



HAL
open science

Particules magnétiques pour le traitement du cancer par effet magnéto-mécanique, application au glioblastome

Cécile Naud

► To cite this version:

Cécile Naud. Particules magnétiques pour le traitement du cancer par effet magnéto-mécanique, application au glioblastome. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAS005 . tel-02406101

HAL Id: tel-02406101

<https://theses.hal.science/tel-02406101v1>

Submitted on 12 Dec 2019

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biotechnologie, Instrumentation, Signal**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Cécile NAUD

Thèse dirigée par **Pr. François BERGER**, et
codirigée par **Hélène JOISTEN**

préparée au sein du **Laboratoire SPINTEC**
dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et
l'Environnement**

Particules magnétiques pour le traitement du cancer par effet magnéto-mécanique, application au glioblastome

Thèse soutenue publiquement le **26 avril 2019**,
devant le jury composé de :

Mme, Nora DEMPSEY

Directrice de recherche, Université Grenoble Alpes, Présidente

Mme, Sylvie BEGIN-COLIN

Professeur, Université de Strasbourg, Rapporteur

M, Julian CARREY

Professeur, INSA de Toulouse, Rapporteur

M, Nicolas FORAY

Directeur de recherche, INSERM UMR 1052 à Lyon, Examineur

M, Emmanuel FARGE

Directeur de recherche, Institut Curie à Paris, Examineur

M, François BERGER

Professeur, Université Grenoble Alpes, Directeur de thèse

Mme, Hélène JOISTEN

Ingénieur Chercheur CEA-Grenoble, Co-Encadrante de thèse



Remerciements

Tout d'abord, je tenais à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse et montré leur intérêt pour ce sujet lors de la discussion très intéressante.

Je tenais à remercier François Berger, pour son enthousiasme, ses discussions toujours très captivantes et pour m'avoir permis de pousser mes expériences jusqu'à *l'in-vivo*, me permettant ainsi de découvrir tout un monde dont je ne connaissais rien.

Je souhaiterais remercier Hélène Joisten pour avoir suivi avec intérêt ces travaux, depuis le stage jusqu'à la fin de la thèse. Merci pour ta gentillesse, l'autonomie que tu m'as laissée et tes encouragements.

Je souhaite également remercier Bernard Diény et Robert Morel pour leur curiosité à l'égard de ce sujet pluridisciplinaire et pour l'aide apportée. Je remercie Marie Carrière et Yanxia Hou-Brouin avec qui j'avais pu entamer l'étude côté biologie lors de mon stage et qui ont continué à suivre avec intérêt ces recherches. Yanxia, merci pour ta grande gentillesse, ton aide et ton soutien.

Je tiens à remercier Lucian Prejbeanu et Olivier Fruchart pour l'excellent accueil au sein du laboratoire Spintec, mais aussi pour leur écoute et leur empathie.

Je remercie très chaleureusement Diane Agay, sans qui les expériences in-vivo n'auraient pu être menées. Merci pour avoir toujours facilité les différentes démarches à effectuer et pour ton aide apportée. Je remercie également les zootechniciens Clément et Guillaume pour leur aide et notamment, pour avoir pris le relai sur les pesées les week-ends.

Je remercie chaleureusement Karin Pernet-Gallay et Anne Bertrand avec qui j'ai pu réaliser les acquisitions au TEM. Merci pour votre aide et les riches discussions.

Et parce qu'une thèse ne se résume pas qu'à des noms inscrits sur une page de garde d'un manuscrit et à des collaborations scientifiques, je tiens à remercier ici tous ceux sans qui je n'aurais pas pu aller au bout de cette thèse. Pour moi, ça aurait été 4 ans, en comptant le stage, 4 ans de rencontres, de partage et de découvertes que je vais essayer de retranscrire ici. Pardonnez mes longueurs, mais l'occasion de tels remerciements se présente rarement.

L'histoire commence pour mon premier jour de stage en 2015 dans « l'aquarium » de Spintec lorsqu'une jolie blonde vient se présenter à moi. Mélissa. A partir de ce moment-là, tu m'as prise sous ton aile et m'a appris tout ce que tu savais sur le sujet, de la fabrication des particules en salle blanche à la culture

Remerciements

des cellules. Un immense merci pour tout le temps que tu as passé à m'expliquer et me ré-expliquer toutes tes connaissances dont la plus utile aura sûrement été « comment on convertit des cm³ en litres ? ;p ». Un immense merci également pour m'avoir pleinement soutenue lorsque j'ai essayé de tout remettre à plat. Et surtout un plus qu'immense merci pour ton sourire, les rigolades, les petits ragots amenés toujours de façon très subtile « Et du coup t'as un copain toi ? » et tous les bons moments qu'on aura passé ensemble, dans ou en dehors de SPINTEC.

Très rapidement, je suis présentée à une horde de jeunes gens affamés se donnant rendez-vous dans un couloir tous les jours à midi pour aller se sustenter. Léa, Magali, Alex, Mathieu, Claire, Lamprini, Paulo, Alexu, Marc, Guigui, ... Que de bons moments passés avec vous, de discussions hasardeuses (jamais aucun esprit mal tourné, bien entendu), de franches rigolades mais aussi l'occasion pour moi de dérouiller mon anglais ! Un grand merci à vous tous pour ces midis qui redonnaient toujours le sourire !

Après le repas, tea time. Lieu de rendez-vous : la cafétéria du deuxième étage, avec les « vieux » de spintec (comprenez « permanents » sinon ils se vexent) qui ont également l'habitude de se réunir au même endroit en cas d'arrivage de viennoiseries et sucreries en tout genre (Attention au poisson séché ramené de Chine !). De manière plus ou moins assidue, on peut y trouver Isabelle, Gilles, Mihai, Clarisse, Claire, Mair, Hélène, Gregory, et bien d'autres encore. Un grand merci à vous tous pour m'avoir fait partager votre expérience de la recherche, des deadlines des appels à projet, de préparation des cours et corrections des copies ! Mais surtout un grand merci pour la très bonne ambiance qui règne au sein de ce labo, les discussions sur tout et n'importe quoi, une culture générale inégalable (spéciale dédicace à Mair !) et de manière générale tous les bons moments passés ici !

Parmi ces rencontres, j'aimerais m'attarder sur le cas de Gilles et Mihai. Outre le fait que vous êtes un duo de choc et que votre complicité est indéniable, j'aimerais vous remercier tout particulièrement pour les précieux conseils que vous avez pu m'apporter tout au long de ma thèse, pour l'aide que vous apportiez à vos doctorants et que j'écoutais toujours discrètement depuis mon bureau, pour le soutien et le réconfort que vous m'avez accordé et pour m'avoir, en quelque sorte, redonné foi en la recherche. Et comment ne pas mentionner les innombrables surprises et idées folles de Mihai !? Que de plaisir et de rigolade à avoir participé à tous tes petits projets ! Mersi fain !

J'aimerais également remercier particulièrement Isabelle, Claire, Clarisse, Léa (et oui ton CDI te classe chez les « vieux » ;)) et Liliana pour leur oreille attentive et leur soutien tout au long de ces années !

Fin de la pause, retour au boulot.

A peu près en même temps que moi, de nouveaux stagiaires font leur apparition et décident de poursuivre en thèse. Dali, Jay, Titiksha et Nicolas, ça aura été un réel plaisir de vous côtoyer tout au long des épreuves et de se soutenir mutuellement !

Remerciements

Début de la thèse, j'ai maintenant droit à un vrai bureau. En face de moi, Mélissa (la gentille blonde, pour ceux qui suivent pas). A ma droite, deux joyeux lurons. Nous avons tout d'abord Claire, qui se détend en cassant des briques sur son ordinateur. Un immense merci à toi pour ce que tu es, tout simplement. Merci pour ta simplicité, ta gentillesse, ton humour, ton soutien et les pots de nutella cachés dans le placard ! Et il y a Alex, dont le temps aura eu raison de sa petite couette bouclée. Un immense merci à toi pour avoir suivi de très près toutes mes péripéties tout au long de la thèse. Merci pour ton écoute, ton soutien, tes conseils, ton réconfort quand tu me retrouvais en larmes, merci pour avoir été là dans ces moments pas faciles ! Il n'y avait qu'une chaise mais on peut presque le compter comme membre du bureau tellement il y passait du temps : Mathieu. Le premier souvenir que j'ai de toi, tu étais tombé par terre tellement tu rigolais. Je m'étais dit « il est bizarre celui-là ». Merci à toi, pour ta bonne humeur, tes références, les anecdotes que tu connais sur un peu tout et n'importe quoi. Et également un immense merci pour ton soutien et tes conseils dans les moments les plus durs ! Le temps passe, des gens partent, des nouveaux arrivent. Thank you Chandra for your kindness and attention. Then Jay is coming. When I heard you were coming in the office, in front of me, I was really nervous because now I can confess I couldn't understand a word when you were talking. But each day, you talk with me and thank to you, my English is now much better and I can understand you! Thank you for all the good moments we spent in the office. I wish you all the best for the rest of your thesis and life! And finally, thank you Haozhe for your kindness and your smile! It was a pleasure to help all of you for what you needed: call Louis Vuitton shop, ask delivery of a Mini Cooper or contact French administration^^.

Des gens partent, d'autres arrivent. Même la plus grande table de H1 est maintenant trop petite pour notre groupe du midi ! Arnaud, Marco, Aurélien, Steven, Daniel, Gabin, les deux Luis, Roméo, Jérémy, Michael, Alvaro, Rana, Laura, et bien d'autres encore ! Thank you guys for the funny lunch time, the very good ambience in the lab and laser games parties! It was really rewarding to be in such a multicultural environment. Now I have to work on my spanish ^^!

En plus de Mélissa, le staff des non-permanents de l'équipe bio de spintec était composé de Tulio que je remercie pour sa sagesse et ses conseils, alors que je n'étais encore que la petite stagiaire du groupe. Les mois passent, des gens partent, des nouveaux arrivent. Merci à Alain pour ton ~~second~~ quinzième degré pas toujours facile à comprendre mais qui m'a finalement bien fait rire, ton avis franc et les longues discussions ! Vient ensuite Marie, « ma » stagiaire. Ça aura été un plaisir de t'aider au cours de ton stage, quitte à faire ta baby-sitter pour que tu puisses faire de la culture cellulaire, et de se recroiser encore et encore. Merci pour ton sourire et ta bonne humeur qui ne te quittent pas et tes balades en t-shirt en plein hiver ! Puis c'est la période creuse, petit vent de solitude au sein de l'équipe ... heureusement terminé grâce à l'arrivée de Svetlana. Merci à toi pour ta gentillesse, ton sourire et ta bonne humeur ! C'est enfin au tour de Caroline de faire son entrée en scène, et quelle entrée ! Avec son mètre cinquante les bras tendus, à peine un mois qu'elle est là qu'on la retrouve déjà en train de sauter sur un ballon avec une tête de cheval au milieu de la Kfet ! Impressionnée dès le début par ta faculté à

Remerciements

parler tout le temps devant des inconnus (mais elle s'arrête jamais ?!) j'ai très vite apprécié tes petites histoires, tes éclats de rire et faire la « gogolle » avec toi ! Mais surtout un immense merci pour m'avoir épaulé dès ton arrivée sur tous les questionnements que j'avais (« Caroliiiiine, tu peux veniiiiir s'il te plaaaaait ? »), que ce soit sur les questions scientifiques, la couleur de mes schémas, le plan du manuscrit, les tournures de phrases, et les mille choses que je t'ai demandé ! Un immense merci pour les multiples corrections de mon manuscrit que tu as faites, la préparation à l'oral et tout le travail de positive attitude que tu as fait sur moi (on dit pas « mes résultats c'est de la merde » !) !

Le travail effectué pendant ma thèse m'a amené vers d'autres laboratoires. C'est d'abord avec Matthieu D. que j'ai commencé à travailler. Un très grand merci pour m'avoir mise sur les rails dès le début, pour m'avoir appris avec passion tous les rudiments des expériences in-vivo et pour avoir permis de lancer toutes les manip côté bio. C'est avec Tanguy que j'ai ensuite réalisé toutes les expériences in-vivo. Un grand merci à toi pour ton professionnalisme, pour toujours essayer de mieux faire, et pour m'avoir transmis tout ton savoir. Ça aura été un réel plaisir de travailler en binôme avec toi !

Dans les couloirs, à Clinatéc, à Jean Roget ou à BioB, j'ai croisé de nombreuses têtes.

Tout d'abord un immense merci à Sandra pour toutes les fois où tu m'as dépanné, en culture ou pour les souris, tu m'as réellement été d'une grande aide ! Et merci pour les pauses thé, ta bonne humeur, ton sourire et ta force, très inspirante ! Un très grand merci à Céline et Graciane pour tous vos conseils ! Harmonie, Adrien, Michèle et Vera, merci pour la Sicile, j'étais vraiment contente de faire ce voyage avec vous ! Vera, merci de nous avoir accueilli chez toi mais surtout un grand merci pour toute ton aide, ta bienveillance, tes conseils, les discussions à BioB et les corrections du manuscrit ! Je rajoute ici Ali et Mylène. Un grand merci à vous tous pour tous les bons moments passés et les blagues graveleuses ^^ ! Un immense merci également à Jenny pour tous tes très bons conseils et ta gentillesse !

Je remercie également Manu, Maxime et Min pour le toujours très bon accueil à Jean Roget ! Merci à Didier pour parler avec autant de passion de la science et pour remettre en questions ce qui est établi. « Ah c'est ça ton sujet de thèse ? Tu ferais mieux d'essayer de faire léviter des tables ».

Merci à Marc, Ashley et Ludovic, avec qui j'ai partagé un bureau de temps en temps, pour les discussions toujours très intéressantes et drôles sur tout et rien, sur la vie, quoi. Merci aussi à Marie P, Paul, Eric, Ludovic, Jean-Marie, Philémon, Cyril, Anne, Fanny, Gaël, Gaëlle, Dodji, etc. pour les midis à parler musique, philo, GoT et autres sujets farfelus qui ne peuvent pas être retranscrits ici...

Tout cela n'aurait pas pu être réalisé sans le travail des gestionnaires de mes différents labos que je remercie très particulièrement. Rachel tout d'abord, merci pour ton efficacité et ta gentillesse. Léa et Sabrina merci pour votre sourire et votre bonne humeur ! Merci à Stéphanie, Andréa, Sandra et Kat pour votre réactivité !

Fin du boulot, le temps de se vider la tête.

Remerciements

En dansant d'abord. Je tiens à remercier tous mes amis danseurs pour tous ces bons moments passés qui font oublier les galères quotidiennes et mes profs qui me font me surpasser ! Charlotte, Cindy et Sandie, merci pour votre enthousiasme inégalable, c'est toujours un plaisir de vous retrouver !

En passant du temps avec ses amis. Merci à la team Phelma du CEA : Charlotte, Stéphanie, Christophe, Mathieu, Corentin, Mario. On s'est suivi depuis l'école d'ingé jusqu'à la thèse. Merci pour les repas ensemble, l'entraide, votre bonne humeur et votre peps ! Merci à tous mes amis de Papet. Hippo, Mathilde, Mattéo, Basou, PAB, Steph, Bibi, Chloé, Inès, Djodjo, Yannis, JB, Flavien, Fanny, Hugo, ... Merci pour tous ces week-ends passés un peu partout dans le monde qui me font me sentir en vacances à chaque fois et me font oublier ce qui ne va pas. Merci pour vos délires, les jeux, les soirées interminables, votre bienveillance (si si !) ... bref, merci pour tout ! Merci à mes amis « grenoblois » Thomas, Lydia, Simon, Vince, Guillaume, Pierre, MaxMat, Clara, Olivia, JP. Merci pour les soirées Shakes, les soirées repas de l'extrême, pour toutes ces soirées ou ces journées passées ensemble qui font que les week-ends « normaux » sont toujours de très bons week-ends ! Un remerciement tout particulier va à Hippolyte. Merci pour ton écoute, ta gentillesse, ton aide et ton soutien ! Et merci à tous ceux, rencontrés ici ou ailleurs qui ont su égayer ma vie au cours du temps.

En se ressourçant auprès de sa famille. Merci à tous pour votre soutien tout au long de ces années ! Merci aux familles Leroy & Baude pour m'avoir si bien accueillie ! Dadou, la Petite, merci pour tout ! Papa, Maman, merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir transmis vos valeurs et de m'avoir donné toutes les clés pour réussir dans la vie, que ce soit professionnellement ou personnellement. Vous m'avez appris à être heureuse et à aimer, c'est le plus beau des cadeaux que vous ayez pu me faire !

Pour finir, je tenais à te remercier toi, Antoine. Quand je t'ai dit que je voulais faire une thèse, tu m'as dit que tu pensais que c'était une mauvaise idée (on pourra en redébattre^^), mais tu m'as aussi dit que, quel que soit ma décision, tu me soutiendrais jusqu'au bout et c'est ce que tu as fait durant toutes ces années. Un immense merci pour ça ! Merci pour m'avoir donné confiance « c'est qui la meilleure ? c'est Kékile ! », merci pour toujours me redonner le sourire, pour rester aussi con et aussi simple, merci pour ton soutien et ta compréhension ! Merci d'être toi et d'être là, tout simplement.

Avant-Propos

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe « *Health & Biology* » du laboratoire SPINTEC et le professeur François Berger, actuel directeur du laboratoire BrainTech Lab – UMR1205, et fait partie du projet EuroNanoMed2 NanoViber.

Le projet européen NanoViber, débuté le 1^{er} janvier 2017, a pour sujet : « *Translational proof of concept of spintronic micro-nanoparticle non thermal vibrational therapy for glioblastomas* » et regroupe les partenaires suivants : l'unité UMR1205, les laboratoires SYMMES (Systèmes moléculaires et nanomatériaux pour l'énergie et la santé) et SPINTEC de l'INAC au CEA, la faculté de pharmacie de l'université de Lisbonne au Portugal (FFUL) / iMed.Ulisboa, l'institut de recherche et développement national pour les métaux rares et non-ferreux de Roumanie – IMNR et l'université de Thessalonique en Grèce / LTFN Laboratory.

Les trois premières années de thèse ont été financées par les budgets de SPINTEC. Les six mois de prolongations ont été financés par le laboratoire BrainTech Lab grâce au projet NanoViber.

Les différentes expériences ont été réalisées au sein de plusieurs laboratoires avec l'aide de multiples personnes, listés ci-après :

- Le laboratoire SPINTEC du CEA/INAC

Production des particules et caractérisation au Microscope Electronique à Balayage dans les salles blanches de la PTA (Plateforme Technologie Amont) avec l'aide de Mélissa Morcrette en tout début de thèse et avec l'aide de Caroline Thébault en fin de thèse ; Caractérisation magnétiques (Magnétomètre à échantillon vibrant (VSM) et Microscopie à Force Magnétique). Les dépôts de Co/Pt ont été réalisés par Stéphane Auffrey. Les observations des sphéroïdes en gel pendant l'application du champ ont été réalisées avec Mihai Miron. Les systèmes de mise en rotation des cylindres de Halbach ont été réalisés par Eric Billiet. Les acquisitions au MFM sous l'application d'un champ magnétique ont été réalisées avec Olivier Fruchart. L'image du vortex magnétique sur une particule de permalloy en forme de disque a été réalisée par Hélène Joisten.

- Le laboratoire UMR1205

En plus de la formation à l'expérimentation préclinique, mon apprentissage aux techniques de chirurgie a été dispensé par Matthieu Dreyfus, qui a aussi participé à la préparation des expériences. Toutes les expérimentations *in-vivo* ont été réalisées en binôme avec Tanguy Chabrol. Les protocoles d'immuno-histo-chimie ont été mis au point avec l'aide de Céline Le Clec'h. Certains marquages Ki-67/GFAP/Hoechst ont été réalisés par Harmonie Durand. Intégrée dans Clinathec au début de la thèse,

Avant-Propos

l'unité UMR1205 a évolué pendant ma thèse et est maintenant localisée sur deux sites, l'un à l'université de Biologie de Grenoble et l'autre à la faculté de médecine de Grenoble.

- Clinatex – Centre de recherche biomédicale Edmond J.Safra

Culture des cellules, Vidéomicroscopie, Comptage au Bleu de Trypan, Préparation des sphéroïdes, Mise en gel d'agarose, Application du champ magnétique, Animalerie, Chirurgie stéréotaxique, Imagerie à Résonance Magnétique, Coupes au cryostat, Immuno-Histo-Chimie, Microscopie à fond clair, Microscopie à fluorescence. Les opérations de change et d'entretien, ainsi que des pesées du week-end ont été réalisées par Diane Agay, Clément Perrin et Guillaume Barboux. Ma formation à l'Imagerie à Résonance Magnétique a été dispensée par Vincent Auboiron.

- Le laboratoire SYMMES du CEA/INAC

Tests de toxicité et tests sur les cellules SKRC59 dans les salles de culture du SYMMES (anciennement SCIB). Les tests de toxicité LDH et WST-1 y ont été réalisés par Caroline Thébault. Ces expériences ont été supervisées par Marie Carrière, avec les conseils de David Béal. Fonctionnalisation des particules au SYMMES (anciennement SPrAM) sous la supervision de Yanxia Hou-Broutin.

- Institut des Neurosciences de Grenoble (GIN)

La préparation des échantillons ainsi que les acquisitions par Microscopie à Transmission Electronique (TEM) ont été réalisées au GIN avec Anne Bertrand et Karin Pernet-Gallay.

- Autre

Les mesures de potentiel zêta ont été réalisées par Monica Focsan et Dumitrita Olivia Rugina du Nanobiophotonics Laboratory en Roumanie.

Catherine Godfroy, neuropathologiste, a aidé à l'analyse des colorations HE.

Table des matières

Remerciements	3
Avant-Propos	9
Liste des abréviations	15
Chapitre 1 - Introduction générale.....	18
I. Cerveau et cancer	19
I.1. Généralités sur le cancer.....	19
I.1.1. Les facteurs de risque	19
I.1.2. Capacités caractéristiques des cellules cancéreuses	20
I.2. Le glioblastome	23
I.2.1. Le cerveau	24
I.2.2. Pronostic et traitement actuel du glioblastome.....	27
I.2.3. Emergence de nouveaux traitements	28
II. Particules magnétiques pour la médecine.....	29
II.1. Notions de magnétisme	29
II.2. Utilisation de nanoparticules magnétiques pour la médecine.....	35
II.3. Effet magnéto-mécanique des particules – cancer	39
II.3.1. Principe.....	40
II.3.2. Les particules utilisées.....	44
II.3.3. Application du champ.....	46
II.3.4. Les effets obtenus	49
II.3.5. Etudes <i>in-vivo</i>	58
III. Description du projet	61
Chapitre 2 - Fabrication et caractérisation des particules magnétiques.....	64
I. Introduction	65
II. Fabrication des particules	66
III. Caractérisation des particules magnétiques	69
III.1. Caractérisation physico-chimique	69

Table des matières

III.2.	Caractérisation magnétique	70
III.3.	Comportement en suspension.....	75
IV.	D'autres pistes de particules	77
IV.1.	Particules SAF à aimantation perpendiculaire.....	77
IV.1.1.	Particules avec 80 répétitions de Co.....	79
IV.1.2.	Particules avec une seule couche de Ru	84
IV.2.	Vortex elliptique.....	90
V.	Conclusions du chapitre.....	93
Chapitre 3 - Etude <i>in-vitro</i>		96
I.	Culture des cellules.....	97
II.	Tests de toxicité intrinsèque des particules	98
II.1.1.	Tests quantitatifs.....	98
II.1.2.	Observation des cellules à très haute concentration de particules	101
III.	Interactions des particules avec les cellules.....	101
IV.	Traitement par application d'un champ magnétique rotatif.....	106
IV.1.	Application du champ – Cylindre de Halbach.....	106
IV.2.	Effet du traitement sur des cellules <i>in-vitro</i>	108
IV.2.1.	Méthode.....	108
IV.2.2.	Acquisitions au microscope et optimisation des paramètres	108
IV.2.3.	Marquage au Bleu de Trypan des cellules restantes.....	118
IV.2.4.	Observation des cellules restantes après traitement.....	120
V.	Conclusions du chapitre.....	122
Chapitre 4 - Etude <i>in-vivo</i> et développement d'un nouveau modèle <i>in-vitro</i> 3D.....		124
I.	Méthode.....	125
I.1.	Procédures chirurgicales, suivi des animaux et analyses des échantillons	125
I.2.	Composition des études.....	131
II.	Injection des particules – Toxicité.....	134
II.1.	Défi de l'injection des particules	134
II.2.	Diffusion des particules dans la tumeur	136

Table des matières

II.3.	Etude de l'internalisation des particules.....	138
II.4.	Toxicité des particules.....	139
III.	Evaluation du traitement.....	142
III.1.	Etude histologique.....	142
III.2.	Etudes de survie.....	146
III.2.1.	Première étude de survie.....	147
III.2.2.	Deuxième étude de survie.....	151
III.3.	Conclusions.....	153
IV.	Développement d'un modèle <i>in-vitro</i> 3D.....	155
IV.1.	Les limites du modèle <i>in-vitro</i> classique – Nécessité du développement d'un nouveau modèle.....	155
IV.2.	Mise au point de la méthode.....	156
IV.3.	Validation de la méthode.....	159
IV.3.1.	Sphéroïdes obtenus.....	159
IV.3.2.	Injection des particules dans les sphéroïdes.....	160
IV.3.3.	Application du traitement.....	162
IV.3.4.	Utilisation du modèle de sphéroïdes en gel et pistes d'optimisation.....	164
IV.3.5.	Conclusions.....	167
Chapitre 5 - Conclusions, discussion et perspectives.....		168
Bibliographie.....		173
Annexes.....		188
I.	Protocole détaillé de fabrication des particules.....	189
II.	Protocole pré-règlementaire de fabrication des particules.....	193
III.	Particules de magnétite.....	197
IV.	Protocole de préparation des échantillons pour le TEM.....	198
V.	Protocoles de marquage.....	200
VI.	Etude statistique.....	202
Résumé.....		204
Abstract.....		204

Liste des abréviations

2D	2 Dimensions
3D	3 Dimensions
7-AAD	7-AminoActinomycine D
AC	Courant Alternatif
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AF	AntiFerromagnétique
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
AM	AcétoxyMéthyl
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
BdT	Bleu de Trypan
BRCA	BReast CAncer
BrEth	Bromure d'Ethidium
CA9	<i>Carbonic Anhydrase 9</i>
CGS	Centimètre-Gramme-Seconde
CM	Champ Magnétique
DC	<i>Direct Current</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
D-PBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DR4	<i>Death Receptor 4</i>
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	EthylèneDiamineTétraAcétique
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
emu	<i>electromagnetic unit of current</i>
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i>
EthD-1	homodimère-1 d'Ethidium
FM	FerroMagnétique
IDH	Isocitrate Déshydrogénase
IHC	Immuno-Histo-Chimie

Liste des abréviations

IPA	IsoPropAnol
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GIN	Institut des Neurosciences de Grenoble
HE	Hématoxyline Eosine
IP	Iodure de Propidium
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LCS	Liquide Cérébro-Spinal
L/D	Live/Dead®
LDH	Lactate Déshydrogénase
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
LMP	<i>Lysosomal Membrane Permeabilisation</i>
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MFM	Microscopie à Force Magnétique
MGMT	MéthylGuanine MéthylTransférase
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
MTS tétrazolium)	(3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NHS	N-hydroxysuccinamide
NSC	<i>Neural Stem Cells</i>
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>
NP	NanoParticules
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	<i>Phosphate Buffered Serum</i>
PEG	Poly-Ethylène Glycol
PFA	ParaFormaldéhyde
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle
PPMS	<i>Physical Property Measurement System</i>
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
PTA	Plateforme Technologique Amont
RF	RadioFréquence
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>

Liste des abréviations

RKKY	Ruderman-Kittel-Kasuya-Yoshida
SAF	<i>Synthetic AntiFerromagnet</i>
SAM	<i>Self-Assembled Monolayer</i>
SAR	<i>Specific Absorption Rate</i>
SI	Système International
SNC	Système Nerveux Central
SPION	<i>SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles</i>
SVF	Sérum de Veau Fétal
SyMMES	Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé
TdT	Terminal Désoxynucléotidyl Transférase
TE	Temps d'Echo
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
TEMMP	Traitement par Effet Magnéto-Mécanique de Particules
TMAH	Tétra-Méthyl-Ammonium Hydroxyde
TR	Temps de Répétition
TTF	<i>Tumor Treating Field</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling</i>
Tx100	Triton x100
UV	Ultra-Violet
VSM	<i>Vibrating Sample Magnetometer</i>
WST-1	(4-[3-4-iodophényl]-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tétrazolio]-1,3-benzène disulfonate)
WST-8 tétrazolium)	(2-(2-méthoxy-4-nitrophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfophényl)-2H-

Chapitre 1

Introduction générale

I. Cerveau et cancer

I.1. Généralités sur le cancer

Le cancer est défini comme un ensemble de maladies caractérisées par une prolifération anormale et incontrôlée de cellules pouvant envahir d'autres organes de l'organisme. D'après l'organisation mondiale de la santé, le cancer est la deuxième cause de décès dans le monde derrière les maladies cardiovasculaires, et a fait 8,8 millions de morts en 2015. En France, le nombre de nouveaux cas de cancers en 2018 est estimé à 382 000 par l'Institut National du Cancer avec 157 400 décès. Les cancers les plus fréquents sont le cancer de la prostate, du sein, du poumon et du côlon-rectum (Defossez et al. 2019).

