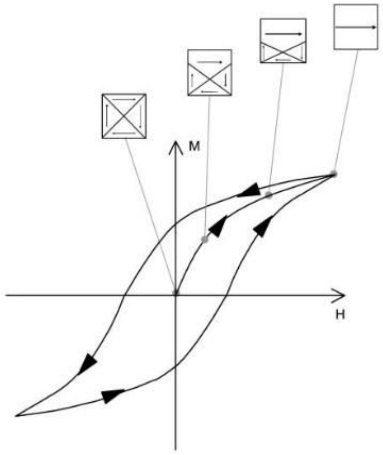


Figure 7. Cycle d'hystérésis d'un matériau magnétique multidomaine, H est l'amplitude du champ magnétique appliqué, et M l'aimantation du matériau. Les flèches indiquent les directions d'aimantation, figure extraite de la référence [58].

Dans certaines études, une faible cytotoxicité des SPIONs brutes a été mise en évidence, d'autres études les désigne biocompatibles et sans effet toxique (selon la Revue publiée dans Small, 2008[59]), mais les faibles effets toxiques mentionnés peuvent être évités par un revêtement de surface adéquate. Ceci montre l'importance de recourir à la chimie de surface pour le contrôle des interactions biologiques [16].

Malgré tous les travaux réalisés à ce jour sur l'hyperthermie, cette technique présente toujours des limitations, notamment en ce qui concerne le pouvoir chauffant des particules magnétiques. Pour avoir un effet thérapeutique, de fortes doses de nanoparticules (l'équivalent de 2 mol/l de fer) doivent être injectées localement dans la tumeur. Par ailleurs, comme mentionné précédemment, des surchauffes locales peuvent se produire détruisant aussi des cellules saines.

Du fait en outre de l'investissement matériel relativement important à mettre en place pour atteindre les champs magnétiques et les fréquences adéquates, la thérapie des cancers par hyperthermie en clinique reste exploratoire.

1.4.3 Traitement des tumeurs par vibrations magnéto-mécaniques

L'utilisation des nanoparticules magnétiques de type SPIONs élaborées par synthèse chimique est largement répandue dans les laboratoires de recherche pour différentes applications biomédicales. Ceci étant, il est très difficile par voie chimique de créer des particules de forme autre que sphérique comme des disques par exemple et encore moins constituées de multicouches de divers matériaux.

Dans une récente étude [11], des particules en permalloy (NiFe) en forme de disque ont été fabriquées par voie « top-down » mettant en œuvre diverses technologies utilisées pour la microélectronique. Ces particules sont anisotropes en vortex magnétique comme expliqué dans la partie 1.2 de ce chapitre. Ces particules ont une aimantation planaire rémanente nulle en raison de leur configuration en vortex magnétique, directement reliée à leur géométrie confinée en disque plat. Cette propriété est très importante car elle élimine le problème de l'agrégation des particules (les interactions magnétostatiques liées au moment perpendiculaire du cœur de vortex étant trop faibles elles-mêmes pour créer un effet agglomération des particules).

L'étude citée[11] décrit la première approche basée sur l'interfaçage de micro-disques en vortex magnétique fonctionnalisés définis par lithographie avec des cellules cancéreuses. Quand un champ magnétique alternatif est appliqué, l'aimantation dans les micro-disques magnétiques tend à s'orienter suivant les lignes du champ magnétique. Grâce à leur anisotropie de forme tendant à maintenir l'aimantation dans le plan du disque, les disques vibrent à la surface de la cellule sous l'effet du champ alternatif, exerçant ainsi une force alternative sur la membrane de la cellule. Ce stimulus créé deux effets dramatiques: l'intégrité compromise de la membrane cellulaire (nécrose) et l'initiation de la mort cellulaire programmée (apoptose). Un champ de basse fréquence de quelques dizaines de hertz appliqué pendant dix minutes a été suffisant pour atteindre environ 90% de destruction des cellules cancéreuses in vitro [11].

L'apoptose est un processus naturel de la mort cellulaire qui, contrairement à la nécrose, se produit à la suite d'une signalisation intracellulaire biochimique spécifique en cascade. L'apoptose contrôle des processus fondamentaux, et sa perturbation peut entraîner une prolifération cellulaire incontrôlée, ce qui se produit dans les tumeurs cancéreuses. Les thérapies visant à déclencher l'apoptose des cellules cancéreuses est une des stratégies

thérapeutiques anti-cancéreuses les plus étudiées. Le processus d'apoptose est détaillé dans le chapitre 4.

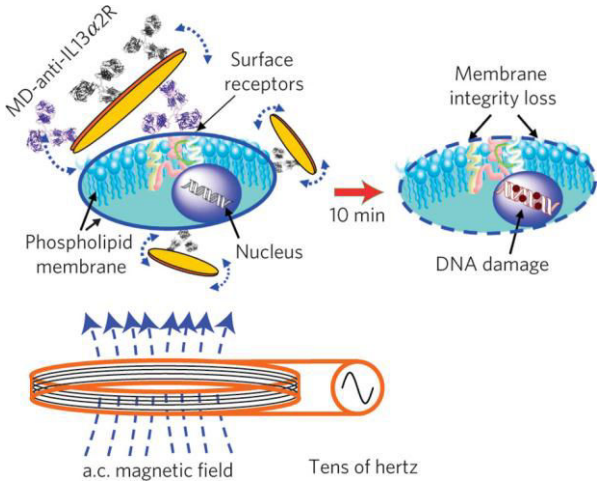


Figure 8. Le concept de destruction des cellules cancéreuses par un stimulus magnéto-mécanique ciblé utilisant des particules magnétiques en forme de disque possédant une configuration en vortex magnétique. Figure extraite de la référence [11]

A la différence des traitements par hyperthermie, le stimulus magnétomécanique induit par les disques magnétiques est transmis directement aux cellules cibles grâce à la biofonctionnalisation spécifique de surface. Grâce au matériau magnétique utilisé, l'effet biologique a été obtenu par l'application faibles champs magnétiques (< 100 Oe, soit < 10 mT) avec des fréquences de quelques dizaines de Hz. Cette approche est en contraste avec l'hyperthermie magnétique nécessitant des fréquences de champ magnétique élevées de l'ordre de centaines de kilohertz, nécessaires pour atteindre le chauffage des SPIONs. La faible intensité du champ opératoire peut créer des possibilités de traitement à faible coût avec un caractère invasif minimal. Le principe de déclenchement de l'apoptose des cellules cancéreuses ciblées peut permettre d'envisager dans le futur des traitements du cancer limitant fortement les effets secondaires.

Nous avons résumé dans ce chapitre l'état actuel des connaissances dans l'utilisation des particules magnétiques dans le domaine médicale. En premier lieu, nous avons décrit les propriétés ainsi que les procédés de fabrication des particules magnétiques SPIONs dites aussi « conventionnelles », élaborées par des méthodes de synthèse chimiques appelée aussi « bottom up », ces particules sont généralement sphériques avec une certaine dispersion en taille à la fin du procédé. Ce type de particule a été utilisé pour des applications comme l'hyperthermie ou le tri magnétique par exemple. De nouvelles approches thérapeutiques requièrent l'utilisation de particules magnétiques anisotropes, à fortes susceptibilités, avec de

grandes aimantations avec l'exigence que ces particules n'interagissent pas entre elles pour former des agglomérats. Toutes ces caractéristiques sont réalisables par un procédé de fabrication « top-down ». En effet, en utilisant les techniques employées dans la technologie de la microélectronique, il est possible de fabriquer des particules avec des tailles, des formes et des compositions parfaitement contrôlées.

Deux types de particules magnétiques répondent aux exigences citées précédemment ; les particules antiferromagnétiques synthétiques constituées d'un empilement de couches ferromagnétiques séparées par une couche non magnétique et les particules en vortex magnétique. Ces deux types de particules présentent l'avantage d'avoir des aimantations nulles en l'absence de champ magnétique extérieur, cette propriété permet d'éviter la formation d'agglomérats de particules, phénomène rédhibitoire pour une utilisation en biomédicale. Le développement de procédés spécifiques permet de transférer les particules du substrat en silicium dans des solutions liquides pour les besoins de biofonctionnalisation où les particules magnétiques une fois en suspension voient se succéder plusieurs bains de solutions contenant divers réactifs pour les besoins de la modification chimique de leur surface, dont les procédés les plus communément répertoriés dans la littérature sont détaillés dans la troisième partie du chapitre. Enfin, la dernière partie du chapitre décrit l'utilisation des particules magnétiques dans le traitement des tumeurs, après un rappel sur les propriétés caractérisant si particulièrement la cellule cancéreuse, nous avons détaillé les deux grandes approches utilisées pour la destruction ciblée individuelle des cellules cancéreuses ; l'hyperthermie, approche largement étudiée et très référencée dans la littérature, ainsi que la dernière approche mise en évidence en 2010 qui consiste à détruire les cellules cancéreuses par des vibrations magnéto-mécaniques de particules magnétiques en vortex.

Le chapitre suivant est structuré en deux grandes parties ; en premier lieu nous décrivons les procédés de fabrication top-down développés en salle blanche pour l'élaboration des particules SAF et vortex avec les motivations pour chaque procédé développé et ses inconvénients, en second lieu est détaillée une étude comparative des propriétés magnétique entre les particules SAF et vortex, avec en conclusion, le type de particule retenu pour le reste de l'étude pour la destruction des cellules cancéreuses par les vibration magnéto-mécaniques.

Chapitre 2. Synthèse et caractérisation des particules vortex et antiferromagnétiques synthétiques, étude comparative leurs propriétés magnétiques.

2.1 Procédés de fabrication développés en salle blanche

Contrairement aux particules magnétiques conventionnelles généralement synthétisées par les voies chimiques, les particules magnétiques étudiées dans le cadre de cette thèse sont élaborées par des méthodes novatrices de micro et nanotechnologies utilisées en microélectronique comme expliqué précédemment dans la partie 1.2.

Le procédé de fabrication des particules magnétiques est développé et réalisé sur le Silicium. Sur ce substrat vont se succéder différentes étapes technologiques comme la lithographie DUV (« Deep Ultraviolet » / Ultraviolet lointain), la pulvérisation cathodique ou « sputtering » de couches magnétiques minces, l'évaporation de couches magnétiques et de matériaux comme l'or pour la fonctionnalisation de surface, ainsi que les différentes gravures par des plasmas et les lift-off (enlèvement de matière par dissolution chimique).

Une partie importante de cette thèse a été consacrée à l'étude du développement technologique de la nanofabrication des particules magnétiques. Ceci dans l'objectif d'obtenir un procédé relativement simple et rapide. Les procédés développés devaient être reproductibles, homogènes sur toutes les particules réalisées, avec l'exigence de pouvoir détacher les particules élaborées sur la plaque de silicium (par lift-off) et les mettre en solution. Comme ces particules magnétiques seront utilisées pour la destruction des cellules cancéreuses, la condition finale est de vérifier la compatibilité de ce procédé de fabrication avec la non-agglomération des particules magnétiques en solution, pour les formes et matériaux choisis.

2.1.1 Procédé par bi-couche de résine

Dans ce procédé (Brevet SPINTEC WO2011128585), la forme des particules magnétiques est dessinée en creux par lithographie optique dans une résine étalée sur le substrat de silicium, préalablement recouvert d'une première résine sacrificielle. Les couches magnétiques sont ensuite déposées par évaporation ou par pulvérisation cathodique sur ce moule. Enfin les

résines sont dissoutes successivement par lift-off pour la mise en solution des particules : le premier lift-off laisse apparaître les particules en relief sur le substrat, suivi du deuxième lift-off permettant leur mise en solution. Pour cela la première résine est insensible au solvant de la deuxième. Le procédé est schématisé sur la Figure 9.

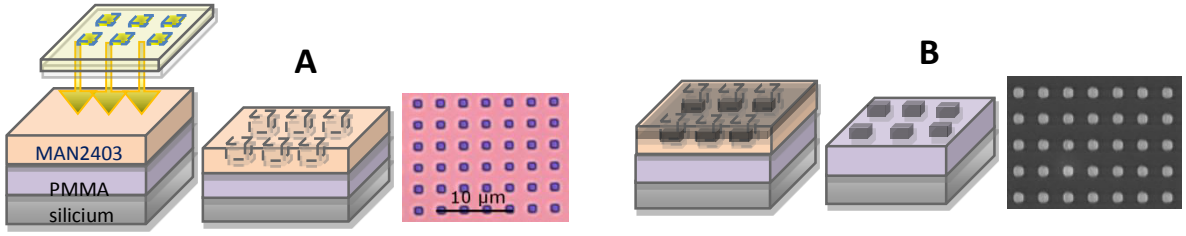


Figure 9. Illustration des étapes du procédé de fabrication des particules par bi-couche de résine comprenant les étapes de photolithographie et de dépôt magnétique. (A) Schéma des étapes d'insolation et développement de la résine, et photo au microscope optique du réseau de trous résultant. (B) Schéma des étapes du dépôt magnétique et 1er lift-off, et photo au MEB des particules obtenues sur le substrat.

Dans un premier temps la résine PMMA est étalée sur la plaque de silicium, il s'agit d'une résine positive, utilisée comme résine sacrificielle, elle ne sera pas affectée par la plupart des étapes ultérieures du procédé et n'intervient qu'au moment du dernier lift-off pour la mise en solution des particules. Une seconde résine négative photosensible est étalée sur la résine précédente, c'est cette dernière qui est insolée par photolithographie en utilisant un masque portant les motifs chromés des particules. Le développement permet de dissoudre les zones de résine non insolées et donne forme au réseau de trous dans la résine superficielle.

Après l'étape de structuration de la résine négative MAN, le dépôt des couches magnétiques est réalisé sur l'échantillon par pulvérisation cathodique ou par évaporation. Un premier lift-off permet d'éliminer la résine négative recouverte du dépôt magnétique. Au terme de cette étape, les particules magnétiques formées par le dépôt restent fixées sur la résine sacrificielle PMMA. C'est le second lift-off permettant la dissolution de celle-ci qui permet la mise en solution des particules. La sélection des matériaux à déposer étant choisie par l'opérateur, il est possible de réaliser aussi bien des particules antiferromagnétiques synthétiques (SAF) constituées d'une succession de couches minces de NiFe/Ru, que des particules en vortex magnétique constituées d'une couche unique relativement épaisse de NiFe. Des dépôts de magnétite peuvent être également envisagés par cette technique, pour leur biocompatibilité.

Des particules SAF ont été réalisées par pulvérisation cathodique, le nombre de répétitions (NiFe/Ru)nNiFe a été déterminé pour que la susceptibilité magnétique demeure inférieure au seuil de susceptibilité magnétique donné par le modèle auto-cohérent prédisant l'autopolarisation ou la dispersion des particules[12], soit n = 7 ou 11 pour des particules d'environ 1 μm^2 et d'épaisseur environ 120 nm. De cette manière, les particules doivent se redisperser spontanément en champ nul.

L'observation en microscopie optique de ces particules SAF en solution après les étapes de lift-off montre une agglomération importante illustrée par la Figure 10, alors que l'observation escomptée était des particules bien dispersées en solution.

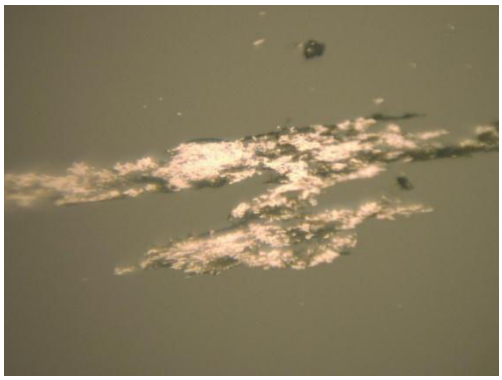


Figure 10. Photo de particules SAF en solution, observées au microscope optique. Agglomération inattendue.

Nous pouvons remarquer sur la Figure 10 que les particules s'agglomèrent en grands agrégats, ce qui est gênant pour les manipuler pour les expériences ultérieures en biologie. Les compositions des particules SAF $(NiFe/Ru)_nNiFe$ déterminées selon le modèle d'agglomération/dispersion [12], auraient dû présenter une susceptibilité magnétique inférieure au seuil d'agglomération. Cela n'a pas été le cas dans cette série d'essais. Après de nombreuses réalisations identiques, nous avons recherché la cause des dérives du procédé technologique mis en œuvre.

Une potentielle cause de cette agrégation est la rugosité de surface sur laquelle le matériau magnétique a été déposé, empêchant un bon couplage antiferromagnétique dans le matériau SAF. Pour avoir des informations sur l'état de surface sur lequel est déposé l'empilement de matériaux magnétiques constituant le SAF, nous avons mesuré à l'AFM la rugosité de la

surface du fond des trous qui forment le moule des particules, les résultats sont montrés sur la Figure 11 ci-dessous :

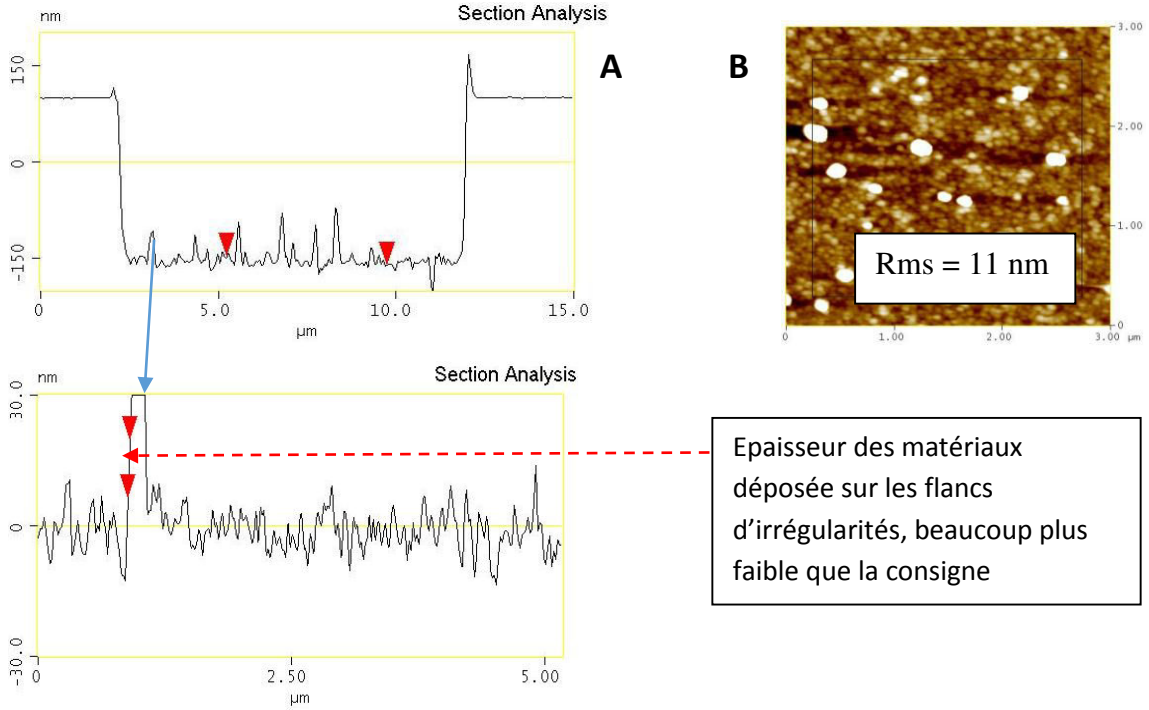


Figure 11. Mesure à l'AFM de la rugosité de la surface au fond des motifs réalisés dans la résine après la lithographie optique. (A) irrégularités de surface observées après l'analyse d'une section au fond d'un motif. (B) Image AFM et mesure de la rugosité au fond du motif.

La mesure de la rugosité par AFM révèle une importante rugosité au fond des motifs, une étude de la rugosité du substrat et son influence sur les propriétés magnétiques a dû être menée, cette étude est décrite dans l'annexe numéro 2. L'apparition de cette rugosité qui n'était pas survenue lors des études antérieures réalisées à SPINTEC, est la conséquence de modifications de composition des solvants contenus dans la résine (MAN) par le fabriquant. Ce paramètre étant non modifiable au cours de cette thèse, une importante partie de l'étude, décrite ci-dessous, a été consacrée au développement de nouveaux procédés technologiques, destinés à éviter ces effets négatifs de rugosité apparus au cours de notre étude, compromettant la fabrication de particules antiferromagnétiques synthétiques (SAF). Plusieurs développements technologiques ont été testés, avec pour chaque procédé, une mesure de la rugosité de la surface recevant le dépôt magnétique qui forme la particule.

2.1.2 Procédé par tri-couches de résines (2 résines sacrificielles)

Ce procédé a été pensé et développé pour éliminer l'interaction entre les couches de résines précédemment utilisées (PMMA et MAN2403). Une troisième couche d'un polymère non photosensible (LOR10A) est étalée entre les deux résines. Ce dernier se dissout facilement aux développeurs basiques permettant de transférer les motifs créés par photolithographie dans MAN2403 dans la couche de LOR10A, par gravure chimique lors du développement post-insolation.

Dans ce procédé, le substrat est couvert par la résine sacrificielle PMMA, puis par la couche de LOR, et en dernier lieu par la résine photosensible MAN. Après l'insolation, le développement de la résine MAN dissout en même temps les parties de LOR exposées, ce qui permet de transférer les motifs à travers cette couche intermédiaire jusqu'à la couche de PMMA comme montré sur la Figure 12(A).

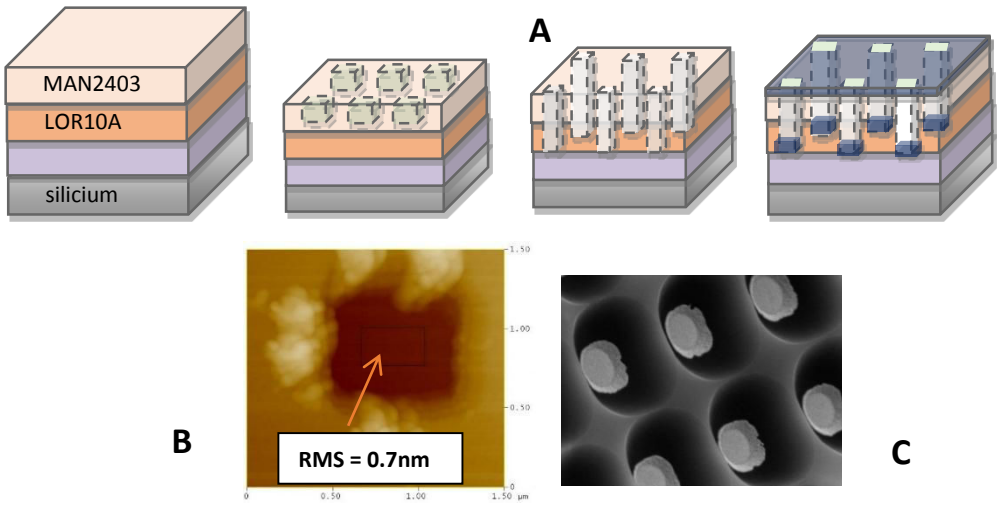


Figure 12. Illustration des étapes du procédé de fabrication des particules par tri-couches de résine. (A) Schéma comprenant l'étape de photolithographie et de dépôt magnétique. (B) Mesure par AFM de la rugosité de surface de la résine PMMA au fond d'un motif après la lithographie optique et juste avant le dépôt magnétique. (C) Photographie au MEB après le lift-off de la résine MAN et le dépôt du matériau. Les particules sont formées dans l' «undercut » de la résine LOR sur la PMMA.

La mesure AFM, illustrée par la Figure 12(B), montre que la rugosité au fond des motifs est relativement faible (0.7nm), bien inférieure à celle du procédé initial en deux résines. Il existe donc un réel intérêt à séparer les deux résines PMMA et MAN2403 pour éliminer l'interaction

entre ces deux dernières créant une rugosité à l'interface. Il est donc envisageable de déposer l'empilement du matériau SAF dans les creux réalisés avec ces trois couches de résines.

Après avoir effectué un dépôt par pulvérisation cathodique de la multicouche $(NiFe/Ru)_nNiFe$ constituant les particules SAF, l'observation au MEB (microscopie électronique à balayage) illustrée par la Figure 12 (C), montre que les particules sont surmontées d'une collerette de dépôt magnétique. Ce dépôt autour des particules SAF est gênant en termes de couplage RKKY en raison de l'épaisseur critique du ruthénium qui n'est pas conservée sur ce niveau oblique des particules. Il s'agit là d'un gros inconvénient car lors du lift-off, ces rebords magnétiques (probablement ferromagnétiques) interagissent magnétostatiquement entre eux et sont à l'origine de l'agglomération des particules.

La gravure chimique de la résine LOR10A étant isotrope, les motifs sont transférés dans couche de résine inférieure avec des profils qui ne sont pas parfaitement verticaux. L'augmentation du temps de gravure reste délicate car les motifs étant espacés par seulement 2µm finissent par communiquer entre eux.

En conclusion, compte tenu des résultats obtenus avec le procédé de la tri-couche de résine, des particules avec des flancs obliques compromettant le couplage antiferromagnétique, nous avons décidé d'arrêter le développement de ce procédé, qui devait limiter la rugosité par une couche de résine LOR placée entre les résines PMMA et MAN.

2.1.3 Procédé de fabrication des particules au sommet des plots de résine

Le principe de ce procédé consiste à structurer une résine photosensible sur un substrat par lithographie optique pour réaliser des piliers de résine sur le silicium. L'empilement magnétique est pulvérisé sur ce substrat, recouvrant ainsi toute la surface du substrat et les sommets des piliers de résine. Ces derniers une fois dissouts par lift-off vont libérer les particules formées à leurs sommets. Le principe est expliqué sur la Figure 13.

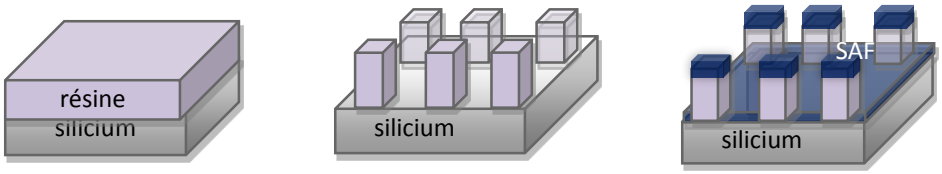


Figure 13. Schéma illustrant le procédé de fabrication des particules SAF déposées sur le sommet des plots de résine.

Avant le dépôt magnétique, la rugosité au sommet de ces piliers de résine positive a été mesurée à l'AFM pour vérifier si le couplage RKKY ne serait pas compromis par la présence de rugosité trop importante à la surface des plots. L'empilement magnétique a ensuite été déposé sur l'échantillon par pulvérisation cathodique, suivi d'un lift-off pour la dissolution des piliers de résine et la mise en solution des particules. Les résultats sont montrés sur la Figure 14.

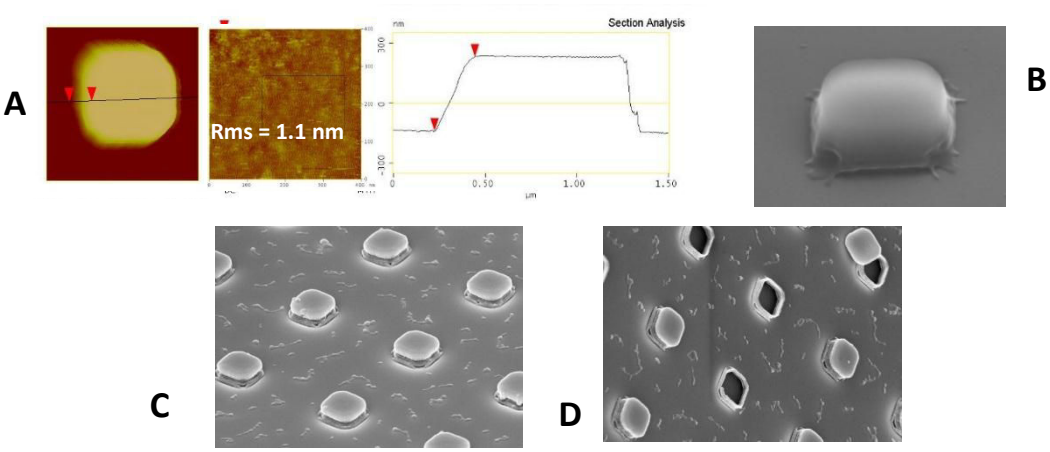


Figure 14. Résultats de la préparation de particules au sommet des plots de résine (A) Image AFM, mesure de rugosité sur le sommet du plot et section du plot de résine positive ZEP. (B-E) Photographie au MEB : (B) Silicium + plot de résine positive. (C-D) Après la pulvérisation cathodique des couches minces magnétiques sur le substrat : (C) Image d'ensemble de plusieurs particules sur plusieurs plots de résine. (D) Echantillon après le lift-off montrant que plusieurs particules sont restées fixées aux piliers de résine positive par un redépôt de matériau magnétique sur les flancs des plots.

L'observation au MEB montre que le dépôt magnétique est homogène sur l'ensemble du substrat avec des motifs conformes aux motifs de lithographie. Des observations plus minutieuses montrent cependant la présence d'un dépôt sur les flancs des piliers, qui pourrait obstruer le passage de solvants lors du lift-off de la résine et empêcher la dissolution de plots. En effet, après avoir réalisé le lift-off de l'échantillon dans un bain de solvants assisté d'ultrasons, une grande proportion de particules restent fixées à des plots de résine toujours

présents, par le dépôt magnétique déposé sur les flancs des piliers de la résine. La présence de ce dépôt sur les flancs proviendrait d'une part des profils de la résine positive utilisée qui ne sont pas parfaitement verticaux, mais plutôt avec une légère pente positive, et d'autre part de l'angle de pulvérisation de la machine de dépôt : en effet il existe un angle d'incidence non directionnel du flux d'ions pulvérisés sur le substrat.

Nous avons réalisé un second test en utilisant cette fois-ci une résine négative car les résines négatives présentent des pentes légèrement négatives. La rugosité au sommet des plots a été suffisamment faible (0.9 nm) pour entreprendre un dépôt magnétique d'une couche de 60 nm de NiFe. Deux techniques de dépôt ont été utilisées, le premier par pulvérisation cathodique et le second par évaporation.

Figure 15. Observation des dépôts magnétiques de monocouche de NiFe sur des piliers de résine négative. (A) Dépôt réalisé par pulvérisation cathodique. (B) Dépôt réalisé par évaporation PVD (Physical Vapor Deposition).

Les résultats, illustrés par la Figure 15, montrent que l'angle d'incidence des ions lors d'un dépôt par pulvérisation cathodique, est bien à l'origine du dépôt qui recouvre les flancs des plots de résine, étant présent lorsque ces derniers ont une pente négative. Le lift-off réalisé sur cet échantillon n'a pas permis la libération des particules. A contrario, le dépôt par évaporation est directionnel et laisse les tranchées libres d'accès aux solvants pour le lift-off final des particules de NiFe.

Le dépôt de la multicouche (NiFe/Ru)n des particules SAF est réalisé obligatoirement dans le bâti de pulvérisation cathodique dû aux ressources techniques disponibles en salle blanche PTA. Nous ne pouvons donc pas envisager la fabrication des particules SAF compte tenu de la non-directionnalité des ions pulvérisés, responsable de dépôts sur les flancs des plots de résines autant négatives que positives.

En conclusion, nous n'avons pas pu fabriquer les particules SAF sur des plots de résine dû au dépôt magnétique sur les flancs des piliers de résine, mais il est tout à fait envisageable

d'utiliser ce procédé pour la réalisation des particules en vortex magnétique par l'évaporation d'une couche unique de NiFe.

2.1.4 Procédé de fabrication des particules SAF par gravure ionique (IBE)

Toujours dans la perspective de s'affranchir du problème de rugosité créé par la bi-couche de résine dans le procédé initial, nous avons développé un procédé qui consiste à obtenir des particules magnétiques en utilisant la gravure par faisceau d'ions focalisés (IBE, Ion Beam Etching) en gravant des motifs de particules dans une couche de matériau magnétique continue. Le principe de cette méthode de gravure repose sur l'utilisation d'un faisceau d'ions pour pulvériser un matériau qui n'est pas protégé par un masque de gravure.

Après avoir étalé la couche de résine sacrificielle de PMMA sur du silicium, nous déposons la multicouche magnétique en pleine tranche par pulvérisation cathodique sur l'ensemble de la plaque. Ensuite, afin de transférer les motifs des particules sur la couche de matériau magnétique, nous protégeons une partie de ce matériau par le masque de gravure en résine photosensible par photolithographie. Cette résine une fois développée révèle les motifs (pattern) aux dimensions des particules qui protègent les surfaces ne devant pas être gravées. Les étapes du procédé sont schématisées sur la Figure 16.

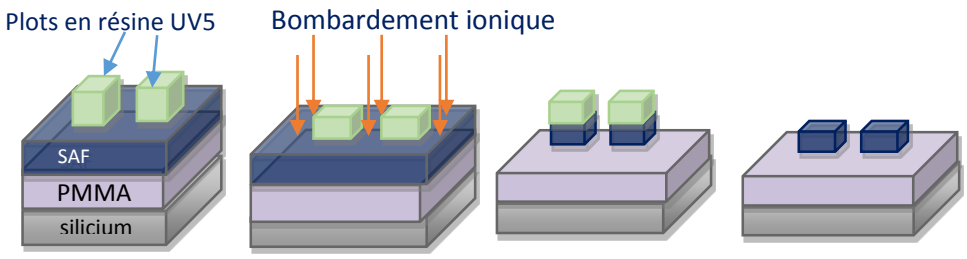


Figure 16. Schéma illustrant les étapes du procédé de réalisation des particules SAF par gravure ionique.