I.1.1. Les facteurs de risque

Les causes du cancer sont multiples et peuvent être aggravées par certains facteurs.

Les facteurs externes sont liés à l'environnement ou au mode de vie et peuvent être éliminés ou limités. Une exposition prolongée aux rayonnements ultra-violet (UV) peut, par exemple, être responsable de cancers de la peau (Stenehjem et al. 2017). Des virus et bactéries peuvent aussi être la cause de cancers. C'est le cas du papillomavirus responsable du cancer du col de l'utérus, du virus de l'hépatite B qui peut être relié au cancer du foie ou encore de la bactérie *Helicobacter pylori* qui peut causer un cancer de l'estomac. La pollution industrielle est un facteur aggravant, notamment pour les populations habitant au voisinage de certaines industries. Une corrélation possible entre la proximité d'une zone industrielle et des cancers de l'enfant, des cancers du poumon et des cancers de l'ovaire, par exemple, a été démontrée (Park et al. 2017; C. K. Lin et al. 2017; García-Pérez et al. 2015). L'utilisation de pesticides est aussi un facteur de risque. L'exposition aux pesticides pendant l'épandage mais aussi pendant la récolte augmente le risque de cancers de la prostate, de la vessie et de la thyroïde, par exemple (Lemarchand et al. 2016; Koutros et al. 2016; Zeng et al. 2017). Une corrélation entre une exposition domestique aux pesticides et insecticides et les tumeurs du cerveau chez l'enfant a aussi été établie (Van Maele-Fabry, Gamet-Payraastre, and Lison 2017) ainsi qu'entre l'exposition aux pesticides pendant la période prénatale et l'incidence des cancers de l'enfant (Vinson et al. 2011). Les rayonnements ionisants tels que les rayons X sont également déjà bien connus comme facteurs de risque (Smoll et al. 2016). L'exposition aux ondes électromagnétiques issues des téléphones mobiles a été considérée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme un facteur cancérigène possible après une

utilisation intensive et prolongée (Guha et al. 2011; Morgan et al. 2015) Une étude *in-vivo* montre également une corrélation possible entre l'exposition à des radiations radio-fréquence et l'apparition de tumeurs (Wyde et al. 2018).

Concernant le mode de vie, le tabagisme est le premier facteur de risque pour le cancer du poumon (avec un risque multiplié par 10 à 15) et du cancer de la vessie, mais augmente aussi la fréquence de nombreux autres cancers. L'alcoolisme augmente le risque de cancers buccaux du pharynx, de l'œsophage, de larynx et du foie mais aussi du cancer colorectal, du pancréas et du sein. La sédentarité, le manque d'activité physique et une mauvais régime alimentaire sont des facteurs aggravants de plusieurs types de cancer dont le cancer colorectal et le cancer du sein (Kerr, Anderson, and Lippman 2017). Notamment, un régime alimentaire avec un index glycémique élevé (critère basé sur l'augmentation de la glycémie) augmente le risque de cancer colorectal alors qu'un régime alimentaire à charge glycémique élevée (prenant en compte la quantité de glucides par portion) augmente le risque de cancer du sein et de l'endomètre (Sieri and Krogh 2017).

Des facteurs internes, et donc non modifiables, sont aussi des facteurs de risque comme l'âge et la prédisposition génétique. En effet, bien que les cancers puissent apparaître à tout âge, ils sont plus fréquents pour les personnes âgées de plus de 60 ans. Ce phénomène s'explique par l'accumulation des agressions extérieures subies par les cellules et par un système de réparation de l'ADN moins performant. Une prédisposition génétique apparaît lorsqu'une mutation génétique est présente dans une cellule germinale, c'est-à-dire un spermatozoïde ou un ovocyte. La mutation a donc une chance sur deux d'être transmise à la descendance. Les gènes BRCA1 et BRCA2 sont notamment impliqués dans la prédisposition génétique du cancer du sein (Romagnolo, Romagnolo, and Selmin 2014; Rousset-Jablonski and Gompel 2017).

I.1.2. Capacités caractéristiques des cellules cancéreuses

La formation d'une tumeur maligne résulte de la prolifération anormale de cellules cancéreuses. La transformation d'une cellule saine en une cellule cancéreuse passe par de multiples dérèglements. En effet, les cellules comportent un grand nombre de systèmes de régulations qui permettent d'éliminer les cellules défectueuses pour le bon fonctionnement de l'organe ou du tissu. La cellule cancéreuse résulte d'une accumulation d'altérations qui lui permet d'échapper aux systèmes de régulation. Les capacités cellulaires caractéristiques, appelées *hallmarks*, que l'on retrouve dans quasiment tous les cancers ont d'abord été définies en 2000 par Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg puis complétées en 2011 (Hanahan and Weinberg 2000, 2011) (Figure 1).

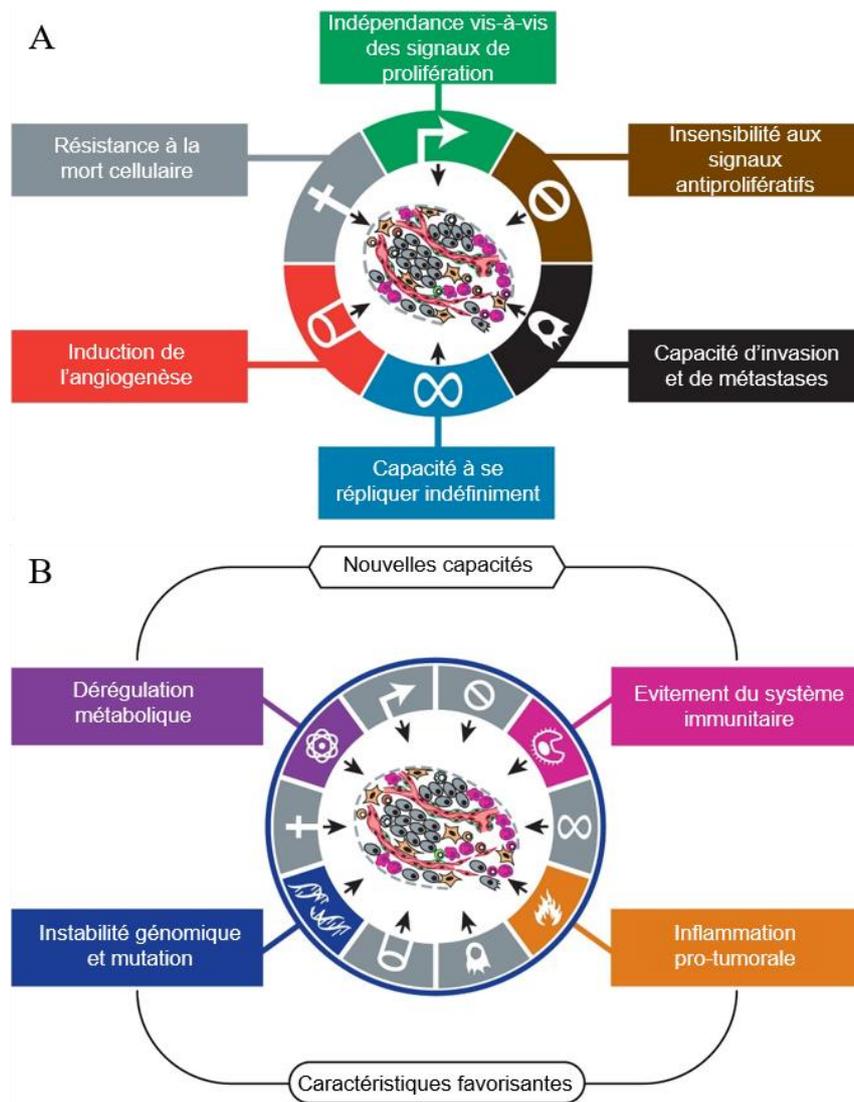


Figure 1 : Schémas adaptés de (Hanahan and Weinberg 2011) présentant A/ les 6 capacités caractéristiques définies en 2000 et B/ complétées en 2011.

La Figure 1A présente les six premières capacités définies en 2000 et détaillées ci-après que sont l'indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération et des signaux antiprolifératifs, la résistance à la mort cellulaire, la perte de la sénescence, la capacité d'induire l'angiogenèse, et la capacité d'invasion tissulaire et de métastase (Hanahan and Weinberg 2000).

➡ Dans un tissu, le nombre de cellules est régulé par des **signaux de prolifération** qui vont enclencher le cycle cellulaire (phases de croissance de la cellule) et maintenir un équilibre. Cette capacité d'un tissu à maintenir son équilibre en s'autorégulant s'appelle l'homéostasie. Contrairement à une cellule saine, une cellule cancéreuse est indépendante vis-à-vis des signaux de prolifération provenant de son environnement.

⊘ L'homéostasie des tissus est aussi maintenue par des **signaux antiprolifératifs** qui forcent, lorsque cela est nécessaire, une cellule proliférative à retourner à l'état de quiescence (c'est-à-dire à

sortir de son cycle cellulaire) ou à renoncer de façon permanente à son potentiel prolifératif. Les cellules cancéreuses ignorent ces signaux de prolifération.

 La régulation des cellules se fait par le **déclenchement de l'apoptose**, qui est une mort programmée de la cellule. Lorsque cela est nécessaire, les cellules enclenchent une cascade de mécanismes qui va aboutir à leur destruction tout en permettant à l'organisme d'éliminer les déchets résultants. La plupart des cellules cancéreuses sont insensibles aux signaux de déclenchement de l'apoptose envoyés par l'environnement.

 Après avoir effectué un certain nombre de cycles cellulaires, les cellules subissent un phénomène de sénescence qui correspond à une dégradation progressive des fonctions de la cellule et un arrêt de la prolifération. Certaines cellules cancéreuses perdent la sénescence et ont ainsi la **capacité de proliférer de façon illimitée**.

 Chez l'adulte, le **phénomène d'angiogenèse** qui consiste en la formation de nouveaux vaisseaux sanguins n'a lieu que de façon temporaire, suite à une cicatrisation ou pendant une grossesse par exemple. Dans le cas d'un cancer, l'angiogenèse a lieu de façon quasi-continue, aidant ainsi la progression de la tumeur en lui apportant les nutriments et l'oxygène nécessaires à sa croissance anormale.

 Les interactions entre les cellules cancéreuses et leur environnement peuvent évoluer pour permettre aux cellules cancéreuses de se détacher et de migrer vers d'autres parties du corps. Cette **capacité d'invasion tissulaire et de diffusion métastatique** est la cause majeure de la mortalité des cancers.

En 2011, deux nouvelles capacités sont ajoutées : la capacité de modifier le métabolisme cellulaire et d'éviter la détection par le système immunitaire (Hanahan and Weinberg 2011) (Figure 1B).

 En conditions normales, les cellules transforment le glucose en pyruvate par un phénomène de glycolyse. Le pyruvate est ensuite transporté vers les mitochondries et entre en jeu dans le cycle de Krebs pour la respiration cellulaire, *i.e.* pour produire l'énergie nécessaire à la cellule. En cas de manque d'oxygène, la glycolyse est favorisée et seulement une faible quantité de pyruvate est envoyée dans les mitochondries. Les cellules cancéreuses ont la capacité de modifier leur métabolisme cellulaire en favorisant la glycolyse, quelle que soit la teneur en oxygène. Bien que le rendement énergétique soit nettement inférieur par glycolyse que par le cycle de Krebs, ce mécanisme permettrait aux cellules cancéreuses de produire plus d'espèces intermédiaires nécessaires à l'assemblage de nouvelles cellules. La mise en évidence de cette **dérégulation métabolique** par Otto Heinrich Warburg et récompensée par un prix Nobel en 1931 est très importante, car elle permet de comprendre les processus cancéreux et constitue une source de cibles thérapeutiques nouvelles.

 Le système immunitaire permet la détection des cellules anormales et peut intervenir pour les éliminer. Les cellules cancéreuses ont la capacité **d'éviter ou de limiter la détection par le système immunitaire ou son intervention**, ce qui leur permet de survivre. Il faut citer en particulier l'expression par certaines cellules tumorales de protéines (CTLA-4 et PD-L1, notamment) qui s'opposent à l'activation du système immunitaire. Cette découverte, récompensée par un prix Nobel en 2018, a permis des avancées thérapeutiques majeures par l'utilisation d'anticorps inhibant ces voies d'échappement au système immunitaire (Ferris et al. 2016; Joshi, Maron, and Catenacci 2018).

En plus des nouvelles capacités spécifiques, deux caractéristiques facilitant l'acquisition des propriétés nécessaires à la transformation d'une cellule saine en une cellule tumorale sont énoncées :

 **L'instabilité du génome** qui provoque de nombreuses mutations aléatoires. Le système de maintenance du génome permet de détecter et « réparer » la plupart des défauts de réplication de l'ADN. Les cellules cancéreuses montrent un taux de mutation plus élevé que la normale rendu possible par une sensibilité accrue aux agents mutagènes et une défaillance du système de maintenance du génome.

 **L'inflammation pro-tumorale.** La réaction d'inflammation déclenchée par le système immunitaire pour tenter d'éliminer les cellules cancéreuses peut en fait favoriser la progression de la tumeur. En effet, l'inflammation peut faciliter l'apparition des capacités caractéristiques en fournissant un grand nombre de biomolécules actives dans le microenvironnement tumoral. De plus, les cellules inflammatoires peuvent relarguer des molécules potentiellement mutagènes pour les cellules avoisinantes.

Tous ces mécanismes ne sont pas présents dans chacun des cancers, mais quelques-unes de ces capacités caractéristiques suffisent à induire un cancer. La chronologie d'apparition de ces mécanismes n'est pas la même pour tous les cancers.

I.2. Le glioblastome

Dans notre étude, nous nous intéressons à un type de cancer : le glioblastome. Il s'agit d'une tumeur du cerveau particulièrement agressive qui atteint environ 4000 patients par an en France. Pour mieux comprendre l'environnement dans lequel évolue une tumeur du cerveau, une brève description du fonctionnement du cerveau et des cellules impliquées est présentée ci-après.

I.2.1. Le cerveau

Le système nerveux central (SNC) est composé de l'encéphale et de la moelle épinière. L'encéphale correspond à toutes les entités présentes dans la boîte crânienne. On y trouve le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral. Le cerveau contrôle les actions de l'organisme en réponse aux signaux sensoriels qu'il reçoit. Il est responsable des sensations perçues, des mouvements de notre corps, de la mémorisation et joue aussi un rôle dans la régulation hormonale. Le cervelet entre en jeu dans les fonctions motrices avec notamment l'équilibre, la posture et le tonus musculaire mais aussi dans la régulation des émotions et l'apprentissage. Le tronc cérébral, situé dans le prolongement de la moelle épinière joue un rôle majeur puisqu'il régule les fonctions vitales de l'organisme (rythme cardiaque et respiration, notamment).

Le cerveau est composé de deux hémisphères, eux-mêmes séparés en plusieurs lobes régulant des fonctions différentes. La matière grise est située en périphérie du cerveau et abrite les cellules nerveuses (neurones) et les cellules gliales. La matière blanche située au centre du cerveau comporte les fibres nerveuses, ce qui correspond aux axones myélinisés des neurones.

Les cellules du Système Nerveux Central

Plusieurs types de cellules composent le SNC. Les plus connues sont les neurones mais d'autres types de cellules sont nécessaires pour assurer le bon fonctionnement des neurones (Figure 2).

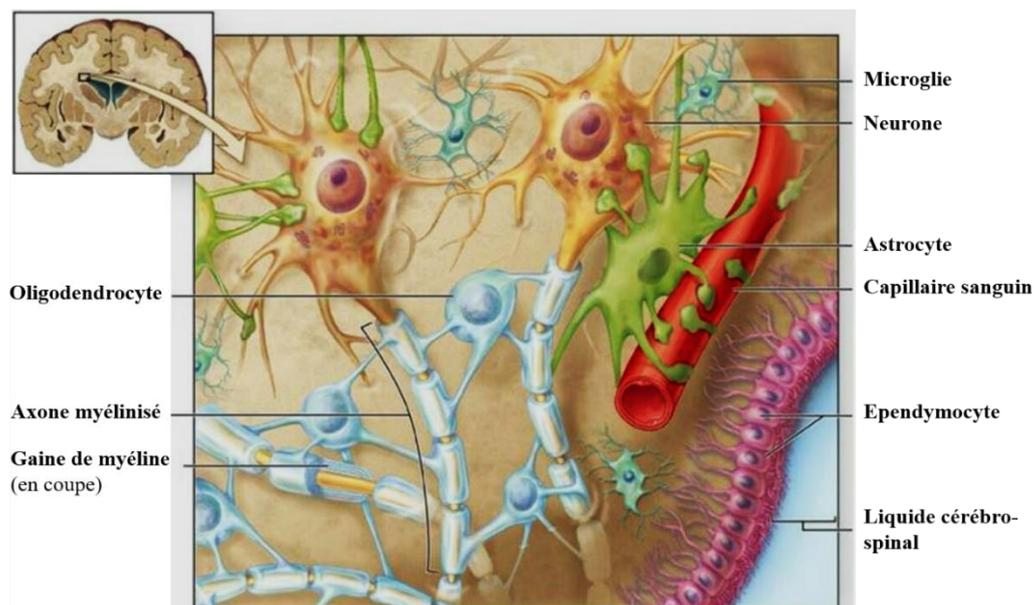


Figure 2 : Schéma présentant les différents types de cellules au sein du système nerveux central. Image extraite de (Roy 2013)

Les neurones sont les cellules qui peuvent recevoir et transmettre des messages nerveux. Ils sont au nombre de 86 milliards dans le cerveau. Un neurone est composé de son corps, de multiples dendrites en étoile et d'un axone qui est plus long que les dendrites. L'information est codée et transmise par voie électrique au travers d'un potentiel d'action, propagé le long de l'axone. La transmission de l'information entre deux neurones se fait au niveau des synapses par voie chimique par l'intermédiaire de neurotransmetteurs.

Les cellules gliales sont présentes au voisinage des neurones et permettent leur bon fonctionnement :

- Les astrocytes sont des cellules de forme étoilée qui assurent le maintien des structures cérébrales. Elles jouent un rôle dans la communication neuronale, participent à la barrière hémato-encéphalique (détaillée ci-après) et à l'astroglie (phénomène de cicatrisation et de réaction immunitaire). Ce sont ces cellules qui prolifèrent anormalement dans le cas du glioblastome.
- Les oligodendrocytes sont responsables de la formation des gaines de myéline entourant les axones permettant une circulation plus rapide du potentiel d'action.
- Les épendymocytes sont les cellules épithéliales formant les parois entre les différentes cavités. Elles produisent le liquide cérébro-spinal (LCS). Le LCS protège le cerveau contre les chocs et permet la circulation des diverses molécules présentes dans le cerveau.
- La microglie correspond aux macrophages du SNC et constitue donc sa principale défense immunitaire. Les macrophages sont des cellules capables de phagocyter (absorber et digérer) d'autres cellules ou corps étrangers détectés comme potentiellement dangereux pour l'organisme. Les cellules microgliales sont de forme étoilée, petites et mobiles.

L'endothélium vasculaire correspond aux cellules endothéliales formant les parois des vaisseaux sanguins. Dans le cerveau, les cellules endothéliales sont reliées entre elles par des jonctions serrées et forment ainsi la barrière hémato-encéphalique. Cette barrière protège le cerveau des agents pathogènes, des toxines et des hormones présentes dans le sang, qui pourraient grandement perturber son fonctionnement. Seules de toutes petites molécules nécessaires au cerveau comme l'oxygène et des aliments (glycérine et urée) sont capables de franchir la barrière. L'inconvénient de cette protection est que la plupart des médicaments sont eux aussi stoppés.

Contrairement aux dogmes initiaux, des cellules souches neurales ont aussi été décrites dans le cerveau. Ces cellules, très actives pendant l'embryogénèse, assurent également un renouvellement lent des astrocytes, des neurones et des oligodendrocytes chez l'adulte.

Les gliomes

Les gliomes sont des tumeurs cérébrales. Ils peuvent se développer à partir des différents types de cellules du SNC. Le pronostic est très variable selon la taille, la localisation et l'infiltration de la tumeur. Le glioblastome, aussi appelé astrocytome de grade 4, se développe à partir des cellules astrocytaires.

TABEAU 1		Classification OMS 2016 des tumeurs gliales
En italique: entité provisoire.		
Grades	Tumeurs diffuses astrocytaires et oligodendrogiales	
II	Astrocytome diffus, <i>IDH</i> -muté Astrocytome gémistocytique, <i>IDH</i> -muté	
<i>II</i>	<i>Astrocytome diffus, IDH-non muté</i>	
II	Astrocytome diffus, NOS	
III	Astrocytome anaplasique, <i>IDH</i> -muté	
<i>III</i>	<i>Astrocytome anaplasique, IDH-non muté</i>	
III	Astrocytome anaplasique, NOS	
IV	Glioblastome, <i>IDH</i> -non muté Glioblastome à cellules géantes Gliosarcome <i>Glioblastome épithélioïde</i>	
IV	Glioblastome, <i>IDH</i> -muté	
IV	Glioblastome, NOS	
IV	Gliome diffus de la ligne médiane, H3 K27M-muté	
II	Oligodendrogliome, <i>IDH</i> -muté et codélétion 1p-19q	
II	Oligodendrogliome, NOS	
III	Oligodendrogliome anaplasique, <i>IDH</i> -muté et codélétion 1p-19q	
<i>III</i>	<i>Oligodendrogliome anaplasique, NOS</i>	
<i>II</i>	<i>Oligoastrocytome, NOS</i>	
<i>III</i>	<i>Oligoastrocytome anaplasique, NOS</i>	
Autres tumeurs astrocytaires		
I	Astrocytome pilocytique Astrocytome pilomyxoïde	
I	Astrocytome subépendymaire à cellules géantes	
II	Xanthoastrocytome pléomorphe	
III	Xanthoastrocytome pléomorphe anaplasique	
Tumeurs épendymaires		
I	Subépendymome	
I	Ependymome myxopapillaire	
I	Ependymome Ependymome papillaire Ependymome à cellules claires Ependymome tanacytique	
II ou III	Ependymome, <i>RELA</i> fusion-positif	
III	Ependymome anaplasique	
Autres gliomes		
II	Gliome chordoïde du 3 ^e ventricule	
I	Gliome angiocentrique	
-	Astroblastome	

Figure 3 : Tableau de classification des tumeurs gliales, extrait de (Brouland and Hottinger 2017).

Les tumeurs cérébrales primitives sont maintenant classées par une classification qui associe des marqueurs histologiques et moléculaires (Brouland and Hottinger 2017; Van Den Bent et al. 2017). La détection de certaines mutations (*IDH1* et *IDH2*, méthylation du promoteur *MGMT*, par exemple) apporte des marqueurs moléculaires qui permettent d'affiner le diagnostic et l'évaluation pronostique et

d'orienter les voies thérapeutiques. La nouvelle classification des tumeurs gliales définie en 2016 par l'OMS est présentée en Figure 3. Ces tumeurs sont classées en gliomes de grades progressifs, impliquant une oncogénèse multi-étapes, de l'astrocytome de bas grade jusqu'au glioblastome de grade 4. Le glioblastome peut aussi survenir directement, en particulier chez le sujet âgé. Il se caractérise notamment par sa capacité à éviter sa destruction par le système immunitaire, une prolifération augmentée, une angiogénèse, un caractère invasif ou encore des nécroses hypoxiques (Nørøxe, Poulsen, and Lassen 2016). Une origine probable du glioblastome réside au niveau des cellules souches neurales (Goffart, Kroonen, and Rogister 2013).

I.2.2. Pronostic et traitement actuel du glioblastome

Le glioblastome est un cancer avec un mauvais pronostic. Malgré les recherches et le développement de nouvelles thérapies la médiane de survie reste entre 12 et 15 mois (Furnari et al. 2007; Messaoudi, Clavreul, and Lagarce 2015).

Le traitement actuel repose sur une combinaison de chirurgie, de radiothérapie et de chimiothérapie (Stupp et al. 2005; Alifieris and Trafalis 2015). Cette thérapie très lourde provoque de nombreux effets secondaires (nausées, vomissements, éruptions cutanées, fatigue, troubles sexuels, perte des cheveux, etc.) chez les patients, pour un résultat malheureusement insuffisant.

La chirurgie consiste en une exérèse de la tumeur. Cependant, il est très difficile d'enlever toutes les cellules cancéreuses du fait de la grande capacité d'infiltration de ces cellules, illustrée en Figure 4C. De plus, la résection tumorale est parfois accusée de favoriser la transformation de la zone péri-tumorale en environnement pro-tumoral (Hamard et al. 2016; van der Sanden et al. 2016). Suite à la chirurgie, une phase de radiothérapie est entamée. L'objectif est d'irradier les cellules cancéreuses pour les détruire. En complément de la radiothérapie, du témozolomide est administré en tant que chimiothérapie. Son principe d'action consiste à endommager l'ADN en ajoutant un groupement méthyle, ce qui va causer la mort des cellules. Les effets de la chimiothérapie sont malheureusement limités par un phénotype résistant des cellules cancéreuses (Messaoudi, Clavreul, and Lagarce 2015; Alifieris and Trafalis 2015).

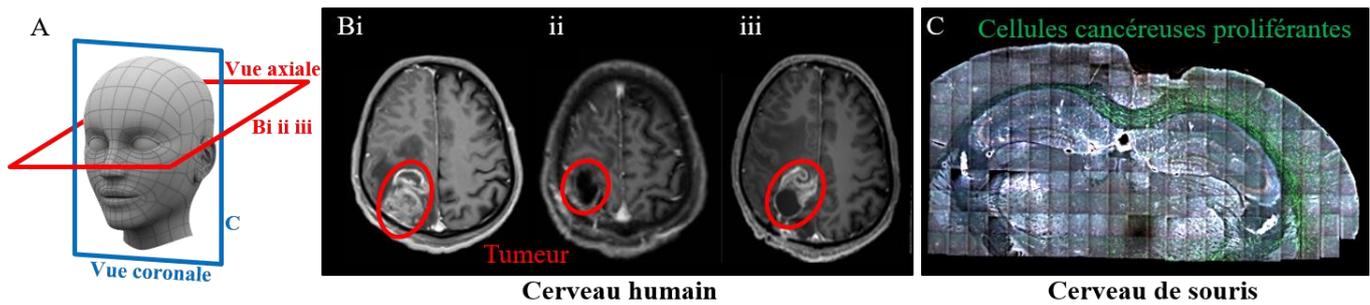


Figure 4 : A/ Plans de coupe correspondant à B/ des acquisitions IRM d'un cerveau humain en vue axiale i/ présentant une tumeur, ii/ après exérèse et iii/ en récurrence ; C/ coupe d'un cerveau de souris en vue coronale montrant des cellules cancéreuses marquées en vert, qui envahissent les tissus.

Malgré les traitements lourds actuellement mis en œuvre, une récurrence apparaît dans quasiment tous les cas dans la zone périphérique à la tumeur (Tosoni et al. 2016). Un exemple de récurrence dans la zone péri-tumorale suite à une exérèse est présenté en Figure 4B/ i à iii.

I.2.3. Emergence de nouveaux traitements

Pour augmenter les chances de survie, des thérapies personnalisées se développent. Le but est d'utiliser les anomalies moléculaires du glioblastome propres à chaque patient pour mettre en place des thérapies ciblées personnalisées. Le bénéfice de cette méthode est cependant freiné par l'hétérogénéité présente au sein d'une même tumeur (Chow et al. 2018). Le Bévacicumab, un anti-angiogénique, est le premier anticorps autorisé dans la thérapie des glioblastomes. L'utilisation du Bévacicumab reste controversée car la diminution de la vascularisation de la tumeur pourrait pousser les cellules à adopter un comportement plus invasif et ainsi aggraver chez certains patients la pathologie tumorale (Burger et al. 2017). De nombreuses améliorations restent nécessaires pour augmenter l'efficacité des thérapies ciblées (Jain 2018).

Parmi les nouveaux traitements émergents, l'immunothérapie qui vise à stimuler les défenses immunitaires de l'organisme semble être une piste prometteuse (Polivka et al. 2017). Cependant, cette technique n'a pas encore pu faire ses preuves dans le traitement du glioblastome (Filley, Henriquez, and Dey 2017). L'hétérogénéité tumorale et l'échappement moléculaire quand une voie moléculaire unique est ciblée sont des facteurs déterminants de cet échec (Jain 2018). L'absence d'accès au secteur infiltratif péri-tumoral est aussi une explication majeure de la récurrence tumorale (Lynes et al. 2018).

À côté des thérapies moléculaires ciblées actuellement en échec, des thérapies « physiques » sont apparues. Dans un essai clinique de phase III, la stimulation électrique à haute fréquence (thérapie TTF

pour *tumor treating fields*) a ainsi montré son efficacité, en augmentant la survie des patients traités par TTF en combinaison à du témozolomide comparé à un traitement au témozolomide seul (Stupp et al. 2017; P. Zhu and Zhu 2017). La thérapie TTF consiste à appliquer un courant alternatif de faible intensité à haute fréquence (200 kHz) dans le but de perturber et prolonger la division cellulaire pour provoquer l'apoptose des cellules cancéreuses (Burri et al. 2018). Il cible spécifiquement les cellules cancéreuses en tirant profit de leur division rapide, de leur forme et de leur polarité électrique. L'application du courant se fait de manière locale avec un casque, évitant ainsi d'affecter les cellules se divisant rapidement dans d'autres parties du corps. Au niveau du cerveau, la plupart des cellules se divisent lentement chez l'adulte, réduisant le risque que le TTF interfère avec les cellules saines (Saria and Kesari 2016).

Cette thérapie ouvre de nouvelles voies de modulation non médicamenteuses, que nous explorons dans cette thèse avec le Traitement par Effet Magnéto-Mécanique de Particules (TEMMP). L'idée est d'appliquer un stress mécanique sur les cellules cancéreuses à l'aide de particules magnétiques mises en vibration grâce à un champ magnétique rotatif.

II. Particules magnétiques pour la médecine

Avant de présenter plus spécifiquement les particules magnétiques utilisées pour le traitement du cancer par stimulation mécanique, nous introduisons plus généralement les applications déjà existantes de nanoparticules magnétiques pour la médecine.

II.1. Notions de magnétisme

Pour aider à la compréhension du lecteur non initié, les notions de magnétisme utilisées dans ce manuscrit sont brièvement expliquées ici (Fruchart 2015). Les notations en gras sont des quantités vectorielles.

Magnétisme et électricité, champ induit par des courants ou aimants

La découverte des interactions entre l'électricité et le magnétisme nous vient du danois Hans Christian Ørsted en 1820. Ces effets sont théorisés notamment dans les équations de Maxwell, permettant les études magnétiques macroscopiques. Le courant I passant par un long fil rectiligne crée une induction magnétique \mathbf{B} , tangente au cercle centré sur le fil, qui correspond à une densité de flux magnétique

(exprimée en Tesla). L'induction \mathbf{B} ainsi générée est proportionnelle au courant I et décroît en $1/r$ en s'éloignant du fil. D'autres sources de champ magnétique sont couramment réalisées sous forme de bobines constituées de fils conducteurs enroulés pour maximiser l'intensité du champ. Par exemple un solénoïde ainsi formé génère sur son axe un champ perpendiculaire au plan des spires, présentant à l'extérieur une décroissance forte en $\sim 1/z^3$, lorsqu'on s'éloigne d'une distance z du bobinage. Cette source de champ s'approche alors du champ généré par un dipôle magnétique, qui présente également une composante en $1/z^3$. Il est donc nécessaire de placer les échantillons au plus près des aimants ou bobines pour appliquer un champ magnétique suffisant.

Pour encore augmenter l'induction magnétique, les fils peuvent être enroulés autour d'un « noyau » constitué de matériaux ferromagnétiques doux, dont la définition sera donnée dans les parties suivantes. Ces dispositifs constituent les électroaimants. Cependant l'inductance de telles bobines limite l'intensité des courants alternatifs pour une fréquence donnée et une puissance d'alimentation donnée, limitant ainsi l'intensité des champs magnétiques alternatifs générés.

Nous verrons plus loin que l'induction magnétique du champ appliqué permet de calculer la force et le couple s'appliquant sur un moment magnétique \mathbf{m} . Les forces et couples magnétiques sont exprimés en fonction du moment \mathbf{m} , et de l'induction \mathbf{B} ou du champ magnétique \mathbf{H} dont la définition sera présentée ci-dessous.

Matériau magnétique

Un échantillon magnétique se caractérise par son aimantation moyenne \mathbf{M} , qui correspond à la densité volumique de moments magnétiques \mathbf{m} , de telle sorte que : $\mathbf{M} = \mathbf{m}/V$, avec V le volume de l'échantillon. En unités du système international (SI), l'aimantation s'exprime en A/m et le moment magnétique s'exprime en A.m². Ils peuvent aussi s'exprimer en utilisant les emu (pour *electromagnetic unit of current*) en unités CGS (centimètre-gramme-seconde). L'aimantation et le moment magnétique traduisent la tendance qu'a un objet magnétique à s'aligner dans le sens du champ magnétique \mathbf{H} (aussi exprimé en A/m). Tous les matériaux possèdent une aimantation lorsqu'un champ magnétique externe est appliqué. Pour de faibles amplitudes de champ appliqué, cette aimantation est proportionnelle au champ, ce qui permet de définir la susceptibilité magnétique χ telle que $\mathbf{M} = \chi\mathbf{H}$. Plus généralement, $\chi(H) = \frac{d\mathbf{M}(H)}{dH}$ est variable selon les mécanismes d'aimantation, les phénomènes d'hystérésis, et le champ appliqué. Lorsque $\chi < 0$, le matériau est diamagnétique. Lorsque $\chi > 0$, le matériau est paramagnétique. Tous les matériaux ont une composante diamagnétique, très peu dépendante de la température, dont la valeur est spécifique au matériau. Seuls certains matériaux, comme les métaux, ont en plus une composante paramagnétique, qui elle, varie en fonction de la température. L'ordre de grandeur de la susceptibilité est, pour la plupart des matériaux, très faible ($10^{-5} - 10^{-3}$). Les matériaux

que nous utiliserons ici sont des matériaux ferromagnétiques (définition expliquée dans les parties suivantes) et présentent ainsi une susceptibilité nettement supérieure ($1 - 10^5$).

Lien entre induction magnétique et champ magnétique

L'induction magnétique \mathbf{B} est reliée au champ magnétique externe \mathbf{H} et à l'aimantation d'un corps magnétique \mathbf{M} , avec la relation $\mathbf{B} = \mu_0(\mathbf{H} + \mathbf{M})$. Dans le vide, $\mathbf{B} = \mu_0\mathbf{H}$. Le champ magnétique \mathbf{H} s'exprime en A/m (ou en Oersted en unités CGS avec la relation $1 \text{ Oe} = 1.10^3/4\pi \text{ A/m}$). L'induction \mathbf{B} s'exprime en Tesla (T) (ou en Gauss en unités CGS avec $1 \text{ G} = 1.10^{-4} \text{ T}$). Ces deux grandeurs s'utilisent selon les phénomènes étudiés. On remarquera que, en unités CGS, $1 \text{ G} = 1 \text{ Oe}$. De même, l'aimantation $\mu_0\mathbf{M}$ ou le champ $\mu_0\mathbf{H}$ peuvent être exprimés en Tesla.

Ordres magnétiques

Dans certains matériaux, les moments magnétiques sont couplés par une interaction d'échange, d'origine quantique, ce qui va entraîner un arrangement des moments magnétiques au niveau microscopique en l'absence de champ appliqué. Les principaux ordres magnétiques sont :

- Le ferromagnétisme, caractérisé par une interaction d'échange positive qui favorise l'alignement parallèle des moments magnétiques. Ce phénomène entraîne une aimantation spontanée, même en l'absence de champ magnétique appliqué. Cet ordre magnétique n'apparaît que sous une température seuil, appelée température de Curie T_C . Les matériaux ferromagnétiques les plus connus sont le fer, le nickel et le cobalt.
- L'antiferromagnétisme, caractérisé par une interaction d'échange négative qui favorise l'alignement antiparallèle des moments magnétiques. L'aimantation résultante est nulle, les moments magnétiques s'annulant les uns avec les autres. La température seuil s'appelle ici température de Néel T_N .
- Le ferrimagnétisme, caractérisé par une interaction d'échange négative entre des moments magnétiques de différentes amplitudes. Les amplitudes différentes sont causées par l'emplacement des électrons non appariés sur des couches différentes. Les moments magnétiques n'étant pas compensés les uns avec les autres, il résulte une aimantation non-nulle. La température seuil est ici la température de Curie T_C .

Cycle d'hystérésis

Les propriétés magnétiques du matériau s'obtiennent notamment par la mesure de l'amplitude des moments magnétiques ou de l'aimantation en fonction du champ appliqué. La courbe obtenue s'appelle un cycle d'hystérésis ou une courbe d'aimantation. Un exemple de cycle d'hystérésis de matériau ferromagnétique est donné en Figure 5.

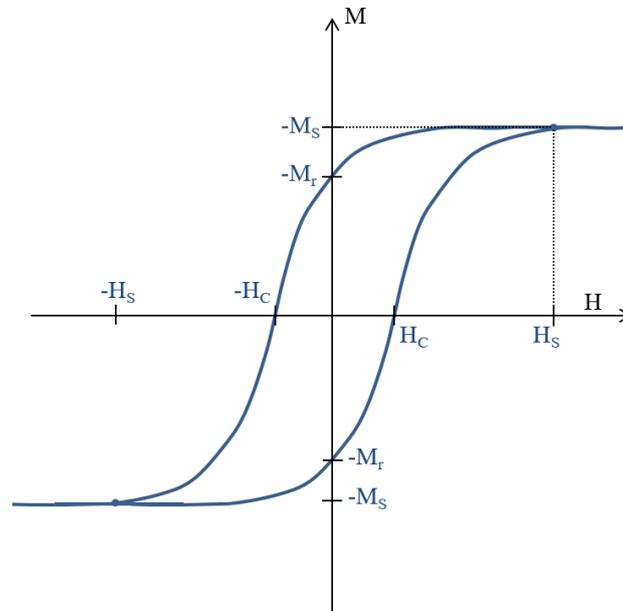


Figure 5 : Cycle d'hystérésis typique d'un matériau ferromagnétique montrant l'aimantation moyenne M en fonction du champ magnétique appliqué H , faisant apparaître l'aimantation à saturation M_S , l'aimantation rémanente M_r , le champ coercitif H_C et le champ de saturation H_S .

Le cycle d'hystérésis permet de connaître certaines grandeurs caractéristiques. L'aimantation à saturation M_S correspond à l'aimantation de l'échantillon une fois que tous ses moments magnétiques sont alignés avec le champ. Usuellement, les cycles d'hystérésis sont normalisés en fonction de M_S . Le champ appliqué nécessaire pour atteindre cette valeur s'appelle le champ de saturation H_S . La rémanence ou aimantation rémanente notée M_r correspond à l'aimantation d'un échantillon lorsque le champ magnétique appliqué est coupé. Il s'agit d'une caractéristique particulièrement intéressante lorsqu'on étudie des particules magnétiques, car sa valeur est à minimiser pour éviter leur agglomération. Elle est souvent exprimée en fonction de M_S . Le champ coercitif ou coercivité noté H_C correspond au champ à appliquer pour que l'aimantation de l'échantillon s'annule. On peut extraire du cycle la susceptibilité χ , déjà présentée précédemment qui correspond aux pentes locales de la courbe.

Le superparamagnétisme

Les particules magnétiques classiquement utilisées dans les applications biologiques sont couramment dans un état superparamagnétique, qui apparaît à température ambiante lorsque les tailles de particules

sont suffisamment réduites (Bean and Livingston 1959). L'intérêt des particules superparamagnétiques est de présenter une courbe d'aimantation linéaire et réversible à l'origine avec une aimantation rémanente nulle, permettant d'éviter les phénomènes d'agglomération, et une forte susceptibilité, dépendante du matériau choisi.

Les particules superparamagnétiques les plus connues sont les nanoparticules d'oxyde de fer (SPIONs pour *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*), dont l'état superparamagnétique est atteint pour des dimensions de l'ordre de 2 à 10 nm. Elles sont éventuellement groupées dans des sphères de polymères formant des billes micrométriques de manière à générer des forces magnétiques plus importantes tout en conservant les propriétés magnétiques des nanoparticules (Hai et al. 2009). Cependant, l'état superparamagnétique peut être atteint pour de nombreux matériaux, avec des diamètres critiques différents. Citons par exemple une étude de notre laboratoire ayant mis en évidence l'état de type superparamagnétique de nanoparticules de permalloy ou de magnétite de diamètre 35 nm et épaisseur quelques nm (Morcrette et al. 2017).

Le principe en est que la taille réduite de la particule impose une configuration d'aimantation uniforme. Au-delà d'une certaine température appelée température de blocage T_B , l'aimantation se retourne spontanément sous l'effet de l'agitation thermique ce qui entraîne une aimantation nulle moyennée dans le temps de mesure. Le temps moyen entre deux retournements d'aimantation, appelé temps de relaxation de Néel τ_N , varie exponentiellement avec le volume de matériau magnétique. L'état superparamagnétique n'est atteint que lorsque τ_N est nettement inférieur au temps d'observation. Pour cette raison, l'état superparamagnétique n'est possible que pour de très faibles volumes, de longueur caractéristique inférieure à 100 nm, typique des nanoparticules utilisées pour la biologie.

Par ailleurs, en dessous de T_B , les moments ne fluctuent pas au cours du temps d'observation. Le régime superparamagnétique n'est donc présent qu'au-delà de la température de blocage T_B .

Les énergies

La mesure du cycle d'hystérésis informe sur l'état de stabilité dans lequel se trouvent les matériaux magnétiques, résultant d'une minimisation de l'énergie magnétique totale. Les différentes énergies entrant en jeu sont :

- L'énergie de Zeeman, dont la densité est $E_Z = -\mu_0 \mathbf{M}_S \mathbf{H}$, avec M_S l'aimantation à saturation, qui favorise l'alignement de l'aimantation \mathbf{M} dans la direction du champ appliqué \mathbf{H} .
- L'énergie d'anisotropie magnétocristalline E_{mc} , qui dans sa forme la plus simple (anisotropie uniaxiale) s'écrit $E_{mc} = KV \sin^2 \theta$, avec θ l'angle entre l'aimantation et la direction dite d'aimantation facile et K la constante d'anisotropie. Cette énergie favorise l'alignement de l'aimantation le long de certains axes ou plans cristallographiques, dépendant de l'organisation

crystalline du matériau. On distingue alors les matériaux magnétiques doux (composés par exemple de Fe, Co, Ni, Mg, Si), possédant une faible E_{mc} des matériaux magnétiques durs caractérisé par une forte E_{mc} , comme par exemple les aciers, les ferrites et l'alliage de néodyme-fer-bore (NdFeB).

- L'énergie d'échange E_{ex} , qui exprime le fort couplage entre moments magnétiques voisins à l'origine du ferromagnétisme, favorisant en particulier les configurations en domaines magnétiques (zones d'aimantation uniforme). Elle caractérise cette interaction locale entre les moments magnétiques voisins, par : $E_{ex} = -J\mathbf{m}_i \cdot \mathbf{m}_j$, avec \mathbf{m}_i et \mathbf{m}_j les moments magnétiques de spin localisés aux positions voisines i et j , et J exprimant un facteur d'intégrale d'échange, tel que $J > 0$ favorise des moments parallèles (alignement ferromagnétique) et $J < 0$ favorise des moments antiparallèles (alignement antiferromagnétique).
- L'énergie magnétostatique ou énergie dipolaire E_d , qui trouve son origine dans la somme des énergies d'interaction mutuelle entre les dipôles magnétiques d'un échantillon. Elle s'exprime à l'aide du champ dipolaire \mathbf{H}_d créé par l'ensemble des dipôles élémentaires de l'échantillon en lui-même. Toujours positive, elle est minimale en particulier si \mathbf{H}_d tend vers 0. Ce champ \mathbf{H}_d est aussi appelé champ démagnétisant à l'intérieur de l'échantillon et champ de fuite à l'extérieur. Agissant à longue portée (à l'échelle macroscopique de l'échantillon) sur les dipôles de l'échantillon, le champ \mathbf{H}_d est généré par les charges magnétiques volumiques ou surfaciques, déterminées par la répartition de l'aimantation \mathbf{M} dans l'échantillon. L'énergie magnétostatique favorise une configuration de \mathbf{M} minimisant charges magnétiques et champ démagnétisant généré. Notamment, une aimantation uniforme ou à divergence nulle (charge volumique nulle), et/ou une aimantation parallèle à la surface délimitant l'échantillon (charge surfacique nulle), sont favorisées. Pour minimiser l'énergie magnétostatique, l'aimantation a donc tendance à être parallèle aux bords de l'échantillon. L'énergie magnétostatique induit ainsi une anisotropie de forme. En particulier, un fil aura tendance à présenter une aimantation longitudinale, alors qu'un film mince aura tendance à présenter une aimantation planaire.

Force et couple magnétique

L'application d'un champ magnétique sur un moment magnétique a des effets mécaniques et thermiques, qui dépendent à la fois des conditions d'application du champ et des propriétés propres de l'élément magnétique considéré.

Lorsqu'un moment magnétique \mathbf{m} est soumis à l'induction uniforme \mathbf{B} , il subit un couple $\boldsymbol{\tau} = \mathbf{m} \times \mathbf{B}$, qui tend à aligner le moment dans la direction du champ appliqué. Si un champ magnétique rotatif est appliqué dans le cas où il n'y a pas d'anisotropie de forme (particule sphérique) ni d'anisotropie magnétocristalline (matériau doux), le moment magnétique tournera sans entrainer la particule. Dans le

cas contraire c'est le couplage entre le moment magnétique et l'orientation de la particule qui détermine le couple mécanique.

Lorsque l'induction n'est pas uniforme dans l'espace, un gradient $\nabla \mathbf{B}$ apparaît. Il est exprimé en T/m et va entraîner l'attraction des corps magnétiques vers la zone d'induction la plus élevée, avec une force \mathbf{F} donnée par $\mathbf{F} = m\nabla \mathbf{B}$.

Chauffages par pertes hyperfréquences

Le retournement de l'aimantation d'une particule magnétique donne lieu à une dissipation d'énergie. Ce phénomène est notamment utilisé pour l'hyperthermie magnétique où des particules superparamagnétiques sont soumises à des champs magnétiques de 100 kHz à plusieurs GHz (hyperfréquence). La quantité de chaleur délivrée correspond à l'aire A du cycle d'hystérésis dans le champ magnétique alternatif appliqué (Carrey, Mehdaoui, and Respaud 2011). La puissance absorbée par les particules est nommée SAR (*Specific Absorption Rate*) et dépend de la fréquence f : $SAR = A \times f$. Elle s'exprime en W/g.

Les domaines magnétiques

Pour expliquer le fait que des blocs composés de matériaux ferromagnétiques ont une rémanence nulle, Pierre Weiss émet l'hypothèse en 1907 que les blocs sont divisés en plusieurs domaines dans lesquels les moments magnétiques sont orientés dans la même direction (Weiss 1907). La présence de plusieurs domaines, orientés antiparallèlement les uns avec les autres, entraîne alors une aimantation moyenne nulle.

Les frontières entre ces domaines sont nommées parois de domaine. Deux modèles permettent de définir la transition d'une direction des moments magnétiques à la direction opposée. Dans le modèle de Bloch, les moments magnétiques restent dans le plan de la paroi. Cette configuration évite la création d'un champ dipolaire. Dans le modèle de Néel, la rotation des moments magnétiques se fait perpendiculairement à la paroi. Cette configuration s'applique particulièrement aux couches minces.

II.2. Utilisation de nanoparticules magnétiques pour la médecine

Les particules magnétiques possèdent des caractéristiques très intéressantes pour des applications biomédicales (Pankhurst et al. 2003; Y. Cheng et al. 2014). Leurs dimensions peuvent être contrôlées pour interagir avec des entités biologiques telles que les cellules, les virus, les protéines et l'ADN. Leur

petite taille leur confère un large ratio surface/volume qui peut être utilisé pour le greffage d'un grand nombre de molécules sur leur surface. Les matériaux choisis, et notamment leurs propriétés magnétiques permettent de les actionner à distance. Elles peuvent être attirées vers une zone d'intérêt, mises en vibration, ou utilisées pour créer un échauffement.

Les nanoparticules magnétiques sont utilisées comme agent de contraste pour l'IRM, pour la médecine régénérative (Gao et al. 2015), pour le tri cellulaire, l'ingénierie tissulaire, la purification des protéines (Corchero and Villaverde 2009), l'hyperthermie (Sanchez et al. 2014; Kafrouni and Savadogo 2016) ou encore la magnétofection (Mohammed et al. 2017; Scherer et al. 2002). La magnétofection (pour magnéto-transfection) utilise des nanoparticules magnétiques chargées en acides nucléiques qui sont attirées vers les cellules cibles par un gradient de champ. Quelques exemples d'utilisation sont détaillés ci-après.