Après l'étape de masquage par une lithographie optique, la gravure par IBE permet d'éliminer toutes les zones non protégées par les plots de résine. Lors de cette gravure, un faisceau d'ions d'argon fortement énergétiques est focalisé à la surface du matériau. Les ions entrent alors en collision avec les atomes des couches du matériau pour les arracher de celles-ci. Idéalement, cette gravure doit être sélective (seule la couche non protégée par la résine doit être attaquée sans dégrader le masque de résine) et directive (sans gravure latérale en dessous des plots de résine).

A la fin de la gravure du matériau magnétique, le masque de gravure en résine est éliminé par un plasma d'oxygène, il apparait alors la présence de redépôts de matériau SAF sur l'échantillon : les composants métalliques gravés s'étaient recombinés avec les bords de la résine qui sert de masque, et ces bords métalliques ne partent pas au plasma d'oxygène, comme le montre la Figure 17.

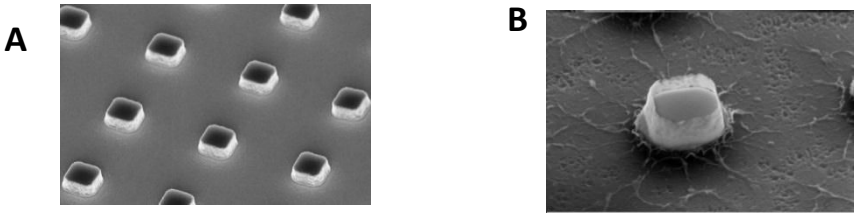


Figure 17. Photos MEB. (A) Du masque de gravure à base de plots de résine UV5 après photolithographie UV. (B) D'une particule après un plasma d'oxygène, avec mise en évidence de la présence du redépôt métallique de SAF, sans l'éliminer.

Après plusieurs étapes de développement, détaillées en annexe numéro 1, permettant d'ajuster plusieurs paramètres notamment de la gravure IBE, du plasma d'oxygène et de la mise en solution des particules, nous avons estimé que la non reproductibilité des résultats obtenus à la fin du procédé et la présence des redépôts magnétiques, nous imposaient d'arrêter le développement du procédé de synthèse des particules par gravure ionique.

2.1.5 Procédé de réalisation des particules SAF par gravure isotrope du silicium

Dans ce procédé la lithographie est réalisée directement sur du silicium, la multicouche de matériau magnétique est déposée par pulvérisation cathodique sur l'échantillon, recouvrant la résine structurée et le fond des motifs sur le silicium. La résine est ensuite enlevée par lift-off de façon à n'obtenir que des particules SAF sur le silicium. Ensuite, une gravure isotrope du silicium permet de libérer partiellement ces particules du substrat et facilite leur mise en suspension dans une solution.

Les principales étapes de ce procédé sont montrées sur le schéma de la Figure 18.

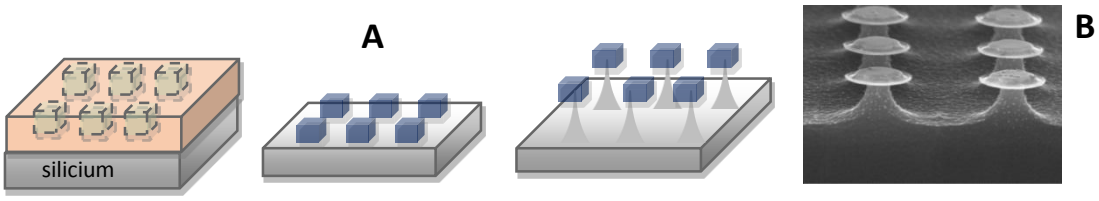


Figure 18. Illustration des étapes de réalisation des particules magnétiques par gravure isotrope du silicium. (A) Schémas de structuration du substrat par lithographie optique de la résine MAN2403, du dépôt du matériau magnétique (multicouche SAF), et de la gravure isotrope du silicium sous les particules magnétiques. (B) Photo MEB du réseau de particules après gravure isotrope du silicium.

La gravure isotrope a la propriété d'attaquer le substrat en silicium dans toutes les directions, donnant un profil de gravure semi-sphérique, ce qui permet d'amincir le volume de silicium en dessous des particules jusqu'à n'obtenir plus qu'un fin plot les reliant au substrat.

Le volume de silicium à graver étant très faible, sous les particules de 1 μm^2, nous avons testé différents temps de gravure, cette étape étant la plus critique car les temps de gravures sont très faibles, de l'ordre de 10 à 15 secondes, temps considérés comme très faibles compte tenu du temps nécessaire à la stabilisation du plasma avant d'amorcer la gravure.

Une fois les piliers de silicium amincis, nous avons réalisé le lift-off dans un bain d'acétone assisté d'ultrasons, mais l'observation au microscope électronique de ce même échantillon après le lift-off a montré qu'une grande partie des particules restent fixées au substrat. Compte tenu des temps très faibles de gravure, l'inhomogénéité du résultat sur la surface du substrat et la difficulté à détacher les particules du silicium, nous n'avons pas retenu ce procédé de fabrication ni pour les particules SAF ni pour les vortex.

2.2 Natures des particules magnétiques retenues pour le reste de l'étude avec le procédé de fabrication correspondant.

Nous avons présenté plusieurs procédés technologiques développés pour la réalisation des particules magnétiques SAF et en vortex par la voie top-down, avec plusieurs essais successifs menés pour l'optimisation du procédé de fabrication. Tous les essais menés en salle blanche et leur caractérisation sont détaillés dans l'annexe n° 1.

En conclusion concernant la fabrication des particules SAF, leur configuration magnétique requière un procédé hautement maitrisé à l'échelle nanométrique dû aux couches séparatrices non magnétiques en ruthénium qui permettent le couplage antiferromagnétique entre les couches minces de NiFe (rappelons que l'épaisseur optimale des couches de

ruthénium est de 0.7 nm). Enfin la contrainte additionnelle est la mise en solution des particules ; en effet, le lift-off de l'échantillon libère l'ensemble des structures se trouvant sur la résine sacrificielle du substrat. Or dans nos réalisations, nous avons été confrontés i) à une trop forte rugosité dans le procédé par bicouches de résines, ii) à la présence de défauts résiduels tels que des redépôts magnétiques autour des particules après le procédé par la gravure ionique, iii) ou à des dépôts magnétiques obliques dans le procédé par la tricouche de résine, modifiant l'épaisseur des couches déposées de ruthénium. Ces défauts ou redépôts produisent des couplages ferromagnétiques plutôt qu'antiferromagnétiques, qui contribuent fortement aux interactions magnétostatiques entre les particules une fois qu'elles sont mises en solution par le lift-off, menant à la formation de grands agrégats. Les procédés technologiques disponibles actuellement ne permettaient pas de résoudre facilement ces problèmes soulevés par les SAF.

Les particules en vortex, ne présentent pas les mêmes inconvénients. La composition de ces particules en couche unique de NiFe est relativement moins sensible à la rugosité présente dans le procédé de la bicouche de résine, et détaillée en annexe n°2. Elles peuvent aussi être déposées de manière directionnelle au sommet des plots de résine. Les conditions d'élaboration des particules en vortex magnétiques sont moins drastiques que les précédentes SAF et permettent d'obtenir leur dispersion en solution.

Ainsi, compte tenu des résultats obtenus lors de ces étapes technologiques, nous avons choisi d'utiliser les particules en vortex magnétique plutôt que SAF pour les tests biologiques de destruction de cellules cancéreuses par les vibrations magnéto-mécaniques (collaboration SCIB), présentés au Chapitre 4. Au préalable, une étude de fonctionnalisation a été réalisée (collaboration SPrAM), présentée au Chapitre 3.

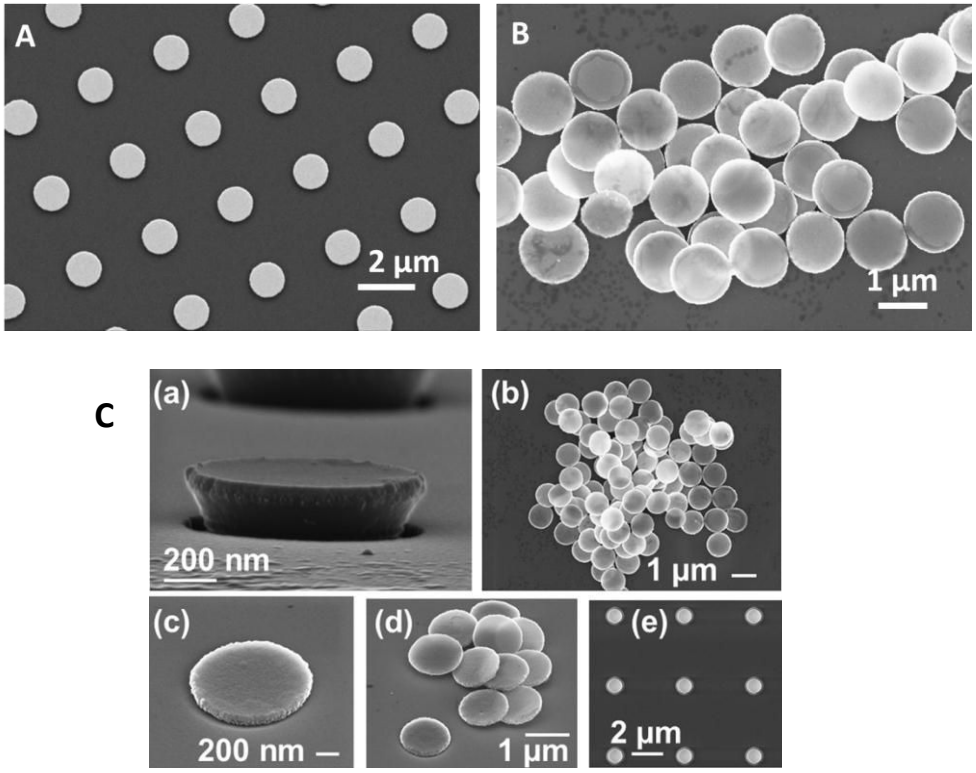


Figure 19. Photos prises au MEB des particules en vortex magnétique. (A) les micro-vortex sont fixés sur le substrat à travers la résine. (B) micro-vortex libérés après le lift-off. (C) [13] (a ; c ; e) micro-vortex fixés sur le substrat. (b-d) libérés après le lift-off.

Le procédé principalement utilisé pour la fabrication des particules en micro-vortex magnétique est semblable à celui mis au point pour les particules SAF [12], en bi-couches de résine. Les particules en vortex (représentées sur la Figure 19) sont constituées d'une couche unique de NiFe d'une épaisseur variant entre 20 à 150 nm, cette couche de NiFe est déposée entre deux couches d'or de 20 nm d'épaisseur. L'or sert à la fois à protéger le NiFe de l'oxydation et aussi au greffage de molécules biologiques par la biofonctionnalisation. Deux procédés ont permis la réalisation de ces particules vortex, celui de la bi-couche de résine a été préféré, Figure 19(A-B), mais le procédé de dépôt par évaporation sur les plots de résine est également possible, illustré par la Figure 19(C).

Une étude comparative entre les deux types particules SAF et vortex une fois libérées en solution a été menée, notamment pour l'étude des phénomènes d'agglomération / dispersion en raison de leurs interactions magnétostatiques, ainsi que le couple mécanique que ces deux types de particules peuvent générer lors de l'application d'un champ magnétique externe [13]. Cette étude est décrite dans la partie qui suit.

2.3 Comparaison des propriétés des particules synthétiques antiferromagnétiques et en vortex

Les propriétés magnétiques des particules SAF ont été largement étudiées lors d'une précédente étude ayant fait l'objet d'une thèse à SPINTEC [60], [12]. Dans cette étude, les particules SAF sont élaborées sans subir les problèmes de rugosité de résine décrits plus haut, difficultés apparues seulement avec les résines actuellement disponibles. Les matériaux et leurs épaisseurs ont été adaptés pour l'obtention de particules antiferromagnétiques synthétiques qui imitent les propriétés des particules superparamagnétiques, (c'est-à-dire présentant une aimantation nulle à champ nul) mais avec une susceptibilité magnétique plus importante.

Les phénomènes d'auto-polarisation menant à l'agglomération des particules SAF en solution ont été étudiés et corrélés au nombre de couches magnétiques couplées, pour un volume magnétique donné. Un modèle analytique auto-consistant basé sur l'interaction dipolaire entre les particules, a pu être établi, permettant d'éviter le phénomène d'agglomération des particules en solution, en choisissant la susceptibilité de l'empilement magnétique. Lorsque la susceptibilité des multicouches magnétiques devient inférieure à un seuil de susceptibilité, le phénomène d'auto-polarisation ne se produit plus, et les particules sont monodisperses en solution en champ nul. Dans ce chapitre, nous avons étudié le comportement des particules magnétiques de type vortex, en particulier les propriétés d'agglomération / dispersion en solution, et nous les avons comparées à celles des particules SAF précédemment établies. Les couples mécaniques que ces particules peuvent exercer lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique extérieur ont ensuite été évalués pour ces deux types de particules, et comparés. Cette étude permettra finalement d'évaluer les avantages et inconvénients de chacun de ces types de particules pour la destruction des cellules cancéreuses.

2.3.1 Caractérisation magnétique

Des caractérisations magnétiques des réseaux de particules en microvortex magnétiques encore attachées au substrat ont été réalisées par des mesures au VSM (vibrating sample magnetometer ou magnétomètre à échantillon vibrant).

La Figure 20 présente les courbes d'hystérésis des particules en microvortex pour différentes épaisseurs de NiFe. Comme prédit pour les particules de configuration en microvortex magnétiques [32,61], les courbes ne présentent pas de rémanence à champ nul et ont un comportement linéaire M(H) à faibles champs, suivi par une soudaine apparition d'hystérésis précédant la saturation.

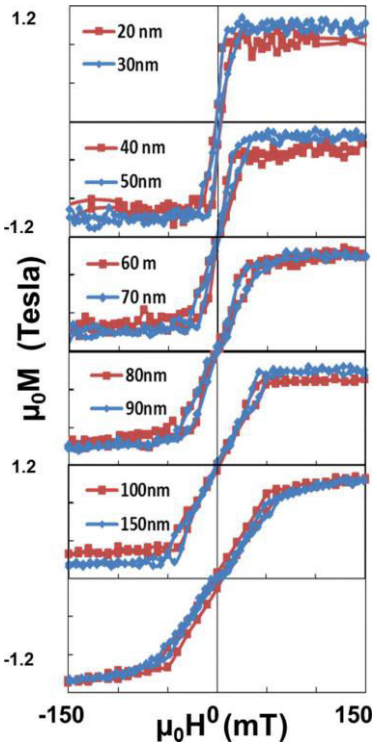


Figure 20. Cycles d'hystérésis d'un réseau de particules micro-vortex en permalloy fixées sur le silicium, mesurés au VSM. Série de courbes expérimentales de l'aimantation en fonction du champ magnétique appliqué, pour des épaisseurs de permalloy variant de t = 20 nm à t = 150 nm. Le diamètre des particules est maintenu constant et égal à 1.3 µm.

En régime linéaire, les micro-vortex se polarisent progressivement dans la direction du champ appliqué. Cette polarisation correspond à un déplacement progressif du cœur de vortex dans une direction transversale à la direction du champ appliqué. Au-delà d'une certaine valeur de champ nommé champ d'annihilation (Hann), le cœur de vortex est expulsé et l'aimantation atteint la saturation Ms. Ensuite, si le champ de saturation diminue à nouveau, on remarque la nucléation du vortex magnétique à une valeur de champ de nucléation (Hn) inférieure au champ d'annihilation Hann. La différence entre le champ de nucléation à des champs décroissants et le champ d'annihilation à des champs croissants est à l'origine de l'hystérésis observée après le régime linéaire.

Une deuxième caractéristique importante sur les courbes présentées sur la Figure 20 est que les particules en vortex minces présentent une hystérésis plus grande que celles plus épaisses. Cette observation peut être expliquée comme suit : dans les microdisques, la configuration de vortex magnétique résulte d'un équilibre énergétique entre les énergies magnétostatique,

d'échange et Zeeman. Ces énergies étant volumiques, augmentent pratiquement linéairement avec l'épaisseur de la couche magnétique. Cependant, dans des échantillons réels, une certaine rugosité existe aux interfaces des couches magnétiques (Au/NiFe et NiFe/Au dans nos échantillons). Cette rugosité entraîne la présence de charges magnétostatiques répartis sur les interfaces qui peuvent piéger localement le cœur du vortex dans son mouvement hors ou vers le centre du microdisque en fonction de l'évolution du champ magnétique appliqué. L'influence de cette énergie de piégeage interfaciale en comparaison avec les autres termes d'énergie est plus grande pour les couches minces de NiFe que pour les couches épaisses. Cela peut expliquer la plus grande hystérésis observée pour les couches minces dans la Figure 20. L'inconvénient de la présence de cette hystérésis dans les particules en vortex fines est que l'aimantation des particules ne s'annule pas complètement à champ nul, donc les particules fines ont tendance à rester partiellement agglomérée lorsque le champ appliqué est coupé.

Une diminution de la susceptibilité magnétique aux faibles champs a été observée quand l'épaisseur de la couche de NiFe augmente. Ceci est cohérent avec la prévision théorique [32] selon laquelle la susceptibilité initiale des microvortex magnétiques est donnée par l'équation suivante extraite de la référence [32] -en unité SI- pour β «1, où β $=\frac{épaisseur}{rayon} = \frac{t}{r}$ est le ratio d'aspect de la particule.

$$\chi(0) = 4\pi \cdot \left[2\beta \cdot \left(\ln\left[{}^{8}/_{\beta}\right] - 1/2\right)\right]^{-1} \qquad (1)$$

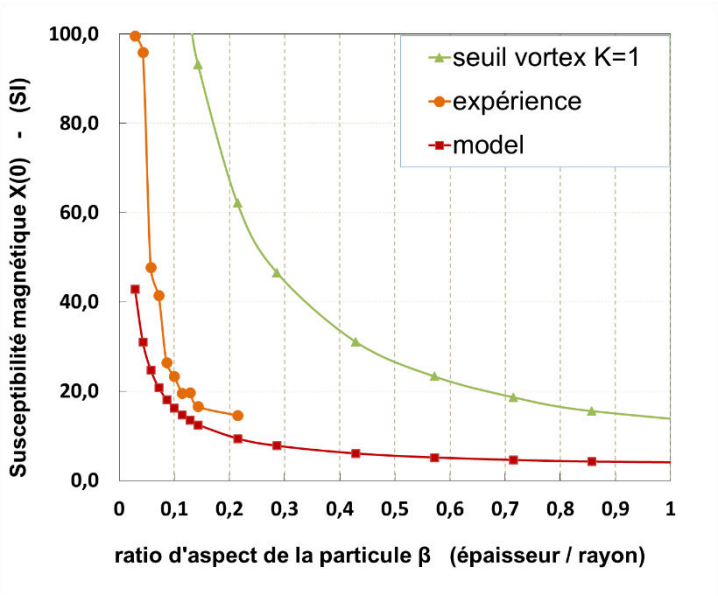


Figure 21. Susceptibilités initiales χ (0) des particules en vortex (expériences en ligne orange et la ligne théorique-rouge) et seuil de susceptibilité (en vert) au-dessus duquel une agglomération serait amenée à se produire, en fonction du rapport β = t / r.

La Figure 21 compare la susceptibilité mesurée dérivée de la pente à faible champ de la courbe M(H) de la Figure 20 pour diverses épaisseurs de NiFe (courbe orange), avec les valeurs théoriques calculées à partir de l'équation (1) (courbe rouge). Une concordance relativement bonne a été trouvée entre les mesures expérimentales et la théorie avec, cependant, une susceptibilité légèrement plus grande observée dans les mesures expérimentales.

Cette légère différence peut être expliquée par les interactions magnétostatiques qui existent entre les particules en vortex fixées en réseau sur le silicium, qui conduisent à intensifier le champ appliqué exercé sur une particule donnée, par le champ de fuite dipolaire des particules avoisinantes [62].

La Figure 21 montre également que la susceptibilité initiale des particules en vortex reste toujours inférieure au seuil de susceptibilité calculé, au-delà duquel l'agglomération se produirait, montrant leur capacité à rester dispersées en solution. Cette propriété sera développée dans le §2.2 suivant.

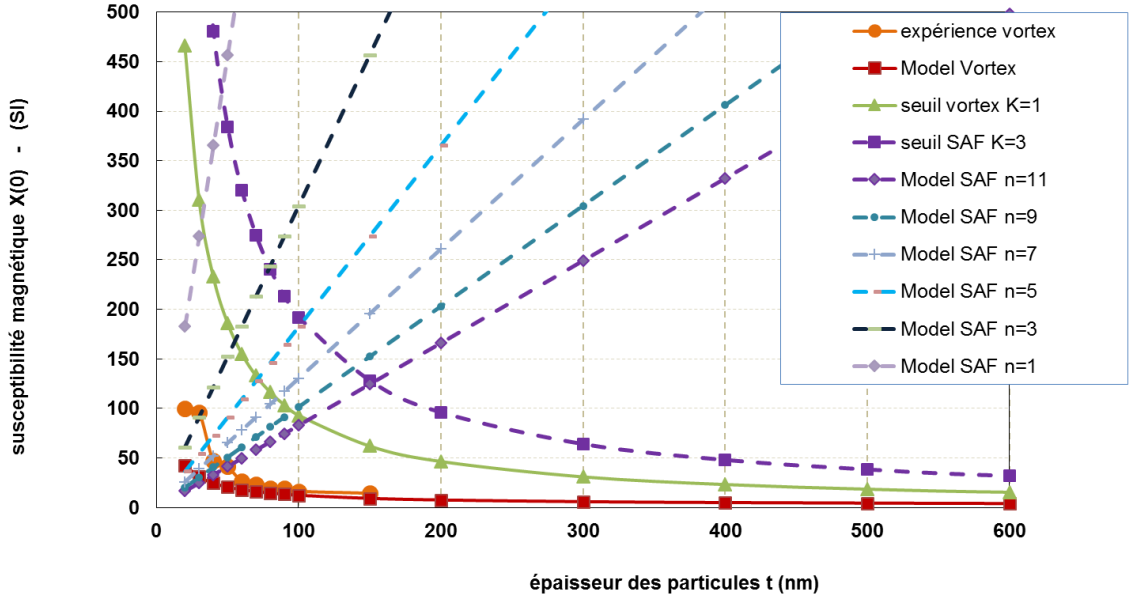


Figure 22. Susceptibilités initiales des particules en vortex χ (0), et des particules SAF $(NiFe/Ru)_n/NiFe$ pour n = 1, 3, 5, 7, 9, 11, et seuil de susceptibilité des SAF au-delà duquel une agglomération des particules SAF est attendue, en fonction de l'épaisseur des particules pour un rayon de vortex de r = 0.7 µm et une longueur de côté pour les SAF de l = 1.225 µm produisant un volume magnétique équivalent pour les deux types de particules.

La Figure 22 met alors en évidence la comparaison entre les susceptibilités des vortex avec les particules SAF dont les susceptibilités à l'origine ont été calculées à partir de l'expression théorique M(H)[12]. Contrairement aux microvortex, la susceptibilité des SAF augmente en augmentant l'épaisseur de la particule pour un nombre de couches magnétiques donné [12].

La Figure 22 confirme également que les susceptibilités initiales des particules SAF, contrairement à celles des vortex, peuvent dépasser le seuil théorique d'agglomération lorsque leurs épaisseurs augmentent. Ces propriétés seront comparées pour les vortex et SAF dans le §2.2 suivant.

2.3.2 Etude comparative des susceptibilités seuil en relation avec le phénomène d'agglomération des particules SAF et vortex.

Les phénomènes d'agglomération et de dispersion des microdisques en vortex une fois libérés en solution par le procédé du lift-off ont été alors étudiés comme effectué précédemment pour les particules SAF. Des observations en microscopie optique d'une suspension de

microvortex juste après le lift-off sont montrées sur la Figure 23. Lorsqu'un champ magnétique est appliqué, comme il est généralement observé, les microvortex tendent à s'aligner en chaines. Une fois que le champ magnétique est coupé, ces microvortex se re-dispersent graduellement. Toutefois, cette re-dispersion reste moins immédiate que pour les particules SAF et peut nécessiter quelques minutes (6 à 7 minutes dans nos expériences) pour atteindre une monodispersion totale des microvortex.

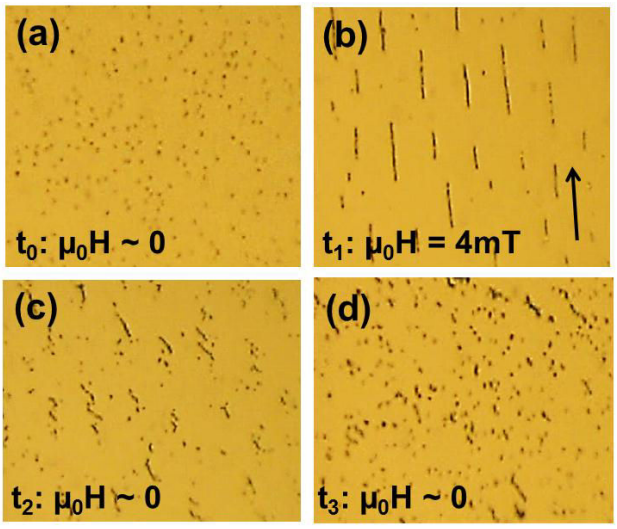


Figure 23. Photos prises en microscopie optique de microvortex libérés par lift-off dans de l'acétone. (a) Les microvortex sont monodisperses (non agglomérées) à H ~ 0 (champ terrestre), (b) agglomérées en chainettes à μ_0H ~4 mT. (c) dispersion instantanée à μ_0H ~ 0 à nouveau, et (d) stade de dispersion avancée après 6 minutes.

De plus, nous avons remarqué que la re-dispersion suite à la coupure du champ appliqué n'était pas complète pour les microvortex les plus fins, probablement en raison de l'hystérésis mentionnée précédemment dans le paragraphe « Caractérisation magnétique ». Toutefois, la tendance générale observée avec les microvortex magnétique va vers une complète dissociation des particules quel que soit leur épaisseur si nous laissons assez de temps au système.

Tout comme le modèle développé précédemment pour les particules SAF [12], nous avons recherché ensuite par une approche théorique, l'existence de conditions pour les particules en vortex notamment sur la taille et l'épaisseur, qui empêcheraient leur auto-polarisation. En effet, nous avons démontré précédemment que si la susceptibilité des particules est trop grande, le champ de fuite créé par les particules microvortex avoisinantes sur une particule

donnée quand les particules sont en chaîne -lors de l'application d'un champ magnétique- peut maintenir la polarisation des particules même si le champ magnétique est coupé. Cet effet d'auto-polarisation est critique pour notre application finale et dans le domaine biomédical en général car il mène à l'agglomération des particules.

La susceptibilité critique au-delà de laquelle les vortex magnétiques demeurent auto-polarisés peut être obtenue en écrivant deux équations couplées : (i) l'une exprimant le moment magnétique acquis par une particule magnétique sous un champ appliqué (assumé comme restant dans le régime linéaire de la polarisation) : M = χVH où V est le volume de la particule, χ est sa susceptibilité, et H le champ agissant sur la particule, (ii) l'autre exprimant que le champ magnétique agissant sur une particule donnée, est le champ de fuite crée par les autres particules polarisées avec un moment M. La condition d'existence d'une susceptibilité seuil au-delà de laquelle une auto-polarisation a lieu, est obtenue quand une solution non nulle pour M existe entre ces deux équations couplées [12]. Tenant compte du fait que les particules sont cylindriques de rayon R et épaisseur magnétique t, et en assumant que chacune d'entre elles agit comme un dipôle locale, la susceptibilité suivante est obtenue :

$$\chi_{threshold} = \left.\frac{\partial M}{\partial H}\right|_{H=0} = \frac{16K\,.R}{\left[\sum_{k=1}^{N}\left(\frac{1}{k^3}\right)\right].t} = \frac{16\,K}{\left(\sum_{k=1}^{N}\left(\frac{1}{k^3}\right)\right).\beta} \qquad (2)$$

La somme, dans laquelle N représente le nombre de particules le long de la chaine converge très rapidement vers 1.202, la valeur exacte de N n'a donc pas une très grande importance. Le facteur numérique K, de l'ordre de 1 à 4, décrit le fait que le champ de fuite créé sur une particule par les particules avoisinantes peut être réduit par le fait que les plans des particules le long des chaînes peuvent être non alignés.

La Figure 21 illustre la comparaison des susceptibilités des particules en vortex (expérimentales et théoriques) avec la valeur de la susceptibilité seuil au-delà de laquelle les particules s'auto-polarisent. Il apparaît que quel que soit le diamètre et l'épaisseur des particules, la susceptibilité des microvortex reste toujours en dessous du seuil critique d'auto-polarisation. En conclusion, ces particules en vortex ne devraient jamais s'agglomérer par des interactions magnétostatiques, tant qu'elles conservent un comportement magnétique réversible à faibles champs.

Ce résultat marque un fort contraste avec les particules SAF, dont la susceptibilité peut être ajustée pour une même épaisseur finale de matériau magnétique en changeant le nombre de répétitions dans la multicouche, avec la possibilité de dépasser le seuil de susceptibilité conduisant à leur autopolarisation, donc à leur agglomération.

2.3.3 Comparaison des couples générés par les particules SAF et vortex.

Notre application biomédicale finale, visant à cibler et à détruire les cellules cancéreuses par les vibrations magnéto-mécaniques des particules lorsqu'elles sont attachées aux membranes des cellules, implique d'utiliser des particules qui peuvent être actionnées par des champs magnétiques alternatifs. Grâce à l'approche top-down, il est possible de produire des particules avec une anisotropie magnétique de forme, contrairement aux voies de synthèse bottom-up produisant principalement des particules quasisphériques, qui resteraient quasi-immobiles.

C'est donc grâce à leur anisotropie de forme que les particules SAF et vortex peuvent être activées par des champs magnétiques alternatifs. Pour l'application prévue qui est de produire des vibrations magnéto-mécaniques, dans le but de déclencher l'apoptose des cellules cancéreuses rénales, plus le couple exercé sur les membranes est fort, plus le traitement devrait être efficace. Nous avons donc comparé les couples magnétiques créés par les deux types de particules SAF et vortex.

Le couple magnétique Γ exercé sur une particule magnétique ayant un moment magnétique *m* dans un champ magnétique donné H est donné par $\mathbf{\Gamma} = \mathbf{m} \times \mu_0 \mathbf{H}$.

En raison de la forme plate (énergie de champ démagnétisante favorisant une orientation d'aimantation dans le plan), et de la faible anisotropie dans le plan des deux particules vortex et SAF, le moment magnétique net des particules (de volume V) peut être considéré comme étant dans le plan et aligné avec la projection dans le plan du champ appliqué. Si θ est l'angle entre le plan de la particule et le champ appliqué, l'amplitude du couple est donc :

$$\Gamma = \mu_0 V \times \chi H^2 \times \cos\theta \sin\theta$$

Selon cette expression, la valeur du couple est maximale lorsque le champ est à 45° du plan de la particule, ces grandeurs étant schématisées sur la Figure 24.

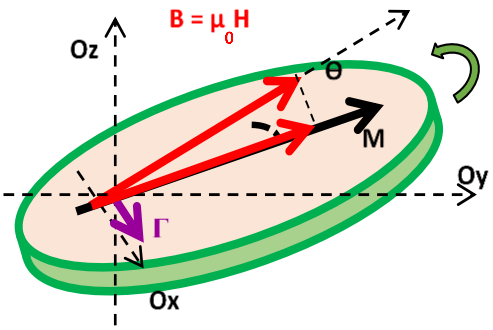


Figure 24 : Schéma représentant la particule (d'aimantation M), dans un champ magnétique appliqué avec un angle θ par rapport au plan de la particule, (B = μ_0H). Le couple Γ exercé sur la particule, est maximum pour un champ B appliqué à 45° du plan de la particule.

Revenons à la comparaison entre le couple généré par les particules SAF et en vortex. Pour les particules en vortex, en tenant compte de leur volume cylindrique et leur susceptibilité donnée par l'équation 1 ($\chi_{Vortex} = \frac{4\pi}{\frac{2T}{R}[\ln(8R/T)-1/2]}$) extraite de la référence [32], le couple est alors exprimé par l'équation suivante :

$$\Gamma_{Vortex} = \mu_0 H^2 \frac{2\pi^2 R^3}{[\ln(8R/T)-1/2]} \cos\theta \sin\theta \qquad (3)$$

Nous remarquons un fait intéressant : dans la mesure où la gamme de champ appliqué correspond au régime linéaire de déformation de l'aimantation du vortex, cette expression du couple ne dépend pas des caractéristiques du matériau magnétique (en particulier son aimantation et sa constante de raideur d'échange). En effet l'expression du couple ne dépend que de la géométrie des particules (épaisseur et rayon). Il est alors préférable d'utiliser des matériaux magnétiques doux (tels que $Ni_{80}Fe_{20}$) pour qui le cœur du vortex puisse se déplacer d'une façon plus réversible qu'avec un matériau magnétiquement plus dur.