Agents de contraste pour l'Imagerie par Résonance Magnétique

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est basée sur la détection du phénomène de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) des protons de l'eau contenus dans l'organisme. Un champ magnétique statique est appliqué et entraîne l'alignement des moments magnétiques des protons, parallèlement ou antiparallèlement à la direction du champ. L'aimantation des tissus se fait par un mouvement de précession à une fréquence donnée, nommée fréquence de Larmor. Un champ radiofréquence (RF) de faible amplitude est alors appliqué à la fréquence de Larmor pour faire entrer les moments magnétiques en résonance. Lorsque le champ est coupé, le système retourne à l'équilibre par un phénomène de relaxation. Il se caractérise par deux temps de relaxation caractéristiques. Le temps de relaxation longitudinale T_1 correspond au temps nécessaire pour que l'aimantation longitudinale (parallèle au champ statique appliqué) des protons atteigne 63 % de la valeur initiale (valeur pendant l'application du champ). Le temps T_1 dépend de la mobilité des atomes d'hydrogène et est caractéristique d'un tissu. Le temps de relaxation transversale T_2 correspond au temps de retour à une aimantation transversale (perpendiculaire au champ statique) équivalente à 37 % de sa valeur initiale. Le temps T_2 dépend du tissu, mais aussi de l'organisation physico-chimique de l'eau dans ce tissu. Il permet de révéler des modifications liées à une lésion ou un phénomène inflammatoire, par exemple. Différentes séquences sont utilisées pour pondérer les signaux T_1 ou T_2 . De manière générale, un premier *pulse* RF est suivie par un ou plusieurs *pulses* appliqués à des temps différents (temps de répétition TR). L'acquisition du signal est enregistrée par des bobines, après le temps d'écho (TE). L'information spatiale qui permet d'obtenir une image haute résolution est obtenue par l'application de gradients de champ dans les 3 directions de l'espace.

Pour augmenter le contraste de l'image, parfois trop faible pour différencier les tissus ou les zones d'intérêt, des agents de contraste sont utilisés (Tsapis 2017). Les agents de contraste positifs sont utilisés

pour diminuer le temps de relaxation T_1 . L'ion gadolinium (Gd^{3+}), du fait de ses propriétés paramagnétiques est largement utilisé comme agent de contraste positif. En effet, le moment magnétique du Gd^{3+} sous l'application d'un champ magnétique résulte de la présence d'électrons non appariés. Les interactions dipolaires entre le moment magnétique du Gd^{3+} et celui des protons entraînent une diminution du temps de relaxation, améliorant ainsi le contraste lors de l'acquisition de séquences pondérées T_1 en augmentant l'intensité du signal. Le Gd^{3+} étant toxique, il est encapsulé dans une autre molécule : ce complexe forme un chélate de gadolinium. En cancérologie, la vascularisation importante de la tumeur entraîne l'accumulation de l'agent de contraste en son sein, et permet ainsi de révéler la tumeur.

Les agents de contraste négatifs comme les SPIONs sont utilisés pour augmenter le contraste en T_2 . En fonction de leur taille, les SPIONs vont s'accumuler préférentiellement dans certains tissus. Le champ magnétique généré par une particule crée un gradient qui va accélérer le déphasage des moments magnétiques des protons situés à proximité. Ce phénomène va entraîner une diminution du temps de relaxation T_2 . L'intensité du signal va donc diminuer en séquences pondérées T_2 .

Outre les SPIONs déjà très répandus pour cette application, de nouvelles particules possédant une forte aimantation avec une rémanence quasi-nulle sont étudiées comme possible agents de contraste. C'est le cas par exemple de particules couplées antiferromagnétiquement (Roosbroeck et al. 2014). Les SPIONs peuvent aussi être fonctionnalisées pour cibler encore plus spécifiquement une zone d'intérêt (Shevtsov et al. 2014).

Guidage magnétique et délivrance localisée de médicaments par nanoparticules magnétiques

L'intérêt de la délivrance localisée de médicaments est d'augmenter l'effet thérapeutique d'une molécule tout en limitant les effets secondaires. Parmi les multiples vecteurs utilisés pour la délivrance localisée de médicaments comme les liposomes, les micelles ou les nanocapsules, on retrouve aussi des nanoparticules magnétiques, généralement des SPIONs. Les SPIONs peuvent être intégrées dans les vecteurs par différentes méthodes : adsorption ou conjugaison à la surface d'un liposome, encapsulation dans le cœur d'un liposome, dans la membrane d'une microbulle ou dans un gel (Al-Jamal and Kostarelos 2011). Les véhicules sont ensuite attirés vers la tumeur par l'application d'un gradient de champ (Pankhurst et al. 2003). La délivrance du médicament se fait suite à la dégradation du véhicule, provoquée par les changements de pH au sein de la tumeur ou par une élévation de la température causée par l'application d'un champ magnétique à haute fréquence (hyperthermie), par exemple (Lima-Tenório et al. 2015).

Outre les SPIONs, des micro-disques de permalloy sont aussi à l'étude pour la délivrance localisée de médicaments (D. H. Kim et al. 2011). Les médicaments attachés à la surface du disque sont libérés par l'application d'un champ magnétique alternatif qui entraîne une vibration des particules.

Certaines particules utilisées pour la délivrance ciblée de médicaments comportent des caractéristiques semblables aux agents de contraste. Une double utilisation, à la fois pour le diagnostic et pour le traitement, est alors souvent employée. On parle dans ce cas de théranostic, pour une combinaison de thérapie et diagnostic (Golovin et al. 2017).

Traitement par hyperthermie magnétique

L'exemple le plus connu de l'utilisation de nanoparticules magnétiques pour le traitement du cancer est l'hyperthermie magnétique (De Bree, Romanos, and Tsiftsis 2002; Bañobre-López, Teijeiro, and Rivas 2013). L'objectif est dans ce cas d'induire un échauffement des particules. La puissance absorbée par les particules étant proportionnelle à la fréquence, les particules sont soumises à un champ magnétique alternatif à très haute fréquence (>50 kHz) (Hervault and Thanh 2014). L'intérêt pour la médecine d'augmenter la température de tout ou partie du corps humain remonte à plusieurs siècles, avec la thermoablation qui est utilisée pour détruire des cellules cancéreuses en altérant les protéines et autres molécules biologiques (Kaur et al. 2016; Hervault and Thanh 2014).

Pour des températures inférieures à 42°C, le débit sanguin dans la tumeur est augmenté. Cette propriété peut permettre d'augmenter la sensibilité des cellules à la radiothérapie ou à la chimiothérapie (Hildebrandt et al. 2002). Pour des températures supérieures à 42 °C, le débit sanguin diminue ce qui entraîne une moins bonne dissipation de la chaleur et impacte l'apport en oxygène et en nutriments au sein de la tumeur (Song 1984; Hildebrandt et al. 2002). L'hyperthermie appliquée au-delà de 46 °C est nommée thermoablation. Elle entraîne la nécrose des cellules tumorales mais aussi du tissu sain (Okhai and Smith 2013).

Combiné à des techniques de délivrance localisée de médicaments, de guidage magnétique pour cibler la tumeur ou même de diagnostic, l'effet anti-tumoral de l'hyperthermie peut être encore amélioré (Kaur et al. 2016). Cependant, pour générer un champ magnétique assez puissant pour produire l'effet d'hyperthermie, il est nécessaire d'appliquer un courant alternatif élevé sur la bobine entourant le noyau magnétique. Les dispositifs utilisés doivent être compatibles avec des courants très élevés et ont l'inconvénient de générer du champ magnétique fort hors de la zone ciblée. Mais surtout, la génération de champ magnétique suffisamment élevé à haute fréquence dans un volume suffisamment grand pour insérer une partie du corps humain, reste un challenge technique (Dutz and Hergt 2014).

Le traitement par hyperthermie a tout de même débuté en clinique en 2010 à l'hôpital de la Charité – MagForce de Berlin (Spirou et al. 2018). Une étude clinique traitant la récurrence de glioblastome a montré

une augmentation de quelques mois de la médiane de survie des patients avec l'application simultanée de radiothérapie et de l'hyperthermie magnétique (Maier-Hauff et al. 2011). Cependant, le potentiel de cette technique reste limité à cause des problématiques techniques évoquées ci-dessus. Les optimisations de cette technique se focalisent maintenant sur les particules, en produisant des particules avec un moment magnétique plus élevé (Maenosono and Saita 2006; Mehdaoui et al. 2010; Kafrouni and Savadogo 2016).

Cependant, de récentes études viennent remettre en cause l'effet thermique de l'hyperthermie magnétique (Dutz and Hergt 2014). En effet, plusieurs études étudiant l'effet thérapeutique de l'hyperthermie montrent un effet sur la viabilité cellulaire, sans pour autant détecter une élévation de la température à 42°C (Rabin 2002; Villanueva et al. 2010; Sanchez et al. 2014). Depuis, une élévation locale de la température en surface des particules a été observée (Clerc et al. 2018). Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer les effets sur la viabilité cellulaire tout de même observés. Une étude théorique montre par exemple que l'oscillation des particules dans un champ alternatif inhomogène crée des ultrasons (Carrey, Connord, and Respaud 2013). Or, les ultrasons sont de plus en plus utilisés dans le traitement du cancer (Boissenot et al. 2016; Negishi, Endo-Takahashi, and Maruyama 2016). Une deuxième hypothèse est que le stress mécanique sur les cellules provoqué par la vibration ou l'oscillation des particules pourrait perturber le fonctionnement des cellules (Domenech et al. 2013). Ce possible effet mécanique des particules ouvre alors la voie à de nouvelles études, cherchant à maximiser le stress mécanique produit, tel que présenté dans la partie suivante.

II.3. Effet magnéto-mécanique des particules – cancer

Les premières utilisations de nanoparticules magnétiques soumises à des champs alternatifs à faible fréquence pour agir mécaniquement sur les cellules remontent à 2008. Des SPIONs ont notamment été utilisées pour modifier la concentration intracellulaire en calcium de mastocytes (Mannix et al. 2008) ou pour activer le récepteur mécanosensible TREK-1 (Hughes et al. 2008) impliqué entre autres dans la neuroprotection, l'épilepsie et la dépression. L'intérêt des particules magnétiques présentant une anisotropie de forme émerge aussi avec l'utilisation de nanofils de nickel utilisés pour réduire la viabilité de fibroblastes (Fung et al. 2008).

Prenant en considération les effets induits par le mouvement de particules magnétiques à faible fréquence et le possible effet mécanique des particules utilisées pour l'hyperthermie, une nouvelle technique visant à détruire des cellules cancéreuses par les mouvements mécaniques de particules magnétiques émerge en 2010 (D.-H. Kim et al. 2010).

II.3.1. Principe

Contrairement à l'hyperthermie qui nécessite de très hautes fréquences afin d'induire un échauffement, la stimulation magnéto-mécanique peut être obtenue à des fréquences inférieures à 100 Hz. Les paramètres tels que la forme et les propriétés magnétiques des particules, la fréquence et l'amplitude du champ à appliquer sont maintenant à choisir afin de maximiser la réponse mécanique des particules au champ appliqué.

Concernant les particules, la biocompatibilité des matériaux utilisés reste un point essentiel pour que les particules puissent être utilisées *in-vivo* puis dans un but clinique. Les oxydes de fer tels que la magnétite (Fe_3O_4) ou la maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) sont ainsi de très bons candidats car ils sont métabolisés par le corps et sont connus pour leur biocompatibilité (Ling and Hyeon 2013; Samadishadlou et al. 2018). Le nickel ou le cobalt sont plus toxiques (Ermolli et al. 2001) mais peuvent être utilisés en étant recouverts d'or (Dreaden et al. 2012; Shukla et al. 2005) ou de polyélectrolytes (Hartmann and Krastev 2017), ce qui permet d'assurer la biocompatibilité des particules. L'avantage de ces métaux est qu'ils ont une susceptibilité magnétique plus forte. Un champ d'amplitude plus faible peut donc être utilisé.

Dans le but de viser spécifiquement une cible ou d'augmenter les propriétés de dispersion des particules, une fonctionnalisation de la surface des particules peut être nécessaire (Bodhinayake, Ottenhausen, and Boockvar 2014; Hadjipanayis et al. 2010). Le dépôt d'une couche d'or sur les particules permet un greffage simple de molécules thiolées tout en apportant de la biocompatibilité (Prats-Alfonso and Albericio 2011).

La taille des particules doit être choisie en faisant un compromis entre une taille assez petite pour une utilisation *in-vivo* et assez grande pour obtenir un effet mécanique sur les cellules. En effet, la taille des particules destinées à être injectées par voie intraveineuse doit être suffisamment petite pour traverser les pores des vaisseaux sanguins et pénétrer dans les tissus (Hobbs et al. 1998; Decuzzi et al. 2010). Quelle que soit la méthode d'injection choisie, la taille des particules est limitée par le dispositif d'injection, la diffusion dans la tumeur et les interactions avec les cellules.

La forme des particules est choisie en fonction du matériau utilisé pour atteindre des propriétés magnétiques bien précises. Par exemple, les particules présentant une faible rémanence seront préférées. En effet, cette propriété permet aux particules en suspension de se redisperser après l'application d'un champ magnétique (Leulmi et al. 2013). C'est notamment le cas des SPIONs qui présentent une rémanence nulle grâce à leurs propriétés superparamagnétiques. Une rémanence faible peut aussi être obtenue avec le contrôle de la forme et de la taille des particules (Gusliencko et al. 2001; Vemulkar et al. 2015).

Afin d'induire une vibration ou une oscillation des particules, le champ magnétique doit être rotatif ou alternatif d'amplitude au moins égale au champ de saturation des particules, de préférence. La fréquence est choisie inférieure à 100 Hz pour que l'amplitude de l'oscillation des particules soit suffisante pour appliquer un stress mécanique aux cellules.

La technique que nous étudions étant multidisciplinaire et relativement récente, les termes utilisés pour la désigner diffèrent énormément entre les publications. En effet, certains parlent de magnéto-lyse, de thérapie par actionnement ou stimulation magnéto-mécanique, de magnéto-actionnement, d'induction non chimio-toxique de la mort des cellules, de destruction mécanique de tumeur, d'effets non induits par la température, de vibrations ou d'oscillations de particules magnétiques par l'application d'un champ non-chauffant qui peut être rotatif ou alternatif à faible fréquence. Cette multitude de termes utilisés rend l'étude de la bibliographie assez complexe et les citations d'articles montrent bien ces lacunes. Pour la suite du manuscrit, nous avons choisi d'utiliser le terme de traitement par effet magnéto-mécanique de particules (TEMMP) qui fait à la fois référence à la source magnétique du stimulus, mais aussi à la réponse mécanique de la particule qui va agir sur la cellule.

La diversité rencontrée dans le vocabulaire utilisé est aussi très présente dans les paramètres choisis par les différentes équipes travaillant sur le sujet. En effet, le type de particules ainsi que leur fonctionnalisation, le champ appliqué et les cellules cancéreuses choisies diffèrent énormément selon les articles, montrant l'étendue des possibilités. Le Tableau 1 répertorie les paramètres principaux utilisés dans ces études et met ainsi en avant leur hétérogénéité. Bien que le maximum ait été fait pour regrouper le plus grand nombre de publications sur le sujet, il est possible que certaines soient manquantes, compte-tenu de la difficulté de faire des recherches par mots-clés.

Tableau 1 : Récapitulatif des propriétés des particules et du champ appliqué utilisés dans la littérature pour un traitement par effet magnéto-mécanique de particules

	Diamètre	Longueur	Matériau	Fonctionnalisation	Chimio	Dispositif	
	(Shen et al. 2017)	-	62nm	Zn-IO ¹	DA-PAA-PEG + EGF peptide	-	Agitateur magnétique
	(Fung et al. 2008)	200nm	4,4µm	Ni	-	-	Agitateur magnétique
	(Liu et al. 2012)	100nm	1µm	C + ²	-	-	Agitateur magnétique
	(Wang et al. 2013)	80nm	580nm	Oxyde de fer	silice	-	Aimant oscillant
	(Cheng et al. 2014)	250-120	200nm	Fe ₃ O ₄	-	-	Electroaimant
	(Contreras et al. 2015)	35nm	4µm	Ni	-	-	Bobine
	(Kilinc et al. 2015)	254nm	1,98µm	Fe-Au	PEG+HRG	Oui ³	Electroaimant
	(Martínez et al. 2016)	30-40nm	6,4 µm	Fe	BSA, APTES	Oui ⁴	Electroaimant
	(Wong et al. 2017)	150-350nm	50-500nm	NiFe	-	-	4 bobines
	(D.-H. Kim et al. 2010)	1µm	70nm	Au/NiFe/Au	anti-human-IL13a2R	-	Electroaimant
	(Cheng et al. 2015)	2µm	70nm	Au/NiFe/Au	-	-	Cylindre Halbach
	(Leulmi et al. 2015)	1,3µm	80nm	Au/NiFe/Au	anti-hCA9	-	Agitateur magnétique
	(Muroski et al. 2016)	2µm	60nm	SAF ⁵	-	-	Cylindre Halbach
	(Zamay et al. 2016)	500nm	60nm	Au/Ni/Au	AS-9 et AS-14	-	Bobine
	(Mansell et al. 2017)	2µm	118nm 70nm	SAF ⁵ ou Au/NiFe/Au	-	-	Cylindre Halbach
	(S. H. Hu and Gao 2010)	180nm	-	Oxyde de fer	PS _{16-b} -PAA ₁₀	-	Agitateur magnétique
	(Cho et al. 2012)	15nm	-	Zn-IO	Ab for DR4	-	2 aimants
	(Domenech et al. 2013)	61±29nm	-	Oxyde de fer	CMDx+EGF	-	Bobine
	(Wang et al. 2013)	0,2-2µm	-	Oxyde de fer	APTES	-	Aimant oscillant
	(Cheng et al. 2014)	200nm	-	Fe ₃ O ₄	-	-	Electroaimant
	(E. Zhang et al. 2014)	0,1-5,8µm	-	Oxyde de fer	Lamp-1	-	Des bobines
	(Master et al. 2015)	7-8nm	-	Oxyde de fer	PAA(PMA)-PEG ou PAA-P85	-	Electroaimant
	(Ju et al. 2016)	40 nm	-	Fe ₃ O ₄	-	-	Bobine
	(Brossel et al. 2016)	100nm	-	Fe	-	-	2 aimants
	(Hapuarachchige et al. 2016)	80nm	-	Oxyde de fer	amidon	-	IRM
	(Vegerhof et al. 2016)	50-100-200nm	-	Fe ₃ O ₄	PEG+C225	Oui ⁶	Electroaimant
	(Li et al. 2017)	30nm	-	Fe ₃ O ₄	DMSA	-	2 aimants tournants
	(Chiriac et al. 2018)	-	10-200nm	Fe-Cr-Nd-B	-	-	4 bobines

¹ Zn-IO : Particules d'oxyde de fer dopées au Zink

² 5% d'impuretés métalliques

³ Vemurafenib

⁴ Doxorubicine

⁵ Synthetic AntiFerromagnet composé de :

Au/(Ta/Pt/CoFeB/Pt/Ru/Pt/CoFeB/Pt)/Au

⁶ Cetuximab

Tableau 1 (suite) : Récapitulatif des propriétés des particules et du champ appliqué utilisés dans la littérature pour un traitement par effet magnéto-mécanique. Le symbole § indique les études réalisées in-vivo.

Champ	Amplitude	Fréquence	Durée	Lignée	Type ⁷
Rotatif	40mT	15Hz	30min*3jours	U87	Glioblastome
Rotatif	240mT	1Hz	20min	NIH/3T3	Fibroblaste
Rotatif	40-75mT	16,7Hz	20min	MCF-7	Cancer du sein
Oscillant Ou Gradient	160kA/m	2-10Hz	20-60min	HepG2	Carcinome hépatocellulaire
Alternatif		35kHz	0-10-30-60- 120min	HeLa ⁸	Métastase
Alternatif	0,5mT	1-1000Hz	10-30min	HCT116	Carcinome colorectal
Alternatif + gradient	/	0,5Hz (1s on 1soff)	15min	MCF7, MDA-MB-231	Cancer du sein
Alternatif	1mT	10Hz	10min	MDA-MB-231	Cancer du sein
DC, AC uni ou bi-axial pulsé	140Oe	1-20Hz	10min	HeLa ⁸	Métastase
Alternatif	90Oe	10-60Hz	10min	N10	Gliome
Rotatif	1T	20Hz	5-30min	U87	Glioblastome §
Rotatif	30mT	20Hz	45min	SKRC59 hCA9	Carcinome rénal
Rotatif	1T	20Hz	30min*3jours	HB1.F3.CD, U87	Cellules souches neurales, Glioblastome
Alternatif	100Oe	100Hz	10min	EAC	Cellules Elrich ⁹ §
Rotatif	1T	20Hz	1min	U87	Glioblastome
Rotatif	/	0,83Hz	15min	LNCaP	Tumeur de la prostate
Gradient	0,2T	-	2h	DLD-1	Cancer du côlon §
Alternatif	42kA/m	233kHz	1h	MDA-MB-23 184-B5	Cancer du sein Glande mammaire saine
Oscillant ou gradient	160kA/m	2-10Hz	20-60min	HepG2	Carcinome hépatocellulaire
Alternatif		35kHz	0-10-30-60- 120min	HeLa ⁸	Métastase
Alternatif + gradient	30mT	5-20Hz	20min	INS1	Insulinome de rat
Alternatif sinusoïdal	50 or 100kA/m	50Hz	30min ou 3*(10on+5off)	MDA-MB-231, BT474, MCF10A	Cancer du sein, Carcinome canalaire, Glande mammaire saine
Alternatif	0,7mT	100Hz		HepG2 Bel-7402 HL-7702	Carcinome hépatocellulaire Carcinome hépatocellulaire ¹⁰ Cellules hépatiques saines
Gradient	0,66T	-	2h*21jours	MDA-MB-231	Cancer du sein §
Alternatif	9,4T	5,4kHz	60min	MDA-MB-231	Cancer du sein
Alternatif + radient	6,2G	4Hz	15min	A431	Cancer de la peau §
alternatif	0,1-20mT	2-20Hz	1h	MCF-7	Cancer du sein §
Rotatif ou gradient	1-200Oe	20-50-70- 100Hz	5-10-15-20min	HOS, NHDF	Ostéosarcome, Cellules saines de peau

⁷ Cellules humaines sauf contre-indication

⁸ Métastase d'un cancer du col de l'utérus

⁹ Mouse Elrich ascite adenocarcinoma

¹⁰ Une contamination par des cellules HeLa a récemment été montrée (Rebouissou et al. 2017)

II.3.2. Les particules utilisées

Bien que des particules présentant une anisotropie de forme soient préférables pour agir mécaniquement sur les cellules, plusieurs études observent un effet létal par TEMMP sur des cellules cancéreuses en utilisant des particules sphériques (E. Zhang et al. 2014; Master et al. 2015; Vegerhof et al. 2016; Ju et al. 2016; Li et al. 2017). Les particules utilisées sont principalement des SPIONs disponibles dans le commerce. Cependant, de nombreuses études visant à induire un TEMMP avec des nanosphères utilisent des fréquences très élevées (supérieures à 10 kHz) (Domenech et al. 2013; D. Cheng et al. 2014; Hapuarachchige et al. 2016) ou un gradient de champ (Cho et al. 2012; Brossel et al. 2016). Des structures plus complexes sont aussi utilisées pour obtenir des architectures anisotropes. C'est le cas de Hu et Gao qui développent des microsphères composées de SPIONs qui se situent dans un seul hémisphère de la particule afin de créer une anisotropie (S. H. Hu and Gao 2010).

En plus des SPIONs déjà très répandues dans le domaine biomédical, les besoins très particuliers de cette application font appel à des particules présentant une anisotropie de forme. Des particules en forme de disque sont produites dès 2009 aux Etats-Unis et utilisées pour détruire des cellules de gliome (Rozhkova et al. 2009; D.-H. Kim et al. 2010). Ces particules sont composées de permalloy (un alliage de nickel_{80%}-fer_{20%}) et leur diamètre ainsi que leur épaisseur ont été étudiés pour obtenir un vortex magnétique (Guslienko et al. 2001). Cette structure magnétique est celle que nous avons choisie pour nos particules, elle sera donc détaillée au chapitre 2. Brièvement, elle permet d'obtenir une faible rémanence et une susceptibilité suffisante pour une réponse efficace au champ magnétique tout en restant sous un seuil critique, évitant ainsi qu'elles s'agglomèrent (Joisten et al. 2010; Leulmi et al. 2013; Goiriena-Goikoetxea et al. 2016; Wong et al. 2017). Ce type de particules a par la suite été utilisé dans plusieurs études afin de détruire des cellules de carcinome rénal humain (Leulmi et al. 2015), des cellules d'adénocarcinome et des cellules de glioblastome (Muroski et al. 2016). Elles ont aussi été utilisées pour les premiers essais *in-vivo* de cette méthode (Y. Cheng et al. 2015; Zamay et al. 2016). Des particules en forme de disque mais composées de multicouches avec un comportement antiferromagnétique (SAF pour *Synthetic AntiFerromagnets*) ont été étudiées (W. Hu et al. 2008; Vemulkar et al. 2015). Ces particules ont l'avantage d'avoir une aimantation hors du plan qui leur permet de s'aligner avec le champ dans les trois directions de l'espace. Une expérience comparative a montré que les particules SAF à aimantation perpendiculaire induisaient un meilleur effet que les vortex de permalloy après l'application d'un champ magnétique rotatif pendant 1 min (Mansell et al. 2017). Des particules SAF avec une aimantation dans le plan ont aussi été étudiées (Joisten et al. 2010).