De la même manière, pour les particules carrées SAF, ce couple peut être calculé à partir de l'expression de la susceptibilité qui est donnée par

$$\chi_{SAF} = \frac{\mu_0 . M_S^2 . t}{4n.(J_{1Ru} - 2J_{2Ru})}$$

Cette expression de la susceptibilité est issue de l'expression de H=M(H), détaillée dans la référence [12] . Cette expression est obtenue en minimisant l'énergie totale du multicouche prenant en compte l'énergie de couplage intercouches bilinéaire (caratérisée par le paramétre J1Ru) et

biquadratique (caractérisée par le paramètre J2Ru) et l'énergie Zeeman caractérisant le couplage du moment de chaque couche magnétique avec le champ appliqué. L'expression du couple exercé sur la particule est donc :

$$\Gamma_{SAF} = {\mu_0}^2 \,.\, H^2 \frac{M_S^2.a^2.t^2}{4n.(J_{1Ru}-2J_{2Ru})} \cos\theta \sin\theta \qquad (4)$$

où « a » représente la dimension latérale des particules, « t » est l'épaisseur magnétique totale, « n » est le nombre de couches non magnétiques subdivisant l'épaisseur totale, J_{1Ru} et J_{2Ru} sont les constantes d'énergie de couplage entre les couches (couplages bilinéaire et bi-quadratique respectivement), et M_s l'aimantation à saturation.

Pour l'étude comparative, le volume V des particules en vortex et SAF (respectivement $\pi R^2 t$ et $a^2 t$) est égal pour les deux en définissant le rayon de la particule en vortex R = 0.7 µm et la taille des particules SAF a = 1.225 µm.

La Figure 25 montre une comparaison des couples de ces deux types de particules, dans un champ appliqué à 45°, H = 100 Oe.

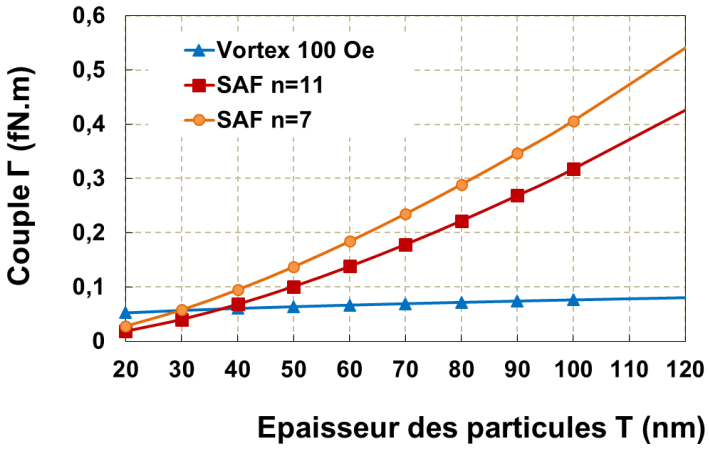


Figure 25. Les couples magnétiques en fonction de l'épaisseur des particules SAF et microvortex. Le champ magnétique H = 100 Oe est appliqué à un angle de 45° par rapport au plan des particules. Les couples magnétiques pour les particules vortex et SAF ont été calculés à partir des expressions (3) et (4) respectivement. Les particules SAF étant carrées de composition $(NiFe/Ru)_n/NiFe$, avec n=11 ou 7 répétitions, en assumant que Ms du NiFe =800 kA/m, J_{1Ru}=6.6 x 10^{-5} J/m^2 et J_{2Ru} =2.2x 10^{-5} J/m^2.

Il ressort de ce graphique que pour les microvortex magnétiques, le couple ne varie que faiblement avec l'augmentation de l'épaisseur magnétique à cause de l'évolution logarithmique de la susceptibilité des vortex en fonction de leur épaisseur t. Un gain de couple

de 20 % peut être obtenu en doublant l'épaisseur magnétique (de 50 nm à 100 nm par exemple). Une manière efficace d'augmenter ce couple serait d'augmenter le rayon des particules. En effet, le couple varie proportionnellement à r^3, ou encore d'augmenter l'amplitude du champ alternatif appliqué ; rappelons que le couple est proportionnel à H^2.

Le couple des particules SAF peut atteindre des valeurs significativement plus importantes que les particules en vortex à des champs magnétiques modérés. Nous avons calculé un couple 5 fois plus grand pour les SAF que pour les vortex pour les plus grandes épaisseurs (t ~ 120nm). Par conséquent, les particules SAF, une fois attachées aux membranes cellulaires devraient être plus efficaces pour la perturbation mécanique des membranes que les particules en vortex. Nous remarquons malgré tout que pour des épaisseurs inférieures à environ 40 nm, le couple généré par les particules vortex peut devenir plus important que celui des particules SAF.

Cependant, de manière évidente, à des champs plus élevés que les champs de saturation des particules, les couples deviennent égaux pour les deux types de particules puisque les volumes magnétiques des particules SAF ou vortex sont égaux.

2.4 Conclusion

En conclusion, lors de la comparaison entre les particules SAF et vortex, les points suivants doivent être pris en compte. Même si les particules vortex génèrent des valeurs de couples moins importantes que les particules SAF, leur aptitude à déclencher l'apoptose des cellules cancéreuses a déjà été démontrée.

Comme expliqué précédemment dans la partie «

Procédés de fabrication développés en salle blanche», les particules SAF sont plus complexes à fabriquer vu leur constitution en multicouches avec un couplage antiferromagnétique entre les couches ferromagnétiques successives, qui est atteint en utilisant des couches séparatrices spécifiques telles que le ruthénium dont l'épaisseur doit être minutieusement contrôlée (typiquement

$t_{Ru=}$0.8 nm ± 0.1 nm). Ceci requiert des couches de très faibles rugosités, rendant le procédé de fabrication des particules SAF difficile, d'autant plus en tenant compte de la contrainte supplémentaire – par rapport aux applications habituelles des SAF en spintronique (e.g. têtes magnétorésistives pour disques durs)- de mise en solution des particules à la fin du procédé.

En effet la sous-couche sacrificielle composée ici de résine, doit elle-même présenter cette rugosité minimale. Et pour les expériences en biologie où un nombre relativement important de particules est requis pour l'obtention de résultats significatifs, il est grandement nécessaire en effet qu'il n'y ait aucune agglomération de particules.
Au contraire, les particules en vortex sont plus faciles à fabriquer étant donné qu'elles consistent en une seule couche de matériau magnétique dont l'épaisseur et la rugosité ne nécessitent pas un contrôle rigoureux. De plus, les particules en vortex seraient plus faciles à réaliser avec des oxydes de fer Fe_3O_4 (magnétite) et γ-Fe_3O_4 (maghémite), dont la biocompatibilité a été démontrée. Pour les particules SAF, remplacer le Ru par un matériau biocompatible serait plus délicat.

En résumé, nous avons décrit dans ce chapitre les procédés top-down développés en salle blanche pour la fabrication des particules SAF et vortex, aussi, nous avons mené une large étude sur l'origine de la rugosité qui apparait à une étape du procédé de fabrication, cette étude étant détaillée dans l'annexe numéro 2. Enfin, nous avons présenté dans ce chapitre la comparaison entre deux types de particules magnétiques adaptées aux applications biomédicales. Les deux types de particules SAF et vortex présentent chacune des avantages. Les particules SAF peuvent, en principe, produire des couples plus importants que les vortex, mais sont plus difficiles à fabriquer, plus spécialement avec des matériaux biocompatibles. Les particules en vortex sont plus facilement réalisables, aussi, leur susceptibilité est toujours en dessous du seuil d'auto-polarisation de façon à ce que les particules ne s'agglomèrent jamais. Le procédé de fabrication maîtrisé et les propriétés magnétiques caractérisées, le chapitre qui suit décrit la biofonctionnalisation chimique des particules recouvertes d'or, cette étape ayant pour objectif d'accrocher l'anticorps à la surface des particules magnétiques. Cet anticorps spécifique permettra ensuite à la particule de se lier à l'antigène exprimé par la cellule cancéreuse, ensuite, l'application d'un champ magnétique alternatif extérieur fera osciller ces particules, qui transmetteront aux membranes cellulaires les effets des couples magnéto-mécaniques étudiés ci-dessus.

Chapitre 3 : Fonctionnalisation des particules magnétiques

Dans ce chapitre, nous décrivons la fonctionnalisation de la surface des particules en micro-vortex magnétiques, cette étape est très importante et a pour objectif l'ancrage des anticorps à la surface des particules pour permettre la liaison de celles-ci aux antigènes membranaires des cellules cancéreuses. Rappelons que dans le procédé de fabrication des particules magnétiques (décrit dans la première partie du second chapitre), nous avons décrit l'introduction d'une étape supplémentaire qui est le dépôt d'une couche d'or avant et après le dépôt magnétique. L'objectif étant d'enrober les particules avec un matériau biocompatible et dont la modification de la chimie de surface est connue et largement étudiée dans la littérature.

La fonctionnalisation de surface a été réalisée au CEA au sein du groupe SPrAM/CREAB (Chimie pour la Reconnaissance et l'Etude d'Assemblages Biologiques). L'activité principale de cette équipe se situe à l'interface entre physique, chimie, biologie et nanotechnologies, pour l'étude d'interactions spécifiques entre surfaces fonctionnalisées et objets biologiques de complexités différentes - de la molécule individuelle à la cellule, en passant par les nanoparticules décorées, les vésicules et autres.

Diverses fonctionnalisations de surfaces d'or ont été développées au sein du groupe CREAB. Cette expertise a été mise à profit dans le travail de cette thèse pour développer une biofonctionnalisation adéquate des particules en micro-vortex magnétiques. Le schéma de fonctionnalisation choisi consiste à adsorber sur la surface d'or des molécules « cross- linker » qui se lient à la fois sur les surfaces d'or par une extrémité et sur la molécule d'intérêt par la seconde extrémité, l'établissement de ces liaisons chimiques requérant des étapes et des conditions spécifiques qui sont détaillées dans le corps de ce chapitre.

3.1 Auto-assemblage des thiols sur les surfaces d'or

La première étape du procédé de bio-fonctionnalisation des particules magnétiques consiste à recouvrir la surface des particules par des molécules pouvant se lier à l'or d'un côté, et aux anticorps de l'autre. Pour cela, nous avons utilisé les monocouches auto-assemblées ou

« SAMs » (Self-Assembled Monolayers) d'alkanethiols et dialkanethiols sur or. En effet, ces derniers représentent des éléments clés pour la réalisation de nombreux dispositifs avec diverses applications dans le vaste domaine des nanotechnologies.

Le terme « auto-assemblage » se réfère à la formation spontanée d'unités discrètes nanométriques à partir de sous-unités simples ou de briques de base (building blocks).

Durant le procédé d'auto-assemblage, les sous-unités (atomes, molécules..) se combinent de façon à former une structure secondaire, plus complexe avec moins de degrés de liberté. Alors que les membranes biologiques peuvent être considérées comme des systèmes auto-assemblés hautement sophistiqués [63], les monocouches auto-assemblées quant à elles sont considérées comme les systèmes les plus simples. En quelques mots, les SAMs sont des arrangements de molécules ou d'atomes adsorbés sur des surfaces solides sur lesquelles les forces intermoléculaires jouent un rôle clé. Ces arrangements peuvent être spontanément formés à partir d'une solution ou d'une phase vapeur. Chaque molécule peut être divisée en trois parties distinctes : la tête (groupement de liaison à la surface), le squelette (chaîne carbonée principale) et le groupement terminal portant les groupements actifs.

Le groupe de tête guide le processus d'auto-assemblage sur un type de substrat, reliant la chaine hydrocarbonée à la surface métallique par une forte liaison. Les interactions entre les chaînes carbonées des squelettes impliquant des forces hydrophobes et de Van Der Waals, maintiennent une structure resserrée et contribuent à la stabilisation de la structure. Le groupe terminale confère des propriétés spécifiques à la surface et peut servir à ancrer différentes molécules, des biomolécules ou des nanostructures, par de faibles interactions ou des liaisons covalentes.

Les SAMs présentent de très nombreux avantages pour la fonctionnalisation des surfaces, notamment pour la facilité de leur préparation, une grande flexibilité et un large choix de groupes terminaux et la possibilité de former des SAMs sur des objets de toutes tailles avec une grande variété de formes.

Les SAMs peuvent être considérés comme l'interface entre deux mondes : les composés inorganiques (métaux, semiconducteurs) d'un côté, et les matières biologiques et organiques de l'autre. Ils représentent un moyen facile de lier des matériaux avec des propriétés physico-chimiques complètement différentes.

Dans le domaine de la médecine, les SAMs de thiols sont utilisés comme agents de liaison de biomolécules dans la délivrance ciblée de médicaments et également pour fonctionnaliser des dispositifs médicaux tels que les stents en or [64].

Pour notre étude concernant l'utilisation de particules magnétiques élaborées par l'approche top-down pour induire l'apoptose des cellules cancéreuses, nous avons choisi une fonctionnalisation des particules avec la chimie des thiols sur or, en effet, les atomes de souffre ont une forte affinité pour l'or, ce qui permet d'utiliser les thiols comme intermédiaires pour le greffage de molécules biologiques sur les surfaces d'or.

Le paragraphe suivant décrit les principales étapes d'élaboration d'un SAM de thiols à la surface des particules magnétiques recouvertes d'or.

Rappelons que la fonctionnalisation des particules magnétiques a pour but d'ancrer des anticorps à leur surface afin de lier les particules aux antigènes se trouvant sur les membranes cellulaires. Afin d'optimiser l'ancrage des anticorps sur les groupements réactifs du SAM, nous avons choisi d'élaborer un SAM mixte c'est-à-dire un SAM constitué par la coadsorption de deux thiols distincts sur la même surface d'or [65]. Nous avons choisi de construire un SAM contenant des carboxythiols longs (C12) et des hydroxythiols courts (C6) avec un ratio de 1/5 en faveur des thiols courts. Le premier possède un groupement terminal actif pour le greffage des anticorps, le second a été utilisé comme espaceur pour éviter les effets d'encombrements stériques lors de la fixation de ces derniers.

La préparation du SAM mixte de thiols débute par la préparation de la solution contenant les deux types de thiols dilués dans de l'éthanol anhydre avec le premier thiol long [11-MercaptoUndécaoic acid ($HSCH_2(CH_2)$] à une concentration de 2 mM et le second thiol court [6-Mercapto-1Hexanol] à une concentration de 10 mM, soit 5 fois plus concentré que les carboxythiols longs pour permettre l'espacement de ces derniers lors de la formation du SAM à la surface des microparticules magnétiques, comme le schématise la Figure 26.

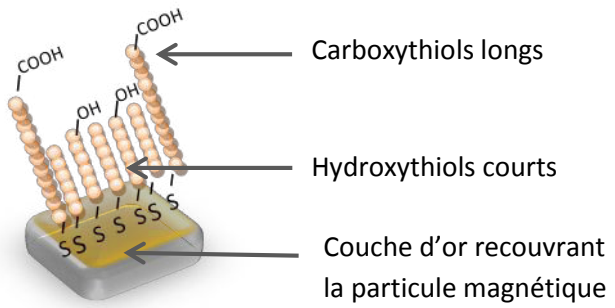


Figure 26. Schéma d'adsorption du SAM mixte sur la couche d'or recouvrant les particules magnétiques.

3.2 Activation des groupements carboxyliques de SAMs

Les fonctions carboxyliques sont très intéressantes pour les applications biologiques car elles permettent d'accrocher des biomolécules de façon covalente dans des conditions douces sur des substrats en or. La liaison des groupements carboxyliques avec les fonctions amines, disponibles en grande quantité dans les biomolécules en général, nécessite une étape d'activation des fonctions carboxyliques pour les transformer en ester activé.

Les composés contenant des fonctions carbodiimide N-C-N sont des agents déshydratants souvent utilisés pour activer les acides carboxyliques COOH pour faciliter leur couplage avec les amines primaires NH_2 pour former des liaisons amides COONH.

Pour activer les fonctions carboxyliques des thiols longs du SAM mixte, nous avons utilisé de l'EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide), qui est un carbodiimide soluble dans l'eau. L'ajout de ce dernier génère l'ester activé intermédiaire par réaction d'addition du groupement OH de l'acide carboxylique sur le carbone électrodéficient de l'EDC, selon la Figure 27.

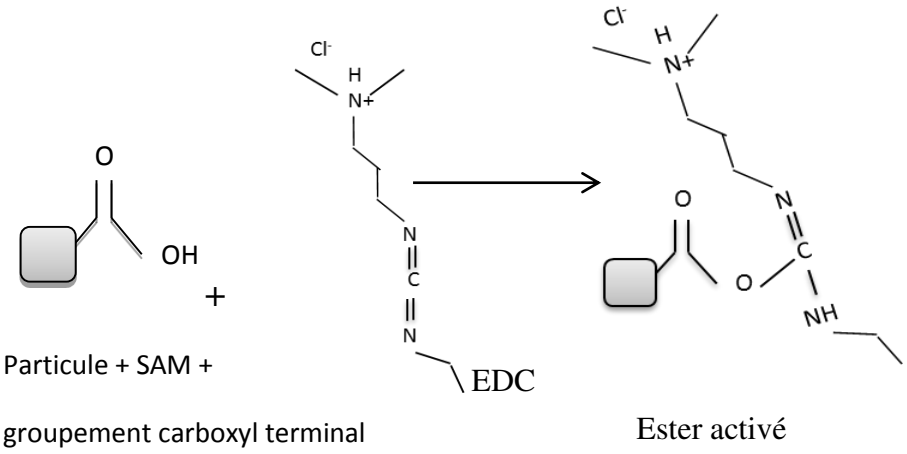


Figure 27 : Schéma réactionnel de l'EDC avec les groupements carboxyl des thiols lors de l'activation des fonctions COOH.

Cependant, l'EDC n'est pas particulièrement efficace pour le couplage des groupements COOH avec les amines portées par des anticorps. En effet, l'ester activé est instable en solution aqueuse. Pour cette raison, nous combinons l'utilisation de l'EDC avec du NHydroxysuccinimide NHS, souvent utilisé pour augmenter l'efficacité du couplage COOH-NH_2, (Figure 28).

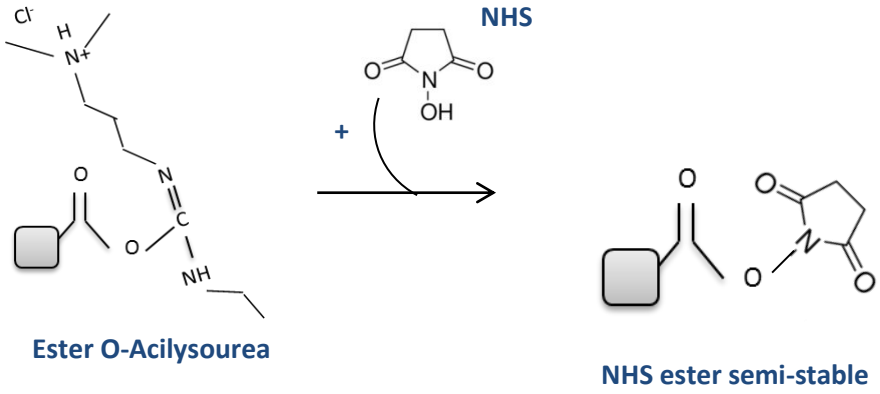


Figure 28 : Schéma réactionnel de l'attaque nucléophile du NHS sur l'ester activé.

Après cette étape d'activation des groupements carboxyliques de SAMs, les anticorps peuvent être attachés de façon covalente à la surface des microparticules magnétiques par la réaction d'amidation.

3.3 Caractérisation de la formation du SAM par la microscopie à fluorescence

Avant de passer à l'étape de la liaison des anticorps sur les particules magnétiques, il est indispensable de vérifier si la première couche de SAMs a bien été liée à la surface des particules magnétiques après la première étape de fonctionnalisation. La formation du SAM a été caractérisée par la microscopie à fluorescence. Pour cela, la streptavidine couplée à un fluorophore appelé phycoérythrine a été utilisée. La streptavidine est une protéine purifiée de la bactérie *Streptomyces avidinii*. Comme les anticorps, elle possède de nombreuses fonctions amines primaires qui permettent l'ancrage sur des surfaces via la liaison à des groupements carboxyliques. De plus, l'utilisation de la streptavidine s'avère plus économique que celle des anticorps.

La détection par la fluorescence est très utilisée dans les systèmes miniaturisés, le principe étant basé sur le marquage d'une cible par un fluorophore : molécule qui absorbe l'énergie d'une source lumineuse à une certaine longueur d'onde (excitation) et la restitue en partie sous forme de lumière fluorescente (émission) à une longueur d'onde supérieure. L'excitation et l'émission sont des propriétés intrinsèques du fluorophore. Un des inconvénients majeurs de cette technique est le photoblanchiment qui correspond à la perte des propriétés d'émission des fluorophores sous l'effet d'une excitation prolongée à une intensité lumineuse.

Tout d'abord, nous avons laissé l'échantillon contenant le réseau de particules magnétiques fixées sur la plaque de silicium, en immersion dans la solution de thiols environ 24h (temps estimé nécessaire pour la formation de SAM bien ordonnée sur les surfaces d'or). Ensuite, les groupements carboxyliques de SAM ont été activés par EDC/NHS. Enfin, nous avons ajouté une solution de streptavidine couplée à la phycoérythrine pour révéler l'adsorption des thiols sur les surfaces d'or. Comme nous l'avons cité précédemment, la streptavidine par ses nombreux groupements amines primaires a pu être substituée aux anticorps dans cette expérience, puisqu'elle se lie de la même façon aux fonctions carboxyliques terminales. En parallèle, un échantillon témoin a reçu le même traitement mais sans présence de thiols en solution. L'observation par la fluorescence des échantillons, présentée sur la figure 4, met en

évidence la réussite de cette première étape de fonctionnalisation, montrant bien l'adsorption des thiols sur les surfaces d'or des particules magnétiques.

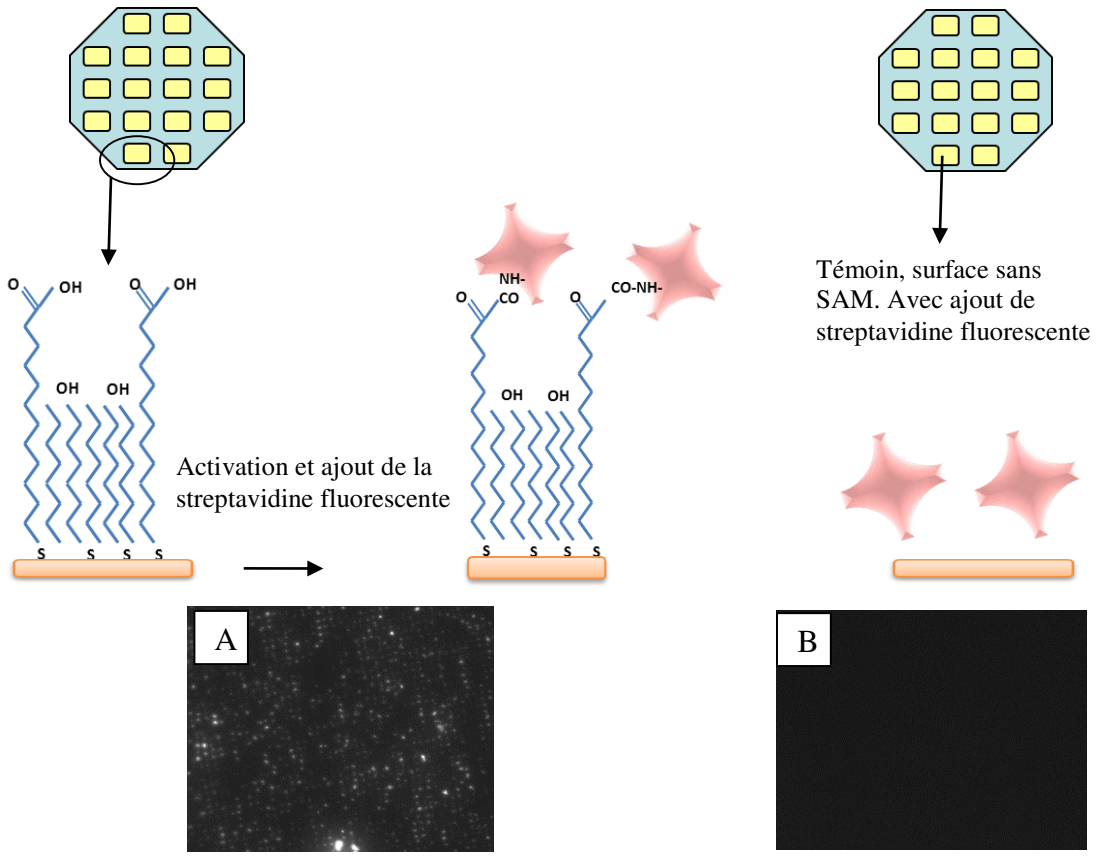


Figure 29 : Schéma explicatif de la mise en évidence du SAM de thiols à la surface de l'or. Photos au microscope à fluorescence du réseau de particules après l'ajout de streptavidine fluorescente A/ Sur un réseau de particules couvertes d'or après immersion dans la solution de thiols : observation d'un réseau de points fluorescents de 1 µm x 1 µm avec une périodicité de 3 µm, montrant la fonctionnalisation des particules par les SAMs. B/ Sur une surface témoin après immersion dans la solution sans thiol : elle ne présente pas de fluorescence. La fonctionnalisation par les SAMs de thiols est bien démontrée sur l'échantillon A.

Les résultats de cette expérience montrent deux réalisations réussies pour la bio-fonctionnalisation des particules magnétiques : premièrement, le protocole opératoire développé permet bien la formation du SAM à la surface des particules. Deuxièmement, la liaison de la streptavidine fluorescente prouve que les groupements carboxyliques du SAM ont bien été activés par le procédé élaboré mettant en œuvre le couple EDC/NHS. Ces premières étapes d'adsorption du SAM de thiols et l'activation de ses fonctions carboxyliques réussies, nous pouvons donc débuter les tests d'immobilisation des anticorps spécifiques, qui

serviront plus tard, rappelons-le, à la liaison sur les antigènes membranaires des cellules cancéreuses.

3.4 L'immobilisation des anticorps

Les anticorps, appelés aussi immunoglobulines, sont des protéines du système immunitaire. Ils ont pour fonction la fixation spécifique sur des pathogènes via la reconnaissance de protéines spécifiques appelées antigènes. Les anticorps sont constitués de chaînes polypeptidiques structurées en Y, la propriété de reconnaissance étant conférée par le fragment appelé Fab (Fragment antigen binding), voir Figure 30. Nous reviendrons sur l'importance de cette structure lors de la fonctionnalisation par les anticorps et le traitement sur les cellules dans les parties suivantes de ce chapitre.

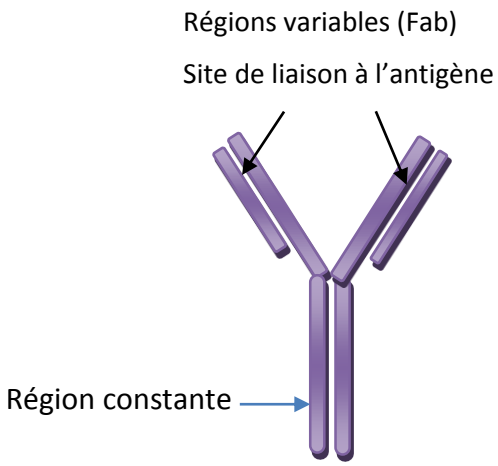


Figure 30 : Structure d'un anticorps.

3.4.1 Mise en évidence de l'immobilisation des anticorps sur SAM

Une fois l'adsorption des thiols vérifiée, l'objectif du second test de vérification est de démontrer l'immobilisation des molécules d'anticorps sur SAM. Après l'activation des groupements carboxyliques, les particules magnétiques sont transférées dans une solution d'anticorps d'origine commerciale (référence sc-25599 Santa Cruz Biotechnologies). Les groupements amines primaires NH_2 disponibles en grande proportion dans les molécules protéiques d'anticorps vont se substituer au NHS dans les esters activés. La réaction a lieu dans une solution d'anticorps dilués dans du PBS à pH8 pendant 90 minutes.

Pour faciliter la visualisation de la liaison des anticorps par microscopie optique, l'expérience décrite ci-dessous a été réalisée sur une plaque d'or de dimension 1 cm x 3 cm (évitant l'utilisation de particules micrométriques).

Une solution d'anticorps d'intérêt couplés à des molécules de biotine à 10µg/ml a été préparée, puis nous avons fonctionnalisé une zone réduite de la plaque d'or avec ces anticorps biotinylés. Après avoir lavé la plaque d'or avec du PBS, la liaison spécifique des anticorps aux SAMs de thiols a été révélée en microscopie à fluorescence par l'ajout de streptavidine couplée au fluorophore phycoérythrine (PE) sur l'ensemble de la plaque d'or. Cette expérience est expliquée sur la Figure 31 ci-dessous.

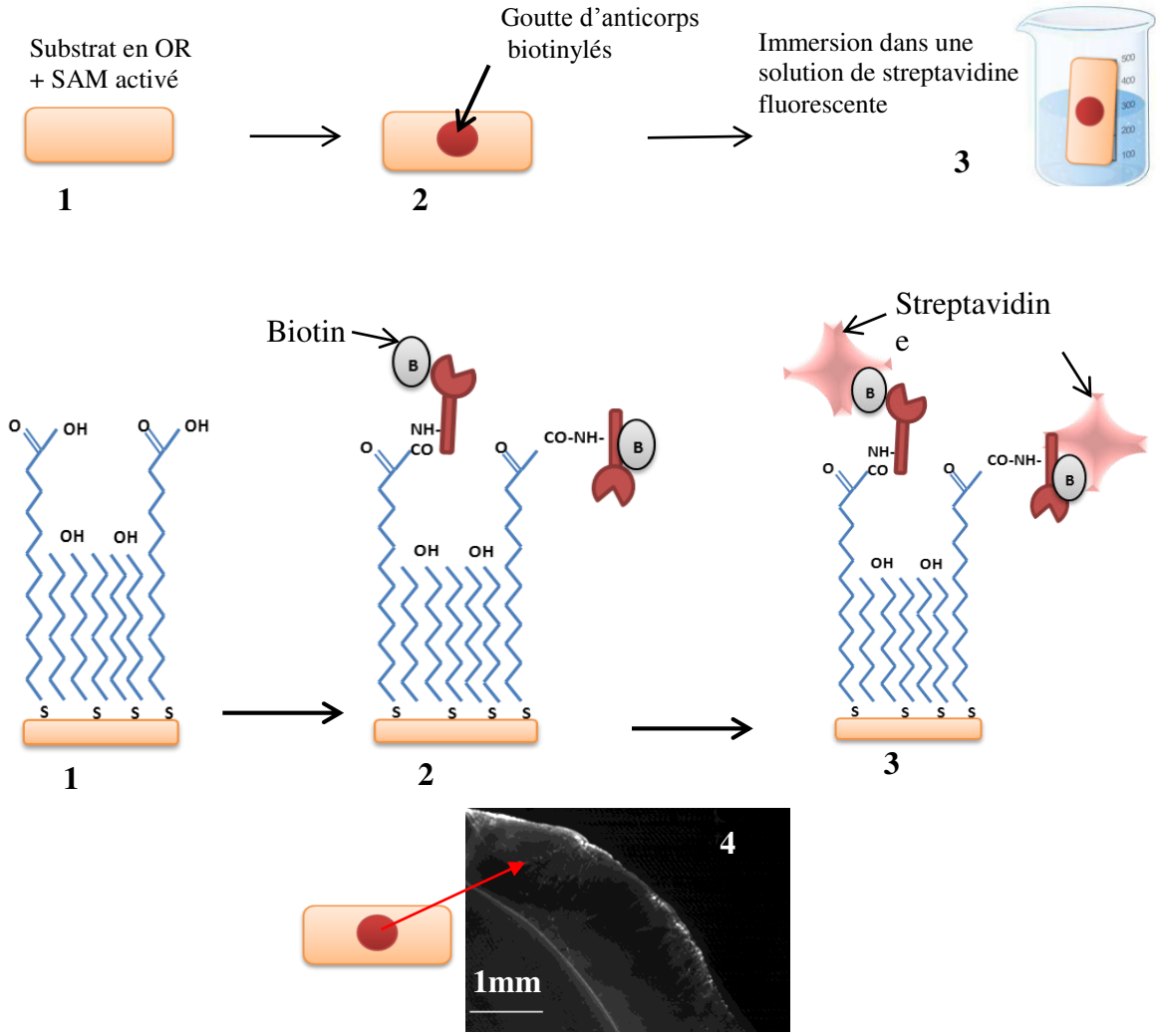


Figure 31 : Schéma récapitulatif du test de validation de liaison des anticorps. (1) adsorption du SAMs de thiols à la surface d'une plaque d'or, avec l'étape d'activation des groupements carboxiliques. (2) Dépôt d'une goutte d'une solution contenant des anticorps biotinylés. (3) Immersion de la plaque d'or dans une solution de streptavidine-PE. (4) observation au microscope à fluorescence du bord de l'emplacement de la goutte révélant la liaison réussie des anticorps sur les carboxy-thiols activés.

Le résultat obtenu ci-dessus montre que les anticorps se sont bien fixés aux carboxy-thiols activés comme on peut le voir sur l'image (4) de la Figure 31. En effet, il est possible d'observer la forme d'un quart de goutte émettant une fluorescence, correspondant à l'emplacement de la goutte d'anticorps biotinylés déposée sur le substrat en or après l'activation des thiols. Lors de l'immersion dans la solution contenant de la streptavidine-PE, en se liant aux molécules de biotines couplées aux anticorps, la streptavidine émet la fluorescence à l'observation au microscope, mettant ainsi en évidence la présence d'anticorps immobilisés sur le substrat d'or fonctionnalisé. La zone témoin hors de la goutte d'anticorps n'émet pas de fluorescence restant noire, confirmant la localisation précise des anticorps et leur lien spécifique aux SAMs.

3.4.2 Maintien de la fonction de reconnaissance des anticorps

La fonction principale d'un anticorps est la reconnaissance et la liaison à un antigène. Cette propriété est mise à profit pour lier les microparticules magnétiques aux membranes des cellules cancéreuses et transmettre les stimuli des vibrations magnéto-mécaniques. La présence des antigènes sur les membranes des cellules cancéreuses sélectionnées (SKRC 59) a été démontrée par des techniques de cytométrie en flux et d'immunofluorescence, expliquées et décrites plus loin dans le chapitre 4.

Au cours de la fonctionnalisation des microparticules magnétiques, la fixation des anticorps aux carboxythiols activés peut se produire par différentes parties des anticorps, de manière aléatoire, et pourrait avoir lieu au niveau des domaines de reconnaissance des anticorps. Une telle orientation pourrait altérer la fonction de reconnaissance, il est donc indispensable de mettre en place un test de vérification du maintien de cette propriété en post-fonctionnalisation.

Afin de mettre en évidence la reconnaissance entre les anticorps immobilisés sur les microparticules, et les cellules cancéreuses rénales, nous avons fonctionnalisé la moitié d'une plaque de silicium portant les particules, avec l'anticorps spécifique, l'autre moitié témoin ne recevant pas cet anticorps. Enfin, l'ensemble de l'échantillon a été immergé dans une solution de blocage à la BSA (Albumine de sérum bovin) pour limiter les fixations non spécifiques des cellules. En ensemençant les cellules cancéreuses sur le wafer, le résultat escompté serait que les cellules soient capturées et concentrées dans les zones fonctionnalisées par les anticorps spécifiques. S'il n'y avait pas de reconnaissance entre anticorps et cellules, les cellules pourraient recouvrir la totalité des particules, juste par

adsorption non spécifique sur l'or. L'expérience est expliquée sur le schéma ci-dessous, Figure 32.

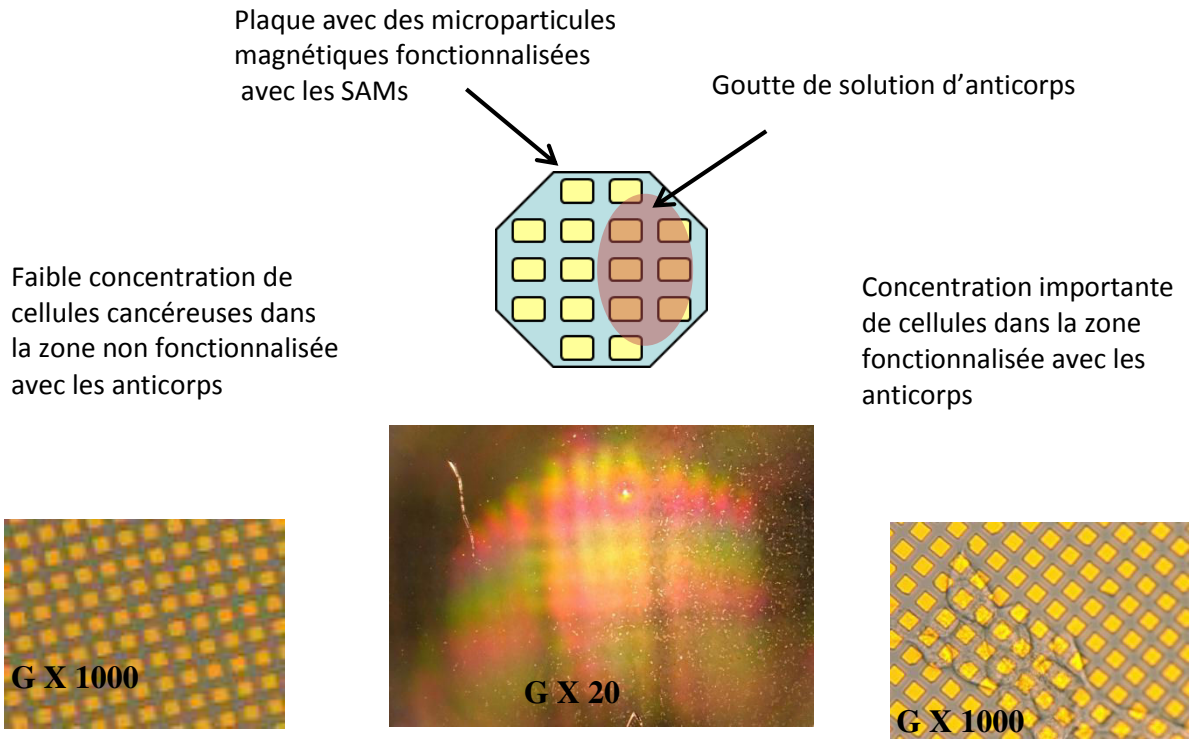


Figure 32 : Expérience de validation du maintien de la fonction de reconnaissance des anticorps après l'étape de fonctionnalisation les liants aux particules.

Le résultat ci-dessus est très intéressant car d'une part, il confirme que la chimie de formation des SAMs de thiols et la fixation des anticorps a été obtenue, d'autre part l'hypothèse que les cellules soient adsorbées aux surfaces en or de façon non spécifique est écartée car la moitié de l'échantillon ne contenant pas d'anticorps ne contient pas non plus de cellules cancéreuses. Ces résultats montrent que les anticorps immobilisés à la surface des particules gardent bien leur fonction de reconnaissance et de liaison envers les antigènes présents sur les membranes des cellules cancéreuses.

En résumé, nous avons décrit dans ce chapitre le procédé de bio-fonctionnalisation conçu et utilisé pour ancrer des anticorps à la surface des particules magnétiques. Nous avons établi la procédure d'adsorption de la monocouche auto assemblée de thiols mixtes sur les surfaces en or qui recouvrent les particules, ainsi que l'activation des fonctions carboxyliques présentes dans le SAM de thiol permettant la liaison aux groupements amines primaires des

anticorps. Pour mettre en évidence cette chimie, nous avons développé des protocoles expérimentaux de validation pour chaque étape clé. Basés sur des observations en microscopie optique à réflexion et à fluorescence, ces expériences ont permis de démontrer de façon nette l'établissement des différentes liaisons chimiques détaillées dans ce chapitre. Ces résultats encourageants ouvrent la voie au lancement des premières expériences de stimuli magnéto-mécaniques sur les cellules cancéreuses rénales par des micro particules magnétiques. Nous avons utilisé pour ces tests les particules en microvortex magnétiques pour les raisons évoquées dans la première partie du deuxième chapitre (simplicité du procédé de fabrication, facilement réalisables avec des matériaux biocompatibles… etc)

Chapitre 4. Traitement des cellules cancéreuses par les vibrations magnéto-mécaniques

4.1 Introduction

A partir des microparticules magnétiques préparées par l'approche «top-down», synthétisées, caractérisées et fonctionnalisées, l'étude biologique visant à la destruction de cellules cancéreuses par les vibrations magnéto-mécaniques de particules attachées aux membranes cellulaires, peut être démarrée. Ce dernier chapitre décrit la mise en place de premières expériences de stimuli magnéto-mécaniques par des microparticules en vortex magnétiques fonctionnalisées, ciblant essentiellement des cellules cancéreuses rénales.

Après avoir détaillé les caractéristiques de la lignée cellulaire cancéreuse utilisée, nous décrirons le protocole expérimental pour l'interfaçage des particules magnétiques avec les cellules cancéreuses, et la mise en place du traitement menant à leur destruction, notamment leur apoptose. Les premiers résultats biologiques de l'action antinéoplasique obtenus seront présentés et discutés.

4.2 Culture cellulaire

Pour étudier le comportement des cellules cancéreuses, il faut commencer par les mettre en culture pour disposer de populations de cellules suffisantes pour mener à bien les tests envisagés et obtenir des données statistiques sur les comportements observés. On appelle culture cellulaire le maintien en vie des cellules en dehors de l'organisme. Ces cellules ne sont pas organisées en tissu mais possèdent des métabolismes et des fonctions spécifiques qui leur confèrent la capacité de croître et de se diviser in-vitro. Nous détaillons dans cette partie du chapitre le protocole général de la culture, les notions nécessaires sur la croissance des cellules, le déroulement de la culture en elle-même ainsi que la cryo-préservation.

Les cellules peuvent avoir besoin ou pas d'un support pour croître. On distingue alors les cellules qui croissent en suspension telles que les cellules sanguines et les cellules nécessitant un support sur lequel elles adhèrent pour croître, comme les cellules des tissus solides.

En fonction de leur provenance, le mode de culture employé varie : si les cellules sont prélevées sur le donneur et sont directement remises en culture, on parle alors de culture

primaire. Ces cultures ont généralement une durée de vie limitée à une cinquantaine de divisions, et pour utiliser une culture de façon stable dans le temps, il faut procéder à un procédé d'immortalisation par l'intermédiaire de virus spécifiques par exemple. Les cellules utilisées dans ce travail de thèse proviennent d'une lignée immortalisée du carcinome rénal humain appelée SKRC 59.

La culture des cellules débute en général par la décongélation d'un cryotube d'une suspension cellulaire congelée à -180°C. Les cellules sont ensuite approvisionnées en nutriments essentiels servant à leur croissance, contenus dans un milieu de culture complet. La mise en culture est faite dans des flasques en plastique traité de 75 cm^2, placées ensuite dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO_2.

Le milieu utilisé pour les cellules SKRC 59 est le RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) Glutamine+ (Invitrogen). Ce dernier contient des vitamines, des acides aminés essentiels et un tampon évitant les variations de PH avec un indicateur de PH qui est le rouge de phénol. Ce milieu, dit de base, est supplémenté de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté à 10% et d'un mélange de pénicilline/streptomycine pour empêcher les contaminations bactériennes.

Une fois ensemencées, les cellules SKRC 59 adhèrent au fond de la boîte et se divisent jusqu'à tapisser toute la surface du fond de la boîte, on dit alors qu'elles sont à confluence. Pour maintenir la culture cellulaire in vitro, il faut procéder régulièrement à des changements de milieu et à des passages (division de la concentration cellulaire par flasque) qui sont effectués via l'utilisation d'une enzyme protéolytique appelée trypsine, cette étape est d'ailleurs appelée trypsination. Cette enzyme dégrade les protéines d'adhésion des cellules au support et entre elles. Après quelques minutes d'action de l'enzyme, les cellules sont individualisées et son action doit être inhibée par l'ajout d'un certain volume de milieu neuf.

L'entretien des cultures cellulaires se fait régulièrement tous les deux jours par des observations au microscope et des passages, le taux de passages est adapté en fonction de la vitesse de croissance de la lignée cellulaire. Des modifications ou altérations cellulaires peuvent survenir dans une population cellulaire en culture, pouvant entraîner la perte des caractéristiques importantes d'une lignée cellulaire à cause des effets biologiques du vieillissement cellulaire. C'est pour ces raisons que des protocoles de congélation des cellules dans de l'azote liquide ont été mis en place [66] permettant de disposer d'une réserve importante de cellules homogènes pouvant servir à remplacer les pertes occasionnelles. Ainsi,

il est possible de revenir sur les stocks congelés et faire des expérimentations sans avoir de variables indésirables dues au vieillissement. Après toute décongélation, il existe une période de latence de quelques jours avant de retrouver une phase de croissance cellulaire normale.

4.3 Propriétés antigéniques de la lignée cellulaire SKRC-59

Deux lignées cellulaires du carcinome rénal SKRC-59 et SKRC-59 hCA9 nous ont été fournies par le Dr. X. Chauchet du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Grenoble. La lignée cellulaire SKRC-59 a été décrite précédemment par T. Ebert [67] notamment pour la non expression de la protéine anhydrase carbonique (AC ou CA « carbonic anhydrase ») au niveau membranaire. Les cellules de la seconde lignée SKRC-59 hCA9 sont des cellules SKRC-59 ayant été transfectées avec le plasmide pcDNA3.1 hCA9 codant pour la séquence complète de la CA9 humaine (hCA9). Après un tri cellulaire au FACS (Fluorescence Assisted Cell Sorting), la lignée cellulaire SKRC-59 hCA9 a été analysée par cytométrie en flux et un Western-Blot. Une expression avoisinant un taux de 100% de la protéine hCA9 a été observée. Ces travaux de transfection ont été réalisés par l'équipe du Dr. X. Chauchet au laboratoire TIMC-IMAG/TheREx (Faculté de médecine de Grenoble).

4.3.1 Anhydrase carbonique IX

D'importantes conditions préalables sont pré-requises pour le succès d'une immunothérapie, comme l'identification d'antigènes de surface associés aux tumeurs qui ne sont pas exprimés dans les tissus sains, et aussi la découverte d'anticorps hautement spécifiques à ces antigènes. Dans ce cadre, la CA9 est l'antigène de surface le plus étudié dans le carcinome à cellules claires du rein.

Alors que la CA9 apparaît lors du processus de transformation maligne et marque positivement environ 95% des cellules cancéreuses rénales claires et des métastases des RCC (Renal Cell Carcinoma), aucune CA9 n'a été détectée à la surface des cellules saines excepté une expression cytoplasmique dans l'épithélium des conduits de la bile, l'intestin grêle et les cellules muqueuses de l'épithélium gastrique [68] . En conséquence cette expression de surface restreinte en fait une excellente cible pour l'immunothérapie du RCC.

L’anhydrase carbonique 9 est une protéine transmembranaire (voir Fig 33) ayant la propriété de catalyser réversiblement le dioxide de carbone en acide carbonique. C’est une enzyme inductible par l'hypoxie, surexprimée par les cellules cancéreuses de nombreuses tumeurs. La CA9 aide à produire et à maintenir un PH intracellulaire favorable à la croissance des cellules tumorales et à leur survie. Elle participe en même temps à l’acidification du milieu extracellulaire, favorisant l'invasivité des cellules tumorales.

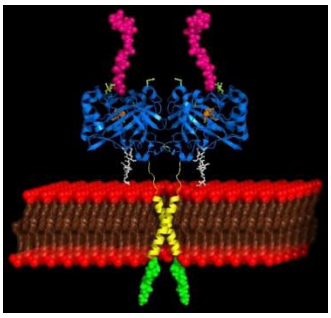


Figure 33. Modèle proposé montrant l'agencement structural de la AC IX sur la membrane cellulaire. Le domaine catalytique est représenté par la partie bleue. Figure extraite de la référence [69].

La CA9 est une cible très étudiée qui s’avère être non seulement un bon marqueur pour le diagnostic clinique mais aussi une cible thérapeutique de choix pour le traitement des carcinomes rénaux à cellules claires. En oncologie, il a été récemment démontré que des anticorps monoclonaux ou des petites molécules inhibitrices CA9-spécifiques peuvent induire la perturbation pharmacologique de l’activité catalytique de la CA9. Ces dernières provoquent un déséquilibre de régulation du PH par les cellules cancéreuses, ce phénomène étant accompagné par un ralentissement de la croissance de la tumeur primaire et des métastases. Un grand nombre de ces agents constituent une nouvelle stratégie ciblée de la thérapie du cancer et sont actuellement en cours de développements précliniques ou cliniques.

4.3.2 Mise en évidence de l’AC9 sur les membranes cellulaires

4.3.2.1 Immunohistochimie

Une étape cruciale pour le déclenchement de l’apoptose des cellules cancéreuses par les vibrations magnéto-mécaniques est la liaison des micro-vortex magnétiques fonctionnalisés

aux membranes cellulaires. Comme expliqué précédemment dans la 4ème partie du chapitre 1, cette liaison se fait par l'interaction spécifique de l'antigène exprimé à la surface de la cellule avec un anticorps greffé sur les particules magnétiques. Cette interaction antigène-anticorps fait intervenir quatre types de liaisons non covalentes (des liaisons hydrogènes, des liaisons électrostatiques, des liaisons hydrophobes et les forces de Van der Waals). Afin d'exercer le stress magnéto-mécanique sur les membranes des cellules cancéreuses, il est donc indispensable de s'assurer en premier lieu que la lignée cellulaire utilisée pour nos expériences exprime bien l'antigène que l'on souhaite cibler.

Pour cela, nous avons utilisé une technique de marquage cellulaire appelée immunofluorescence. Comme expliqué dans le chapitre 1, le passage d'une cellule normale à une cellule cancéreuse s'accompagne d'une succession de modifications dont des modifications antigéniques comme l'expression d'antigènes tumoraux (appelés aussi marqueurs tumoraux). C'est cette dernière propriété antigénique qui est exploitée lors d'un marquage cellulaire par immunofluorescence. Cette dernière est une technique de laboratoire couramment utilisée dans pratiquement tous les aspects de la biologie, l'immunofluorescence a été décrite pour la première fois par Coons et Kaplan [70] et a été depuis largement utilisée à la fois dans la recherche et le diagnostic clinique.

Dans la technique d'immunofluorescence, les anticorps sont chimiquement conjugués à des marqueurs fluorescents. Ces derniers se lient à l'antigène d'intérêt permettant sa détection par fluorescence.

Les deux principales méthodes de marquage en immunofluorescence sont les marquages directs et indirects. Dans la méthode directe, l'anticorps dirigé contre l'antigène d'intérêt exprimé par les cellules est conjugué à une molécule fluorescente, et dans ce cas, un seul anticorps est utilisé. Le marquage indirect implique l'utilisation de deux réactifs successivement, le premier étant un anticorps primaire non marqué spécifique de l'antigène exprimé par les cellules d'intérêt, puis un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire, couplé à un fluorochrome. La détection se fait ensuite par microscopie à fluorescence ou par tri cellulaire via l'utilisation de la cytométrie en flux.

Afin de vérifier à la fois la présence de l'antigène CA9 sur les membranes des cellules SKRC-59 hCA9 et la liaison de l'anticorps anti-anhydrase carbonique d'origine commerciale CA IX (H-120) sc-25599 (SantaCruz) sur les membranes des cellules cancéreuses rénales, nous

avons réalisé un test d'immunofluorescence en utilisant ce dernier comme anticorps primaire, conjointement avec l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-IgG marqué par un fluorochrome.

Les cellules ont été ensemencées sur des lamelles de verre, et maintenues en culture pendant 3 jours pour atteindre la confluence. Après avoir été lavées au PBS, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde à 4 % (la fixation est une opération ayant pour but de stabiliser les tissus dans un état aussi proche que possible de leur aspect vivant pour permettre leur observation en microscopie dans de bonnes conditions).

Après l'étape de fixation, les cellules sont incubées avec l'anticorps anti CA9. Après plusieurs rinçages, la solution d'anticorps secondaires fluorescente a été ajoutée aux cellules afin de révéler la localisation de l'anticorps CA9. L'observation des lamelles en microscopie à fluorescence est montrée sur la Figure 33.

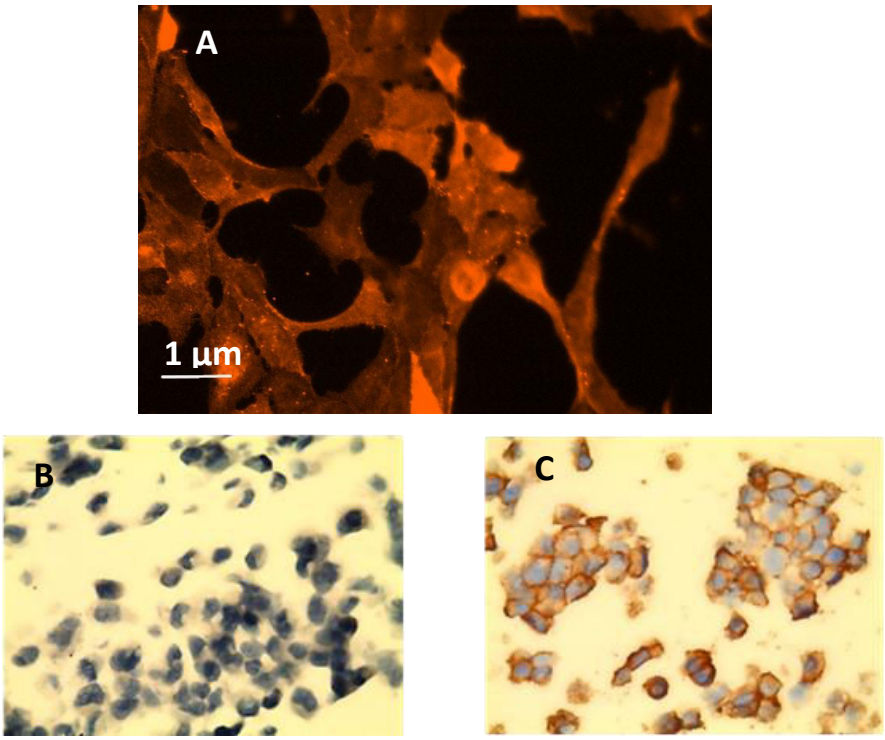


Figure 33. Observation au microscope à fluorescence (A) immunofluorescence des cellules SKRC-59 hCA9, la fluorescence rouge indiquant le marquage de la protéine transmembranaire CA9. (B) confirmation immunohistologique de l'expression négative de la CA9 par les cellules SKRC-59, et (C) du marquage membranaire positif des cellules transfectées SKRC-59 hCA9. Figures (B, C) fournie par Dr. X. Chauchet.

Les observations en microscopie à fluorescence confirment deux résultats, d'une part les cellules SKRC-59 hCA9 expriment bien l'antigène tumoral anhydrase carbonique IX au niveau

des membranes plasmiques et d'autre part, l'anticorps d'origine commercial utilisé et dirigé contre la CA9 se lie bien à cette dernière. L'anticorps dont nous disposons peut donc être utilisé pour servir d'intermédiaire entre les micro-vortex magnétiques et les cellules cancéreuses SKRC-59 pour le stimulus par les vibrations magnéto-mécaniques.
Des résultats similaires ont été observés sur les cellules transfectées SKRC-59 hCA9 en comparaison avec la lignée témoin non transfectée comme montré sur la Figure 33, où apparait clairement un marquage positif des membranes cellulaires indiquant l'expression de la protéine transmembranaire CA9. Les deux lignées SKRC-59 et SKRC-59 hCA9 constituent donc une bonne base de travail pour la comparaison de la spécificité des réactions cellulaires aux stimuli des vibrations magnéto-mécaniques. D'un côté une lignée exprimant le biomarqueur que l'on souhaite cibler avec les micro vortex magnétiques fonctionnalisés et d'un autre côté, sa lignée homologue n'exprimant pas le biomarqueur d'intérêt constituant ainsi un parfait contrôle négatif.

4.3.2.2 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet l'analyse multiparamétrique d'un grand nombre de cellules individuelles. C'est la seule technique qui permet de faire une analyse cellule par cellule, quantitative, multiparamétrique, à grande vitesse et avec une bonne sensibilité de détection. Le principe d'une cytométrie en flux, schématisé sur la Figure 34, est l'analyse des signaux optiques (fluorescence et diffusion) émis par des cellules traversant une à une un faisceau laser face à un système de détection. Ces informations sont collectées, traitées par une composante informatique et représentées sous forme d'histogramme. Le cytomètre analyse l'intensité et le type de fluorescence émise par chaque cellule préalablement marquée et quantifie le nombre de cellules correspondant à chaque fluorescence. Cette technique permet d'évaluer le niveau d'expression d'une protéine membranaire par exemple.

La suspension cellulaire est incubée avec des anticorps fluorescents qui se fixent sur une molécule donnée (une protéine membranaire par exemple). La suspension préparée est injectée dans un système d'entonnoir, les cellules sont entraînées dans un conduit très fin par focalisation hydrodynamique où elles défilent une à une à travers un faisceau laser. La fluorescence émise est mesurée par des photomultiplicateurs. Simultanément, la lumière

diffusée sur de petits angles dans l'axe du faisceau laser permet d'avoir des informations sur la taille des cellules, et la lumière diffusée sur de grands angles détectée à 90° du faisceau laser, correspondant à la réfringence et réflexion, donne des indications sur la granulométrie, la forme et structure des cellules.

Il est possible d'associer la fonction de tri des cellules à la cytométrie en flux, ce tri cellulaire par fluorescence est appelé FACS pour Fluorescence Activated Cell Sorting. Cette fonction est capable de séparer les cellules d'intérêt au sein d'un mélange cellulaire par la fluorescence. Le principe consiste à marquer spécifiquement les cellules d'intérêt dans l'échantillon par un colorant fluorescent.

Afin de trier les cellules et récupérer les cellules d'intérêt, la suspension est fractionnée en microgouttes comportant une seule cellule. En fonction de leur marquage, ces microgouttes sont déviées par un champ électrique et collectées dans des récipients appropriés, elles peuvent être remises en culture cellulaire dans un milieu de culture approprié [71].

Cette fonction de tri a permis la sélection de la lignée cellulaire sur laquelle nous allons réaliser nos tests.

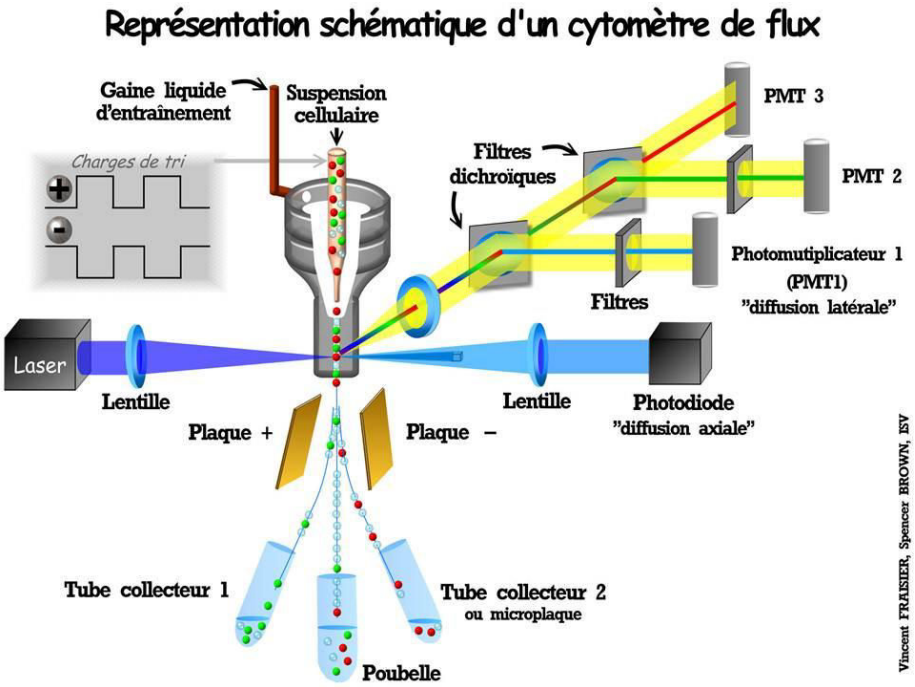


Figure 34. Schéma du principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux, avec l'option FACS.

La lignée cellulaire SKRC-59 hCA9 a été analysée par FACS au Laboratoire TIMC-IMAG/TheREx (Faculté de médecine de Grenoble) / CHU de Grenoble. Une expression de la protéine hCA9 a été observée chez 100% des cellules transfectées comme le montre la Figure 35 ci-dessous, contrairement à la lignée témoin SKRC-59 où l'analyse par FACS confirme la non-expression de la protéine hCA9.

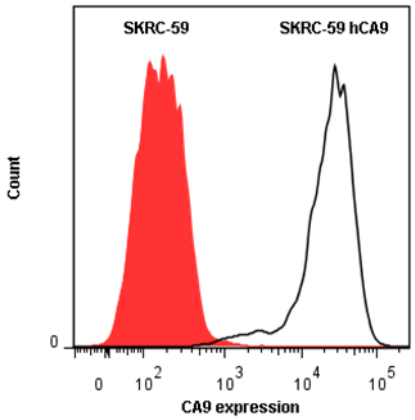


Figure 35. Etablissement de la lignée cellulaire SKRC-59 hCA9 et caractérisation de l'expression de la protéine hCA9. Analyse par cytométrie en flux des lignées SKRC-59 et SKRC 59 hCA9 avec l'anti-hCA9 après le tri cellulaire. Figure fournie par X.Chauchet TIMC-IMAG/TheREx (Faculté de médecine de Grenoble).

4.4 Test de cytotoxicité MTT

Afin de confirmer que la présence des micro-vortex magnétiques n'altère pas la viabilité des cellules cancéreuses en culture, notamment par la nature chimique de la tranche des particules, constituée de NiFe, nous avons réalisé un test de cytotoxicité MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) dont le principe, décrit ci-dessous, permet d'évaluer la viabilité d'une population cellulaire. Le but de ce test étant d'évaluer la toxicité du Nickel envers les cellules, les micro vortex utilisés dans ce test n'ont pas été fonctionnalisés.

Le test MTT permet de mesurer l'activité d'une enzyme mitochondriale appelée succinate déshydrogénase dans les cellules vivantes par dosage colorimétrique. Cette enzyme coupe le cycle du MTT de couleur jaune initiale, en cristaux de formazan violets. Une fois ces cristaux dissouts par l'action du DMSO (Dimethyl Sulfoxyde), une lecture de l'absorbance est réalisée à 568 nm. Dans ce test, l'activité métabolique permet l'évaluation de la viabilité cellulaire et l'intensité de la coloration est ainsi directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Des suspensions de particules magnétiques avec des concentrations croissantes en particules sont ajoutées aux cellules. Après 24h d'exposition des cellules cancéreuses aux particules magnétiques, le test MTT (détaillé en annexe) a été réalisé sur l'ensemble des cellules, le résultat est montré ci-dessous sur la Figure 36.

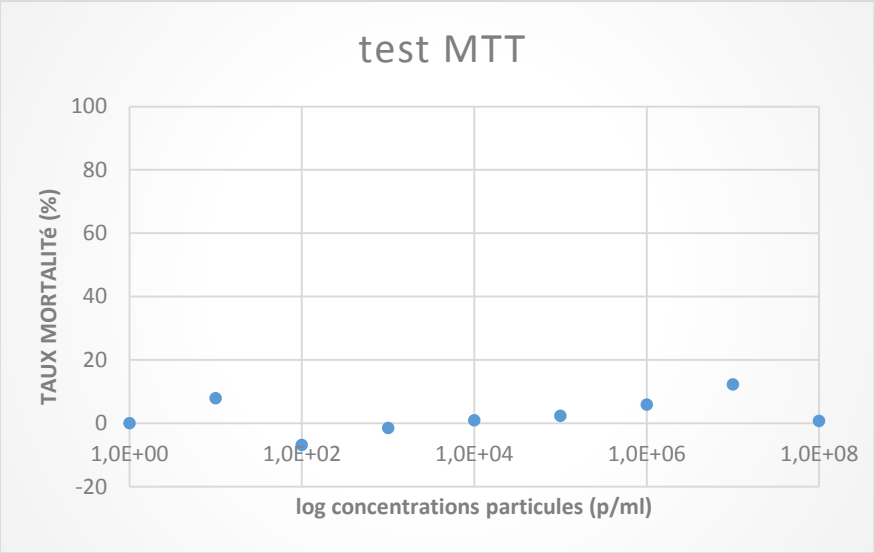


Figure 36. Test de cytotoxicité MTT pour l'étude de la viabilité des cellules cancéreuses en présence de concentrations croissantes de micro-vortex magnétiques.

Le résultat montre que les particules magnétiques préservent un bon taux de viabilité des cellules SKRC 59, il est donc possible de conclure que selon ce test MTT, les microvortex magnétiques en NiFe ne présentent aucune toxicité envers les cellules en culture. La suite des tests notamment de fonctionnalisation de surface et de liaison des particules aux cellules peuvent donc être entrepris.

4.5 Thérapie anti-cancéreuse par les vibrations magnéto-mécaniques des micro-vortex fonctionnalisés et caractérisation de la mort cellulaire in vitro

L'ensemble des travaux décrits précédemment dans ce manuscrit de thèse constituaient la partie préparatoire, en amont de l'objectif principal de la thèse qui est développé dans cette partie : l'expérience de destruction des cellules cancéreuses par les vibrations des particules magnétiques fonctionnalisées. En effet, après avoir conçu des particules magnétiques monodisperses avec des propriétés magnétiques bien précises, nous avons réussi à bio-

fonctionnaliser ces particules avec succès en immobilisant des anticorps à leurs surfaces. Les propriétés de reconnaissance entre les anticorps portés par les particules et les cellules cancéreuses ont été mises en évidence comme mentionné précédemment dans le troisième chapitre portant sur la biofonctionnalisation des particules magnétiques. Pour cela, nous avons également travaillé aux choix des lignées cellulaires, mis en évidence l'expression de l'antigène exprimé à la surface des cellules transfectées, pris en main les formes de cultures cellulaires, et mis au point les préparations d'échantillons notamment les témoins adaptés, ainsi que vérifié l'absence de toxicité directe de nos particules sur les cellules.

Les résultats accumulés de l'ensemble de ces expériences nous ont permis de lancer les expériences de la thérapie anti-cancéreuses par les vibrations magnéto-mécaniques des micro-vortex fonctionnalisés. Cette approche est décrite en détail dans ce chapitre, avec la discussion des résultats préliminaires obtenus.

L'approche thérapeutique présentée dans cette thèse est très différente de l'hyperthermie, largement étudiée dans le domaine des nanoparticules magnétiques en oncologie. Comme expliqué précédemment dans le premier chapitre, l'effet thérapeutique repose sur un effet mécanique généré par la vibration des micro-vortex magnétiques fonctionnalisés liés aux membranes cellulaires, qui a pour effet de modifier le transport ionique à travers la membrane, menant à la mort des cellules par apoptose. Dans cette méthode, la vibration des micro-vortex magnétiques est efficace par l'application de champs magnétiques extérieurs relativement faibles (300 Oe) et à basse fréquence (20 Hz). Cette approche remarquable a été découverte et décrite pour la première fois en 2010 à Argonne National Labs[11]. Les travaux menés lors de cette thèse constituent la seconde étude au niveau international de ce phénomène, sur d'autre lignées cellulaires cancéreuses humaines, avec pour la première fois, une quantification de l'effet antinéoplasique de ce traitement innovant.