Les nanofils ou nanotubes ont une anisotropie de forme accrue qui leur confère une haute susceptibilité mais aussi une aimantation rémanente proche de 100 % de M_s (Ivanov, Vázquez, and Chubykalo-Fesenko 2013) en fonction du rapport diamètre / longueur. Cette caractéristique va entraîner une

agrégation des particules après application du champ. La première utilisation des nanofils pour un effet magnéto-mécanique a été testée sur des cellules de cancer du sein (Liu et al. 2012). Il s'agissait de nanotubes de carbone, composés à 5% d'impuretés métalliques qui donnent aux nanofils leurs propriétés magnétiques. La formation d'amas a été observée lorsque les particules sont soumises à un champ magnétique. Des nanofils de Ni ont été utilisés sur des cellules de carcinome colorectal (Contreras et al. 2015). Ces particules sont saturées pour un champ inférieur à 250 mT et comportent, comme attendu, une très forte rémanence (environ 75 % de M_s). Des nanofils de fer et d'oxyde de fer ont aussi été testés (Martínez-Banderas et al. 2016; D. Cheng et al. 2014). Pour permettre deux types de fonctionnalisation sur une même particule, des nanofils de fer avec une extrémité en or ont été synthétisés (Kilinc et al. 2015). Ce type de particules caractérisées par différentes propriétés de surface s'appellent des particules Janus. Dans une approche faisant varier la longueur et le diamètre de particules cylindriques, Wong et al. ont étudié l'influence de l'anisotropie de forme. Pour un diamètre variant de 150 à 350 nm, les particules de longueur inférieure à 100 nm ont une structure en simple vortex, en accord avec les caractéristiques des particules en forme de disque. Pour une longueur entre 100 et 300 nm, une structure en double vortex apparaît, puis évolue vers une structure en triple vortex pour des longueurs supérieures à 300 nm, cas proche de particules en forme de nanofils (Wong et al. 2017). Une forte augmentation de la susceptibilité est observée pour des particules en forme de nanofils ($d = 150$ nm pour $l > 400$ nm). Cependant cette augmentation est associée à une hausse de l'aimantation à rémanence. Les calculs de la force appliquée sur les cellules montrent une force induite de l'ordre de quelques dizaines de pN, suffisante pour provoquer l'apoptose des cellules quel que soit le diamètre, mais tout de même plus importante pour des particules en forme de nanofils (Wong et al. 2017). Dans une étude comparant des particules en forme de bâtonnets ($d = 50-120$ nm et $l = 200$ nm) à des particules sphériques ($d = 200$ nm) d'oxydes de fer, les auteurs montrent une meilleure efficacité avec les bâtonnets (D. Cheng et al. 2014). Wang et al. ont également comparé des bâtonnets ($d = 80$ nm et $l = 580$ nm) à des particules sphériques ($d = 0,2 - 2$ μm) et ont eux aussi observé un meilleur effet avec les bâtonnets (Wang et al. 2013). Cela confirme l'importance de l'anisotropie de forme des particules pour appliquer un stress mécanique suffisant sur les cellules.

Bien que les disques, les particules sphériques et les nanofils soient les trois formes les plus utilisées dans cette application, des particules cubiques de fer dopées avec du zinc ont également été étudiées (Shen et al. 2017). Cependant les auteurs ont observé une agrégation des particules en forme de chaînette lors de l'application du champ magnétique, ramenant la situation au cas de particules en forme de nanofils. Dans une approche similaire, des SPIONs sont soumis à un champ magnétique qui entraînent la formation de nanochaînes pendant qu'une coque de silice est déposée pour fixer la structure (Kralj and Makovec 2015). Contrairement aux nanofils, ces structures ont l'avantage de conserver leur propriété superparamagnétique et présentent une très faible rémanence. Des particules de FeCrNdB

produites par broyage à billes ont été utilisées pour la première fois pour un TEMMP (Chiriac et al. 2018). Cette technique de fabrication consiste à broyer une poudre métallique pour obtenir des particules de forme anisotrope et de taille nanométrique. Les particules obtenues ici ont une taille comprise entre 10 et 200 nm, une faible aimantation à rémanence et une forte susceptibilité. L'inconvénient est une plus grande disparité en taille et un contrôle moins précis des propriétés des particules. La pureté de la poudre initiale est aussi très importante pour éviter les contaminations par d'autres métaux.

II.3.3. Application du champ

De même que pour les particules, il existe une grande diversité de champs appliqués pour un TEMMP tant au niveau des paramètres choisis que des dispositifs utilisés (Tableau 1). Une représentation schématique des différents dispositifs est présentée en Figure 6.

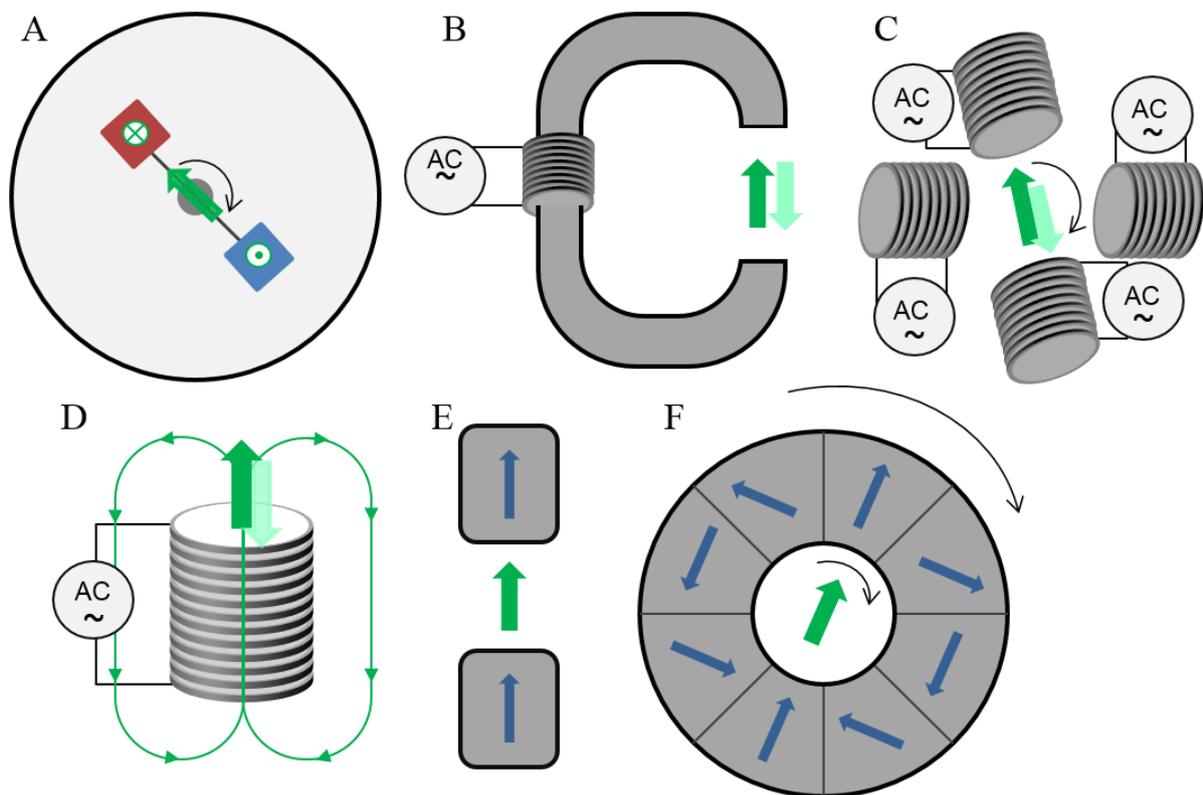


Figure 6 : Schémas simplifiés des dispositifs d'application du champ. A/ Agitateur magnétique composé de deux aimants à l'extrémité d'une baguette en rotation. Vue du dessus. B/ Noyau en ferrite entouré de fil de cuivre traversé par un courant alternatif sinusoïdal. C/ Système composé de 4 bobines alimentées par un courant sinusoïdal alternatif. L'amplitude, le déphasage et la fréquence du courant appliqué peuvent être choisis pour créer au centre des 4 bobines un champ alternatif ou rotatif. D/ Une bobine alimentée par un courant alternatif qui permet de créer un champ magnétique alternatif à l'intérieur ou sur la bobine. Les boucles représentent la direction du champ magnétique. E/ Système composé de deux aimants permettant de créer un champ constant relativement homogène. F/ Cylindre de Halbach composé dans cet exemple de 8 aimants permanents pour l'application d'un champ homogène au creux du cylindre. Le champ rotatif est obtenu par la mise en rotation du cylindre.

La première méthode d'application du champ a été l'utilisation d'agitateurs magnétiques du commerce ou fait-maison, traditionnellement utilisés pour l'agitation de mélanges à l'aide d'un barreau aimanté (Fung et al. 2008; Liu et al. 2012; Leulmi et al. 2015; Shen et al. 2017). Composés de deux aimants disposés à chaque extrémité d'une baguette en rotation, la vitesse de rotation peut être augmentée jusqu'à 2000 rpm selon les modèles (Figure 6A). L'avantage de ces dispositifs est qu'ils sont peu coûteux et déjà présents dans la plupart des laboratoires de chimie ou de biologie. L'inconvénient majeur est une inhomogénéité du champ appliqué. En effet, une cartographie du champ réalisée sur un agitateur magnétique du commerce (Morcrette 2016) montre que, sur la trajectoire circulaire des aimants, le champ subi est perpendiculaire au plan de l'agitateur et d'une valeur de 30 mT. Bien que le terme « rotatif » soit généralement utilisé pour désigner ce type de dispositif, le champ perçu est en fait pulsé le long de la trajectoire. En s'éloignant de la trajectoire de 1 cm vers l'extérieur, l'amplitude du champ diminue et une composante parallèle au plan apparaît, d'environ 5 mT. Au centre de l'agitateur, le champ est parallèle au plan et d'une valeur de 15 mT ; il s'agit bien ici d'un champ rotatif. Dans le reste de la littérature, les valeurs de champ appliqué par agitateur magnétique sont données entre 30 et 240 mT mais la localisation de la mesure (centre ou trajectoire des aimants) n'est pas indiquée. Ce dispositif ne peut donc être utilisé qu'*in-vitro*, en prenant soin de répartir les cellules à traiter au choix sur la trajectoire des aimants pour un champ vertical pulsé, ou au centre de l'agitateur pour un champ horizontal rotatif. Dans les deux cas, l'inhomogénéité du champ et le gradient induit sont à prendre en considération. Un système basé aussi sur la rotation de deux aimants est utilisé par (Li et al. 2017). Dans ce cas, l'échantillon est placé entre l'extrémité de deux baguettes en rotation. Les deux baguettes sont alignées et un aimant est placé à l'extrémité de chacune des baguettes, de façon opposée. Le champ appliqué peut être ajusté en faisant varier la distance entre les deux baguettes et est d'au maximum 50 mT.

De nombreuses études sur le sujet utilisent des bobines ou électroaimants pour appliquer un champ magnétique alternatif. Le champ peut être appliqué avec un bâtonnet de fer placé entre les puits d'une plaque de culture, elle-même enroulée d'un fil de cuivre, pour appliquer un champ de 90 Oe (D.-H. Kim et al. 2010) ou en plaçant la plaque de culture sur une bobine (Figure 6D) (Contreras et al. 2015; Vegerhof et al. 2016; Ju et al. 2016). Kilinc et al. utilisent quant à eux une pointe de Fe-Co-V enroulée de fils de cuivre pour appliquer un champ (amplitude non donnée) (Kilinc et al. 2015). Dans ce dernier cas, le champ est appliqué très localement. Le champ produit par ces trois méthodes présente une forte inhomogénéité et décroît fortement en s'éloignant de la source de champ. Une autre méthode consiste à placer l'échantillon dans l'entrefer d'un noyau en ferrite en forme de U ou C soumis à un courant alternatif (Figure 6B). Cette technique a été choisie par D. Cheng et al. à très haute fréquence (35 kHz) sur des cellules détachées du support et placées dans un tube (D. Cheng et al. 2014); et par Martínez-Banderas et al. pour appliquer un champ de 1 mT à 10 Hz (Martínez-Banderas et al. 2016). Cette méthode permet d'appliquer un champ homogène dans l'entrefer mais est limitante par l'encombrement du dispositif ramené à l'intensité du champ appliqué. Dans une approche différente, les cellules ou la

souris sont placées directement au centre du solénoïde pour appliquer un champ de $100 \text{ Oe} = 10 \text{ mT}$ (Zamay et al. 2016). Ici encore, le champ appliqué est très faible. Plusieurs dispositifs commerciaux ont aussi été utilisés combinant un système d'induction avec un noyau ferromagnétique ou un système composé de plusieurs bobines (Domenech et al. 2013; E. Zhang et al. 2014; Master et al. 2015). Le champ produit par ces trois systèmes crée un gradient qui est, soit utilisé par certains auteurs, soit évité en se plaçant au plus près de la source du champ. L'utilisation de bobines de taille identique et en nombre pair, placées autour de la zone d'intérêt permet de créer un champ homogène. On parle dans ce cas de bobines de Helmholtz (Figure 6C). Cette configuration a été utilisée pour appliquer un champ pulsé uni ou bi-axial de 140 Oe (Wong et al. 2017). L'inconvénient de cette méthode est l'échauffement rapide des bobines lorsqu'un fort courant est appliqué, qui nécessite un système de refroidissement.

Afin d'appliquer un champ qui soit le plus homogène possible, un cylindre de Halbach peut être utilisé (Figure 6F). Il s'agit d'un cylindre composé de plusieurs aimants permanents (généralement 8, 12 ou 16) orientés de façon à produire un champ uniforme au creux du cylindre. A l'aide d'un système de mise en rotation, ce cylindre a été utilisé pour appliquer un champ rotatif d'environ 1 T sur des cellules mais aussi sur souris (Y. Cheng et al. 2015; Muroski et al. 2016; Mansell et al. 2017). Ce dispositif permet d'appliquer des champs plus forts pour un encombrement limité. La fréquence de rotation dépend du moteur et du générateur et peut être ajustée selon les besoins.

Dans une approche innovante, un système préclinique d'IRM est utilisé pour appliquer un gradient pulsé (Hapuarachchige et al. 2016). L'avantage principal de cette méthode est la compatibilité pour une utilisation en clinique par la suite, les systèmes d'imagerie IRM étant déjà largement répandus dans les hôpitaux. Le champ appliqué ici est de $9,4 \text{ T}$ à une fréquence de $5,4 \text{ kHz}$.

Alors que la plupart des études évoquées ici s'intéressent à un mouvement oscillant ou rotatif des particules, des études visant uniquement à créer une force par déplacement de particules due à l'application d'un gradient ont aussi été réalisées (Cho et al. 2012; Brossel et al. 2016). Pour cela, le champ est appliqué en utilisant deux aimants permanents disposés de part et d'autre des cellules ou de la souris (Figure 6E). Le champ maximum créé est compris entre $0,2$ et $0,66 \text{ T}$. Cependant, dans une étude comparant les effets d'un champ oscillant et d'un gradient de champ, une meilleure efficacité a été démontrée avec le champ oscillant (Wang et al. 2013). Le champ de 160 kA/m ($= 0,2 \text{ T}$) est dans ce cas appliqué grâce un aimant, qui est éloigné et rapproché de l'échantillon pour produire le champ oscillant.

Nous venons de voir que les dispositifs d'application du champ utilisés pour viser un TEMMP sont très variés mais les paramètres d'application du champ diffèrent eux aussi d'une étude à l'autre (Tableau 1). L'influence de ces paramètres sur les résultats obtenus est discutée dans la partie suivante.

II.3.4. Les effets obtenus

Pour évaluer l'efficacité de cette méthode, les auteurs ont étudié la viabilité cellulaire pour déterminer si le TEMMP induisait une diminution du nombre de cellules cancéreuses viables. De plus, certains auteurs ont cherché quels mécanismes pouvaient expliquer les effets observés en s'intéressant à la perméabilité de la membrane, à l'apoptose des cellules traitées ou encore aux perturbations des lysosomes. Il est important de signaler que toutes ces études ont été réalisées sur des modèles cellulaires *in-vitro* classiques en deux dimensions.

Diminution de la viabilité cellulaire

La plupart des études montrent une diminution de la viabilité cellulaire suite à l'exposition au champ magnétique, cependant l'ordre de grandeur est très différent d'une étude à l'autre. Les résultats énoncés ci-après sont les meilleurs obtenus, pour chaque publication, lorsque plusieurs conditions ou paramètres ont été testés. La viabilité cellulaire est mesurée par différentes techniques : test MTT, test MTS, test CCK-8, test LDH, test au Bleu de Trypan, test à l'Iodure de Propidium, test à la résazurine (CellTiter Blue et PrestoBlue®), LIVE/DEAD® assay, dont les principes d'action sont brièvement expliqués ci-après (Riss et al. 2004).

- Le bleu de Trypan (BdT) rentre dans toutes les cellules, vivantes ou mortes mais est très rapidement relargué par les cellules vivantes. Le mécanisme d'exclusion nécessitant de l'énergie, seules les cellules pouvant synthétiser de l'adénosine triphosphate (ATP, nucléotide fournissant l'énergie nécessaire à de nombreuses réactions chimiques dans la cellule) sont capables de faire sortir le bleu de Trypan. Les cellules colorées en bleu sont donc mortes. Ce colorant est couramment utilisé avec un hémocytomètre qui permet de compter les cellules vivantes et les cellules mortes automatiquement. Cependant, ce comptage automatique n'est pas toujours pertinent, notamment lorsque les cellules sont chargées en particules car l'appareil compte les amas de particules comme des cellules mortes. Pour utiliser le bleu de Trypan dans notre application, un comptage manuel peut être réalisé, en prenant soin de différencier les cellules colorées en bleu des cellules chargées en particules qui apparaissent plus foncées au microscope.
- Les tests CCK-8, MTT et MTS sont composés de sels de tétrazolium solubles dans l'eau. Les mécanismes d'action de ces tests ne sont pas encore parfaitement connus. Le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) est réduit par la NADH (nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) sous forme réduite) et forme des cristaux de formazan violets non hydrosolubles dans les cellules. Le NAD est une enzyme qui intervient dans les réactions d'oxydoréduction à l'intérieur des cellules, et notamment dans la chaîne respiratoire qui a lieu

dans les mitochondries. Sa concentration est donc reliée à l'activité métabolique des cellules. La quantité de formazan formé est donc proportionnelle au nombre de cellules viables par l'intermédiaire de l'activité mitochondriale. Le formazan violet formé doit ici être solubilisé par un tampon de lyse avant quantification par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 570 nm. D'après la loi de Beer-Lambert la concentration est proportionnelle à l'absorbance. De manière semblable, le WST-8 (2-(2-méthoxy-4-nitrophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfophényl)-2H-tétrazolium), présent dans le kit CCK-8, et le MTS (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium) sont réduits et forment du formazan de couleur orange soluble dans le milieu de culture. Cela a pour avantage d'éviter l'étape de solubilisation des cristaux, nécessaire pour le test MTT. Ces tests permettent donc de quantifier l'activité métabolique des cellules. Le nombre de cellules viables est alors proportionnel à l'intensité d'absorbance à une longueur d'onde de 490 nm.

- La résazurine (présente par exemple dans le CellTiter-Blue® ou le PrestoBlue®) de couleur bleue est réduite par l'activité métabolique des cellules viables en résorufine qui est rose et fluorescente. La quantité de résorufine produite est alors proportionnelle au nombre de cellules viables et mesurée par fluorescence pour des longueurs d'onde d'excitation de 569 nm et d'émission de 586 nm.

Alors que les tests présentés jusqu'ici permettent de marquer l'activité des cellules viables, les tests suivants sont basés sur la perméabilisation de la membrane cellulaire. De la même façon, ils permettent de caractériser l'effet sur les cellules par des différences d'absorbance ou de fluorescence.

- L'iodure de propidium (IP) est utilisé pour colorer les noyaux des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire. Il s'agit d'un intercalant de l'ADN et de l'ARN fluorescent.
- Lors d'un test LDH, la perméabilité de la membrane cellulaire est évaluée par le dosage du lactate déshydrogénase (LDH), enzyme cytoplasmique stable présente dans toutes les cellules, qui est relarguée hors de la cellule lorsque celle-ci perd son intégrité membranaire.
- Le 7-AAD (7-aminoactinomycine D) est également un intercalant fluorescent de l'ADN qui colore en rouge profond les noyaux des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire.
- Le test LIVE/DEAD® (L/D) utilise deux colorants : l'acétoxyméthyl calcéine (AM) qui marque les cellules vivantes et l'homodimère-1 d'éthidium (EthD-1) qui marque les cellules mortes. Dans les cellules vivantes, la calcéine AM non fluorescente est convertie par l'activité estérase intracellulaire en calcéine à fluorescence verte. L'EthD-1 entre dans les cellules dont les membranes sont lésées et se lie à l'acide nucléique augmentant ainsi l'intensité de sa fluorescence rouge.
- Le Bromure d'Ethidium (BrEth) est un produit très toxique, principalement utilisé pour l'électrophorèse sur gels d'agarose. Il s'agit d'un intercalant de l'ADN qui ne marque en orange foncé que les noyaux de cellules ayant perdu leur intégrité membranaire.

Dans certaines études, des comptages au microscope optique du nombre de cellules ont été réalisés pour quantifier le nombre de cellules vivantes, en comparant avec un contrôle non traité. Des marqueurs peuvent être utilisés sur les noyaux et ainsi différencier les cellules saines des cellules affectées, caractérisées par un marquage nucléaire dense et une forme atypique (Kilinc et al. 2015). Une quantification de l'intensité lumineuse émise par les cellules exprimant la Luciférase, enzyme catalysant la réaction de bioluminescence, a aussi été utilisée pour quantifier le nombre de cellules (Muroski et al. 2016).

Il a été démontré que les tests MTT, MTS, LDH et avec résazurine peuvent interférer avec les particules (Kroll et al. 2012; Ong et al. 2014) et que les mesures d'absorbance et de fluorescence sont impactées par les nanoparticules (Ong et al. 2014). Il est donc nécessaire de réaliser des tests d'interférences lorsque l'on travaille en présence de particules pour pouvoir valider les tests. Pour éviter les interférences il est préférable de travailler sur le surnageant, lorsque les particules sont assez lourdes pour sédimenter, et d'éviter toute mesure de fluorescence, ou d'absorbance en présence de particules. Cependant, la quasi-totalité des travaux présentés ici ont été réalisés dans des conditions expérimentales avec de possibles interférences. Ce phénomène est d'autant plus problématique lorsque le contrôle cellules + particules n'est pas montré. L'étude de cette thérapie étant relativement récente, un manque de reproductibilité dans les publications est pour l'instant observé. Certains travaux publiés présentent des résultats obtenus sur une seule expérience. Il est d'autant plus difficile de comparer les différentes études entre elles, certaines en étant au stade de résultats préliminaires et d'autres montrant des résultats statistiquement significatifs.

Les diminutions de viabilité observées par les différents auteurs sont rapportées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Pourcentage de viabilité après traitement (particules + champ), pour des particules seules ou pour des cellules (contrôle). Pour des raisons de clarté, les résultats ont été extrapolés et sont ici exprimés en pourcentage de viabilité, excepté les résultats en italique. Dans ce cas, le relargage du LDH est normalisé à 1 pour des cellules saines, et exprimé en fonction de cette valeur pour les autres conditions. En l'absence de contrôle négatif, il n'est pas possible de calculer un pourcentage de viabilité. Le symbole † est utilisé pour indiquer les comptages de cellules marquées au bleu de Trypan réalisés avec un hémocytomètre, qui compte les particules comme des cellules mortes.

Référence	Condition	Test	Particules + champ	Particules	Contrôle	Test	Particules + champ	Particules	Contrôle
(Fung et al. 2008)		MTT	11%		100%				
(D.-H. Kim et al. 2010)		LDH	~10%	~90%					
(S. H. Hu and Gao 2010)		BdT	23%	99,50%	100%				
(Liu et al. 2012)	75mT	BdT †	70%	92%	100%	IP	~80%	~98%	
	40mT	BdT †	83%	92%	100%	IP	~83%	~98%	
	75mT	LDH	<i>x1,61</i>	<i>x0,9</i>	<i>x1</i>				
	40mT	LDH	<i>x1,87</i>	<i>x0,9</i>	<i>x1</i>				
(Cho et al. 2012)		CCK8	~48%	~95%					

Tableau 2, suite :

Référence	Condition	Test	Particules + champ	Particules	Contrôle	Test	Particules + champ	Particules	Contrôle
(Wang et al. 2013)	Nanofil sphère	BdT	65-70%	~95%					
		BdT	~70%	>95%					
(Domenech et al. 2013)	NP+EGF	Resaz.	~70%		100%]	Cancer du sein		
	NP	Resaz.	~120%		100%				
	NP+EGF	Resaz.	~100%		100%]	Cellules saines		
	NP	Resaz.	~100%		100%				
(E. Zhang et al. 2014)	NP fonction.	7-AAD	98,69%		100%				
	NP	7-AAD	99,27%		100%				
(D. Cheng et al. 2014)	bâton 1h	BdT	~76%	~93%		MTT	~70%	100%	
	bâton 2h	BdT	~60%			MTT	~70%		
	sphère 1h	BdT	~89%	~95%		MTT	~92%	100%	
	sphère 2h	BdT	~85%			MTT	~88%		
(Contreras et al. 2015)	1kHz, 30 min	MTT	~62%		100%	LDH	~66%		~88%
	1Hz, 30 min	MTT	~67%			LDH	~66%		~88%
(Master et al. 2015)	Cancer du sein	MTT	~50%	~95%					
	Cancer du sein	MTT	~25%	~85-95%					
	Cellules saines	MTT	~82%	~95%					
(Y. Cheng et al. 2015)		MTT	40%	80%	100%	7-AAD	~13%		
(Kilinc et al. 2015)	0,5Hz	optique	~50%		~97%				
(Leulmi et al. 2015)		BdT †	~20%	-	100%				
(Muroski et al. 2016)	NSC	MTT	25%	58%					
	Glioblastome	Lucif.	~37%		100%				
(Martínez- et al. 2016)	NP +doxo.	Resaz.	~27%	~37%	~100%				
	NP	Resaz.	~65%	~95%	~100%				
(Hapuarachige et al. 2016)		MTS	~73%	~95-97%					
(Vegerhof et al. 2016)		BdT	~49%	-	100%				
(Zamay et al. 2016)	avec AS9-14	BdT	~10%		~70%]	Ascites		
	sans	BdT	~35%		~70%				
	avec AS9-14	BdT	~70%		~80%]	Hépatocytes		
	sans	BdT	~60%		~80%				
(Wong et al. 2017)	1-5Hz	BdT †	~50%	-	~87%	Resaz.	~73%		100%
	1-5Hz	BrEth	~60%		~92%				
(Li et al. 2017)	20HZ 20mT	MTT	~75%	>95%					
(Mansell et al. 2017)	Vortex, 1min	BdT	~88%		~99%				
	SAF, 1 min	BdT	~38%		~99%				
(Shen et al. 2017)	j1	CCK8	~65%	~130%		IP	~43%	~98%	~98%
	j2	CCK8	~40%	~80%					
	j3	CCK8	~10%	~50%					
(Chiriatic et al. 2018)	20Hz 20min	MTT	~55%		~95%				

Le Tableau 2 montre la grande diversité de résultats obtenus selon les études. Bien que non quantifiée, une diminution significative de la viabilité cellulaire après TEMMP a aussi été observée par un test 7-AAD (Muroski et al. 2016) et par un test LIVE/DEAD (Hapuarachchige et al. 2016).

Il est difficile de faire un lien entre les effets obtenus et les paramètres choisis. Cependant, certaines études ont comparé les effets obtenus en fonction des paramètres d'application du champ.

Influence des paramètres d'application sur la viabilité cellulaire

Concernant la fréquence du champ, la plupart des études sont réalisées à fréquence faible, entre 10 et 50 Hz. Quelques études ont aussi testé des fréquences très faibles entre 0,5 et 5 Hz (voir Tableau 1). Ces fréquences faibles sont à opposer aux fréquences très élevées (supérieures à 1 kHz) utilisées dans certaines études, qui correspondent aux fréquences couramment employées pour l'hyperthermie magnétique. Ces études sont tout de même mentionnées ici car les auteurs se sont intéressés aux effets mécaniques induits et ne montrent pas d'élévation de la température pendant l'application du champ. Trois études ont étudié l'influence de la fréquence en gardant les autres paramètres constants. Dans la première réalisée en 2010, les auteurs montrent un meilleur effet pour des fréquences de 10 et 20 Hz avec ~90 % de mortalité. L'effet obtenu est plus faible pour 40 Hz (~75 % de mortalité), significativement diminué pour 50 Hz (~25 % de mortalité) et nul pour 60 Hz (D.-H. Kim et al. 2010). Des fréquences plus faibles (de 1 à 20 Hz) ont récemment été étudiées et montrent une augmentation légère de l'effet quand la fréquence diminue (Wong et al. 2017). En effet, la viabilité cellulaire est de ~73 % pour une fréquence de 1 Hz et de ~80 % pour une fréquence de 10 Hz. Cependant ces résultats sont en contradiction avec ceux de Li et al. publiés la même année. Les auteurs ont étudié des fréquences de 2 à 20 Hz et montrent un meilleur effet pour une fréquence de 20 Hz avec environ 75 % de viabilité après traitement (Li et al. 2017). De même, Wang et al. montrent un meilleur effet pour une fréquence de 10 Hz comparé à des fréquences de 2 et 5 Hz. Des fréquences supérieures à 20 Hz ont été étudiées par Chiriack et al. en 2018. Ils montrent un meilleur effet du traitement pour une fréquence de 50 Hz avec ~68 % de viabilité, comparé à des fréquences de 20, 70 et 100 Hz qui donnent des viabilité d'au minimum 75 % (Chiriack et al. 2018). Dans une étude sur des cellules de cancer colorectal, une fréquence très faible (1 Hz) a été comparée à une fréquence beaucoup plus élevée (1 kHz), mais avec un champ appliqué de 0,5 mT alors que le champ de saturation des particules est de 250 mT (Contreras et al. 2015). Les auteurs concluent à un meilleur effet lors d'un traitement à 1 kHz avec ~62 % de viabilité contre ~67 % pour un traitement à 1 Hz. Cependant, les figures présentées pour le test MTT ne montrent pas de différence significative entre les deux fréquences. La similarité de l'effet obtenu avec ces deux fréquences très différentes amène la question des mécanismes impliqués. En effet il est possible que les particules soumises à chacune des fréquences soient efficaces pour provoquer un effet létal, mais par l'intermédiaire de mécanismes bien différents.

Le temps d'application du champ varie de 1 min à 2 h et est parfois répété plusieurs jours d'affilée (voir Tableau 1). Dans une étude publiée en 2015, le champ est appliqué *in-vitro* pendant 5 ou 30 min (Y. Cheng et al. 2015). Les auteurs montrent sur une unique expérience un effet quasi-identique (89,3 % et 87 % de viabilité, respectivement) entre ces deux durées sur la viabilité cellulaire après traitement. En revanche, dans leur étude *in-vivo*, le champ appliqué est de 1 h, répété quotidiennement pendant 1 semaine. Dans une autre étude *in-vitro* à haute fréquence, la durée de traitement est variée entre 10 et 120 min et les auteurs montrent une diminution de la viabilité cellulaire plus importante pour des durées d'exposition croissantes, qui atteint 30 % de diminution pour 1 et 2 h de traitement (D. Cheng et al. 2014). De même, une comparaison entre 10 et 30 min de traitement montre un meilleur effet *in-vitro* pour 30 min (Contreras et al. 2015), bien que le meilleur effet obtenu soit une diminution de la viabilité cellulaire de 5%, ce qui est très faible. Des durées d'exposition inférieures à 20 min ont aussi été testées (Chiriac et al. 2018; Vegerhof et al. 2016) et font apparaître une relation linéaire entre la viabilité cellulaire et le temps d'exposition. En conclusion, la viabilité cellulaire diminue avec le temps d'exposition au traitement. Cet effet semble saturer au-delà de 1 h de traitement.

En répétant le traitement quotidiennement (champ à 20 Hz pendant 20 min), Zhang et al. montrent une croissance moins rapide des cellules que pour les contrôles (E. Zhang et al. 2014). Néanmoins l'expérience n'a pas été réalisée avec un traitement unique pour comparaison. De même, Muroski et al. montrent une diminution de la viabilité après trois traitements (champ à 20 Hz pendant 30 min), mais sans comparaison avec un traitement unique (Muroski et al. 2016).

Un mode « pulsé » a été testé par (Master et al. 2015). Le champ est appliqué pendant 10 min puis arrêté pendant 5 min, pour une application totale de 30 min. Une diminution plus significative de la viabilité cellulaire a été observée par rapport à une application du champ continue. Sur deux types de lignées cellulaires, la viabilité est de ~25 et ~50 % en mode pulsé contre ~50 et ~100 % en mode continu pour une concentration en particules de 0,05 g/l.

Perturbation de la membrane cellulaire

Les altérations de la membrane cellulaire mesurées par les différents tests présentés ci-dessus ont pu être observées directement dans une étude s'intéressant particulièrement à cet aspect. Liu et al. montrent une augmentation de la rugosité de la membrane par Microscopie à Force Atomique après l'application d'un champ de 75 mT à 16,7 Hz pendant 20 min (Liu et al. 2012). Avec une approche innovante, Muroski et al. utilisent des cellules souches neuronales (NSC) comme véhicule pour transporter les particules vers les cellules cancéreuses et appliquent ensuite un champ magnétique rotatif pour libérer les particules. Ils observent que les cellules U87 sont marquées positivement au 7-AAD (non quantifié) après

seulement 30 s d'application du champ et espèrent ainsi que les cellules de glioblastome seront capables d'internaliser les particules libérées par les NSC (Muroski et al. 2016). La perméabilisation de la membrane a aussi été étudiée à l'aide de bromure d'éthidium. Wong et al. montrent, sur une unique expérience, jusqu'à 40 % de cellules marquées au bromure d'éthidium après l'application d'un champ de 140 Oe = 14 mT à 1, 2 ou 5 Hz pendant 10 min (Wong et al. 2017). Les auteurs émettent ici l'hypothèse que la perméabilisation de la membrane serait due à un stade d'apoptose tardive. Cependant, en l'absence de preuves d'apoptose précoce, la ou les causes de la perméabilisation de la membrane peuvent être multiples.

Déclenchement de l'apoptose

Parmi les études ayant cherché à déterminer les mécanismes impliqués, la première hypothèse étudiée concerne le déclenchement de l'apoptose des cellules cancéreuses. En 2010, Kim et al. montrent par un test TUNEL que 60 % des cellules (compté sur 1000 cellules) sont marquées positivement pour l'apoptose après l'application d'un champ AC de 90 Oe = 9 mT à 20 Hz pendant 10 min (D.-H. Kim et al. 2010). Le test TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) est basé sur l'enzyme TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) qui reconnaît les groupes terminaux 3'-OH libérés lors de la dégradation de l'ADN. Cependant ces résultats n'ont été obtenus que sur 6 puits, avec un système d'application du champ très local. Des résultats similaires, bien que non quantifiés, ont par la suite été obtenus en 2012 par Cho et al. qui présentent des images de fluorescence témoignant de l'activation en cascade des caspases 8 – caspases 3 – inversion de la membrane puis apoptose tardive par l'application d'un champ continu de 0,2 T pendant 2 h (Cho et al. 2012). En revanche, Zhang et al. qui se sont aussi intéressés à l'apoptose des cellules après traitement n'obtiennent une augmentation de l'apoptose de seulement ~7 % par un marquage à l'annexine 5 après l'application d'un champ de 30 mT à 20 Hz pendant 20 min. Ils concluent tout de même que le taux élevé de cellules en apoptose impacte la prolifération cellulaire (E. Zhang et al. 2014). En 2015, l'apoptose des cellules après l'application d'un champ de 1 T à 20 Hz pendant 5 min est de nouveau étudiée par un test TUNEL. Le comptage des cellules marquées positivement augmente d'environ 30 % de l'apoptose après l'application du champ magnétique (Y. Cheng et al. 2015). Par un test de cytométrie en flux de cellules marquées à l'annexine 5, Leulmi et al. montrent lors d'une unique expérience une augmentation de 30 % après l'application d'un champ de 30 mT à 20 Hz pendant 45 min (Leulmi et al. 2015). Une activation des caspases 3 par microscopie à fluorescence a aussi été observée lors d'une unique expérience dans cette étude. La cytométrie en flux pour le comptage de cellules marquées par l'annexine 5 a aussi été utilisée par Shen et al. qui montrent une augmentation d'environ 13 % du nombre de cellules marquées après 30 min d'application du champ de 40 mT à 15 Hz (Shen et al. 2017). En utilisant deux marqueurs différents (BCL-2, protéine inhibant l'apoptose et BAX, protéine pro-apoptotique) pour une analyse par cytométrie en flux, Ju et al. montrent que 18 à 22% des cellules cancéreuses sont en apoptose après

traitement contre 3% pour la lignée de cellules saines (Ju et al. 2016). L'application du champ sans particules provoque aussi une augmentation du nombre de cellules en apoptose jusqu'à 7 %. Ce phénomène a été confirmé en étudiant par Western Blot le ratio de protéines BCL-2:BAX qui diminue après traitement, témoignant d'une plus grande quantité de protéines pro-apoptotiques. Bien que non quantifiée, le caractère apoptotique des cellules après traitement a aussi été reporté par une augmentation d'intensité du marqueur nucléaire Hoechst 33258 (Li et al. 2017).

Perturbation des lysosomes

Les lysosomes sont des vésicules de transport impliquées dans la digestion cellulaire. Plusieurs études se sont intéressées aux lysosomes et, en particulier, à la perméabilisation de la membrane lysosomale (LMP). C'est notamment le cas de Domenech et al. qui s'intéressent aux effets mécaniques induits lors du traitement par hyperthermie magnétique et montrent une augmentation de 30 % du nombre de cellules présentant une perméabilisation de la membrane lysosomale par un marquage à l'Acridine Orange, et de 8 % du nombre de cellules avec rupture de la membrane lysosomale par suivi de l'activité des cathepsines B (Domenech et al. 2013). Les cathepsines sont des enzymes protéolytiques présentes dans les compartiments lysosomaux qui peuvent être relarguées dans le cytoplasme en cas de rupture de la membrane lysosomale. Dans une approche ciblant spécifiquement les lysosomes à l'aide de l'anticorps LAMP1, Zhang et al. démontrent eux aussi une perméabilisation des compartiments lysosomaux par la diminution d'intensité des marqueurs LysoTracker et LysoSensor Green, mais aussi une diminution significative de la taille des lysosomes après l'application d'un champ de 30 mT à 20 Hz pendant 20 min (E. Zhang et al. 2014). Cette perturbation des lysosomes a été confirmée par Shen et al. par le marquage des galectines et par l'étude d'images obtenues par microscopie électronique à transmission (TEM) après l'application d'un champ pendant 30 min à 15 Hz (Shen et al. 2017). Cependant, dans une autre étude, Master et al. ne trouvent pas de preuves de perturbation lysosomale ni de perméabilisation de la membrane lysosomale par marquage de LysoTracker Green et Acridine Orange après l'application d'un champ de $50 \text{ kA/m} = 63 \text{ mT}$ à 50 Hz en régime pulsé (3 x 10 min) (Master et al. 2015).

Autres effets

Détachement des cellules

Par observation au microscope optique, Hapuarachchige et al. sont témoins du détachement des cellules du fond des puits après l'application du champ (Hapuarachchige et al. 2016). Ce phénomène est aussi évoqué par Muroski et al. qui émettent l'hypothèse que ce détachement serait dû à la mort des cellules (Muroski et al. 2016). Le détachement des cellules suite au traitement peut être problématique pour les tests effectués sur les cellules en fond de plaque juste après le traitement. En effet, les cellules en

suspension dans le surnageant ne seraient pas comptabilisées. De plus, un tel effet étant spécifique à un test *in-vitro* en 2D, la pertinence de ce modèle pourrait être remise en question.

Perturbation du cytosquelette

L'impact du traitement sur le cytosquelette des cellules a été étudié en s'intéressant plus particulièrement à l'actine. Lorsqu'elle est liée à l'ATP, cette protéine forme des filaments qui composent le squelette de la cellule. Une perturbation du cytosquelette a été observée suite à l'application du champ en présence de particules (Master et al. 2015). De manière intéressante, les auteurs montrent que l'effet létal du traitement dépend des propriétés mécaniques des cellules, ce qui explique que les cellules cancéreuses soient plus affectées par le traitement que les cellules saines. En effet, les cellules cancéreuses sont moins rigides que les cellules saines. L'utilisation de Cytochalasine D pour diminuer la rigidité des cellules montre que des cellules saines dont les propriétés mécaniques ont été modifiées deviennent vulnérables au stress mécanique induit par le mouvement des particules.

Echanges ioniques

En mesurant le courant électrique sortant des cellules, Ju et al. montrent que l'application du champ magnétique, seul ou en combinaison avec des particules magnétiques, réduit l'entrée d'anion dans les cellules (réduction d'environ 40-43 % pour le champ seul et 54-57 % pour le champ avec particules) (Ju et al. 2016). L'effet est significativement moins important sur des cellules saines. L'impact d'une stimulation mécanique de particules sur les échanges ioniques cellulaires avait déjà été observé (Mannix et al. 2008; Dobson 2008; Hughes et al. 2008).

Stress oxydant

Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species*) sont des espèces chimiques qui provoquent un stress oxydant sur les cellules lorsque leur concentration augmente. Une augmentation de la production de ROS après application du champ à très haute fréquence a été observée (Domenech et al. 2013) et corrélée avec la perméabilisation de la membrane lysosomale.

Suractivation des protéines ERK

La phosphorylation (addition d'un groupe phosphate) des ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*) suite à l'application du champ magnétique en présence de particules a été étudiée (Kilinc et al. 2015). Les protéines ERK sont des kinases qui activent d'autres protéines en y ajoutant un groupement

phosphate. Une suractivation de ces protéines entraîne l'arrêt du cycle cellulaire. Les auteurs montrent une phosphorylation plus importante de ces protéines suite au traitement conduisant à la mort cellulaire.

II.3.5. Etudes *in-vivo*

Plusieurs auteurs étudiant le TEMMP ont effectué des tests *in-vivo*, étape nécessaire pour la validation de l'efficacité de ce traitement. Les études menées sont résumées dans le Tableau 3 et détaillées ci-après. Les détails relatifs aux particules et à l'application du champ peuvent être revus dans le Tableau 1 en page 42.

Tableau 3 : Récapitulatif des études in-vivo de l'efficacité du TEMMP. La colonne « Modèle » indique le modèle choisi ainsi que le type et le nombre de cellules utilisés pour l'induction tumorale. La colonne « Injection NP » indique tout d'abord le moment de l'injection des particules (J0 correspondant à l'induction tumorale) puis la quantité de particules injectées ainsi que la procédure d'injection. Le moment de l'injection est parfois déterminé par une condition relative au diamètre D de la tumeur. La colonne « Molécules » indique les molécules complémentaires utilisées. La colonne « Champ magnétique » indique tout d'abord le moment de l'exposition. La condition peut être le volume V de la tumeur. La durée de l'exposition au champ ainsi que les possibles répétitions sont ensuite indiquées. La colonne « Etude » indique le moment de prélèvement des échantillons que les méthodes utilisées pour évaluer l'efficacité du TEMMP. L'abréviation HE désigne un marquage à l'hématoxyline-éosine.

	Modèle	Injection NP	Molécules	Champ Magnétique	Etude
(Cho et al. 2012)	<i>zebrafish</i>	J0 2,5 ng injectés dans le vitellus		24 h après NP 24 h	De suite après CM Angle de la queue Apoptose
(Y. Cheng et al. 2015)	Souris athymic nude 1.10 ⁵ cellules U87 en orthotopique (cerveau)	J0 50 NP/cellule injectées avec les cellules		A partir de J4 1 h x 7 jours	Survie Suivi volume via Luciférase
		J3 5.10 ⁶ NP injectées en intra-tumoral		A partir de J4 1 h x 7 jours	De suite après CM Apoptose HE
(Zamay et al. 2016)	Souris blanche ICR 1.10 ⁶ cellules EAC dans la cuisse	J7 2.10 ⁷ NP / 100 µl de PBS injectées en intra-tumoral	AS-9 et AS-14	1 h après NP 10 min	4 h après CM HE
(Vegerhof et al. 2016)	Souris nude 2.10 ⁶ cellules A431 en sous-cutané	D>4-5 mm		2 h après NP	Semaine 3
		6 mg de NP dans 200 µl injectés en intraveineux	Cetuximab	30 min x 7 en 14 jours	Suivi volume
(Brossel et al. 2016)	Souris BALB/C 1.10 ⁷ cellules MDA-MB-231 en sous-cutané	J0 5 mg de fer injectés avec les cellules		V>0,1-0,2cm ³ 2 h x 21 jours	Temps différents Suivi volume HE
		D>5mm 2 mg en moyenne de NP injectés en sous-cutané		8 h après NP 1 h	24 h après CM HE
(Li et al. 2017)	Souris C75BL/6 1.10 ⁵ cellules MCF-7 en sous-cutané				

En 2012, Cho et al. étudient l'effet de l'application d'un champ magnétique constant de 0,5 T créant ainsi un gradient, pendant 24 h sur des nanoparticules sphériques d'oxyde de fer dopées au zinc injectées dans des poissons-zèbres (communément appelés *zebrafish*) (Cho et al. 2012). Les particules, fonctionnalisées pour cibler le récepteur DR4 (*Death Receptor 4*, qui peut être impliqué dans le déclenchement de l'apoptose) sont injectées au stade embryonnaire dans le vitellus. Après l'application du champ, des altérations morphologiques sont observées au niveau de la queue qui s'est développée en formant un angle de 22°. La caspase 3 a été étudiée ici comme marqueur de l'apoptose et une augmentation d'un facteur 6 du nombre de cellules positives à la caspase 3 a été observée chez les *zebrafish* soumis au champ magnétique.

La première étude sur rongeur a été réalisée par Cheng et al. sur un modèle murin de glioblastome par greffe orthotopique (les cellules sont injectées dans leur organe d'origine, ici le cerveau) (Y. Cheng et al. 2015). En appliquant un champ rotatif de 1 T à 20 Hz pendant 1 h tous les jours pendant 1 semaine, les auteurs montrent une augmentation de la survie médiane, passant de 56 jours pour le groupe avec les particules seules à 63 jours pour le groupe traité, sans montrer de groupe contrôle avec seulement une induction tumorale. Dans une approche préliminaire, les particules en configuration vortex sont ici injectées en même temps que les cellules tumorales et le champ est appliqué dès le 4^{ème} jour post-implantation, alors que les traitements anti-cancéreux sont usuellement testés à partir du 10^{ème} jour, la taille de la tumeur augmentant significativement à partir de ce moment (Vo et al. 2009; Klei et al. 2018). Une diminution significative du volume tumoral pour 60 % des souris au jour 28 est aussi montrée, en utilisant l'intensité de fluorescence de Luciférase. Pour comprendre les mécanismes impliqués, une étude histologique a été réalisée sur des coupes de cerveau après un traitement quotidien de 30 min pendant 1 semaine, les particules étant injectées ici directement dans la tumeur le 3^{ème} jour, soit 24 h avant le début de l'exposition au champ magnétique. Cheng et al. ont montré une augmentation de 19 % du nombre de cellules en apoptose. La quasi-totalité des particules sont toujours situées dans la tumeur 7 jours après leur injection, et aucune particule n'a été retrouvée dans d'autres organes (rein, foie, poumons, gros intestin, cœur, vessie, rate, testicules).

Dans un modèle de tumeur sous-cutanée, Vegerhof et al. montrent une croissance de la tumeur significativement réduite après l'application d'un champ non uniforme de 6,2 G = 0,62 mT à 4 Hz pendant 30 min, répété 7 jours (Vegerhof et al. 2016). Les particules sphériques de magnétite de différentes tailles sont injectées par voie intraveineuse environ 2 h avant l'application du champ. Les particules d'un diamètre de 200 nm fonctionnalisées avec un anticorps (cetuximab) visant les récepteurs EGF sont les plus efficaces avec une croissance de la tumeur de seulement 32 % après 6 jours de traitement comparé à une pousse de 548 % pour le groupe contrôle sans particules avec injection de cetuximab seul. Cependant, les cycles d'hystérésis des particules ne sont pas donnés et l'amplitude très faible du champ utilisé est surprenante.

Egalement dans un modèle sous-cutané, Li et al. observent des changements de morphologie après l'application d'un champ magnétique de 1 à 10 mT avec une fréquence variée entre 2 et 20 Hz pendant 1 h (Li et al. 2017). Les particules sphériques d'oxyde de fer sont ici injectées dans la tumeur sous cutanée et l'exposition au champ magnétique est réalisée 8 h après l'injection. L'euthanasie est réalisée 24 h après et les tissus sont analysés par un marquage Hématoxyline-Eosine (HE) qui permet d'observer la morphologie des cellules. Les auteurs montrent que les tissus des groupes contrôles (injection de sérum physiologique et exposition au champ ou injection de particules seules) sont normaux alors que les tissus soumis à l'injection des particules et au champ magnétique semblent détruits. L'effet est maximisé pour la plus haute fréquence (20 Hz) ainsi que pour la plus haute amplitude de champ (20 mT).

Des tests *in-vivo* ont été réalisés par Zamay et al. par l'injection de cellules d'adénocarcinome dans la cuisse de souris. 1 h après l'injection intra-tumorale des particules (nanodisques de nickel), les souris sont soumises à un champ de 100 Oe = 10 mT à 100 Hz pendant 10 min. Les échantillons sont prélevés 4 h après l'application du champ. L'analyse des coupes histologiques montre que l'injection des aptamères AS-9 et AS-14 conduit à la destruction des cellules cancéreuses mais que cet effet est accru lors de l'application du champ magnétique (Zamay et al. 2016). Le suivi de la taille de la tumeur par de simples photographies lors d'un traitement (injection de particules et/ou aptamères + application du champ) répété 3 fois en 3 jours montre que les aptamères seuls ne permettent pas de réduire le volume de la tumeur. L'application du champ sur des particules non fonctionnalisées provoque une destruction de la tumeur mais aussi des muscles et de l'épithélium causant une nécrose des tissus. Ces phénomènes sont aussi visibles après l'application du champ sur des particules fonctionnalisées mais apparaissent à partir du 3^{ème} jour de traitement sur l'exemple montré ici. Il est cependant difficile de distinguer la tumeur sur les photographies présentées (1 par condition) et l'absence de quantification de taille ou de volume ne permet pas de convenablement différencier les effets entre les différentes conditions.

Dans une approche différente, l'application d'un gradient de champ est étudiée (Brossel et al. 2016). Les nanoparticules de fer sont injectées avec les cellules cancéreuses en sous-cutané. Un gradient de champ est appliqué à partir du 18^{ème} jour pendant 2 h et répété durant 21 jours. Les auteurs montrent une réduction significative du volume de la tumeur, comparé aux contrôles.

III. Description du projet

L'objectif de cette étude est de développer une nouvelle thérapie pour traiter en particulier le glioblastome. Pour cela, nous avons développé des microparticules magnétiques afin de les mettre en contact avec les cellules cancéreuses. En appliquant un champ magnétique rotatif, les particules sont mises en rotation ou en vibration. L'effet attendu est une diminution de la viabilité cellulaire due au stress mécanique ainsi subi par les cellules.

La diversité de paramètres utilisés dans les différentes études et les résultats obtenus qui ne sont pas toujours en corrélation avec ces choix ne permet pas de statuer facilement sur les paramètres optimaux à utiliser. En partant de paramètres déjà utilisés dans des études précédentes, nous allons faire varier certains des paramètres pour choisir la meilleure combinaison.

Dans certaines tumeurs, un phénomène nommé effet EPR (pour *Enhanced Permeability and Retention effect*) entraîne une accumulation de certaines molécules dans le tissu tumoral. Cet effet est dû à la formation rapide des vaisseaux sanguins à proximité des tissus tumoraux, dont les parois laissent pénétrer les éléments inférieurs à 500 nm. Les plus petites molécules traversent rapidement les tissus tumoraux et sont de nouveau libérées dans la circulation sanguine alors que les éléments plus gros se retrouvent bloqués dans les tumeurs. Certains médicaments ou particules de thérapie sont alors naturellement absorbés par les tumeurs. Dans le cas du glioblastome et des cancers du cerveau, la barrière hémato-encéphalique ne laisse entrer que les plus petites molécules, et empêchent donc la plupart des médicaments ou particules de thérapie d'atteindre la zone tumorale. Les particules que nous souhaitons utiliser ne pourraient pas traverser la barrière hémato-encéphalique. Pour cette raison, nous envisageons une injection directement au cœur de la tumeur.