Il est admis que la caractérisation complète de l'apoptose requiert l'utilisation de plusieurs approches. Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi comme approche préliminaire la détection par le marquage des changements morphologiques, cette approche étant décrite en détail dans le paragraphe ci-dessous.

4.5.1 Principe de marquage des indicateurs de la mort cellulaire

L'importance de l'apoptose dans le processus de cancérogenèse a favorisé la recherche active de nouvelles méthodes de détection des lésions intracellulaires dans des mélanges cellulaires

complexes. Certains fluorochromes tel que l'iodure de propidium (IP) sont des agents intercalants pouvant se fixer directement sur l'ADN. D'autres fluorochromes sont couplés à des molécules de liaison comme les anticorps, ou à des marqueurs spécifiques d'éléments cellulaires. Un bon exemple est l'utilisation de l'annexine V pour la détection des cellules apoptotiques précoces [72] (voir Figure 37). En effet, un des événements précoces lors du processus d'apoptose est l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) à la surface de la membrane plasmique [73] qui peut alors être marquée par l'annexine V : une protéine membranaire des phagocytes ayant une haute affinité pour la PS. L'annexine V liée à un fluorochrome s'avère donc être un outil utile pour détecter et quantifier les cellules apoptotiques par cytométrie de flux. La perméabilité de la membranes plasmique à d'autres colorants vitaux tels que l'iodure de propidium a lieu à un stage tardif d'apoptose, ou suite à des lésions traumatiques au niveau de la membrane cellulaire. Ainsi, l'utilisation conjointe de l'annexine V couplée à l'iodure de propidium en cytométrie en flux permet en une seule analyse de détecter et quantifier la population des cellules apoptotiques précoces, les cellules apoptotiques tardives et/ou nécrotiques ainsi que les cellules vivantes.

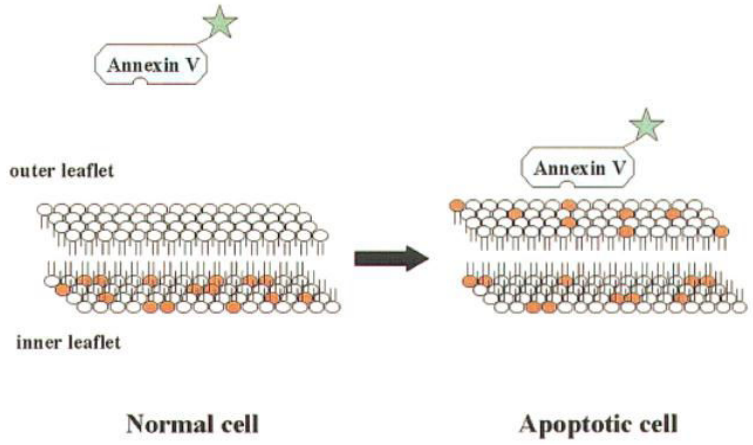


Figure 37. Représentation schématique de la perte de l'asymétrie membranaire lors du processus d'apoptose, figure extraite de la référence [72].

Deux types de morts cellulaires peuvent être caractérisées in vitro ; la nécrose est caractérisée par une rupture de la membrane plasmique accompagnée par un déversement du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire, contrairement à la mort par apoptose où les membranes plasmiques ne sont pas détruites, les cellules en cours d'apoptose émettent des signaux comme l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) à titre d'exemple. Cet évènement précoce du processus peut être détecté et quantifié par la cytométrie en flux,

technique qui permet aussi de compter une à une le nombre de cellules apoptotiques dans l'échantillon.

La phosphatidylsérine possède une forte affinité pour la protéine annexine V (AV), protéine anticoagulante humaine. L'annexine V, une fois conjuguée à un fluorochrome comme le ALEXA FLUOR 488 (Molecular Probes de Invitrogen) par exemple, est utilisée pour la détection des cellules apoptotiques par la liaison à la PS exposée sur le feuillet externe de la membrane. En cytométrie en flux, l'utilisation de la AV conjointement avec l'iodure de propidium (IP), qui se fixe sur l'ADN si la membrane plasmique est rompue (dans le cas d'une nécrose ou une apoptose tardive), permet de discriminer entre les cellules mortes par apoptose ou par nécrose.

Dans le but d'évaluer l'action antinéoplasique du stimulus magnéto-mécanique par les micro-vortex magnétique dans le modèle du carcinome rénal humain in vitro, l'induction de l'apoptose par les vibrations des micro-vortex fonctionnalisés et la viabilité cellulaire ont été déterminées par analyse cytométrique en utilisant le double marquage à l'annexine V-ALEXA FLUOR 488 et au PI.

4.5.2 Préparation des échantillons

On attend tout d'abord que les cellules aient atteint la confluence dans une plaque 6 puits pour atteindre une concentration d'environ $1.5*10^6$ cellules/puits. Parmi ces 6 puits, 3 puits ont été utilisés comme témoins pour le marquage par l'annexine V et le IP comme indiqué dans le protocole du fabriquant. Une suspension des micro-vortex non fonctionnalisés a été ajoutée au quatrième puits constituant un second témoin négatif de la mort cellulaire. Enfin, la solution des micro-vortex conjugués aux anticorps spécifiques par la fonctionnalisation a été ajoutée au cinquième puits, la distribution des puits est montrée sur la Figure 38.

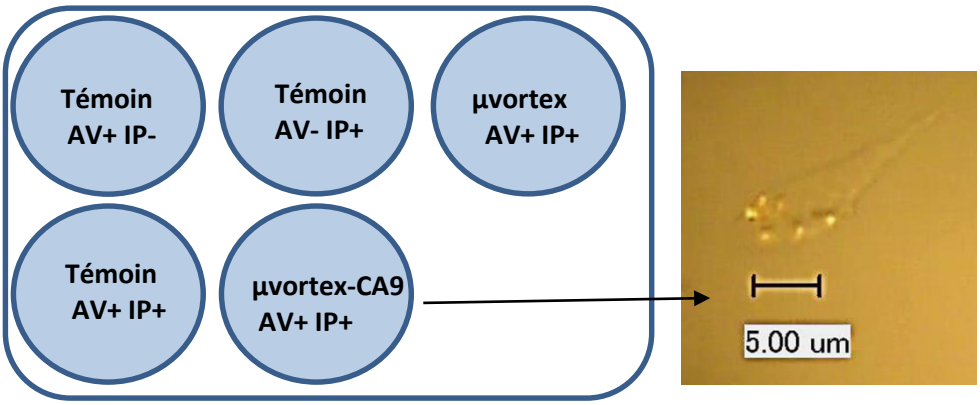


Figure 38. Schéma montrant la distribution des échantillons préparés pour le traitement par les vibrations magnéto-mécaniques, qui seront analysés ensuite qualitativement par des observations au microscope optique, et quantitativement par cytométrie en flux. AV : Annexine V ; IP : Iodure de propidium. Photographie prise au microscope optique à réflexion d'une cellule cancéreuse avec des microvortex liés à sa membrane, après 45 minutes d'incubation. Un rinçage a permis d'éliminer les microvortex non liés aux cellules.

4.5.3 Dispositifs d'application du champ magnétique alternatif

L'application du champ magnétique alternatif a été initialement prévue par des bobines en cuivre alimentées en courant par des alimentations pilotées par un programme Labview développé au laboratoire, ce banc expérimental est montré sur la Figure 39.

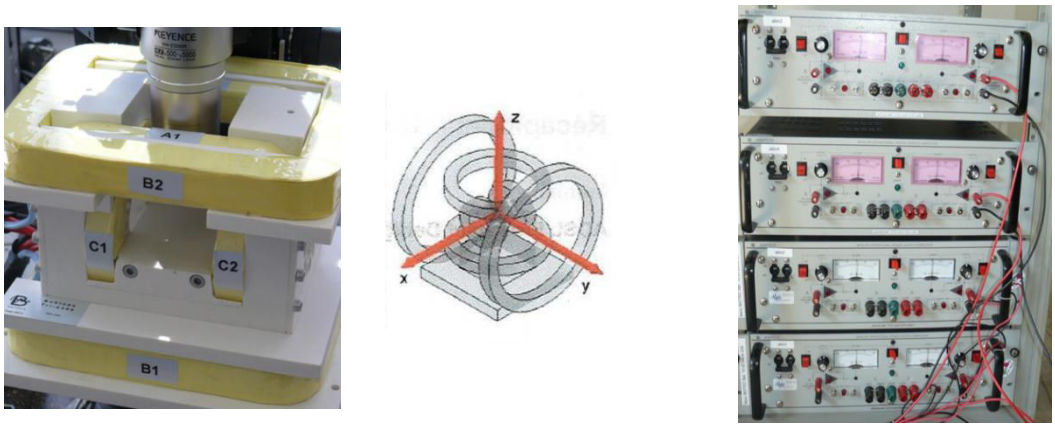


Figure 39 : Banc expérimental développé et caractérisé pour l'application d'un champ magnétique sur les trois axes X, Y et Z. Le système comprend six bobines en cuivre imbriquées, chaque bobine est reliée à une alimentation permettant un contrôle indépendant de chaque bobine, pour la création d'un champ et gradient de champ magnétique quelconque dans l'espace au centre des bobines.

Deux inconvénients se sont présentés. Le champ magnétique ne peut dépasser les amplitudes d'environ 60 Oe (6 mT) à quelques Hz. Et également, ce dispositif étant assez volumineux, il

est impossible à déplacer au laboratoire de biologie. De ce fait, les cellules ayant incubé avec les micro-vortex fonctionnalisés doivent être déplacées depuis le laboratoire de biologie, situé à environ 1Km jusqu'au banc expérimentale, pour subir le traitement, puis déplacées à nouveau pour être mises dans l'incubateur de la culture cellulaire. Afin d'éliminer ces paramètres (amplitude de champ limitée, distance et déplacement des échantillons entre les deux laboratoires) pouvant interférer avec nos résultats, nous avons réfléchi à un autre moyen pour l'obtention du champ magnétique alternatif. Idéalement, cette alternative devrait être peu coûteuse, fournir un champ magnétique relativement élevé avec la possibilité de régler la fréquence du champ magnétique alternatif appliqué, et facilement implantable dans l'environnement de la culture cellulaire. Après réflexion, nous avons identifié un système qui répond à tous ces besoins: il s'agit d'un appareil communément présent dans tout laboratoire de biologie et surtout de chimie : un agitateur magnétique.

Un agitateur magnétique est un appareil utilisé en chimie expérimentale pour le mélange et l'homogénéisation des liquides. Un moteur électrique dont la vitesse est régulée électroniquement est utilisé pour faire tourner un (ou plusieurs) aimants placés sous un plateau, qui à leur tour entraînent un barreau aimanté plongé dans le liquide le mettant ainsi en mouvement. La vitesse de rotation varie généralement de 60 à 1200 tours/minute donc de 1 à 20 Hz pour un aimant seul.

Avant d'utiliser l'agitateur magnétique pour mettre en oscillation des micro-vortex magnétiques, nous avons en premier lieu cartographié le champ magnétique rayonné à la surface du plateau de l'agitateur à l'aide d'un gaussmètre à effet Hall, dont la sonde mesure la densité de flux magnétique perpendiculaire à sa surface. Ceci permet de connaitre le nombre d'aimants se trouvant sous le plateau, ainsi que la valeur maximale du champ magnétique rayonné par ces aimants au niveau du plateau. La cartographie du champ magnétique sur le plateau de l'agitateur, relevée avec la sonde à effet Hall, a révélé la présence de deux aimants dans le moteur, avec une valeur de champ d'environ (+30 mT) pour le premier et (-30 mT) pour le second aimant à la surface du plateau. Le champ magnétique perçu par l'échantillon lors de la mise en rotation du moteur passe graduellement par un maximum de +30mT, 0mT, -30mT reproduisant ainsi le signal sinusoïdale d'un champ magnétique alternatif. La configuration de l'agitateur magnétique est montrée dans Figure 40 ci-dessous :

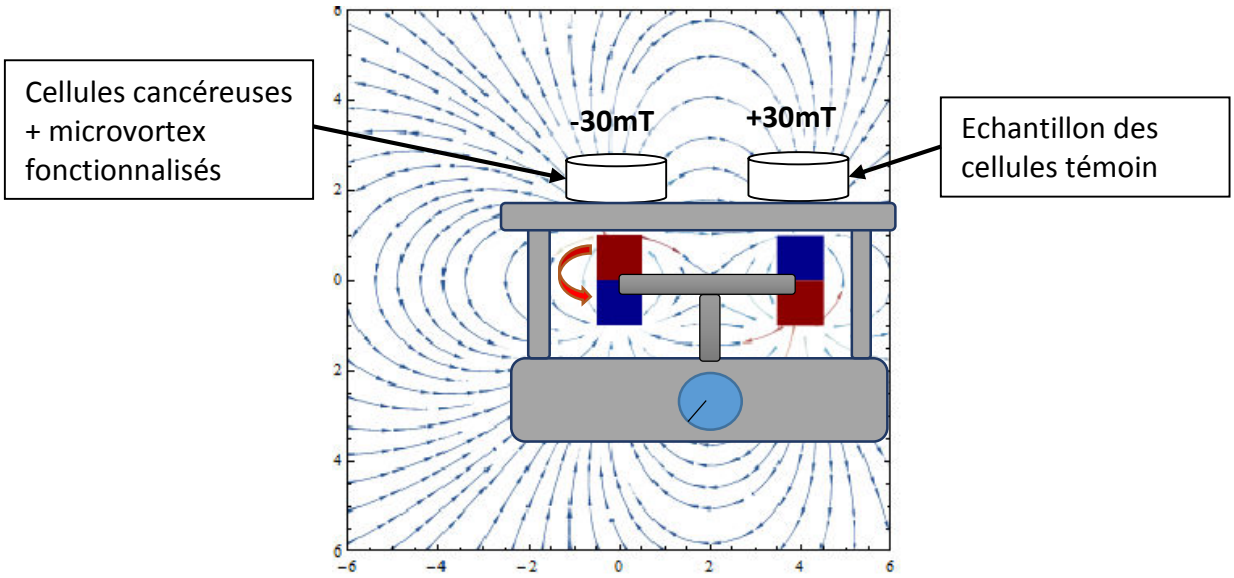


Figure 40 : Schéma illustrant la configuration de l'agitateur magnétique, source du champ magnétique alternatif appliqué (vue en coupe), avec la simulation du champ magnétique rayonné au niveau du plateau à partir des mesures du champ magnétique des deux aimants et leur espacement mesurés à l'aide du gaussmètre.

Le dispositif permettant la mise en oscillation des micro-vortex magnétiques caractérisé, nous sommes donc en mesure de lancer l'expérience majeure de ce travail de thèse : soumettre les cellules cancéreuses aux vibrations des micro-vortex magnétiques fonctionnalisés liés à leurs membranes.

Pour cela, l'étape permettant d'établir la liaison des micro-vortex fonctionnalisés aux membranes des cellules cancéreuses SK RC 59 hCA9 par leur protéine de surface CA9, précède le traitement. L'attache des particules aux membranes cellulaires est obtenue après un certain temps d'incubation des cellules cancéreuses avec la suspension des micro-vortex magnétiques fonctionnalisés (45 minutes). Les cellules sont alors placées sur le plateau de l'agitateur magnétique et exposées à un champ magnétique alternatif homogène d'une valeur de 300Oe avec une fréquence de 20 Hz pendant 45 minutes.

4.5.4 Mise en vibration des particules liées aux cellules et observation de l'effet du traitement au microscope optique

L'observation au microscope optique des puits 24h après le traitement montre une nette diminution de la densité cellulaire dans l'échantillon traité comparé aux deux échantillons

témoins « cellules seules » et « cellules avec micro-vortex magnétique non fonctionnalisés ». Rappelons que l'ensemble des cellules témoins et traitées ont été exposées à la même intensité de champ magnétique. L'observation est montrée sur la Figure 41.

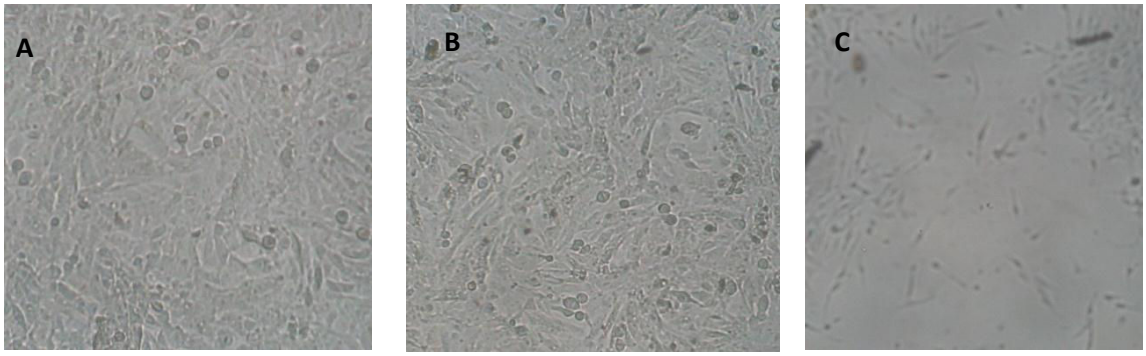


Figure 41. Observation en microscopie optique des cellules SKRC59 hCA9 après le traitement par les vibrations magnéto-mécaniques par des µvortex fonctionnalisés. (A) Photo du puits contenant les cellules seules comme témoin. (B) Photo du puits contenant les cellules en contact avec les µvortex non fonctionnalisés. (C) Photo du puits contenant les cellules en contact avec les µvortex magnétiques fonctionnalisés avec l'anticorps anti CA9. Tous les puits ont été soumis à la même valeur de champ magnétique, pendant la même durée.

L'observation ci-dessus montre que la comparaison entre l'échantillon témoin contenant des cellules seules et l'échantillon des cellules traitées par le stimulus magnéto-mécaniques révèle un net effet cytotoxique des vibrations des particules en micro-vortex magnétiques sur les cellules cancéreuses rénales humaines 24h après le traitement. Les cellules mortes n'ayant plus de protéines d'adhésion se détachent du support et flottent dans le surnageant.

L'observation réalisée dans les puits A et B correspond à un état à 100 % de confluence des cellules cancéreuses, comme expliqué précédemment dans la partie « culture cellulaire », la confluence décrit le degré d'écartement qui existe entre cellules adhérentes, 100% de confluence correspondant à un tapis cellulaire ne présentant aucun interstice entre chaque cellule. Ceci correspond à des taux de croissance et de division très actifs.

Il est important de noter que le traitement avec les micro-vortex magnétique réalisé la veille des observations de la Figure 41, est effectué lorsque les cellules sont à environ 70% de confluence : le tapis cellulaire prend forme, avec la présence d'amas cellulaires avec quelques légers interstices entre les cellules. Nous avons choisi ce taux car lors d'une précédente expérience, une trop grande confluence au moment du traitement empêche d'observer un quelconque effet de mort statistiquement significatif après 24h. Le nombre de cellules étant plus élevé que celui des particules, les divisions des cellules vivantes restantes envahissent la

surface du support de culture là où les cellules mortes suite au traitement se seraient détachées. L'observation 24h après montre donc toujours un état de confluence des cellules. Pour des raisons expérimentales, nous n'avons pas pu énumérer les cellules dans chaque puits, mais étant donné que ce résultat a été obtenu à plusieurs reprises une mesure quantitative de la mortalité cellulaire a été réalisée lors d'un autre essai de traitement par les vibrations, non pas 24h mais six heures après le traitement. Cette mesure est montrée plus loin sur la Figure 44 (A).

4.5.5 Analyse par cytométrie en flux, adaptation du traitement et résultats statistiques

La mort d'une grande partie des cellules 24h après le traitement rend impossible l'analyse par cytométrie pour identifier le mécanisme de mort cellulaire. En effet, il est recommandé pour ce type d'analyse d'utiliser une concentration cellulaire d'environ 10^6 cellules/ml dans chaque tube pour un marquage optimal des marqueurs d'apoptose et/ou nécrose avec un résultat statistique significatif sur les échantillons étudiés.

Nous avons décidé de réduire ce temps à une observation 12h après le traitement, puis 8h après le traitement et enfin, nous avons retenu un laps de temps de 6h entre le traitement par les vibrations magnéto-mécaniques et la préparation des échantillons traités pour l'analyse par cytométrie en flux. En effet, le suivi par les observations en microscopie optique a montré que les cellules n'étaient pas encore détachées du support six heures après les vibrations magnéto-mécaniques, ce qui permet de caractériser sur ces cellules les premiers signes de l'apoptose par le test Annexine/ IP en cytométrie.

Cette analyse de la viabilité des cellules SKRC 59 hCA9 après le stimulus magnéto-mécanique transmis par les micro-vortex magnétiques est représentée sous forme bi-paramétrique en nuage de points (chaque point correspondant à un événement, qui se traduit par le passage d'une cellule à travers le faisceau laser du cytomètre). En fonction de la fluorescence émise par chaque cellule, il est possible de classer trois catégories de populations comme indiqué sur la Figure 42:

- les cellules non marquées à l'annexine (Annexine-) / et non marquées à l'IP (IP –) représentent la fraction de cellules vivantes dans l'échantillon (ni apoptose, ni nécrose).

- Les cellules marquées positivement à l'annexine (Annexine+) / et non marquées à l'IP (IP –) sont des cellules en cours de processus d'apoptose, l'Annexine V se lie alors aux molécules de phosphatidylsérine exposées au feuillet externe des membranes phospholipidiques intactes des cellules cancéreuses en processus apoptotique.
- Les cellules marquées Annexine+ / IP + sont des cellules où la présence de l'IP démontre une rupture de l'intégrité membranaire soit par nécrose soit par le processus apoptotique tardif.

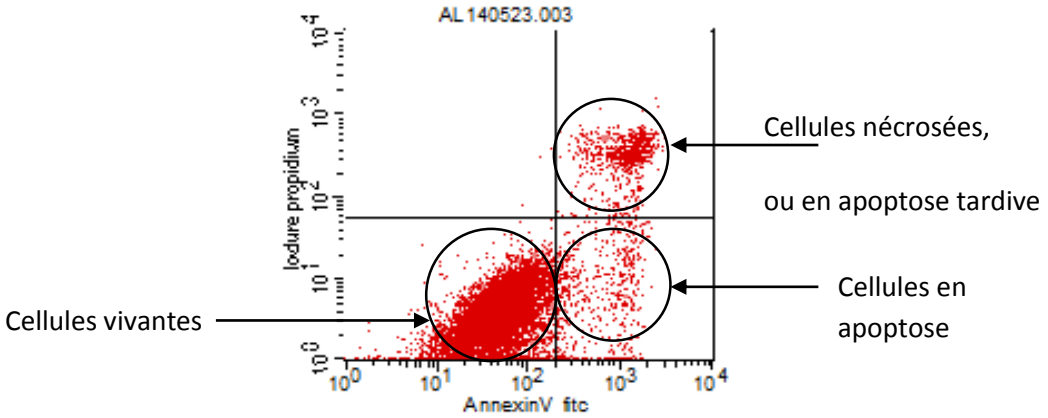


Figure 42. Représentation d'une analyse par cytométrie en flux d'une suspension de cellules cancéreuses SKRC hCA 9. Le diagramme bi-paramétrique de fluorescence indique trois populations cellulaires : les cellules vivantes AV-/IP-, les cellules en apoptose AV+IP- et les cellules nécrosées AV+/IP+, (ou en apoptose tardive).

L'apoptose peut aussi être détectée par les modifications des propriétés de diffusion de la lumière. En effet, le passage d'une cellule à travers le faisceau laser du cytomètre est accompagné par une diffusion de la lumière dans l'axe du faisceau (FSC - Forward Scatter-, qui est en corrélation avec la taille des cellules) et aussi une diffusion latérale à 90° (SSC - Side Scatter -, qui est en corrélation avec la granularité et/ou de la densité de cellules). Alors que la mort nécrotique est caractérisée par une réduction à la fois de FSC et SSC (due à la rupture de la membrane plasmique et le déversement du contenu intracellulaire), au cours de l'apoptose, il y a une augmentation initiale de la SSC (due à la condensation de la chromatine), avec une réduction du FSC (en raison de la contraction de la cellule). Le SSC tend à diminuer aussi durant les phases tardives de l'apoptose. La Figure 43 montre la représentation d'une analyse en fonction de la diffraction de la lumière.

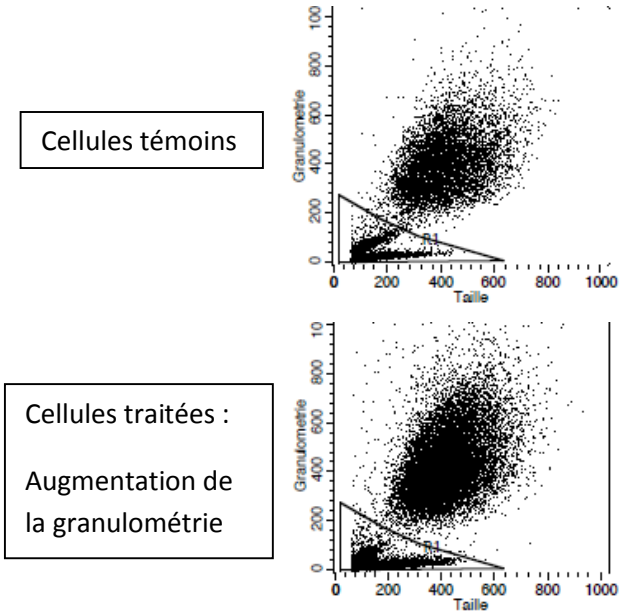


Figure 43. Représentation d'une analyse par cytométrie en flux, par le diagramme bi-paramétrique de diffraction de la lumière pour les cellules témoins et les cellules traitées.

Six heures après le stimulus magnéto-mécanique, les cellules cancéreuses rénales ont été analysées par cytométrie en flux en utilisant le kit commercial (Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor® 488 & Propidium Iodide de Life Technologies). Une analyse par cytométrie en flux nécessite une préparation des échantillons au préalable, cette étape dure environ 1H pour toutes les conditions (témoins et cellules traitées). La préparation des échantillons comprend le décollement des cellules du support sur lequel elles croissent, suivi de deux cycles de centrifugation et de resuspension, pour laver et concentrer les cellules, un comptage des cellules pour chaque condition et enfin le marquage à l'annexine V et à l'IP avec les temps d'incubation correspondant.

Chaque tube contenant les cellules à analyser est placé dans le cytomètre (BD FACSCalibur), les échantillons témoins avec les cellules marquées à l'annexine seulement AV+ IP- et les cellules marquées à l'IP seulement AV- IP+ sont analysés en premier, ces derniers permettent de réaliser une étape appelée « compensation ».

La compensation électronique de fluorescence entre deux fluorochromes permet de soustraire la superposition de deux signaux de fluorescence due au chevauchement des spectres d'émission des différents fluorochromes. Sans cette étape de compensation de fluorescence, une population cellulaire marquée en fluorescence verte (ALEXA Fluor 488) mais

pas en rouge (IP), est positionnée sur la bissectrice de l'histogramme biparamétrique des 2 fluorescences. Le système de compensation permet de soustraire électroniquement la fluorescence rouge qui résulte de la fuite de fluorescence du ALEXA FLUOR 488 dans le canal de l'IP. C'est grâce à cette étape qu'il est possible de distinguer des nuages de populations marqués distinctement.

L'approche développée au cours de cette thèse étant très novatrice et très peu référencée dans la littérature, sa mise en œuvre expérimentale a nécessité d'y consacrer beaucoup de temps pour l'optimisation du protocole expérimentale pour mettre au point en pratique de conditions de manipulation optimales (temps d'incubation pour la liaison particule/cellules, durée du traitement avec les vibrations, fréquence des vibrations, laps de temps écoulé avant l'observation et la détection des signaux apoptotiques, essai de plusieurs kits de détection d'apoptose, présence des particules magnétiques le long du processus). Après un peu plus de 40 essais, chaque essai représentant approximativement une semaine de préparations et mises en œuvre, nous avons réussi à obtenir des résultats satisfaisants, avec des données par la cytométrie en flux exploitables.

La Figure 44 ci-dessous montre le résultat de l'énumération des cellules vivantes et la cytométrie en flux réalisé six heures après le stimulus magnéto-mécanique selon le protocole opératoire décrit ci-dessus.

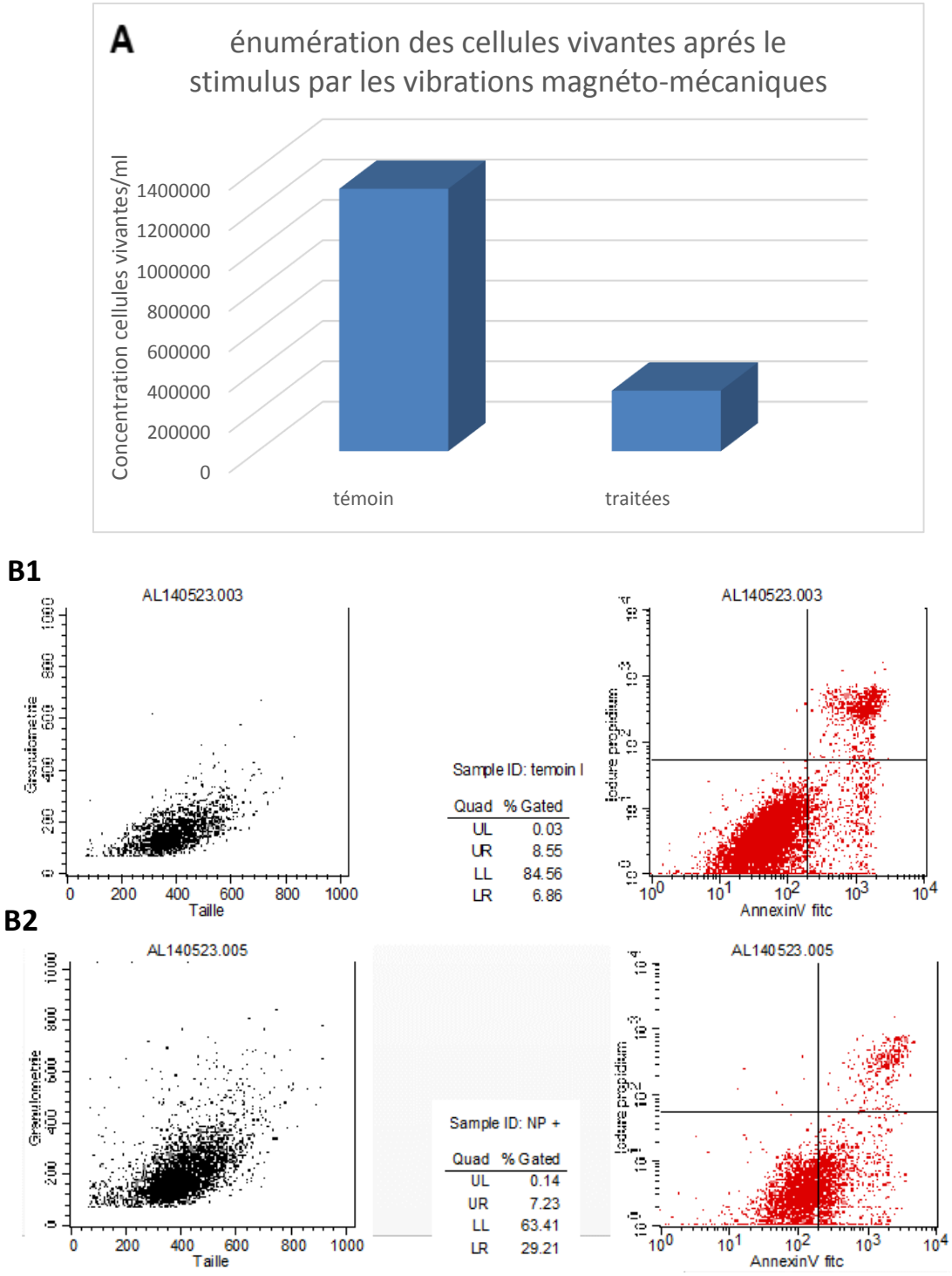


Figure 44 : A/ Enumération des cellules vivantes dans l'échantillon témoin (cellules SKRC 59 hCA9 seules) et l'échantillon traité (cellules SKRC 59 Hca9 avec µvortex magnétiques fonctionnalisés) 6 heures après l'application d'un champ magnétique alternatif. B/Résultats de la cytométrie en flux B1) réalisée sur les cellules témoin. B2) réalisée sur les cellules traitées restantes après le stimulus magnéto-mécanique.

L'énumération des cellules vivantes montre une diminution considérable du nombre de cellules vivantes six heures après le stimulus magnéto-mécanique induit par les µvortex magnétiques fonctionnalisés, une diminution d'un facteur cinq des cellules vivantes a été quantifiée et représentée sur la Figure 44A.

L'analyse par la cytométrie en flux montre que des cellules apoptotiques et nécrotiques ont émergé suite au stimulus par les vibrations magnétiques. L'observation du diagramme de diffraction de la lumière montre une augmentation de la granulométrie comparée à l'échantillon témoin, conséquence du processus apoptotique (condensation de la chromatine, bourgeonnement de la membrane plasmique) qui concorde avec le marquage à l'annexine V des membranes cellulaires.

L'observation du diagramme des deux marqueurs fluorescents montre une nette progression du nuage représentant la population cellulaire non marquée, supposée vivante vers un marquage positif à l'annexine V. Une progression vers le stade d'apoptose tardive a également été observée avec la coloration concomitante à l'annexine V et à l'IP.

4.5.6 Commentaires et Interprétation

Ce résultat, bien que *in vitro*, impliquerait une réduction nette de la taille de la tumeur, si les micro-vortex magnétiques fonctionnalisés sont injectés à proximité de la tumeur par voie intra-tumorale.

Bien que le mécanisme exact de la stimulation magnéto-mécanique des cellules cancéreuses ne soit pas encore pleinement compris, la donnée bibliographique soutient clairement l'hypothèse de l'origine mécanique de la réponse apoptotique [11].

La stimulation magnéto-mécanique élève le niveau du calcium intracellulaire par les étirements de la membrane provoqués par les vibrations des disques magnétiques [11], [74]. Les cellules étant hautement sensibles à l'homéostasie calcique, une exposition prolongée à un certain niveau de calcium intracellulaire peut déclencher l'apoptose de ces cellules [75]. La Figure 44 montre que l'utilisation conjointe de l'annexine V avec l'IP révèle un marquage positif des cellules après le traitement par les vibrations magnéto-mécaniques. L'absence de marquage à l'IP dans une grande proportion des cellules traitées indique que pour la lignée cellulaire donnée, l'apoptose induite magnéto-mécaniquement n'implique pas nécessairement la rupture de la membrane cellulaire étant donné que l'IP ne pénètre pas dans

le noyau, au moins dans les premiers stades de l'apoptose. Fait important, nous avons prouvé par le test MTT que les disques magnétiques ne sont pas cytotoxiques en l'absence de champ extérieur, cette propriété a aussi été retrouvée dans la littérature [76].

La sensibilité des cellules aux stimuli magnéto-mécaniques a été activement étudiée par plusieurs groupes de recherche, expérimentalement et par des modélisations. Une étude a montré que des piliers de cobalt fabriqués par les techniques top-down de microélectronique peuvent être utilisés pour appliquer des forces contrôlées sur les cellules et permettent d'étudier leur réponse à des forces mécaniques [77]. Dans cette approche, les micro-piliers constitués de nanofils magnétiques tournent en réponse à un champ magnétique externe, ce qui provoque une contrainte de traction sur les cellules attachées à l'extrémité des micro-piliers. Cette stimulation a pour effet une augmentation de l'adhésion focale des cellules (qui correspond à un regroupement des molécules d'intégrines) en réponse à la stimulation mécanique.

Aussi, pour approfondir la compréhension de nombreux mécanismes cellulaires, des méthodes de modélisation dédiées à l'étude du comportement mécanique du cytosquelette cellulaire ont été développées. Comme par exemple le modèle de tenségrité, qui considère la cellule comme une structure ayant une intégrité tensionnelle [78]. Brièvement, l'idée fondamentale de la tenségrité est que chaque élément du système perçoit et répond à un stimulus physique qu'il soit interne ou externe. Ce modèle permettrait dans un deuxième temps une meilleure représentation bioréaliste des mécanismes impliqués lors de la réponse apoptotique au stimulus magnéto-mécanique induit par les micro-vortex magnétiques.

4.6 Conclusion

En résumé nous avons décrit dans ce chapitre le concept d'un nouveau traitement permettant de lutter contre le cancer, l'efficacité de cette approche innovante pour la destruction des cellules cancéreuses a été démontrée expérimentalement *in vitro* et discutée. Après avoir décrit le matériel biologique utilisé et les techniques de culture cellulaire associées, nous avons mis en évidence les caractéristiques membranaires des cellules cancéreuses rénales utilisées, par les techniques d'immunofluorescence. Le fait de mettre en évidence la présence du biomarqueur d'intérêt anhydrase carbonique IX à la surface des cellules cancéreuses nous a permis de mener les travaux de ciblage. Enfin, nous avons mis au point la procédure

expérimentale permettant de lier les micro-vortex magnétiques aux cellules cancéreuses, de mettre en vibration ces particules magnétiques, puis d'étudier l'effet cytotoxique de ce traitement sur les cellules cancéreuses.

Dans l'étude décrite ci-dessus, nous avons démontré que le signal de l'apoptose peut être activé *in vitro* à distance dans le modèle du carcinome rénale humain à l'aide d'un champ magnétique alternatif externe. Ce stimulus magnétique a pour effet : i) une diminution significative du nombre de cellules cancéreuses vivantes, essentiellement par apoptose, et ii) l'initiation de la mort cellulaire programmée (ou apoptose) seulement six heures après avoir soumis les cellules cancéreuses aux vibrations magnéto-mécaniques. Cette approche innovante pourrait être largement applicable à tout type de récepteurs membranaires de surface d'intérêt clinique grâce au schéma de biofonctionnalisation développé. En effet, il suffirait de greffer un anticorps avec des propriétés de reconnaissance d'un antigène présent au niveau des membranes du type cellulaire ciblé.
Il est important de souligner que contrairement au traitement par l'hyperthermie magnétique, les vibrations magnéto-mécaniques induisent un stress qui est directement transmis aux cellules cancéreuses ciblées sans atteindre les cellules saines, alors que l'hyperthermie peut également élever la température des cellules saines voisines et les détruire. L'hyperthermie détruisant les cellules cancéreuses par nécrose peut également induire des phénomènes inflammatoires, alors que l'apoptose déclenchée par les vibrations entraine une mort naturelle de la cellule cancéreuse sans effet secondaire inflammatoire. En utilisant un matériau magnétique doux avec une configuration en vortex magnétique, un effet létale envers les cellules cancéreuses a été obtenu par l'application de faibles champs magnétiques ~300 Oe avec une fréquence de 20 Hz. Ce qui est en contraste avec l'hyperthermie nécessitant des fréquences élevées de l'ordre de centaines de kilohertz.

Conclusion générale et perspectives

Nous avons présenté dans ce manuscrit les principaux travaux réalisés dans le laboratoire Spintec pour la destruction des cellules cancéreuses par les vibrations magnéto-mécaniques de particules magnétiques réalisées par voie « top-down ». Les travaux réalisés au cours de cette thèse pluridisciplinaire se sont articulés autour de trois grands axes ; le magnétisme pour l'étude des propriétés magnétiques des particules, la chimie de surface pour le greffage de molécules biologiques à la surface des particules à des fins de ciblage et la biologie pour l'études des effets traumatiques des stimuli magnéto-mécaniques sur les cellules cancéreuses.

Au cours de cette thèse, nous avons mis au point des procédés de fabrication « top down » issus de la technologie des semi-conducteurs pour l'élaboration des particules magnétiques. Contrairement aux dispositifs de microélectroniques développées et maintenus sur un substrat de silicium, le procédé de fabrication avait la contrainte de la libération des particules du substrat pour obtenir une suspension de particules magnétiques en solution. De par leur nature magnétique, la condition primordiale pour l'utilisation de telles particules dans le domaine biomédical est que ces dernières soient monodisperses et non agglomérées, autrement dit sans aimantation rémanente.

Divers procédés de fabrication ont été développés pour la réalisation des particules anti ferromagnétiques synthétiques et en vortex. Chaque procédé était caractérisé par la présence de certaines imperfections de fabrication non adaptées à réalisation des particules SAF, en effet, ces défauts entravent le couplage antiferromagnétique entre les couches et sont à l'origine de l'agglomération des particules SAF. Par contre, la configuration des vortex étant moins sensibles à ces imperfections d'ordre nanométrique, les procédés développés étaient parfaitement adaptés à la réalisation des particules magnétiques en vortex.

Nous avons donc choisi d'utiliser les particules en vortex pour la suite de nos travaux, nous avons étudié les propriétés magnétiques des échantillons réalisés à savoir les susceptibilités magnétiques, les phénomènes d'agglomération/ dispersion et le couple magnéto-mécanique que peuvent transmettre les particules en vortex aux membranes des cellules cancéreuses.

La comparaison entre les deux types de particules magnétiques vortex et SAF a été étudiée. Ces particules ont leurs propres avantages. Selon nos calculs, les particules SAF peuvent, en principe, produire des couples magnéto-mécaniques plus importants que ceux calculés pour

les particules en vortex, mais comme démontré dans le second chapitre, les particules SAF sont plus difficiles à produire en particulier avec des matériaux biocompatibles. Les particules en vortex quant à elles peuvent-être plus facilement fabriquées, notamment avec des oxydes de fer, reconnus comme parfaitement utilisables *in vivo*.

De plus, la susceptibilité des particules en vortex est avantageusement toujours inférieure au seuil d'auto-polarisation de façon à ce qu'il n'y ait pas de phénomène d'agglomération quand les particules sont libérées en solution.

En comparaison avec l'hyperthermie magnétique, le stimulus par les vibrations magnéto-mécaniques, présente plusieurs avantages. En effet, les difficultés qui subsistent dans l'approche de l'hyperthermie sont l'aspect invasif, le ciblage et la distribution homogène de la chaleur au sein de l'organe cible. La subsistance de ces problèmes peut conduire à un effet insuffisant du traitement, voir à l'exposition létale des cellules voisines saines aux températures élevées. A la différence du traitement par hyperthermie, le stimulus par les vibrations magnéto-mécaniques des micro vortex magnétiques transmet le stimulus directement à la cellule cible avec une haute spécificité et une grande efficacité.

Grâce aux propriétés magnétiques des particules en vortex, l'effet cytotoxique a été obtenu par l'application de faibles champs magnétiques ~ 30mT, appliqués à une fréquence de quelques dizaines de Hz, pour une durée de 45 min. Ces conditions sont en contraste frappant avec les champs magnétiques à des fréquences élevées (200 à 400 Oe, >100 KHz,) utilisés pour l'hyperthermie, nécessaires pour atteindre la toxicité cellulaire.

Le second axe de recherche de cette thèse a porté sur le développement d'un protocole de fonctionnalisation des surfaces des particules magnétiques. Le procédé de fonctionnalisation conçu sur ces particules recouvertes de fines couches d'or est relativement rapide, réactif et spécifique. La validation de l'ensemble du processus d'immobilisation successive de la monocouche autoassemblée (SAM) de thiols, puis l'immobilisation des anticorps anti anhydrase carbonique IX ont été révélé par des procédures expérimentales basées sur la microscopie à fluorescence, les résultats de ces expériences ont permis de confirmer la fonctionnalisation de la surface d'or. Cette fonctionnalisation peut être étendue à tout type de lignées cancéreuses en sélectionnant le biomarqueur de surface adéquat, la stratégie développée au cours de cette thèse présente donc des perspectives très intéressantes pour les thérapies de divers cancers.

Nous avons démontré dans le dernier chapitre la preuve de concept de l'action antinéoplasique du stimulus par les vibrations magnéto-mécaniques sur des cellules en culture issues d'un carcinome rénal humain. En appliquant un champ magnétique d'à peine 300 Oe (30mT) avec une fréquence de 20Hz pour une durée de 45 minutes, nos expériences ont montré une nette diminution de la viabilité des cellules exposées aux traitements par rapport à leurs homologues témoins. Une progression vers une mort par apoptose a été observée et quantifiée par les tests de cytométrie en flux, et ce, à peine six heures après le traitement.

La mort cellulaire par apoptose met en œuvre des mécanismes complexes. A court terme, des expériences de caractérisations du processus apoptotique des cellules cancéreuses doivent être menées dans les prochaines études pour une meilleure identification des voies de signalisation apoptotiques déclenchées par les stimuli magnéto-mécaniques. Sur la base de nos observations expérimentales et des références bibliographiques, nous proposons que les stimuli magnéto-mécaniques soient convertis et amplifiés en un signal ionique chimique capable d'initier l'apoptose des cellules cancéreuses.

En effet, l'oscillation des micro vortex magnétiques semble être l'élément déclencheur de la voie de signalisation extrinsèque de l'apoptose calcium dépendante. Des études ont suggéré l'implication des ions Ca^{2+} dans la régulation de la mort cellulaire par apoptose. Il a été démontré que la libération du Ca^{2+} du réticulum endoplasmique ou l'influx de calcium du milieu extracellulaire à travers les canaux ioniques sont des facteurs apoptogènes [79]. Deux scénarios sont alors envisageables :

- Le déclenchement de la voie apoptotique mitochondriale [80] ; l'accumulation du Ca^{2+} cause l'augmentation abrupte de la perméabilité de la membrane mitochondriale et entraine la libération de molécules apoptogènes comme le cytochrome C. Cette molécule est responsable de l'activation des protéases caspases par diverses cascades d'activation. Ces différentes protéases effectuent le clivage de plusieurs molécules, parmi lesquelles des protéines de structure et des protéines impliquées dans les systèmes de réparation cellulaire [81] menant à la mort cellulaire par le processus apoptotique.

- La seconde voie est la voie cytosolique qui est tout aussi importante que la voie mitochondriale. En effet, le rôle du Ca^{2+} n'est pas limité à l'interaction avec les organites intracellulaires dans le contrôle du processus d'apoptose, le cytoplasme est doté de nombreux effecteurs qui peuvent décoder efficacement un signal extracellulaire lors de l'induction d'une apoptose Ca^{2+} dépendante. De multiples cascades de signalisation cytosolique critiques pour la survie cellulaire sont médiées par le Ca^{2+}.

Ainsi, en sélectionnant les marqueurs fluorescents adéquats, il serait possible d'identifier la voie de signalisation biochimique initiée par les vibrations magnéto-mécaniques des particules en microvortex. En plus de son grand intérêt en clinique, cette étude est très intéressante du point de vue fondamental car elle implique l'étude de la reprogrammation intracellulaire des cellules malignes en leur restituant une fin de vie «naturelle »

Aujourd'hui et demain, physiciens, pharmacologistes, biologistes, chimistes et médecins doivent aspirer ensemble à des thérapies novatrices, car si de nouveaux dispositifs de traitement combinés sont utilisés un jour en médecine, ce sera nécessairement le résultat d'un travail commun.

Références

1. Pislaru, S. V. *et al.* Magnetic forces enable rapid endothelialization of synthetic vascular grafts. *Circulation* **114,** (2006).

2. Polyak, B. *et al.* High field gradient targeting of magnetic nanoparticle-loaded endothelial cells to the surfaces of steel stents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105,** 698–703 (2008).

3. Akira Ito, Eri Hibino, Chiaki Kobayashi, Hiroko Terasaki, Hideaki Kagami, Minoru Ueda, Takeshi Kobayashi, and H. H. Construction and Delivery of Tissue-Engineered Human Retinal Pigment Epithelial Cell Sheets, Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force. *Tissue Eng.* **11,** 489–496 (2005).

4. Dobson, J., Cartmell, S. H., Keramane, A. & El Haj, A. J. Principles and design of a novel magnetic force mechanical conditioning bioreactor for tissue engineering, stem cell conditioning, and dynamic in vitro screening. *IEEE Trans. Nanobioscience* **5,** 173–7 (2006).

5. Kanczler, J. M. *et al.* Controlled differentiation of human bone marrow stromal cells using magnetic nanoparticle technology. *Tissue Eng. Part A* **16,** 3241–3250 (2010).

6. Mannix, R. J. *et al.* Nanomagnetic actuation of receptor-mediated signal transduction. *Nat. Nanotechnol.* **3,** 36–40 (2008).

7. Huang, H., Delikanli, S., Zeng, H., Ferkey, D. M. & Pralle, A. Remote control of ion channels and neurons through magnetic-field heating of nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **5,** 602–6 (2010).

8. Courcier, T. *et al.* Tumbling motion yielding fast displacements of synthetic antiferromagnetic nanoparticles for biological applications. *Appl. Phys. Lett.* **99,** 093107 (2011).

9. Dobson, J. Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **3,** 139–43 (2008).

10. Cho, M. H. *et al.* A magnetic switch for the control of cell death signalling in in vitro and in vivo systems. *Nat. Mater.* **11,** 1038–43 (2012).

11. Kim, D.-H. *et al.* Biofunctionalized magnetic-vortex microdiscs for targeted cancer-cell destruction. *Nat. Mater.* **9,** 165–71 (2010).

12. Joisten, H. *et al.* Self-polarization phenomenon and control of dispersion of synthetic antiferromagnetic nanoparticles for biological applications. *Appl. Phys. Lett.* **97,** 253112 (2010).

13. Leulmi, S. *et al.* Comparison of dispersion and actuation properties of vortex and synthetic antiferromagnetic particles for biotechnological applications. *Appl. Phys. Lett.* **103,** (2013).

14. On, I. T. Ieee transactions on. **M,** 1980–1981 (1981).

15. Buchold, D. H. M. & Feldmann, C. Synthesis of Nanoscale Co 3 [Co(CN) 6] 2 in Reverse Microemulsions. 3376–3380 (2007).

16. Gupta, A. K. & Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26,** 3995–4021 (2005).

17. Salgueiriño-Maceira, V., Correa-Duarte, M. a., Spasova, M., Liz-Marzán, L. M. & Farle, M. Composite Silica Spheres with Magnetic and Luminescent Functionalities. *Adv. Funct. Mater.* **16,** 509–514 (2006).

18. Hu, W. *et al.* High-Moment Antiferromagnetic Nanoparticles with Tunable Magnetic Properties. *Adv. Mater.* **20,** 1479–1483 (2008).

19. Beckman, R., Johnston-Halperin, E., Luo, Y., Green, J. E. & Heath, J. R. Bridging dimensions: demultiplexing ultrahigh-density nanowire circuits. *Science* **310,** 465–8 (2005).

20. Litvinov, J. *et al.* High-throughput top-down fabrication of uniform magnetic particles. *PLoS One* **7,** e37440 (2012).

21. Cowburn, R. P., Koltsov, D. K., Adeyeye, a. O. & Welland, M. E. Single-Domain Circular Nanomagnets. *Phys. Rev. Lett.* **83,** 1042–1045 (1999).

22. Rozhkova, E. a. *et al.* Ferromagnetic microdisks as carriers for biomedical applications. *J. Appl. Phys.* **105,** 07B306 (2009).

23. Chou, S. Y., Krauss, P. R. & Renstrom, P. J. Nanoimprint lithography. **14,** 4129–4133 (1996).

24. Yosida, K.-. Ruderman-Kittel theory. **46,** (1992).

25. S. S. P. Parkin, N. More, K. P. Roche, Phys. Rev. Lett. 1990,64, 2304.

26. Shinjo, T. Magnetic Vortex Core Observation in Circular Dots of Permalloy. *Science (80-.).* **289,** 930–932 (2000).

27. Wachowiak, a *et al.* Direct observation of internal spin structure of magnetic vortex cores. *Science* **298,** 577–80 (2002).

28. Metlov, K. L. & Lee, Y. Map of metastable states for thin circular magnetic nanocylinders. *Appl. Phys. Lett.* **92,** 112506 (2008).

29. Usov, N. a. & Peschany, S. E. Magnetization curling in a fine cylindrical particle. *J. Magn. Magn. Mater.* **118,** L290–L294 (1993).

30. Ross, C. *et al.* Micromagnetic behavior of electrodeposited cylinder arrays. *Phys. Rev. B* **65,** 144417 (2002).

31. Guslienko, K. Y. & Novosad, V. Vortex state stability in soft magnetic cylindrical nanodots. *J. Appl. Phys.* **96,** 4451 (2004).

32. Guslienko, K. Y., Novosad, V., Otani, Y., Shima, H. & Fukamichi, K. Field evolution of magnetic vortex state in ferromagnetic disks. *Appl. Phys. Lett.* **78,** 3848 (2001).

33. Kim, D. K. *et al.* Characterization and MRI study of surfactant-coated superparamagnetic nanoparticles administered into the rat brain. *J. Magn. Magn. Mater.* **225,** 256–261 (2001).

34. Lemarchand, C., Gref, R. & Couvreur, P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58,** 327–41 (2004).

35. Aliev, F. G. *et al.* Layer-By-Layer Assembly of Core-Shell Magnetite Nanoparticles: Effect of Silica Coating on Interparticle Interactions and Magnetic Properties. *Adv. Mater.* **11,** 1006–1010 (1999).

36. Smith, R. K., Lewis, P. a & Weiss, P. S. Patterning self-assembled monolayers. *Prog. Surf. Sci.* **75,** 1–68 (2004).

37. Godin, M. *et al.* Surface stress, kinetics, and structure of alkanethiol self-assembled monolayers. *Langmuir* **20,** 7090–6 (2004).

38. Plenderleith, I. H. Clinical Practice Treating the Treatment : Toxicity of Cancer Chemotherapy.

39. Bonnaud, C., Vanhecke, D., Demurtas, D., Rothen-Rutishauser, B. & Petri-Fink, A. Spatial SPION Localization in Liposome Membranes. *IEEE Trans. Magn.* **49,** 166–171 (2013).

40. Shimizu, K. *et al.* Construction of Multi-Layered Cardiomyocyte Sheets Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force. **96,** 803–809 (2007).

41. Plank, C. & Bergemann, C. MAGNETOFECTION : ENHANCING AND TARGETING GENE DELIVERY BY MAGNETIC FORCE. **3,** 79–80 (2002).

42. Arora, S. *et al.* Advances in Magnetofection – Magnetically Guided Nucleic Acid Delivery: a Review. (2013).

43. Khalil, I. A., Kogure, K., Akita, H. & Harashima, H. Uptake Pathways and Subsequent Intracellular Trafficking in Nonviral Gene Delivery. **58,** 32–45 (2006).

44. Hanahan, D., Weinberg, R. A. & Francisco, S. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. **100,** 57–70 (2000).

45. Bodnar, a. G. Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science (80-.).* **279,** 349–352 (1998).

46. Londoño-Vallejo, J. A. Telomere instability and cancer. *Biochimie* **90,** 73–82 (2008).

47. Muntoni, A. & Reddel, R. R. The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum. Mol. Genet.* **14 Spec No,** R191–6 (2005).

48. Shchors, K. & Evan, G. Tumor angiogenesis: cause or consequence of cancer? *Cancer Res.* **67,** 7059–61 (2007).

49. Golubkov, V. S. *et al.* Membrane type-1 matrix metalloproteinase confers aneuploidy and tumorigenicity on mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **66,** 10460–5 (2006).

50. Luk, K. H., Hulse, R. M., Phillips, T. L. & Francisco, S. Hyperthermia in Cancer Therapy. 179–185 (1980).

51. Franken, N. A. P. Radiosensitization with Hyperthermia and Chemotherapeutic Agents : Effects on Linear-Quadratic Parameters of Radiation Cell Survival Curves.

52. Marcos-Campos, I. *et al.* Cell death induced by the application of alternating magnetic fields to nanoparticle-loaded dendritic cells. *Nanotechnology* **22,** 205101 (2011).

53. Hildebrandt, B. *et al.* The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **43,** 33–56 (2002).

54. Pietrangeli, P. & Mondovì, B. C HAPTER 6 On the Biochemical Basis of Tumour Damage by Hyperthermia. (2004).

55. COSS, R. A. & LINNEMANS, W. A. M. The effects of hyperthermia on the cytoskeleton : a review. *Int. J. Hyperth.* **12,** 173–196

56. Press, I. & Basu, S. INTRODUCTION TO MAGNETIC MATERIALS.

57. Markides, H., Rotherham, M. & El Haj, a. J. Biocompatibility and Toxicity of Magnetic Nanoparticles in Regenerative Medicine. *J. Nanomater.* **2012,** 1–11 (2012).

58. Mornet, S., Vasseur, S., Grasset, F. & Duguet, E. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. *J. Mater. Chem.* **14,** 2161 (2004).

59. Lewinski, N., Colvin, V. & Drezek, R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* **4,** 26–49 (2008).

60. Balint, P. Elaboration et étude du comportement de micro /nanoparticules antiferromagnétiques synthétiques pour applications biotechnologiques. (2011). at <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00638878>

61. Schneider, M., Hoffmann, H., Otto, S., Haug, T. & Zweck, J. Stability of magnetic vortices in flat submicron permalloy cylinders. *J. Appl. Phys.* **92,** 1466 (2002).

62. Novosad, V. *et al.* Effect of interdot magnetostatic interaction on magnetization reversal in circular dot arrays. *Phys. Rev. B* **65,** 060402 (2002).

63. Love, J. C., Estroff, L. a, Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G. & Whitesides, G. M. *Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. Chem. Rev.* **105,** 1103–69 (2005).

64. Van Bommel, K. J. C. *et al.* Self-Assembled Monolayers on Gold for the Fabrication of Radioactive Stents. *Adv. Funct. Mater.* **11,** 140–146 (2001).

65. Bain, C. D., Evall, J. & Whitesides, G. M. Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group, and solvent. *J. Am. Chem. Soc.* **111,** 7155–7164 (1989).

66. Mazur, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* **247,** C125–42 (1984).

67. Ebert, T. *et al.* Establishment and Characterization of Human Renal Cancer and Normal Kidney Cell Lines Establishment and Characterization and Normal Kidney Cell Lines1 of Human Renal Cancer. 5531–5536 (1990).

68. Xu, C. *et al.* Unique biological properties of catalytic domain directed human anti-CAIX antibodies discovered through phage-display technology. *PLoS One* **5,** e9625 (2010).

69. Alterio, V. *et al.* Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106,** 16233–8 (2009).

70. A H. COONS, M.D., A. M. H. K. LOCALIZATION OF ANTIGEN IN TISSUE CELLS II. IMPROVEMENTS IN A METHOD FOR THE DETECTION OF ANTIGEN BY MEANS OF FLUORESCENT ANTIBODY. (1949).

71. Baumgarth, N. & Roederer, M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J. Immunol. Methods* **243,** 77–97 (2000).

72. Van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B. & Reutelingsperger, C. P. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* **31,** 1–9 (1998).

73. Koopman, G. *et al.* Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **84,** 1415–1420 (1994).

74. Sigurdson, W., Ruknudin, A. & Sachs, F. Calcium imaging of mechanically induced fluxes in tissue-cultured chick heart: role of stretch-activated ion channels. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* **262,** H1110–1115 (1992).

75. Clapham, D. E. Calcium Signaling Review. 259–268 (1995).

76. Vitol, E. a, Novosad, V. & Rozhkova, E. a. Multifunctional ferromagnetic disks for modulating cell function. *IEEE Trans. Magn.* **48,** 3269–3274 (2012).

77. Sniadecki, N. J. *et al.* Magnetic microposts as an approach to apply forces to living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104,** 14553–8 (2007).

78. Ingber, D. E. Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **104 (Pt 3,** 613–27 (1993).

79. Pinton, P. & Rizzuto, R. Bcl-2 and Ca2+ homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ.* **13,** 1409–18 (2006).

80. Rapizzi, E. *et al.* Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca2+ microdomains to mitochondria. *J. Cell Biol.* **159,** 613–24 (2002).

81. Vindis, C. *et al.* Two distinct calcium-dependent mitochondrial pathways are involved in oxidized LDL-induced apoptosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25,** 639–45 (2005).

Annexe 1. Développement des procédés de fabrication des particules SAF.

A. Procédé par bi-couche de résine.

Rappelons que dans ce procédé, la forme des particules magnétiques est dessinée en creux par lithographie optique dans une résine déposée sur le substrat en silicium, préalablement recouvert d'une première résine sacrificielle. Dans un premier temps (figure 1) la résine PMMA (Polyméthyl Methacrylate) est déposée par spinning (étalement par force centrifuge) sur le wafer (la plaque) de silicium, un recuit est ensuite nécessaire afin de la durcir, 600 secondes à 180°C. Il s'agit d'une résine positive, utilisée comme résine sacrificielle, elle ne sera pas affectée par la plupart des étapes ultérieures du procédé et n'intervient qu'au moment du dernier lift-off pour la mise en solution des particules. Une seconde résine négative photosensible MAN2403 est déposée par spinning, suivie elle-aussi d'un recuit de 90 secondes à 90°C .

Par la suite, la résine négative est insolée par un procédé de lithographie de contact (voir *Figure 45*). Le masque en verre portant les motifs chromés formant les particules est directement mis en contact avec l'échantillon, un vide poussé permettant de plaquer au mieux l'échantillon contre le masque pour assurer un contact uniforme. Dès lors, l'échantillon est exposé durant quelques secondes à une lumière en UV profond (deep UV). Le développement dans un bain de développeur de type AZ (solution aqueuse alcaline) permet de dissoudre les zones de résine non insolées et donne forme au réseau de trous dans la résine MAN2403 sans dissoudre la résine PMMA préalablement déposée.

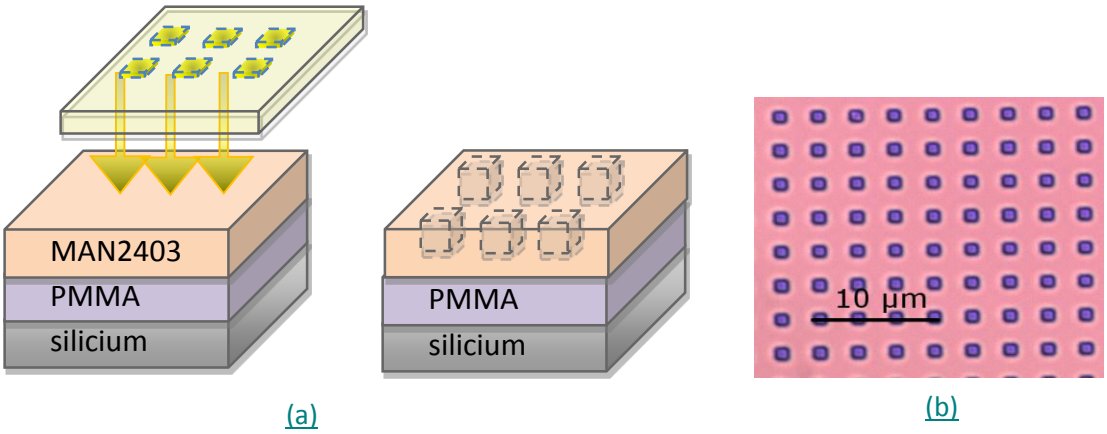


Figure 45. (a) Schémas des étapes d'insolation de la résine négative photosensible à travers un masque et de développement pour l'obtention d'un réseau de trous avant le dépôt magnétique. (b) Photo prise au microscope optique d'un réseau de trous après l'insolation et le développement.

Après l'étape de structuration de la résine MAN, le dépôt des couches magnétiques est réalisé sur l'échantillon par pulvérisation cathodique ou par évaporation (voir *Figure 46*) .
Le dépôt magnétique recouvre ainsi aussi bien le fond des trous que le reste de résine. Pour éliminer ce reste de résine négative insolée recouverte de dépôt, l'échantillon est plongé dans de l'isopropanol afin de dissoudre cette dernière et ne garder que le dépôt magnétique dans les trous

qui sont en définitif des particules magnétiques (voir *Figure 46* b). Cette étape constitue le premier lift-off, le solvant isopropanol de la MAN ne dissolvant pas la sous-couche de résine PMMA.

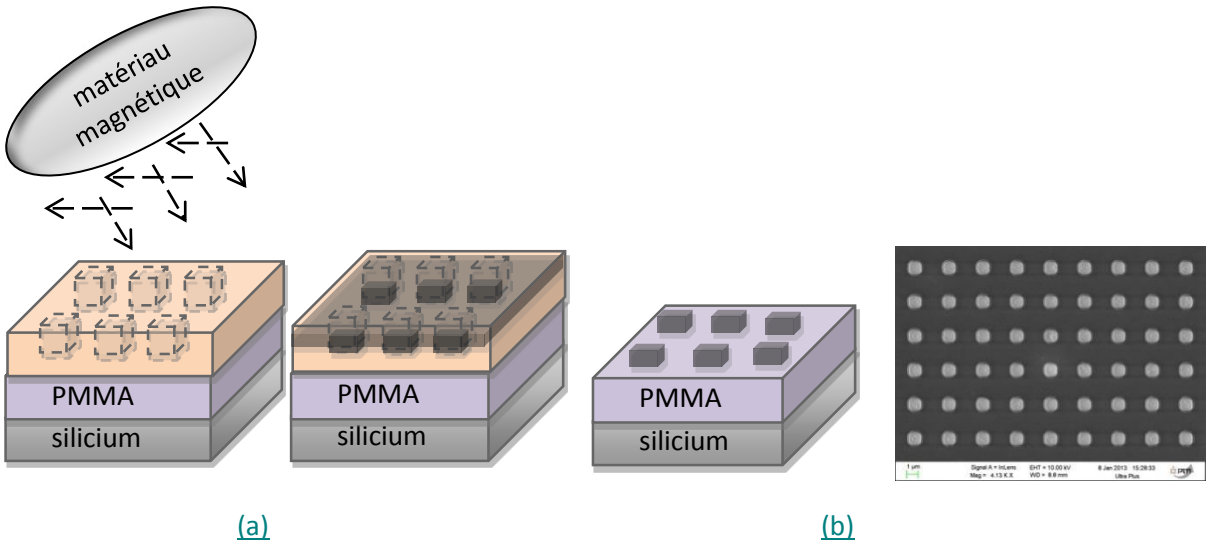


Figure 46 : (a) Illustration de l'étape du dépôt magnétique et du 1er lift-off par enlèvement de la résine négative photosensible MAN2403. (b) Schéma et Photo MEB – microscope électronique à balayage - montrant le réseau de particules fixées au PMMA après ce 1er lift-off (après dissolution de la résine MAN2403).

Enfin, la dernière étape du procédé ; le deuxième lift-off par dissolution de la résine PMMA pour la mise en solution des particules. Celle-ci se fait juste en plongeant l'échantillon dans un bain d'acétone, assisté par des ultrasons pour améliorer la dispersion des particules libérées.

A. Procédé par tri-couches de résines (2 résines sacrificielles)

Ce procédé a été pensé et développé pour éliminer l'interaction entre les couches PMMA et MAN2403 et ainsi protéger la couche sacrificielle PMMA de l'attaque chimique de la MAN2403. Les deux résines sont séparées par une troisième couche de résine sacrificielle appelée LOR10A ; il s'agit d'un polymère utilisé communément pour faciliter l'étape du lift-off car il a la propriété de former des «undercuts» après sa gravure chimique isotrope sous les motifs définis par la résine photosensible. LOR créé en sous-couche des cavités avec « profils rentrant » ou « retraits de parois », qui assurent une discontinuité du film déposé après la lithographie, facilitant l'accès aux solvants lors de lift-offs. Cependant dans notre procédé, l'idée a été d'insérer LOR pour tenter d'éviter la dégradation de la rugosité de PMMA par les solvants de la MAN.