Pour maximiser l'effet que peuvent induire les particules sur les cellules, nous choisissons d'utiliser des particules de forme anisotrope et présentant une faible rémanence. Le chapitre 2 présente la méthode de fabrication des particules par une approche *top-down*. Le premier choix s'est porté sur des vortex de permalloy. Les caractéristiques de ces particules ont ensuite été étudiées. Les questionnements posés au cours de l'étude nous ont incités à fabriquer et étudier deux nouveaux types de particules : des particules en permalloy de forme elliptique qui garde une configuration en vortex et des particules multicouches de Co/Pt à aimantation perpendiculaire en forme de disque. Les caractérisations magnétiques de ces particules seront discutées dans le chapitre 2.

L'étude *in-vitro* de l'effet des disques de permalloy sur des cellules de glioblastome humain est présentée dans le chapitre 3. Des tests de toxicité ont tout d'abord été effectués pour vérifier que les particules seules n'ont pas d'effet létal sur les cellules. Nous avons ensuite étudié les interactions entre

les particules et les cellules, et notamment l'internalisation possible des particules par les cellules. Pour évaluer l'impact du TEMMP sur les cellules, le champ magnétique rotatif est appliqué grâce à un cylindre de Halbach en rotation. Seront présentés l'efficacité du traitement en faisant varier la fréquence, l'amplitude du champ, la durée d'application du champ et la quantité de particules. Le devenir des cellules les jours suivants le traitement a également été étudié.

L'étude *in-vivo* réalisée sur un modèle orthotopique de glioblastome chez la souris nude est présentée dans le chapitre 4. Seront d'abord évoqués les problématiques liées à l'injection des particules au sein de la tumeur et les mises au point réalisées pour y parvenir. La toxicité de l'injection des particules ainsi que l'efficacité du TEMMP sont évalués par des marquages et deux études de survie. Dans une volonté d'utiliser un modèle plus pertinent pour définir les paramètres à utiliser, nous avons développé une méthode de culture *in-vitro* 3D pour mimer les propriétés mécaniques du cerveau. La mise au point de la méthode ainsi que des pistes d'optimisations du TEMMP seront présentées en fin de chapitre.

Pour finir, le chapitre 5 permettra de conclure sur cette étude et de proposer des perspectives.

Chapitre 2

Fabrication et caractérisation des particules magnétiques

I. Introduction

La première étape de notre étude consiste en la fabrication des particules magnétiques. Ces particules ont été choisies pour répondre à différents critères, nécessaires à leur application *in-vitro* et *in-vivo*.

L'objectif de notre étude étant d'exercer une force mécanique sur les cellules, les particules doivent être capables de réagir mécaniquement lors de l'application d'un champ magnétique externe. Dans le cas de particules sphériques de composition homogène possédant une faible anisotropie magnétocristalline, telles que celles fréquemment utilisées pour des applications biomédicales et très répandues dans le commerce, l'application d'un champ magnétique rotatif entraînerait la rotation de l'aimantation de la particule à l'intérieur de la particule, sans permettre un réel mouvement de celle-ci. Si la particule présente une anisotropie magnétocristalline suffisamment forte, l'application d'un champ magnétique rotatif peut entraîner la rotation de la particule sur son axe. Cependant, avec les matériaux biocompatibles comme la magnétite ou la maghémite par exemple, et du fait du caractère polycristallin de ces matériaux, l'anisotropie magnétocristalline effective des particules est en général faible, ne créant qu'une faible force mécanique sur les cellules avoisinantes. Face à ce constat, il est plus efficace de travailler avec des particules présentant une anisotropie de forme afin que l'application d'un champ magnétique rotatif produise un couple mécanique important sur la particule.

Le comportement des particules en suspension est un point très important lorsque les particules sont utilisées pour des applications biomédicales. En effet, il est nécessaire que les particules ne s'agglomèrent pas lorsqu'elles sont dispersées dans un liquide, et qu'elles se redispersent d'elles-mêmes après l'arrêt du champ magnétique pour éviter qu'elles ne forment des amas dans les tissus. Ces caractéristiques sont reliées à la rémanence qui doit être proche de zéro et à la susceptibilité qui doit être inférieure à une valeur seuil, comme nous allons le voir dans les paragraphes suivants.

Un des critères les plus importants concernant les particules pour des applications biomédicales est leur biocompatibilité. Les oxydes de fer, naturellement métabolisés par le corps, sont de très bons candidats en termes de biocompatibilité et de biodégradabilité. Cependant, lorsque ceux-ci ne peuvent être utilisés et sont remplacés par des matériaux moins biocompatibles, comme c'est le cas dans notre application, une solution alternative tel qu'un recouvrement des particules par une couche d'or est une bonne alternative.

Un élément qui peut être intéressant est la fonctionnalisation, spécifique ou non, des particules. La fonctionnalisation spécifique correspond au greffage d'éléments chimiques destinés à se lier à des antigènes ou récepteurs présents en grandes quantités sur les entités biologiques que l'on cherche à cibler. La fonctionnalisation est couramment réalisée sur des surfaces d'or et très bien décrite dans la littérature (Dreaden et al. 2012).

Concernant la taille des particules, il est nécessaire que les particules soient de taille suffisante pour exercer une force suffisante sur les cellules, mais qu'elles ne soient pas non plus trop grosses pour permettre leur utilisation *in-vitro* et *in-vivo*. Les cellules humaines ont une taille moyenne de 10 à 100 μm . Dans la littérature discutant une taille de particules adéquates pour des applications biomédicales, différents articles s'intéressent particulièrement aux particules injectées en intraveineux. En effet, la taille des particules influe sur l'obstruction des vaisseaux (Decuzzi et al. 2010) et la diffusion hors des vaisseaux (Hobbs et al. 1998). Comme cela a déjà été évoqué, la barrière hémato-encéphalique empêche aussi aux particules de pénétrer dans le cerveau. Pour cette raison, nous envisageons une injection intra-tumorale. Les limites concernant la taille des particules sont alors liées à l'injection des particules, à la diffusion dans la tumeur et aux interactions avec les cellules. Nous nous sommes donc intéressés à des particules de l'ordre du micron.

Afin de répondre à toutes ces spécifications, le laboratoire SPINTEC a développé et breveté une technique permettant de fabriquer sur substrat de silicium des particules facilement détachables de leur support, dont la forme, la taille et les matériaux sont contrôlés précisément (FR2958791 (A1) – 2011-10-14).

II. Fabrication des particules

Les particules magnétiques utilisées dans le cadre de notre étude ont été fabriquées grâce à une technique couramment utilisée en microélectronique. Il s'agit d'une approche « *top-down* » de lithographie optique. Le procédé, résumé en Figure 7 et détaillé en annexe I, est réalisé à partir d'un *wafer* (substrat) de silicium qui sert de support et se déroule en trois étapes principales détaillées dans la suite du manuscrit : une première étape de lithographie, une étape de dépôt du matériau et une étape de *lift-off* pour enlever les matériaux inutiles. La précision recherchée et la taille nanométrique souhaitée imposent que le procédé soit réalisé en salle blanche (Plateforme PTA). Pour maximiser la production de particules, des *wafers* 4 pouces (environ 10 cm de diamètre), correspondant à la taille maximale compatible avec les différents outils nécessaires, sont utilisés. Le procédé permet de produire environ 1 mg de particules par *wafer*, correspondant à environ $8,3 \cdot 10^8$ particules.

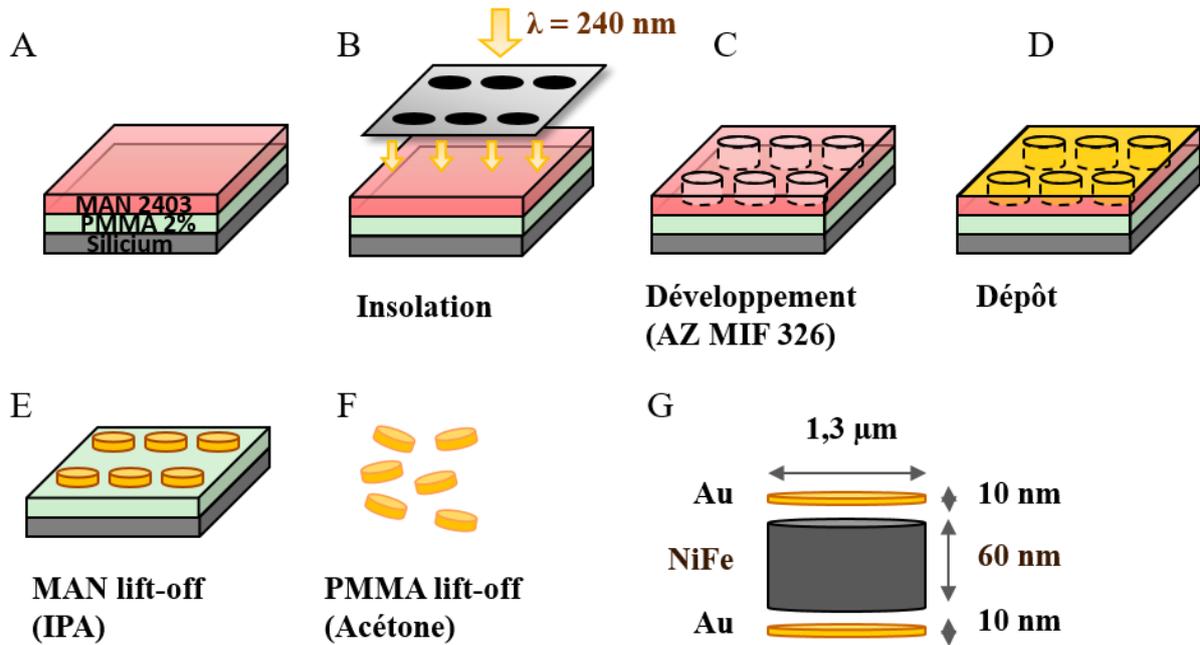


Figure 7 : Schéma de principe du procédé de fabrication des particules ; A/ Dépôt des résines PMMA 2% et ma-N 2403 ; B/ Insolation de la résine avec un masque ; C/ Développement ; D/ Dépôt des matériaux ; E/ Lift-off à l'isopropanol ; F/ Mise en suspension des particules par dissolution de la PMMA ; G/ Schéma d'une particule à la fin du procédé.

Lithographie optique

L'objectif de cette étape est d'obtenir un réseau de puits sur le *wafer* qui serviront de moules pour le dépôt des particules. Pour cela, deux couches de résine sont déposées à l'aide d'une tournette (Figure 7A). La première couche sacrificielle est de la PMMA (poly(méthacrylate de méthyle)) à 2 % dans une solution aqueuse, plus connue sous le nom de plexiglass. La deuxième résine utilisée est de la ma-N 2403. Cette résine photosensible est dite négative, c'est-à-dire que les zones insolées se solidifient. Une insolation est donc effectuée par un appareil MJB4-Deep UV à une longueur d'onde de 240 nm pendant 2,2 s en utilisant un masque qui va protéger certaines zones des rayons (Figure 7B). Les zones protégées sont en forme de disques de 1,3 µm de diamètre ; elles correspondent au futur emplacement des particules. La ma-N 2403 est ensuite développée avec une solution aqueuse de TMAH (*TetraMethylAmmonium Hydroxide*) à 2,38 % (AZ 326 MIF) afin de dissoudre les zones qui n'ont pas été insolées, c'est-à-dire les zones en forme de disque (Figure 7C). La surface est nettoyée à l'aide d'un jet d'eau pour enlever toute trace de développeur.

A cette étape, le *wafer* de silicium est donc recouvert d'une couche de PMMA 2% intacte et d'une couche de ma-N 2403 présentant un réseau de puits de 1,3 µm de diamètre et espacés de 3 µm bord à bord, de profondeur égale à l'épaisseur de la ma-N 2403, soit environ 300 nm.

Dépôt des matériaux par évaporation

Les puits vont maintenant servir de moules pour les particules. Les trois matériaux sont déposés successivement en trois couches : une première couche d'or de 10 nm d'épaisseur, la couche ou multicouches de matériau magnétique, et une dernière couche d'or de 10 nm (Figure 7D). Plusieurs types de matériaux magnétiques sont étudiés pour cette étude. Nous considérerons tout d'abord les couches magnétiques de permalloy (alliage de nickel-fer : $\text{Ni}_{80}\text{Fe}_{20}$) de 60 nm, et présenterons plus loin l'insertion de différents matériaux magnétiques, tels que des multicouches de CoPt. L'or et le permalloy sont déposés par évaporation à une vitesse de 0,25 nm/s. Ce processus consiste à chauffer par bombardement électronique une cible de matériau dans une enceinte sous vide pour que le matériau s'évapore et se recondense sur le substrat. L'avantage de l'évaporation par rapport à d'autres techniques de dépôt en phase vapeur (comme la pulvérisation cathodique, par exemple) est que le dépôt est plus directif ce qui facilite le remplissage des puits dans la ma-N 2403 et ensuite le *lift-off*.

Lift-off de la première résine

Un *lift-off* avec de l'isopropanol permet de dissoudre la ma-N 2403 sans altérer la couche sacrificielle de PMMA, mais aussi d'éliminer les matériaux déposés dessus et donc de révéler les particules produites. Les particules sont alors encore attachées à la couche de PMMA sur le *wafers* et forment un réseau de plots (Figure 7E).

Mise en suspension

Les particules sont finalement mises en suspension par dissolution de la PMMA avec de l'acétone (Figure 7F). L'intérêt d'utiliser deux couches de résine est donc de pouvoir dissoudre la couche inférieure pour libérer les particules dans un liquide, étape beaucoup plus difficile à réaliser si le matériau est déposé directement sur le substrat de silicium. La mise en suspension est réalisée juste avant l'utilisation des particules, celles-ci se conservant très bien lorsqu'encore attachées sur substrat.

III. Caractérisation des particules magnétiques

III.1. Caractérisation physico-chimique

Un Microscope Electronique à Balayage (MEB) est utilisé afin de vérifier la taille et la forme des particules. Des exemples d'images obtenues sont donnés en Figure 8.

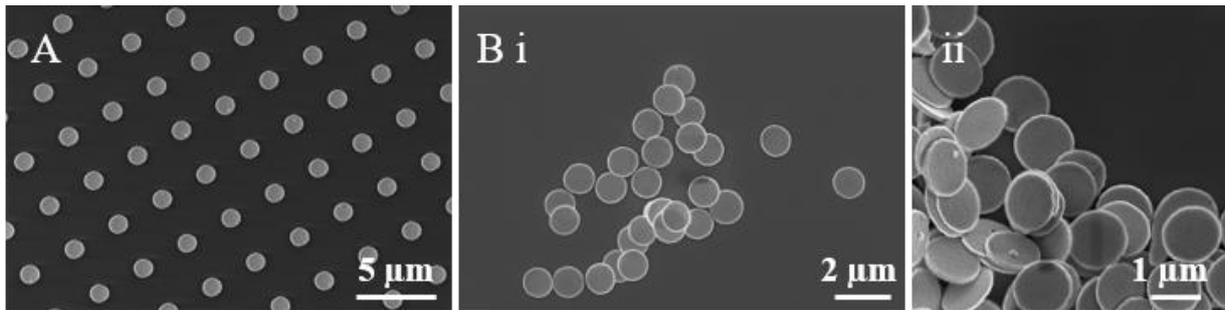


Figure 8 : Observation par MEB des particules A/ sur la résine de PMMA ; B/i&ii déposées sur un substrat après mise en suspension.

La Figure 8A montre le réseau de particules obtenu après le *lift-off* de la ma-N 2403 (Figure 7E). La taille des particules est légèrement supérieure à la taille des motifs du masque : le diamètre moyen est de 1,35 µm contre 1,3 µm de diamètre des motifs. Cet écart est en accord avec la précision attendue du procédé de fabrication.

Il est possible d'observer les particules libérées après dissolution de la PMMA au MEB (Figure 8B). Les particules sont transférées dans de l'éthanol puis une goutte est déposée sur un substrat. Après évaporation de l'éthanol, l'échantillon peut être observé. Les particules obtenues après libération sont des disques de tailles régulières et identiques à l'étape précédente et elles ne présentent pas de résidus de résine. Les acquisitions révèlent l'épaisseur très mince des particules (Figure 8B/ii).

La surface des particules et notamment la présence de charges électriques ont une importance pour les interactions avec les cellules. Il a par exemple été démontré que des particules chargées positivement ont un taux d'absorption par les cellules plus importants que les particules neutres ou chargées négativement, du fait de la charge négative des membranes cellulaires (Oh and Park 2014; Zhou et al. 2017). La charge de nos particules a été évaluée par mesure du potentiel zêta (Figure 9). Le potentiel zêta représente la différence de potentiel entre le milieu de dispersion et la limite extérieure de la couche dense d'ions accrochés à la surface de la particule (Bhattacharjee 2016).

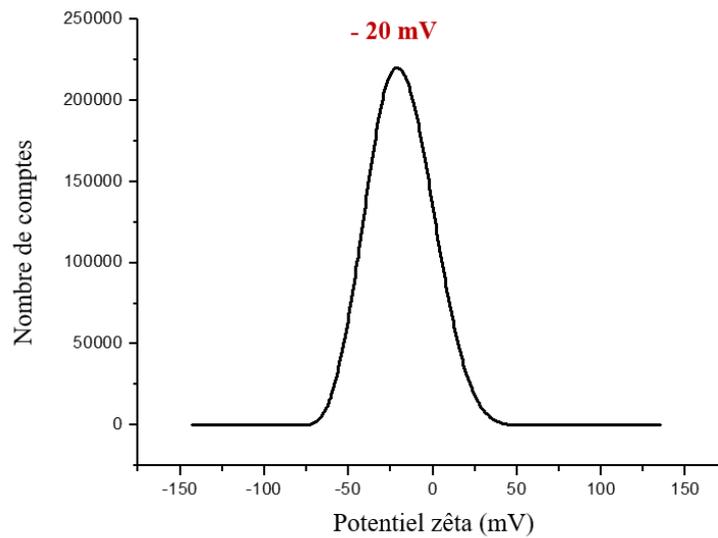


Figure 9 : Mesure du potentiel zêta des particules de permalloy, réalisée sur 10 expériences par Monica Focsan et Dumitrita Olivia Rugina du Nanobiophotonics Laboratory, Roumanie.

Les mesures effectuées nous donnent un potentiel zêta de -20 mV, nos particules sont donc chargées négativement. Bien qu'une charge positive permette de meilleures interactions avec les cellules, la charge négative de nos particules va quand même permettre des interactions avec les cellules. Notamment, la vitesse d'internalisation est plus rapide pour les particules chargées (positivement ou négativement) que pour les particules neutres (Oh and Park 2014).

III.2. Caractérisation magnétique

Le comportement des particules en réponse à l'application du champ magnétique a été étudié d'abord lorsque les particules sont attachées au substrat. Ces propriétés magnétiques sont déterminées par les propriétés intrinsèques du matériau constitutif des particules (constante d'échange, anisotropie magnéto-cristalline), par la forme des particules (disque, ellipse, taille, épaisseur) et par les interactions magnéto-statiques entre particules. Afin de caractériser ces propriétés nous utilisons une technique d'imagerie par Microscopie à Force Magnétique (MFM) qui permet de révéler les domaines magnétiques des particules et une technique de mesure par magnétomètre vibrant (VSM pour *Vibrating Sample Magnetometer*) qui permet de mesurer l'aimantation d'un échantillon en fonction du champ appliqué. Dans un deuxième temps, leur comportement en solution sera caractérisé.

Imagerie par Microscopie à Force Magnétique

Le principe du MFM est proche de celui d'un Microscope à Force Atomique (AFM) à ceci près que la force qui génère les mouvements de la pointe du microscope est d'origine magnétique. Un AFM permet d'analyser la topographie d'un échantillon à l'aide d'une pointe qui balaye la surface. Dans le cas d'un MFM, la pointe magnétique survole la surface à une hauteur donnée et réagit à l'attraction ou la répulsion entre la pointe et le champ de fuite produit par l'échantillon. Le MFM utilisé pour nos observations est un Digital Instrument Dimension 3100 Nanoscope IV avec une pointe « *low moment* » de Co-Cr. Lors de l'analyse, la pointe survole l'échantillon à 40 nm en mode sans-contact.

La Figure 10 montre l'acquisition au MFM d'une particule de permalloy. Une zone plus claire peut être observée au centre de la particule, il s'agit du cœur de vortex.

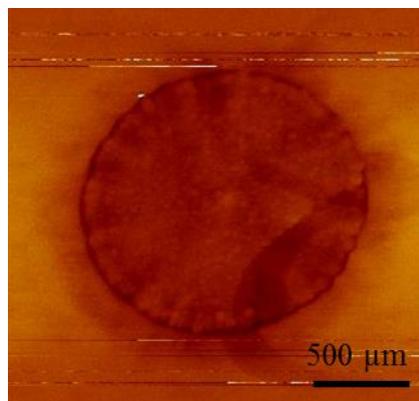


Figure 10 : Image MFM d'une particule de permalloy.

Compte-tenu de leurs dimensions et rapports de forme, les particules de permalloy présentent ici une configuration en vortex : en l'absence de champ magnétique, la minimisation de l'énergie magnétique totale impose que les moments magnétiques s'enroulent dans le plan de la particule autour de son centre, zone de dimensions très réduites appelée cœur de vortex où le moment magnétique est perpendiculaire au plan de la particule (Cowburn et al. 1999; Leulmi et al. 2015). Lors de l'application d'un champ magnétique externe dans le plan de la particule, le cœur de vortex est poussé jusqu'à sortir de la particule (Figure 11). Le champ nécessaire à ce phénomène s'appelle le champ d'annihilation. Les moments magnétiques perdent alors leur configuration en cercle et sont orientés parallèlement au champ dans l'état saturé. Lorsque le champ appliqué est ramené à zéro, le cœur de vortex réapparaît pour un champ appliqué appelé champ de nucléation, inférieur au champ d'annihilation.

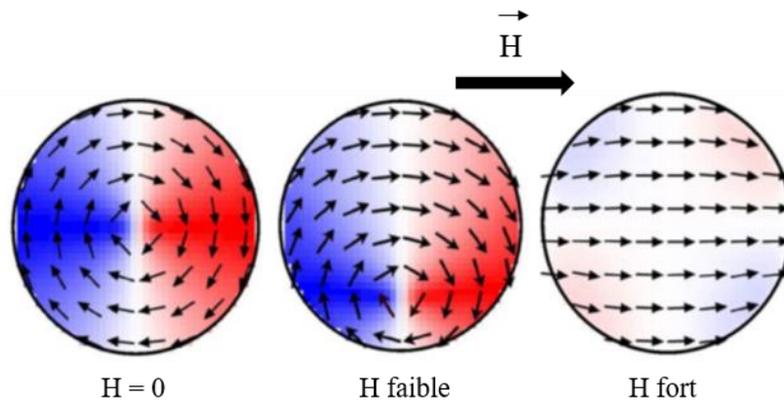


Figure 11 : Représentation schématique des moments magnétiques d'une particule de vortex magnétique. Les moments magnétiques sont en cercle autour du cœur de vortex, au centre de la particule. Lors de l'application d'un champ magnétique externe, le cœur de vortex est poussé transversalement à la direction du champ appliqué et est expulsé de la particule au-delà du champ d'annihilation. L'aimantation de la particule est alors saturée, parallèlement au champ appliqué.

Caractérisation au VSM

Les propriétés magnétiques des particules telles que la susceptibilité ou la rémanence sont mesurées avec un VSM Micro-Sense. L'échantillon est mis en vibration pendant l'application d'un champ magnétique externe. D'après la loi de Faraday, les changements de flux magnétique alors provoqués dans des bobines de détection situées à proximité de l'échantillon produisent une force électromotrice qui permet de remonter à son aimantation. La mesure est réalisée en faisant varier le champ magnétique appliqué : un cycle d'hystérésis donnant l'aimantation en fonction du champ appliqué est obtenu (Figure 12). La mesure est réalisée sur un échantillon de 0,5 cm * 0,5 cm lorsque les particules sont encore attachées au *wafér*. L'échantillon est placé à l'extrémité d'une canne et inséré dans l'entrefer de l'électroaimant qui crée un champ magnétique pouvant varier de -1,7 T à 1,7 T. La canne est alors mise en vibration. La mesure est ici faite « en parallèle » : le plan du *wafér* est parallèle à la direction du champ. Pour une meilleure précision, le pas de variation du champ magnétique est choisi plus faible au niveau de la zone d'intérêt, c'est-à-dire au voisinage de 0 T et au voisinage du champ de saturation.

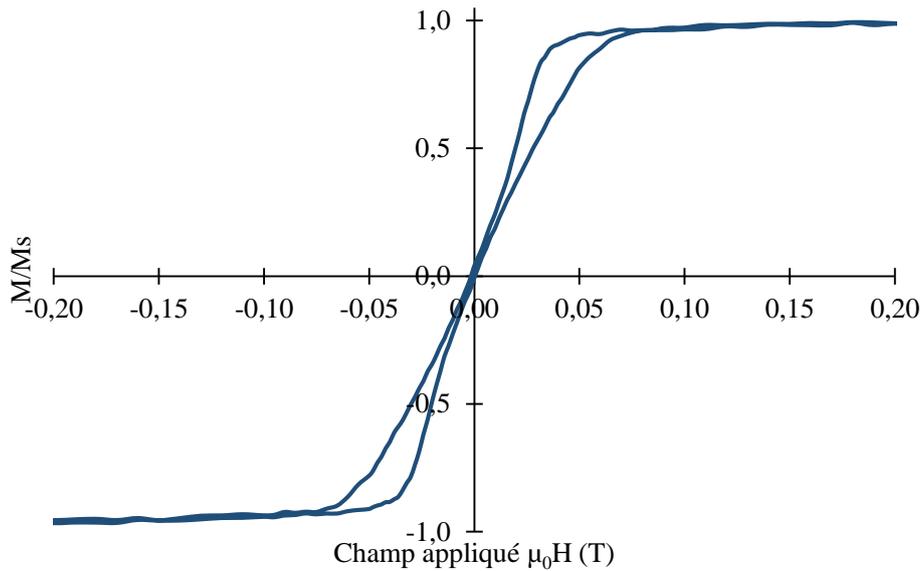


Figure 12 : Cycle d'hystérésis de l'aimantation en fonction du champ appliqué dans le plan, mesuré au VSM pour des particules de permalloy, moyenne de 7 échantillons.