Dans l'ordre, le substrat sera couvert par la résine sacrificielle PMMA, puis par la couche de LOR, et en dernier lieu par la résine photosensible MAN destinée à être insolée. Après l'insolation, le développement de la résine MAN va en même temps dissoudre les parties de LOR exposées, et ainsi transférer les motifs à travers cette couche intermédiaire jusqu'à la couche de PMMA comme montré sur la *Figure 47*.

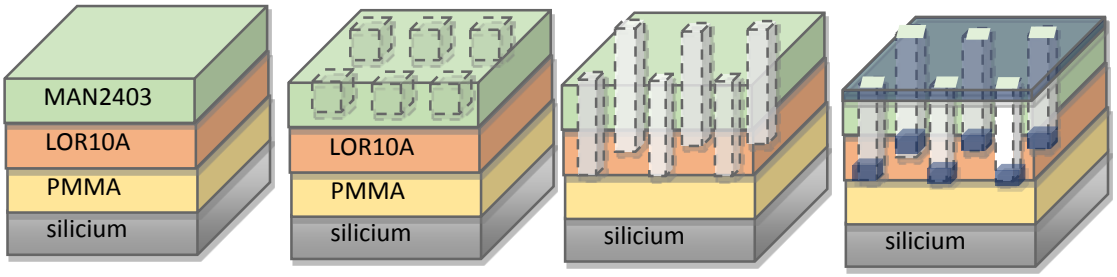


Figure 47. Principe du procédé de fabrication utilisant 3 couches de résines dont 2 sont sacrificielles. Objectif : diminuer la rugosité de la résine PMMA, en évitant l'agression des solvants de la MAN sur PMMA, grâce à la couche intermédiaire de résine LOR. Procédé développé pour diminuer les problèmes de rugosité pour la fabrication des particules SAF, le couplage antiferromagnétique n'étant pas maîtrisé si la rugosité du substrat est trop importante.Après avoir insolé l'échantillon par lithographie DUV, le développement est réalisé dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le procédé de la bi-couche. Dans ce procédé, nous parlerons de gravure humide au lieu de développement, car le développeur de la résine MAN2403 a aussi une action de gravure de la résine LOR10A. Nous avons testé la gravure avec deux solutions basiques; le développeur MF26A et développeur AZ326MIF.

- ## Caractérisation des particules magnétiques obtenues dans LOR sur PMMA

Pour faciliter l'observation des motifs dans la résine au MEB, nous avons tout d'abord évaporé une fine couche d'or sur l'échantillon après la lithographie, et enlevé la couche de MAN 2403 par lift-off à l'isopropanol comme montré sur le schéma de la *Figure 48*. L'isopropanol dissolvant la résine MAN sans dissoudre la résine LOR, ce lift-off laisse un réseau de trous structuré dans LOR attaché au substrat, et le fond des trous avec la fine couche d'or déposée apparente.

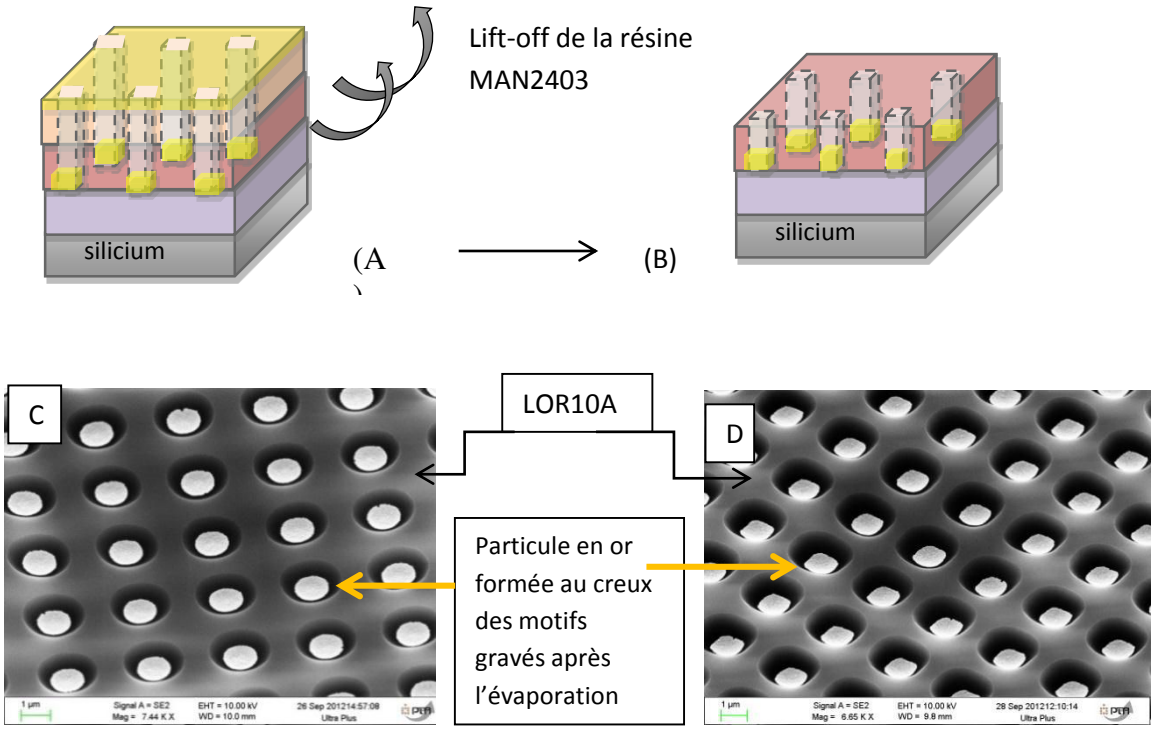


Figure 48. Schéma explicatif des étapes du procédé par tri-couche de résine avant l'observation des profils des motifs au MEB. (A) évaporation d'une couche d'or sur la MAN2403 développée. (B) lift-off dans de l'isopropanol

de la MAN2403, la résine LOR n'étant pas dissoute par l'isopropanol. Photo au MEB après le développement de la résine MAN et du LOR10A avec le développeur MF26A pendant (C) 15 s et (D) 30 s, avec évaporation d'une couche d'or pour l'observation des motifs.

Les observations au MEB montrent que la résine LOR10A se grave relativement bien avec les développeurs de la MAN2403. Mais les temps utilisés dans nos premières expériences (15 et 30 secondes) permettent juste d'amorcer la gravure de motifs isotropes dans la couche du LOR10A, et sont insuffisants pour atteindre la couche de PMMA. Les trous ont un fond concave, visible sur la *Figure 48*, qui pourrait encore une fois gêner le couplage antiferromagnétique à travers la fine couche de ruthénium. Afin d'atteindre la couche de PMMA et obtenir des creux avec des fonds plats, nous avons décidé de prolonger ce temps de gravure à 45 secondes dans le MF26A. Les *Figure 49* et *Figure 50* montrent l'observation de deux échantillons : le premier après pulvérisation cathodique de la multicouche SAF (*Figure 49*), le second après évaporation d'une couche d'or (*Figure 50*).

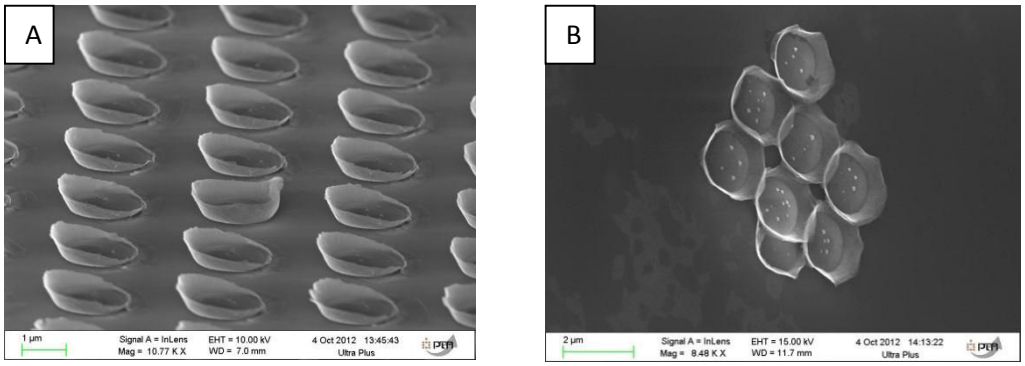


Figure 49. Image au MEB de l'échantillon après un développement de la MAN (gravant LOR) de 45 s, suivi d'un dépôt magnétique SAF par pulvérisation cathodique, et du lift-off de la MAN. A/Image MEB de l'échantillon avant le lift-off de la résine sacrificielle PMMA. B/Image MEB des particules observées sur l'image A libérées après le lift-off.

L'observation au MEB illustrée par la *Figure 49*, des particules obtenues par pulvérisation cathodique sur l'échantillon préparé avec les trois couches de résines, montre que les particules SAF formées dans les trous de résines et sur le PMMA sont surmontées d'un muret de dépôt magnétique. Ce dépôt autour des particules est gênant en termes de couplage RKKY, car les épaisseurs des couches déposées sur ce niveau oblique ne sont pas maitrisées, le couplage antiferromagnétique sera perdu car l'épaisseur de 0.7 nm de consigne pour le dépôt du ruthénium sera plus faible et inhomogène sur les flancs. Il s'agit là d'un gros inconvénient car lors du lift-off, ces rebords magnétiques (probablement ferromagnétiques) interagissent magnétostatiquement entre eux et sont à l'origine de l'agglomération des particules.

L'observation de la *Figure 50*(A) laisse suggérer deux sources de formation de ce dépôt oblique; i) la première raison serait un angle d'incidence des ions lors du dépôt par pulvérisation cathodique suffisamment important pour recouvrir non seulement le fond des trous mais aussi les parois de résine qui les délimitent, ii) la seconde raison serait la gravure chimique de la résine LOR10A qui transférerait des motifs avec des profils qui ne sont pas parfaitement verticaux. Pour vérifier si cela provenait du procédé de structuration des résines ou du dépôt, sur un autre échantillon, nous avons remplacé le dépôt par pulvérisation par une évaporation (plus directive) d'une couche d'or - l'évaporateur ne contenant pas les cibles du matériau SAF. Les images de la *Figure 50* ci-dessous montrent l'observation des résultats au MEB.

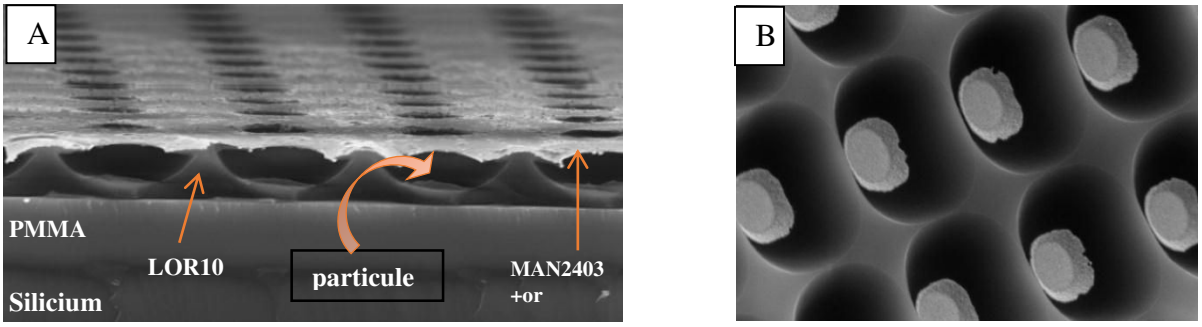
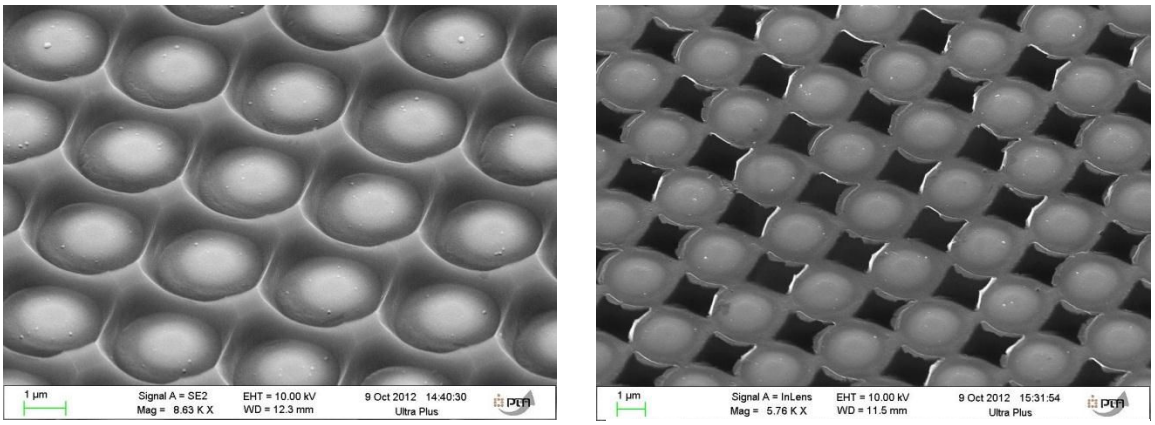


Figure 50. A/ Image au MEB à 90° d'une coupe de l'échantillon après une gravure humide de 60 s par le développeur de la MAN, et dépôt d'or par évaporation (dépôt directif) : la résine MAN développée présente bien un réseau de trous ; la résine LOR, gravée, montre les « undercuts» de forme concave . B/Image MEB du même échantillon après le lift-off de la MAN2403. Les particules d'or sont formées dans l'undercut du LOR10A, sur de la PMMA.

Nous avons observé que les flancs des motifs ne sont toujours pas droits en remplaçant la pulvérisation par une évaporation, l'inclinaison des parois autour des trous provient bien de la gravure chimique de la résine LOR10A. Nous pouvons penser qu'il est possible d'améliorer la verticalité de ces motifs en prolongeant le temps de gravure, mais les images MEB montrent que 60 secondes de gravure semblent être la limite car les trous ne sont séparés que par un film très fin de résine LOR, et graver plus longtemps risque de faire communiquer les cavités. Nous avons décidé quand même de faire un test avec 1min30 de gravure pour vérifier notre hypothèse, les résultats sont montrés dans la *Figure 51*, ci-dessous:



A/ Après le dépôt magnétique, avant le lift-off de la résine LOR10A

B/ Après le lift-off de la résine LOR10A

Figure 51. Observation au MEB du résultat d'un dépôt magnétique après une gravure de 1 minute et 30 secondes.

En conclusion, il est délicat d'obtenir des motifs avec des flancs droits dans la couche LOR10A sans que ces motifs ne communiquent entre eux par le sommet lors du dépôt des couches minces magnétiques.

Nous avons donc décidé de faire des tests similaires avec une nouvelle couche de la résine LOR10A, plus fine pour diminuer les temps de gravure. Pour cela, nous avons changé les paramètres d'étalement en augmentant la vitesse de rotation et l'accélération. La suite des étapes technologiques a ensuite été réalisée comme pour les tests précédents sauf le temps de gravure du LOR où nous avons gravé pendant 20 et 40 secondes avant de lancer les dépôts magnétiques. La

Figure 52 ci-dessous montre par des photos MEB l'aspect des particules SAF fixées sur du PMMA juste avant de les libérer en solution et en microscopie optique leur comportement en solution.

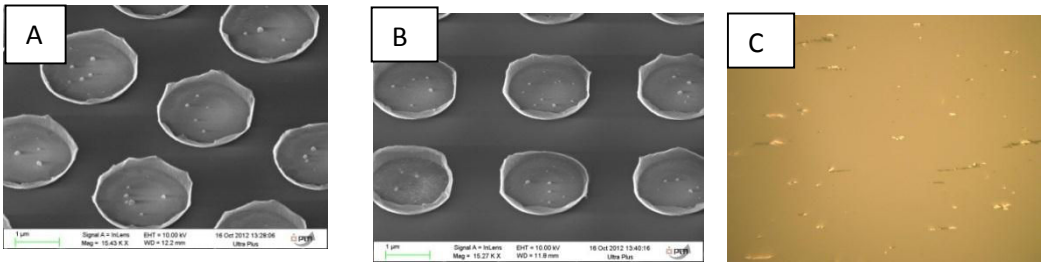


Figure 52: Observation des particules SAF à (A) 20 s de gravure dans le MF26A et (B) 40 s. (C) Photo prise en microscopie optique de ces particules libérées dans de l'acétone.

Nous avons observé sur cette image que le fait de diminuer l'épaisseur de la couche LOR10A réduisait mais n'éliminait pas le dépôt sur les flancs des motifs, le lift-off final dans de l'acétone pour libérer les particules montre que les particules ne sont pas monodisperses mais s'agglomèrent en petits agrégats.

Eventuellement un nouveau masque avec des motifs de particules plus petits espacés du même pas, ou des particules identiques plus espacées, permettant un temps de développement plus long, pourrait être conçu pour éviter ce problème, mais le procédé resterait long à développer.

En conclusion, le procédé de la tri-couche de résine permet d'éliminer la rugosité qui apparait lors du précédent procédé de fabrication. Mais les défauts de formes obtenues à la fin du procédé (dépôt oblique surmontant les particules) causent l'agrégation des particules par les interactions magnéto-statiques causées par ces bordures où le couplage n'est pas de nature antiferromagnétique.

B. Procédé de fabrication des particules SAF par gravure ionique (IBE)

Pour s'affranchir du problème de rugosité créé par la bi-couche de résine, nous avons développé un procédé qui consiste à obtenir des particules magnétiques en utilisant la gravure par faisceau d'ions focalisés (IBE, Ion Beam Etching) en gravant des motifs de particules dans une couche de matériau magnétique. Après avoir étalé la couche de résine sacrificielle de PMMA sur du silicium, nous déposons la multicouche magnétique en pleine tranche par pulvérisation cathodique sur l'ensemble de la plaque. Ensuite, afin de transférer les motifs des particules sur la couche de matériau magnétique, nous protégeons une partie de ce matériau par le masque de gravure en résine photosensible. Cette résine une fois développée révèle les motifs (pattern) qui protègent les surfaces ne devant pas être gravées.
Pour réaliser le masque de gravure à la surface du matériau SAF, nous effectuons une photolithographie en UV en utilisant la résine positive UV5 et le masque en chrome portant

les motifs des particules. Le développement révèle des plots de résine de dimensions latérales 1µm*1µm identiques aux dimensions des particules.
La résine UV5 est idéale pour la gravure par IBE car elle permet d'obtenir des motifs de résine épais (environ 1µm d'épaisseur) après la photolithographie. Il est important de savoir que les ions de la couche SAF arrachés après le bombardement se redéposent ensuite sur au pied des flancs de ces plots de résine. Si ces derniers sont peu épais, il risquerait d'y avoir une continuité entre le matériau à graver, les espèces gravées redéposées et le masque de gravure qui rendrait impossible le lift-off.
Après cette étape de masquage par lithographie, il est possible de procéder à l'étape de gravure par IBE pour éliminer toutes les zones non protégées par les plots de résine. Lors de cette gravure, les ions d'un faisceau d'ions d'argon fortement énergétiques entrent alors en collision avec les atomes des couches du SAF pour les arracher de celles-ci.

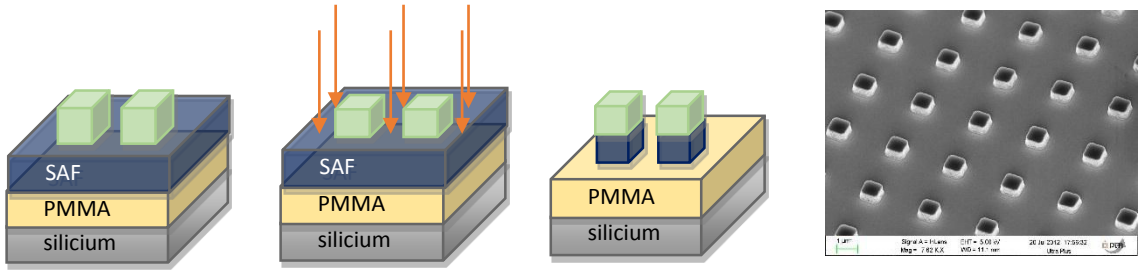


Figure 53. Schéma illustrant les étapes du procédé de réalisation des particules SAF par gravure ionique. Image MEB du masque de gravure à base de plots de résine UV5 après photolithographie UV.

- **Développement du procédé et résultats**

Nous avons commencé le développement sur des plaques 200mm jusqu'à l'étape de photolithographie pour la réalisation du masque de gravure, montré sur la Figure 53. Les plaques ont ensuite été coupées en morceaux de tailles plus petites pour pouvoir tester plusieurs procédés (process) en fonction des résultats obtenus. Nous avons fait varier différents paramètres notamment temps de gravure du SAF, de la puissance RF et de l'angle de gravure pour minimiser les redépôts provoqués par l' IBE. Une étude de procédé a dû également être menée pour l'élimination du masque de gravure et pour le lift-off final.
L'IBE est doté d'un système intégré de spectrométrie de masses des ions secondaires (SIMS) permettant la détection des espèces gravées et le suivi de la gravure en temps réel de l'empilement magnétique Ta_{3nm} $[NiFe_{10nm}Ru_{0.7nm}]_{11}NiFe_{10nm}Ta_{3nm}$. Nous arrêtons la gravure après la détection de tous les éléments jusqu'à ce que la première couche d'accroche du Ta ne soit plus détectée par le SIMS, un graphique du suivi de la gravure ionique par SIMS est montré sur la Figure 54.

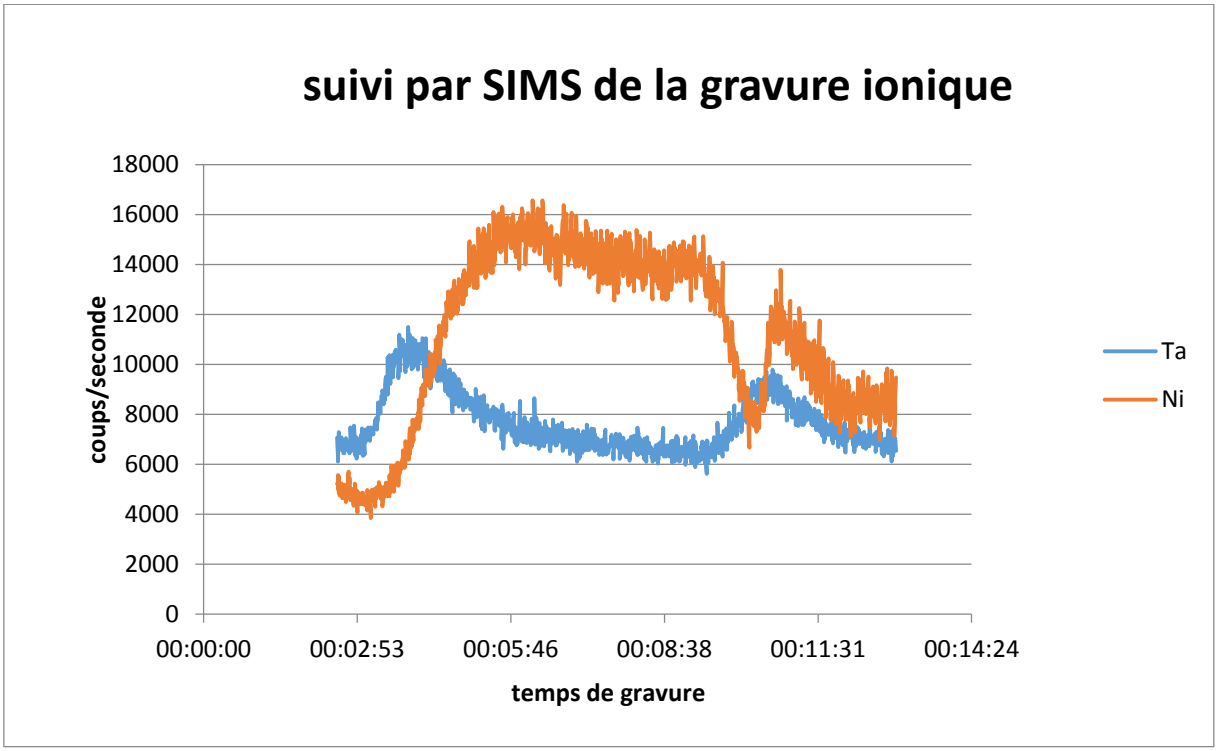


Figure 54. Graphe illustrant le suivi en temps réel des espèces gravées par le SIMS (Secondary ions mass spectroscopy)

Lors de la gravure par IBE, nous devons définir au préalable des paramètres tels que la pression de l'argon, nous la maintiendrons fixée à une valeur supposée optimale préconisée par les spécialistes de l'équipement qui est de $2*10^{-4}$ Torr. Une rotation de l'échantillon est aussi conseillée pour une meilleur homogénéité de la gravure sur le substrat, nous avons décidé de la garder fixe à 10 tours/minutes. Les paramètres que nous avons modifiés et ajustés lors du développement de ce procédé de fabrication sont la puissance RF du plasma, la position de l'échantillon par rapport au faisceau d'ions et le temps de gravure.

Test 1 : pour le premier test, nous avons utilisé les paramètres suivants

- Puissance RF : 500W.
- Position de l'échantillon par rapport au faisceau d'ions : -35°
- Temps de gravure : 20 minutes

L'observation au MEB de l'échantillon gravé montre, sur la Figure 55, que le temps de gravure était trop long et que la puissance utilisée était trop élevée à un tel point que le faisceau d'ions a recuit la résine sacrificielle PMMA qui s'est décollée du substrat dans certaines zones (voir figure 11 (A-B)). Néanmoins, la gravure n'a pas éliminé le masque de gravure et nous avons bien reproduit les dimensions du masque dans le SAF pour l'obtention des particules (voir figure 11 (C) illustrant une zone non décollée).

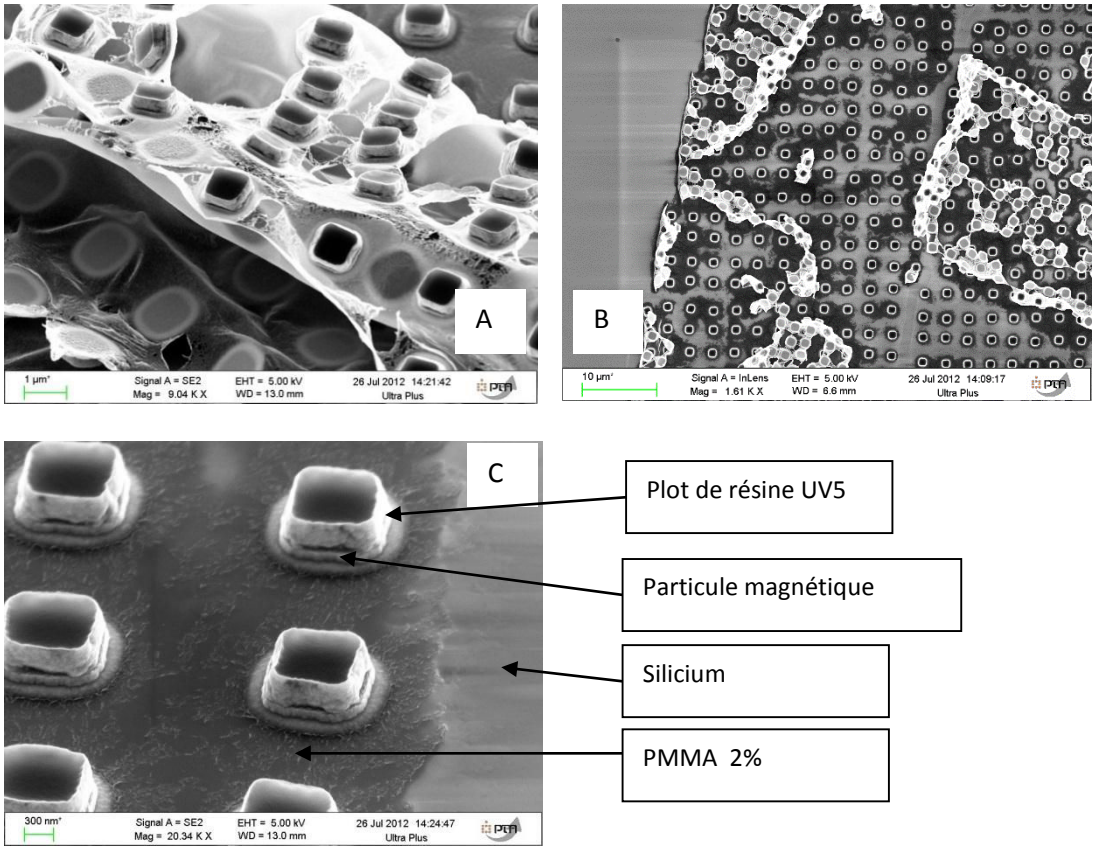


Figure 55. Film de PMMA avec des particules magnétiques et des plots de résine détachés du silicium après la gravure IBE du test 1. (A-B) Zones partiellement décollées suite au recuit du PMMA par le faisceau d'ions. (C) Observation des particules magnétiques formées sous le masque de résine.

Nous avons essayé le lift-off de cet échantillon pour tester la dissolution des résines à la fois PMMA et UV5 dans un bain d'acétone, puis dans du « remover », (solvant agressif supposé dissoudre toutes les résines), les deux essais pendant une heure. L'observation au MEB montre que les polymères recuits par la puissance du faisceau d'ions ne partent pas (ou très mal) au stripping (ou lift-off), les particules restant fixées sur le substrat.

Test 2 : pour ce test nous avons réduit la puissance du faisceau à 250W (puissance plus adaptée aux résines organiques), tous les autres paramètres sont restés inchangés. L'observation au MEB a montré qu'il n'y avait pas d'effet de recuit de la résine PMMA ni de décollement du substrat. Mais les particules s'étaient déplacées, probablement du fait de la rétractation du film de PMMA suite aux contraintes intrinsèques (voir figure 24).

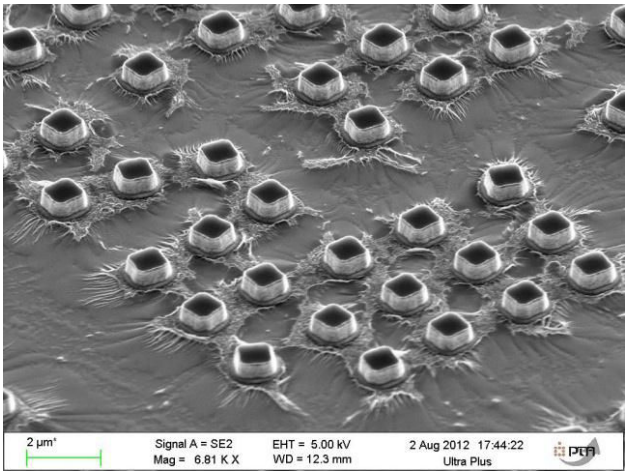


Figure 56. Particules réalisées sur du PMMA 2% après l'étape de gravure par IBE du Test2.

Nous avons ensuite effectué le lift-off pour la mise en solution des particules. Pour cela, l'échantillon a été immergé dans un bain de remover assisté d'ultrasons. Nous avons observé le résultat en deux temps; Tout d'abord nous avons observé au MEB le wafer après le lift-off pour nous assurer que le stripping s'est bien déroulé et qu'il ne restait pas de particules fixées sur le wafer (voir Figure 57 A). Ensuite nous avons récupéré le bain de remover où a été effectué le lift-off pour observer l'aspect des particules. L'observation montre que la résine sacrificielle (PMMA) se dissout au remover mais pas la résine servant au masque de gravure (UV5). Les particules se détachent du substrat mais restent collées aux plots de résine UV5 (voir Figure 57B).

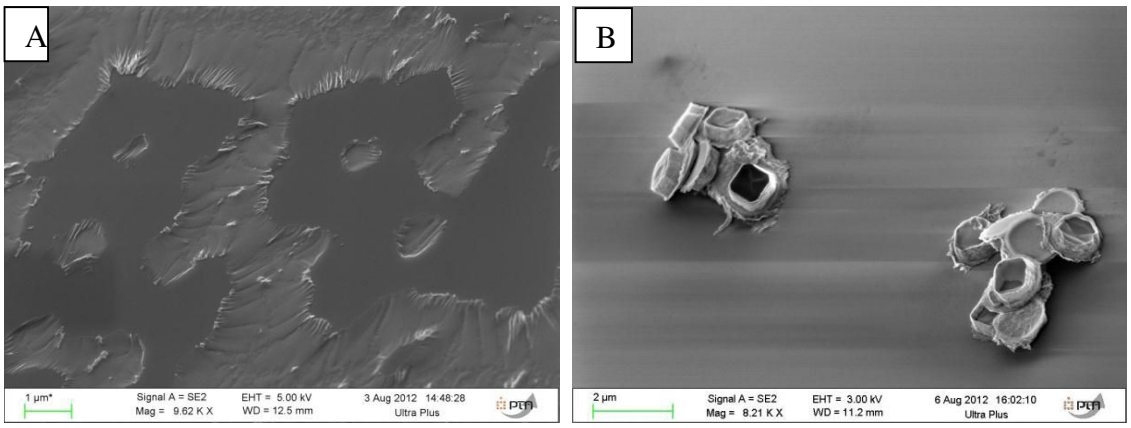


Figure 57. Observation au MEB après gravure IBE du test2, et après le stripping de la résine PMMA2% dans un bain de remover chauffé + ultrasons pour le lift-off de mise en solution des particules (A) du wafer de silicium après le procédé (B) des particules libérées et redéposées par évaporation d'une goutte de solution sur un wafer nu.

Test 3 : L'objectif est ici d'éliminer les motifs de résine UV5 restant attachés aux particules après la gravure du test 2 par une insolation. La résine UV5 étant une résine positive, l'insolation devrait casser les liaisons de polymérisation de la résine, et les zones exposées à la lumière DUV devenir solubles dans le développeur. Nous avons réalisé la même gravure que celle du test 2, ensuite nous avons insolé l'échantillon à la lumière UV afin de fragiliser les liaisons les plots de résines UV5 au-dessus des particules. L'échantillon est plongé ensuite

dans un bain de développeur (AZ300MIF), mais le résultat n'est pas probant. En effet, le masque de résine UV5 ne s'est pas dissout au développeur après cette insolation (voir Figure 58)

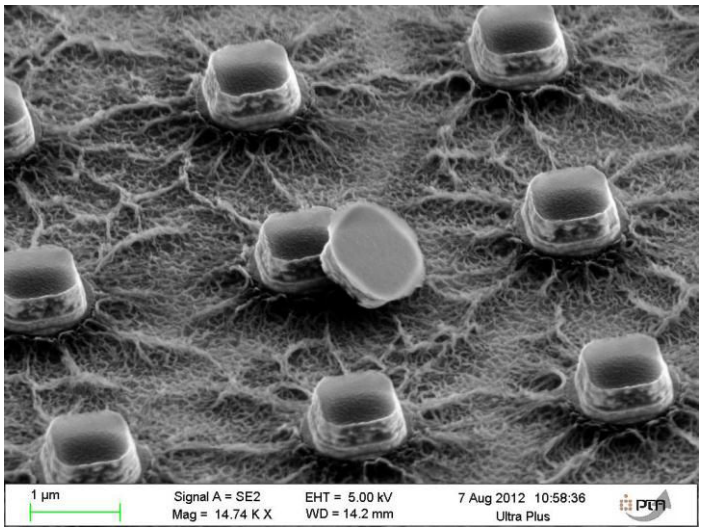


Figure 58. Le test de dissolution des plots UV5 par du développeur n'a pas fonctionné, la résine UV5 reste intacte, collée aux particules magnétiques.

Test 4 : Elimination du masque de gravure UV5 par un plasma d'oxygène

L'objectif est ici d'éliminer les motifs de résine UV5 restant attachés aux particules après la gravure du test 2 par un plasma oxygène. Les plasmas O_2 sont couramment utilisés pour éliminer les traces de contaminants organiques à la surface de substrats. L'oxydation plasma conduit à la dissociation de ces espèces et à la désorption de composés volatils (CO, CO_2, H_2O …) qui seront éliminés par les systèmes de pompage du réacteur. Nous avons donc utilisé cette propriété pour éliminer les résidus du masque de résine UV5. Pour cette application, la vitesse de gravure de la résine dépend des paramètres du programme utilisé (débit en oxygène, pression de travail, polarisation du substrat). Cette étape est assez critique et doit être optimisée afin d'éviter tout endommagement de la résine sacrificielle PMMA en dessous des particules et qui permet de les maintenir fixées au wafer de silicium.

Nous avons essayé des temps de plasma oxygène de 1minute, 1minute 30s et 2 minutes, nous n'avons pas observé de différences significatives sur les résines avec ces temps de gravure. L'observation au MEB montre que les plots du masque de résine s'éliminent bien au plasma d'oxygène mais il apparait que la gravure par IBE génère des redépôts de matériau SAF sur l'échantillon : les composants métalliques gravés s'étaient recombinés avec les bords de la résine qui sert de masque, et ces bords métalliques ne partent pas au plasma d'oxygène, comme le montre la Figure 59. Nous avons aussi remarqué l'existence d'une inhomogénéité des motifs sur la plaque. En effet à la fin d'un même procédé, nous observons des particules avec ce redépôt de métal et d'autres sans (Figure 15 (B-C).

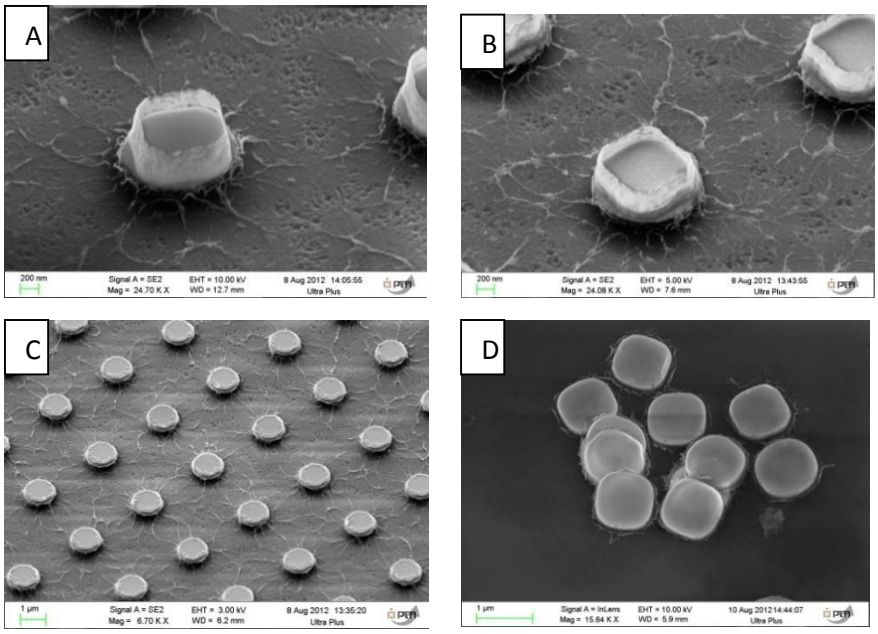


Figure 59. Particules après un plasma d'O_2 (a) durant 1min (b et c) 1min30 (d)après lift-off. Le plasma O_2 a bien éliminé la résine UV5 des particules SAF, mais a mis en évidence la présence du redépôt métallique de SAF sans l'éliminer.

Afin de minimiser le redépôt des métaux autour de la résine, nous avons fait varier l'angle de gravure IBE avec les valeurs -45°, -50°, -60° et -70° (-90° correspondrait au plan de l'échantillon). En théorie, plus l'angle est rasant, moins le redépôt est important mais le temps de gravure doit être allongé. Nos essais, illustrés par les figures 28 et 29, ont montré que de -45° à -60°, les redépôts ne sont pas éliminés.

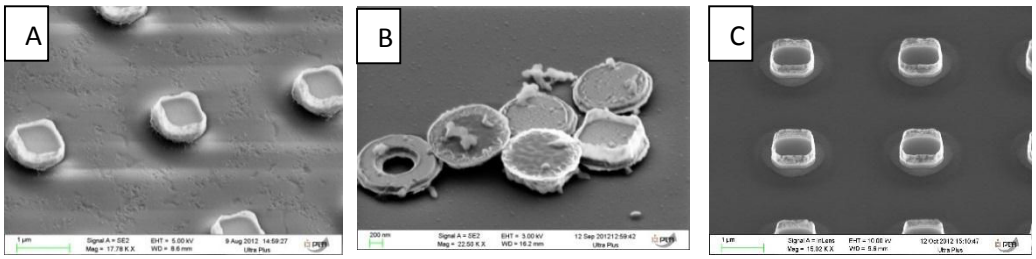


Figure 60 : Observation au MEB des particules après le procédé de gravure IBE avec un angle de - 45°, suivi du plasma d'oxygène (A) particules fixées sur le substrat et (B) après le lift-off. Les redépôts restent présents. (C) procédé de gravure IBE avec un angle de - 60°, suivi du plasma d'oxygène, particules fixées sur le substrat Présence de redépôts et lift-off impossible suite au temps de gravure IBE ayant durci le PMMA.

Non seulement la gravure à -60° ne réduit pas vraiment le redépôt, mais le temps de gravure long (45 minutes) a rendu impossible le lift-off (même après 72h passé dans du remover).

Pour s'assurer de l'influence de l'angle de gravure sur le redépôt, nous poursuivons notre caractérisation de la gravure IBE avec un test à -70°. L'observation a montré qu'il n'y a plus ou très peu de redépôt, comme prévu. Les particules sont parfaitement définies. Par contre du fait de la longueur du temps de gravure, la résine PMMA sacrificielle a durci, et ne s'élimine pas lors du lift-off, ni même au plasma O_2. La résine PMMA durcie et donne lieu à des

déformations sous le faisceau d'électron lors de l'observation au MEB d'où la distorsion observée sur la figure 17.

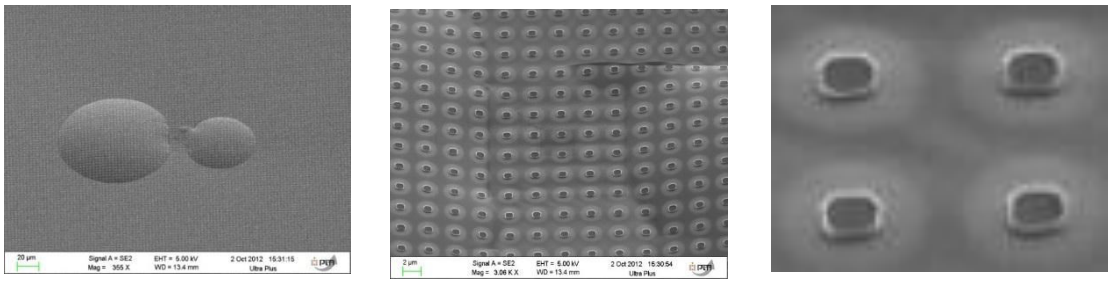


Figure 61. Réseau de particules après une gravure à un angle de -70°, la résine PMMA ayant durci lors de la gravure

Test 5 : Elimination des redépôts par action mécanique

L'objectif est d'éliminer les redépôts métalliques surmontant les particules après l'étape d'élimination des plots du masque de résine par le plasma d'oxygène, par action mécanique. En effet, le redépôt d'espèces gravées surmontant les particules semble assez fin pour être enlevé mécaniquement. Nous avons donc essayé de passer délicatement un coton tige sur la surface du wafer pour casser les redépots métalliques et les éliminer par un rinçage à l'eau désionisée. L'élimination des débris est importante car si ces derniers se retrouvent dans la solution du lift-off des particules, il y aura agglomération de l'ensemble particules/débris. Le résultat montre que les redépôts sont fragilisés par le coton tige (figure 18 a), mais qu'une grande partie des particules ont été détachées par son passage (figure 18 (b)),, aussi délicat soit-il. Le rinçage permet d'éliminer une grande partie des débris, mais pas complètement (figure 18 (c)).

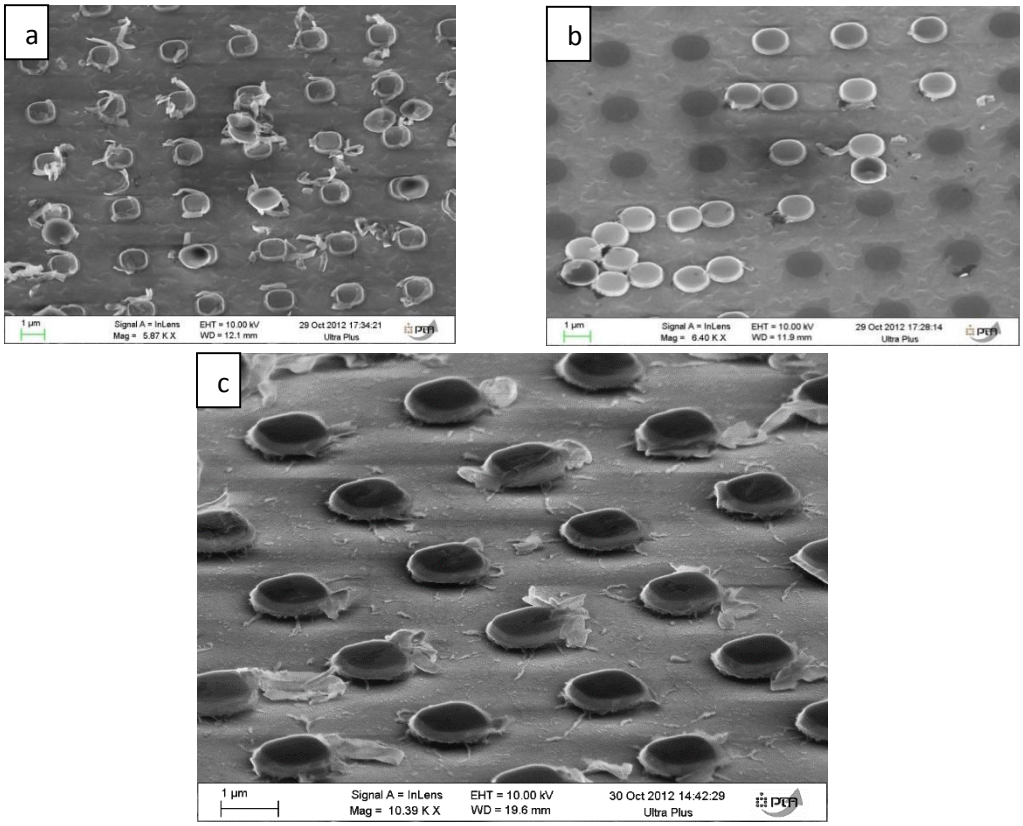


Figure 62. Image MEB d'un wafer de particules gravées par IBE suivie du plasma oxygène, avec passage d'un coton tige pour l'élimination des redépôts métalliques (a) avant le rinçage (b) observation de particules détachées (c) après le rinçage, des débris restent présents.

Cette méthode, peu fiable et reproductible, a dû être abandonnée.

Test 6 : Elimination des redépôts par un bombardement ionique horizontal

Toujours dans la perspective d'éliminer les murets de redépôts métalliques, nous avons réintroduit l'échantillon dans la machine de gravure IBE après l'étape du plasma O_2, pour réaliser une gravure horizontale rasante dans le but d'éliminer les redépôts : une première étape de gravure à -35°, suivie d'un plasma O2, et une seconde gravure à -5°. Mais le résultat n'était pas celui escompté car le faisceau d'Ar a déformé les motifs des particule sans une réelle amélioration sur le redépôt comme montré sur la figure 32 ci-dessous.

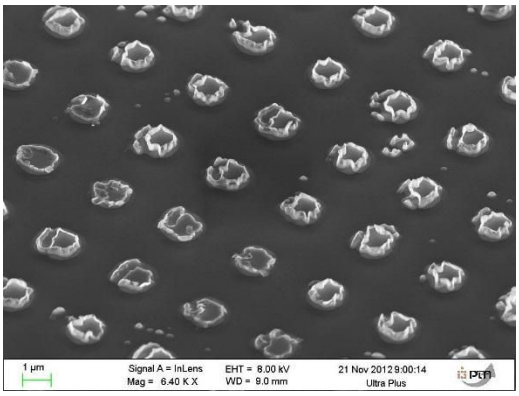


Figure 63. Particules après les étapes : gravure IBE à -35° ; plasma O2 ; et gravure IBE à -5°.

Face à la longueur et la complexité du procédé, et à la non reproductibilité des résultats de gravure par la machine, nous avons décidé d'arrêter le développement du procédé de synthèse des particules par gravure ionique, et d'essayer une autre approche pour l'obtention des particules SAF.

Annexe 2. Etude des rugosités de surfaces liées à l'agglomération des particules SAF

Les mesures par AFM des rugosités des différents substrats ont été réalisées suite à l'agglomération des particules SAF libérées en solution. Comme expliqué précédemment dans le premier chapitre, le couplage RKKY oscille entre le couplage antiferromagnétique et le couplage ferromagnétique en fonction de l'épaisseur du matériau espaceur. Sur une surface rugueuse, les irrégularités géométriques influence la croissance des matériaux et le couplage RKKY entre les couches ferromagnétiques déposées par-dessus est partagé entre les états antiferromagnétique-ferromagnétique. Dans cette partie sont expliquées les études réalisées sur la rugosité de la surface sur laquelle sont déposés les matériaux magnétique à divers stades du procédé technologique de fabrication.

Pour obtenir des particules SAF dispersées en solution, la présence de points ferromagnétiques est rédhibitoire, en effet, les interactions magnétostatiques engendrées entre les particules magnétiques entrainent l'agglomération des particules en suspension dans une solution.

L'étude a été réalisée pour le procédé de fabrication par bi-couche de résine, ce procédé est celui qui a été développé au laboratoire auparavant et utilisé avec succès pour la fabrication des particules SAF.

Pour avoir des informations sur l'état de surface sur lequel est déposé l'empilement de matériaux magnétiques constituant le SAF, nous avons structuré une résine avec le procédé servant à obtenir les motifs en forme de trous, servant de moules pour les particules magnétiques. Nous avons ensuite mesuré à l'AFM la rugosité de la surface du fond des trous, les résultats sont montrés sur la figure 1 ci-dessous.

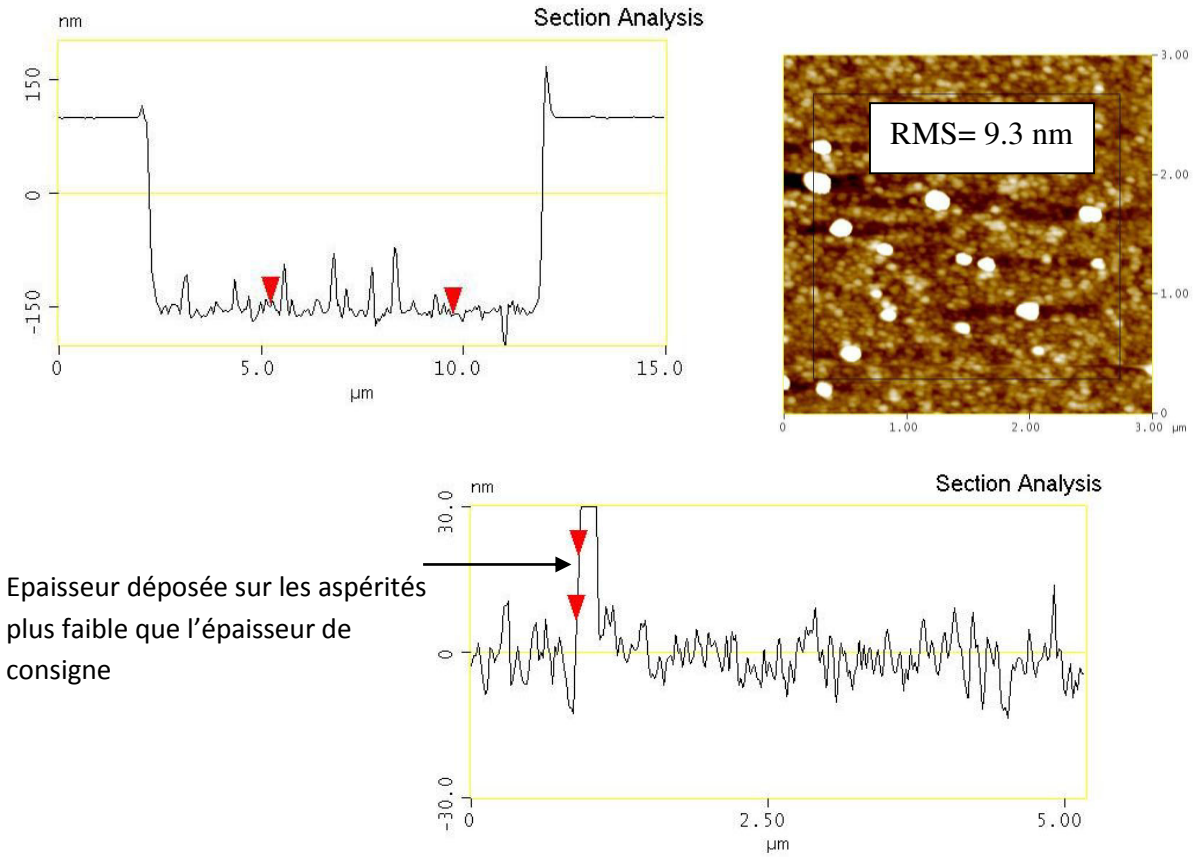


Figure 64. Mesure de la rugosité de la surface au fond des motifs à l'AFM réalisés dans la résine après la lithographie optique. A/ irrégularité de surface observée après l'analyse d'une section d'un motif. B/mesure de la rugosité au fond du motif.

Les mesures AFM confirment notre hypothèse concernant la présence d'une rugosité au fond des motifs dans la résine structurée, plusieurs facteurs sont susceptibles d'être à l'origine de la rugosité mesurée. Afin d'étudier l'origine de cette rugosité, Nous avons effectué des mesures AFM ponctuelles à chaque étape du procédé, les expériences et mesures sont expliquées ci-dessous.

- **Temps de lavage post-développement à l'eau DI**

La première raison qui nous paraissait être la cause de la rugosité de surface au fond des motifs était le temps de lavage à l'eau désionisée (eau DI) suivant le développement. Un temps de lavage trop court (1min30) ne suffirait pas pour l'élimination des résidus de photolithographie et du développement au fond des motifs, donc nous avons décidé de modifier l'étape de lavage, les résultats sont montré sur la table 1 ci-dessous :

Temps de lavage	Rugosité mesurée à l'AFM (RMS)
Lavage dans eau DI 4min	2.67 nm
Lavage dans eau DI 5min	2.8 nm
Lavage dans eau DI 5min + Bain d'eau DI assisté d'ultrasons	3.13 nm

Tableau 1. Influence du temps de lavage post-développement (après l'insolation de la résine MAN2403) sur la rugosité de surface de la PMMA au niveau des motifs.

Les temps de lavage après le développement de la résine insolée ne semblent pas influencer l'état de rugosité de surface mesurée au fond des motifs, nous avons donc décidé d'explorer d'autres voies.

- **Influence du développeur**

En second lieu, nous avons essayé de changer le développeur utilisé révéler les motifs d'insolation, ainsi nous avons testé trois développeurs basiques différents : MADD525, AZ326MIF et MF26. Ces développeurs sont tous de nature basique, mais diffèrent par leur composition chimique. La mesure de la rugosité au fond des motifs pour chaque développeur utilisé est montré sur le tableau ci-dessous

Développeur de la résine MAN	Rugosité mesurée à l'AFM (RMS)
MADD525	6.07 nm
AZ DEVELOPER	3.76 nm
MF26	2.8 nm

Tableau 2. Influence des développeurs utilisés pour la révélation des motifs de la photolithographie.

Ces résultats montrent qu'il existe une légère différence entre les rugosité de surface mesurées en utilisant des développeurs différents, les résultats de ce tableau sont montrés à titre indicatif mais n'était pas reproductibles au fur et à mesure des expériences. En effet, la rugosité de surface oscillait toujours entre 2 nm et 8 nm sans distinction pour ces trois développeurs.

- **Influence de la couche de PMMA**

Nous avons mesuré à l'AFM la rugosité de surface de la couche de résine PMMA, résine sur laquelle la multicouche magnétique est déposée. Nous avons réalisé l'échantillon en gardant les mêmes conditions d'étalement et de recuit que celles utilisées pour le procédé d'élaboration des particules SAF.

La mesure par AFM a montré que la rugosité mesurée est faible (0.3 nm) et il serait peu probable que ces valeurs interfèrent avec le couplage antiferromagnétique dans la multicouche. La résine PMMA, étalée et recuite, n'ayant qu'une très faible rugosité, nous nous sommes intéressés à l'influence des différents solvants et développeurs utilisés lors du procédé sur cette résine.

Pour cette étude, nous avons plongé un wafer recouvert de PMMA dans des bains de différents développeurs utilisés pour la dissolution de la résine MAN2403 ; ces développeurs sont MADD525D, MF26 et AZ326MIF. Nous avons ensuite rincé l'échantillon et mesuré sa rugosité de surface, les résultats sont résumés ci-dessous sur le tableau 3.

Influence des développeurs	Rugosité mesurée à l'AFM (RMS)
PMMA seul	0.29 nm
PMMA + MANDD525	0.33 nm
PMMA + AZ 326MIF	0.37 nm

Tableau 3: effet des développeurs de la résine MAN2403 sur la résine sacrificielle PMMA.

Le contact de la PMMA avec les développeurs ne modifie pas de manière significative la rugosité de celle-ci. Une autre hypothèse à vérifier est l'effet de l'insolation de la résine MAN2403 sur la couche PMMA se trouvant en dessous.

- **Influence de l'insolation de la résine MAN2403 sur la rugosité de la résine sacrificielle PMMA**

Nous avons réalisé un échantillon selon le procédé de photolithographie expliqué dans le chapitre 2 /procédé de fabrication des particules SAF. La résine sacrificielle PMMA a été étalée sur un substrat en silicium, après un recuit, la seconde résine négative MAN2403 a été étalée sur ce même échantillon et suivie d'un recuit. L'échantillon a été insolé en utilisant le masque des particules. Afin d'observer l'état de surface de la sous couche de PMMA après ces étapes technologiques, nous avons dissout la résine MAN2403 dans un bain prolongé du développeur adéquat et mesuré la rugosité du PMMA à l'AFM, les résultats sont montrés sur la Figure 65 ci-dessous.

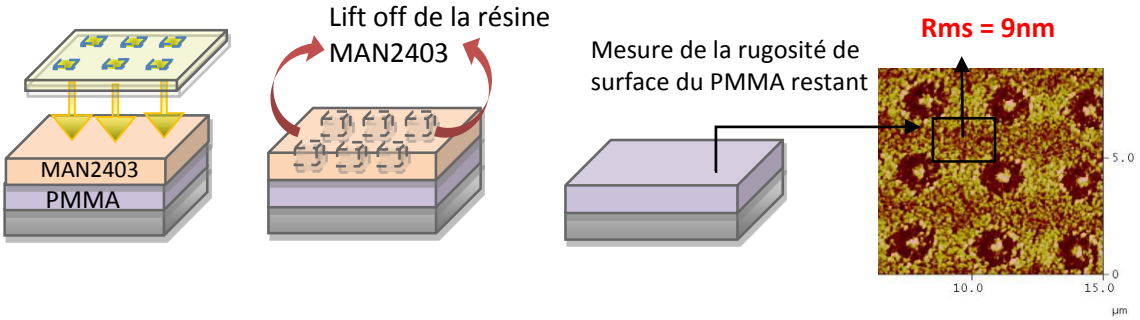


Figure 65. Schéma explicatif de la procédure expérimentale pour la mesure de la rugosité de la résine PMMA après l'étalement, l'insolation et le retrait de la résine MAN2403.

Le résultat ci-dessus montre clairement que l'insolation de la résine MAN détériore l'état de surface de la couche de PMMA se trouvant en dessous, alors que l'on s'attendait à retrouver un surface de PMMA plane, il apparait un empreinte des motifs d'insolation dans la MAN, transférés à la sous couche de PMMA. Pour vérifier si la formation de cette rugosité est due aux rayons de l'ultraviolet lointain utilisés pour l'insolation ou au contact des deux résines, nous avons mesuré la rugosité de la PMMA juste après l'étalement de la seconde résine, sans lithographie, l'expérience est expliquée dans le paragraphe qui suit.

- **Influence des composants de la MAN24.03 sur la résine sacrificielle PMMA**

Nous avons réalisé un échantillon de la manière suivante ; la résine sacrificielle PMMA a été étalée sur un substrat en silicium, après un recuit, la seconde résine négative MAN2403 a été étalée sur ce même échantillon et suivie d'un recuit. Afin d'étudier l'influence de cette deuxième résine sur la rugosité de la PMMA, nous avons dissout la MAN2403 avec un développeur adéquat et mesuré la rugosité de l'échantillon constitué donc d'une plaque en silicium recouverte du PMMA restant. Les résultats sont montrés sur la figure 3 ci-dessous :

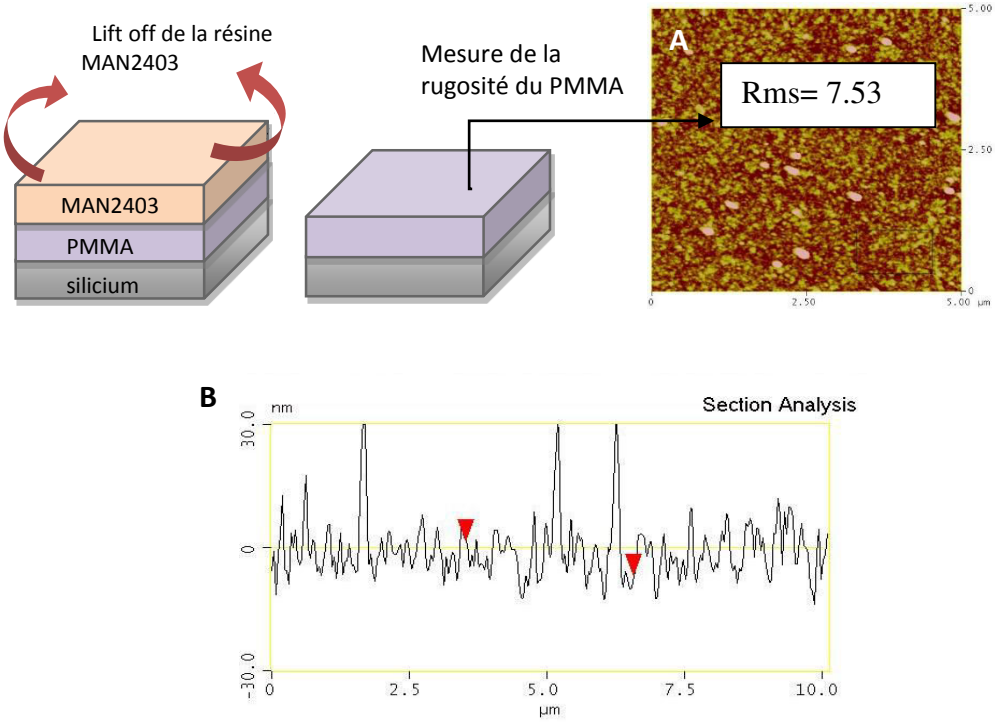


Figure 66. Schéma explicatif de la procédure expérimentale pour mesurer la rugosité du PMMA après avoir été en contact avec la résine MAN2403. mesure de la rugosité de la résine PMMA après l'étalement et le retrait de la résine MAN2403.

La Figure 66 ci-dessus montre clairement une détérioration de la rugosité de la surface de la PMMA après l'étalement de la résine MAN2403, une des raisons potentielles est la présence de solvants organiques dans ces résines. Ces solvants maintiennent les résines à l'état liquide et sont par la suite évaporés lors de l'étape du recuit. Lors de l'étalement de la MAN 2403, ces solvants agiraient sur la couche de PMMA et créent une forte rugosité à l'interface. Le fournisseur de ces résines a confirmé par la suite un changement dans la composition des solvants organiques qui pourrait être à l'origine de l'interaction entre les deux résines. Ce paramètre étant intrinsèque à la résine, nous avons décidé de développer d'autres procédés de fabrication tout en évitant le contact directe entre les deux résines PMMA/MAN2403.

Pour les autres procédés développés, nous avons réalisé des mesures de rugosité ponctuelles des surfaces devant recevoir l'empilement magnétique, ces mesures ont été incluses avec les procédés de fabrication dans la première partie du premier chapitre.

Annexe 3. Observations par microscopie à fluorescence des cellules soumises au stimulus magnéto-mécanique.

Ce test a été réalisé sur une lignée d'un mélanome murin génétiquement modifié pour exprimer l'anhydrase carbonique humaine. La lignée est appelée B16 hCA9.

Après avoir incubé les cellules avec les microvortex fonctionnalisés, les cellules sont placées sur l'agitateur magnétique pour mettre en oscillation les microvortex et transmettre les stimuli magnéto-mécaniques aux cellules. Après 6 heures, les cellules sont lavées deux fois au PBS. Nous rajoutons ensuite 1 ml de tampon (binding buffer) et réalisons le marquage avec 5 µl d'annexine-FITC et 1µl d'IP.

L'observation ci-dessous a été réalisée en microscopie à fluorescence, 10 minutes après le marquage.

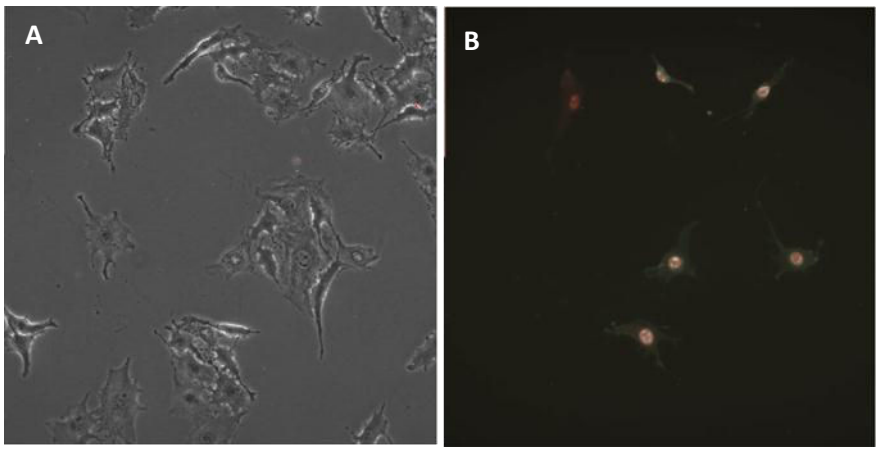


Figure 1 : Observation du marquage Annexine V/ IP des cellules cancéreuses en apoptose après le stimulus magnéto-mécanique. A/ observation des cellules en microscopie optique à transmission. B/Observation des cellules en microscopie à fluorescence. Les cellules fluorescentes sont en apoptose.