Les particules de permalloy présentent une rémanence quasi-nulle et un comportement linéaire pour de faibles valeurs de champ. Ces propriétés des particules de permalloy sont proches des propriétés des particules superparamagnétiques, avec cependant une susceptibilité initiale ($\sim 19,6$ en unités SI) et un volume magnétique plus importants. La forme du cycle présentée en Figure 12 coïncide avec la configuration en vortex des particules de permalloy, déjà observée au MFM. Lorsque qu'aucun champ n'est appliqué, le moment magnétique total de la particule est nul ; après application d'un champ magnétique la particule s'aimante. Une saturation est observée à partir de 80 mT. Ce champ, correspondant sur le cycle d'hystérésis à la fin du régime linéaire lorsque le champ appliqué augmente, est le champ d'annihilation. Il est supérieur au champ de nucléation (champ magnétique nécessaire pour renucléer le cœur de vortex dans la particule) qui correspond à la fin du régime saturé pour des valeurs de champ appliqué décroissantes. Les propriétés des particules de permalloy imitent donc les propriétés des particules superparamagnétiques que sont une aimantation nulle à champ nul et une capacité à se polariser sous champ.

La susceptibilité initiale calculée d'après le cycle d'hystérésis est cohérente à la fois avec des mesures effectuées dans de précédentes études (Leulmi et al. 2013) et avec le modèle théorique de Gusliencko et al. (Gusliencko et al. 2001). La Figure 13 montre différentes valeurs de susceptibilité initiale (en SI) en fonction du rapport de forme $\beta = \text{épaisseur}/\text{rayon}$.

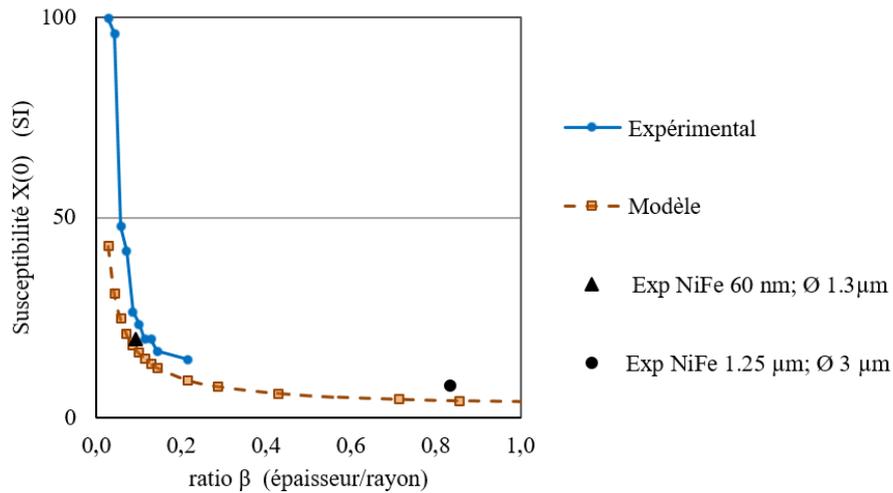


Figure 13 : Susceptibilité initiale $\chi(0)$ en fonction du ratio β (épaisseur/rayon) mesurée pour nos particules (triangle noir), et pour des particules de taille supérieure avec $\beta=0.83$ (point noir). La courbe bleue correspond à des mesures précédemment effectuées sur des particules de permalloy de différentes épaisseurs (Leulmi et al. 2013). La courbe orange est calculée théoriquement selon le modèle de Gusliencko et al. (Gusliencko et al. 2001; Leulmi et al. 2013).

Les valeurs de susceptibilité initiale $\chi(0)$ ont été calculées à partir des cycles d'hystérésis des vortex de permalloy, le champ étant appliqué dans le plan. La valeur de susceptibilité pour nos particules est un peu plus faible que les résultats précédemment obtenus (Leulmi et al. 2013) ce qui est interprété par les effets d'interaction magnétostatique entre particules. En effet, ces interactions tendent à renforcer le champ local agissant sur une particule donnée du fait de la polarisation des particules voisines.

Les susceptibilités expérimentales sont comparées au modèle de Gusliencko et al, $\chi(0)$ étant exprimée en fonction du facteur de forme $\beta = \text{épaisseur/rayon}$ de la particule en unités SI, selon la formule ci-dessous (Gusliencko et al. 2001) :

$$\chi(0) = 4\pi * \left[2\beta \left(\ln \left(\frac{8}{\beta} \right) - \frac{1}{2} \right) \right]^{-1}$$

Pour nos particules avec $\beta = 0,09$, la susceptibilité théorique est de 17,7. La susceptibilité de nos particules ($\chi(0) = 19,6$) correspond bien à l'ordre de grandeur attendu pour un vortex.

Pour vérifier la validité du modèle pour un rapport de forme plus élevé, une mesure est effectuée sur des particules de taille supérieure (3 μm de diamètre et 1,25 μm d'épaisseur) avec un rapport de forme $\beta = 0,83$. La susceptibilité initiale obtenue est ici encore proche de la théorie. Le petit décalage avec la courbe théorique, déjà observé avec nos particules, s'interprète comme expliqué ci-dessus par un couplage magnétostatique inter-disques dans le plan (Gusliencko et al. 2001). Le décalage plus important pour les particules de taille supérieure qu'avec nos particules pourrait s'expliquer par la distance séparant les particules qui est beaucoup plus faible pour les plus grosses particules que pour nos particules qui sont espacées de 3 μm .

III.3. Comportement en suspension

La configuration en vortex des particules de permalloy leur confère donc un comportement de type superparamagnétique avec une faible rémanence, ayant pour avantage de ne pas s'agglomérer en suspension et de permettre leur redispersion après application d'un champ magnétique. Cependant, une étude menée à SPINTEC a montré qu'une faible rémanence ne suffit pas à éviter les agglomérations en suspension (Joisten et al. 2010). En effet, un phénomène d'autopolarisation de particules a été observé et modélisé. Nous observons que lors de l'application d'un champ, les particules aimantées forment des chaînes, alignées dans le sens du champ, et pouvant contenir plusieurs dizaines de particules. Pour permettre la redispersion des particules après l'arrêt du champ, la susceptibilité doit rester inférieure à un certain seuil. L'équation de la susceptibilité seuil s'obtient en combinant l'équation du moment magnétique d'une particule en fonction du champ magnétique appliqué avec celle exprimant le champ de fuite des particules polarisées voisines perçu par une particule donnée (Joisten et al. 2010) :

$$\chi_{seuil} = \frac{16K}{\left(\sum_{k=1}^N \frac{1}{k^3}\right) \times \beta}$$

avec K un facteur numérique compris entre 1 et 4 prenant en compte le fait que le champ de fuite perçu par une particule peut être réduit si les particules ne sont pas parfaitement alignées, N le nombre de particules dans la chaîne et β le ratio épaisseur / rayon. L'équation nous montre que χ_{seuil} est indépendante du matériau, dépendante de la géométrie et des dimensions des particules en chaînes. Au-delà de χ_{seuil} , le champ perçu par une particule correspondant au champ de fuite des particules voisines suffit à maintenir l'aimantation de la particule. Dans ce cas, les particules restent alors en chaînes après l'arrêt du champ. Dans le cas de nos particules de permalloy en vortex, la susceptibilité (calculée à 19,6) reste bien inférieure à ce seuil (150 pour $K = 1$) et les particules sont capables de se redisperser.

Expérimentalement, la non-agrégation des particules a été vérifiée en appliquant un champ sur des particules en suspension (Leulmi et al. 2013). Les résultats sont donnés en Figure 14.

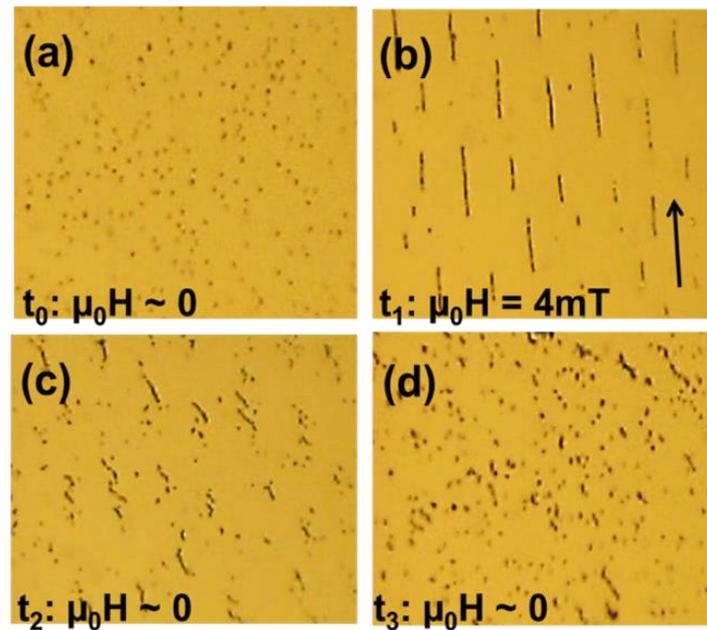


Figure 14 : Images au microscope optique de particules de permalloy A/ en suspension ; B/ soumises à un champ de 4 mT d'après l'orientation de la flèche ; C/ à un temps t_2 après arrêt du champ ; D/ à un temps t_3 après arrêt du champ (Leulmi, et al., 2013).

Les particules libérées en suspension ne s'agglomèrent pas et sont parfaitement dispersées (Figure 14A). Lorsqu'un champ magnétique est appliqué, les particules forment des chaînes alignées dans la direction du champ (Figure 14B). Lorsque le champ est coupé, les particules se redispersent spontanément grâce au mouvement brownien (Figure 14C&D).

De par le choix des matériaux magnétiques, leurs dimensions et rapports de forme, nos particules respectent les deux principaux critères nécessaires à leur utilisation pour une application biomédicale : leur (re-)dispersion en suspension en champ nul et la possibilité de les actionner efficacement à distance par un champ magnétique. Le premier critère est validé par le comportement de type superparamagnétique des particules, montré ci-dessus. Il permet une faible agglomération des particules et une bonne dispersion en suspension lorsqu'aucun champ n'est appliqué, condition nécessaire à une utilisation *in-vitro* et *in-vivo* des particules. Le deuxième critère est favorisé par la forte anisotropie magnétique de forme qui caractérise les particules réalisées par notre approche *top-down*. Dans le cas des vortex de permalloy, l'aimantation est fortement maintenue dans le plan de la particule, et a par ailleurs tendance à s'aligner sur le champ appliqué. Si la particule est libre de se mouvoir dans une solution liquide, elle est ainsi mise en rotation par le champ lorsqu'un champ rotatif est appliqué. Les particules réunissent donc les conditions nécessaires pour provoquer des vibrations sur les membranes cellulaires dans un cadre *in-vitro*.

IV. D'autres pistes de particules

Nous sommes donc capables de produire des particules qui répondent au cahier des charges défini. Si nous appliquons un champ magnétique rotatif, la particule va suivre ce champ et grâce à son mouvement, va pouvoir exercer une force mécanique sur les cellules avoisinantes. Cependant, dans le cas théorique où la rotation du champ appliqué est orientée dans le plan de la particule, l'aimantation de nos particules tournerait dans le plan de la particule en suivant le champ appliqué, sans entrainer de couple mécanique de la part de la particule. Afin de contrer cette éventualité, potentiellement envisageable pour les vortex de permalloy, nous avons travaillé sur deux types alternatifs de particules : les particules à anisotropie perpendiculaire et les particules elliptiques avec une configuration en vortex.

IV.1. Particules SAF à aimantation perpendiculaire

La première solution alternative aux vortex de permalloy est de produire des particules présentant une anisotropie hors du plan. Dans cette configuration, l'axe d'aimantation est perpendiculaire au plan de la particule. Une fois libérée en suspension, les particules seraient capables de suivre le champ dans toutes les directions de l'espace, leur aimantation perpendiculaire tendant à s'aligner avec le champ. Le risque que l'aimantation tourne dans une particule qui resterait alors immobile, est exclu, l'anisotropie perpendiculaire étant uni-axiale et non planaire. En plus de l'anisotropie perpendiculaire, une rémanence faible reste une condition nécessaire pour notre application.

Cette configuration magnétique peut être obtenue par des multicouches magnétiques couplées antiferromagnétiquement (SAF pour *Synthetic AntiFerromagnet*). Ce genre d'empilements est étudié depuis quelques décennies (Johnson et al. 1995), en particulier pour des applications dans la spintronique (Néel 1954; Krishnan et al. 2006; Dieny and Chshiev 2017; Prejbeanu et al. 2013) et notamment les mémoires magnétiques à accès aléatoire (MRAM) (Bandiera et al. 2010).

Dans ce type de multicouches, l'anisotropie magnétique perpendiculaire induite par les interfaces entre les couches de différents matériaux (en particulier Co/Pt) est suffisamment forte pour imposer la direction d'aimantation perpendiculaire. La condition d'aimantation moyenne nulle en champ nul est obtenue par le couplage antiferromagnétique (AF) des couches à travers une couche mince de ruthénium (Ru) d'épaisseur de l'ordre de 0,4 à 0,9 nm. En effet, grâce à ce couplage AF, il est possible de parfaitement compenser les aimantations des 2 couches magnétiques du SAF afin qu'aucun champ magnétique dipolaire ne soit rayonné par ce dernier. Il s'agit d'un couplage de type Ruderman-Kittel-Kasuya-Yosida (RKKY) (Ruderman and Kittel 1954; Yosida 1957; Kasuya 1956; Parkin, More, and

Roche 1990; Bruno and Chappert 1992), largement utilisé en spintronique, pour les matériaux d'aimantation perpendiculaire aussi bien que planaire.

Pour un TEMMP, des particules SAF ont été étudiées à l'université de Cambridge (Vemulkar et al. 2017; Mansell et al. 2017). Dans cette dernière référence, le matériau magnétique des particules est constitué de multicouches d'alliage $\text{Co}_{60}\text{Fe}_{20}\text{B}_{20}$ et de Pt, couplées AF via une couche de Ru. Des empilements comprenant 2 et 12 multicouches de CoFeB/Pt ont été réalisés.

Concernant notre étude, nous avons décidé de travailler sur des particules SAF composées de multicouches de cobalt / platine couplées AF à travers une ou trois couches de Ru, comme présenté schématiquement en Figure 15.

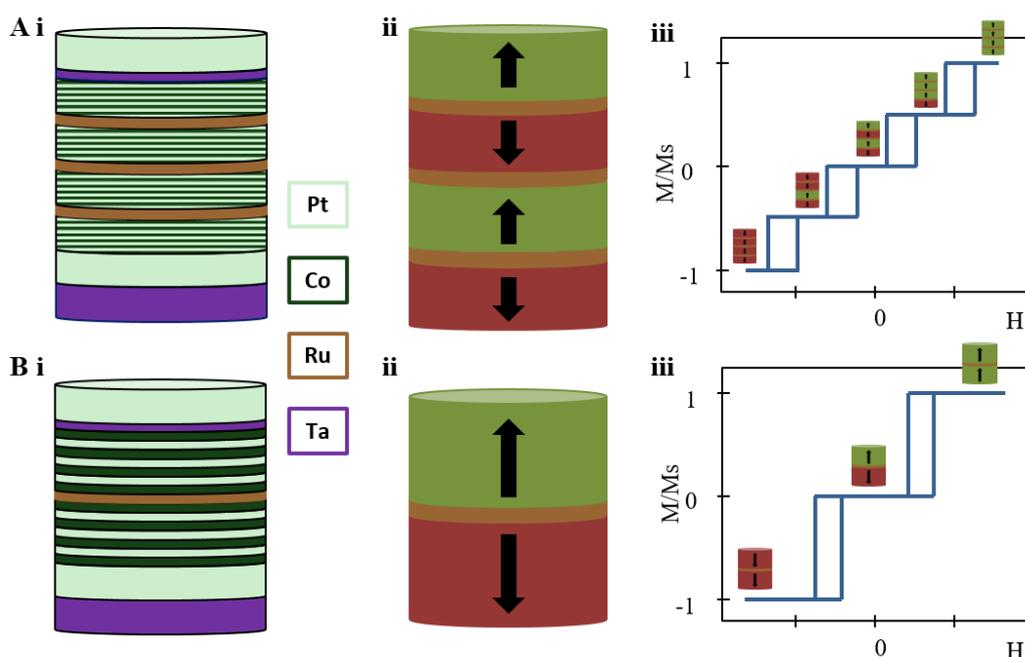


Figure 15 : Schémas des particules multicouches de Cobalt / Platine pour A/ trois couches de Ru avec la formule : $\text{Ta}_{30}/\text{Pt}_{50}/[(\text{Co}_{5}/\text{Pt}_{2,5})_{19}/\text{Co}_{5}/\text{Ru}_{9}]_3/(\text{Co}_{5}/\text{Pt}_{2,5})_{19}/\text{Co}_{5}/\text{Ta}_{10}/\text{Pt}_{20}$; B/ avec une couche de Ru pour $n = 3$ dans la formule : $\text{Ta}_{30}/\text{Pt}_{50}/(\text{Co}_{5}/\text{Pt}_{2,5})_n/\text{Co}_{5}/\text{Ru}_{9}/(\text{Co}_{5}/\text{Pt}_{2,5})_n/\text{Co}_{5}/(\text{Ta}_{10})/\text{Pt}_{20}$; ii/ schémas correspondants de la configuration magnétique attendue à rémanence ; iii/ cycle d'hystérésis attendu pour les deux types de particules si le retournement des aimantations de chaque multicouche était macrospin c'est-à-dire que chaque multicouche se comporte comme un seul bloc magnétique.

Le procédé de fabrication est le même que pour les particules de permalloy, excepté le dépôt qui se fait ici par pulvérisation cathodique. Un plasma d'argon est créé dans la chambre de dépôt par l'application d'une différence de potentiel entre la cible à pulvériser et les parois du bâti de dépôt. Les espèces positives du plasma sont attirées vers la cible, qui correspond ici à la cathode. La collision des espèces positives entraîne alors la pulvérisation des atomes de la cible, qui se déposent ensuite sur le substrat. Ces particules étant principalement étudiées pour leurs caractéristiques magnétiques, elles ne sont pas recouvertes avec de l'or.

Différents empilements à base de Co/Pt ont été étudiés. L'épaisseur de Ru a été ajustée pour obtenir le couplage antiferromagnétique souhaité (Bandiera et al. 2012; Cuchet et al. 2016). Le nombre de couches de Co/Pt a tout d'abord été choisi pour que le volume de matériau magnétique soit identique aux particules de permalloy. Pour cela, trois couches de Ru et 19 répétitions de Co/Pt dans chaque bloc ont été choisies (Figure 15A) selon la formule suivante (avec les épaisseurs notées en Angström (Å)) : Ta30/Pt50/[(Co5/Pt2,5)₁₉/Co5/Ru9]₃/(Co5/Pt2,5)₁₉/Co5/Ta10/Pt20. Pour comparaison, un empilement avec 79 répétitions de Co/Pt plus une couche de Co, pour un même nombre total de couches de Co mais sans Ru a été étudié : Ta30/Pt50/(Co5/Pt2,5)₇₉/Co5/Pt20. Ensuite, des empilements avec un nombre total réduit de couches de Co/Pt et une couche unique de Ru ont été étudiés avec la formule : Ta30/Pt50/(Co5/Pt2,5)_n/Co5/Ru9/(Co5/Pt2,5)_n/Co5/(Ta10)/Pt20 avec n = 3 ; 5 ; 7 ; 11 et 15 (Figure 15B).

La première couche de tantale est une couche d'accroche. Elle permet une croissance uniforme des matériaux déposés par-dessus. La première couche de platine déposée sur la couche de tantale sert de couche tampon et permet d'induire l'anisotropie magnétique perpendiculaire (Bandiera et al. 2012). L'interface entre le Co et le Pt est le moteur de l'anisotropie magnétique perpendiculaire (Johnson et al. 1995). L'alternance de couches de Co et de Pt permet alors d'augmenter le nombre d'interfaces et de favoriser l'aimantation perpendiculaire. La dernière couche de platine permet quant à elle d'éviter l'oxydation des échantillons.

Dans ce type de multicouches, l'anisotropie perpendiculaire induite par les effets d'hybridation électronique et de contraintes aux interfaces Co/Pt est suffisamment forte pour imposer la direction d'aimantation perpendiculaire (Daalderop, Kelly, and Schuurmans 1990). Le couplage RKKY entre les différentes couches permet d'obtenir une rémanence nulle lorsque le nombre de répétitions de Co/Pt est identique dans les deux couches situées de part et d'autre du Ru, comme c'est le cas pour nos empilements tels que présentés en Figure 15A/ii et B/ii. Dans la configuration avec une couche de ruthénium, l'application d'un champ magnétique perpendiculairement au plan de la particule et supérieur au champ de saturation, va entraîner l'alignement des deux aimantations. Le cycle d'hystérésis obtenu devrait alors être en palier tel que présenté en Figure 15B/iii. De manière similaire, pour les particules composées de 4 multicouches, l'aimantation devrait se retourner dans chacune des couches jusqu'à l'alignement de toutes les couches (Figure 15A/iii).

IV.1.1. Particules avec 80 répétitions de Co

L'étude porte tout d'abord sur une configuration avec 3 couches de Ru et un total de 80 couches de Co, réparties en quatre blocs avec chacune 19 répétitions de Co/Pt, plus une couche de Co. Pour

comparaison, un empilement de 80 couches de Co sans les couches de Ru est également réalisé, avec 79 répétitions de Co/Pt plus une couche de Co. Des dépôts pleine tranche sont tout d'abord étudiés. Les cycles mesurés sous l'application d'un champ magnétique perpendiculaire sont mesurés au VSM et donnés en Figure 16A. Les cycles mesurés sous l'application d'un champ magnétique planaire (Figure 16B) sont mesurés grâce à l'option VSM d'un PPMS (*Physical Property Measurement System*). Le champ est créé par une bobine supraconductrice et peut être appliqué jusqu'à 7 T.

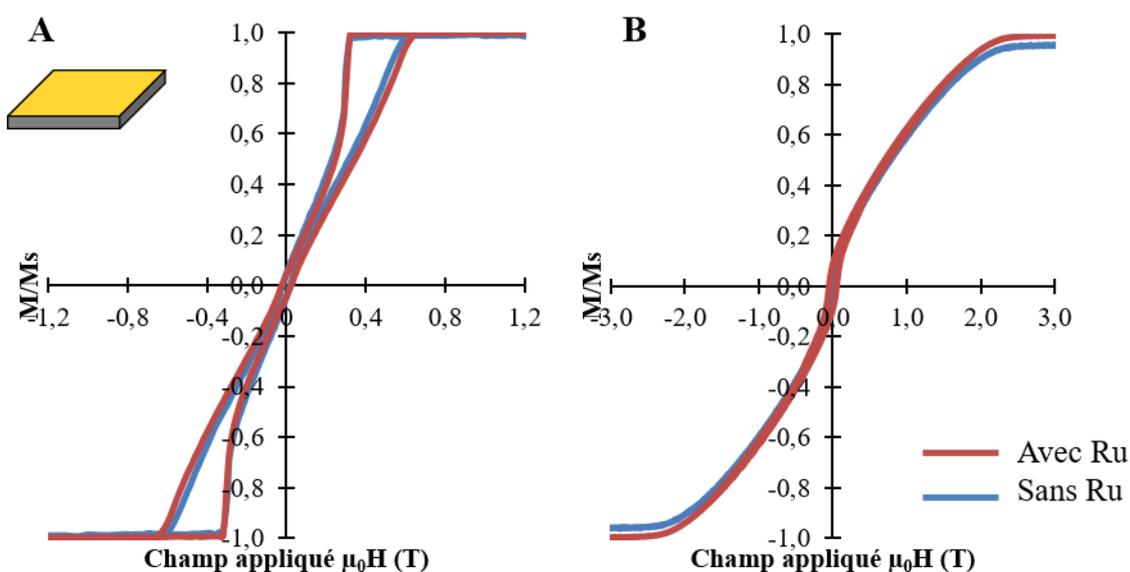


Figure 16 : Cycles VSM et PPMS de dépôts pleine tranche avec le champ appliqué A/ perpendiculairement et B/ en parallèle, avec en rouge le dépôt avec les trois couches de Ru selon la formule $Ta_{30}/Pt_{50}/[(Co_5/Pt_{2,5})_{19}/Co_5/Ru_9]_3/(Co_5/Pt_{2,5})_{19}/Co_5/Ta_{10}/Pt_{20}$ et en bleu sans les trois couches de Ru selon la formule $Ta_{30}/Pt_{50}/(Co_5/Pt_{2,5})_{79}/Co_5/Pt_{20}$. Les deux dépôts comportent au total 80 couches de Co.

Le cycle d'hystérésis des dépôts avec Ru en perpendiculaire ne correspond pas au comportement AF attendu (Figure 15A/iii). Au lieu d'une courbe en paliers, le cycle présente un comportement linéaire à champ faible. Une ouverture de cycle est observée. Conformément à ce qui était attendu, la rémanence est très faible ($\sim 5\%$ Ms). Le champ de saturation est comme attendu plus faible en configuration de champ perpendiculaire que planaire (champ de saturation d'environ 2,2 T en planaire contre environ 0,6 T en perpendiculaire) ce qui confirme l'existence d'une anisotropie perpendiculaire dans ces échantillons. Nous observons ici une grande similarité entre les cycles comprenant les couches de Ru et ceux n'en comprenant pas. La forme du cycle observé en configuration de champ perpendiculaire est en fait assez commune pour des multicouches magnétiques à anisotropie perpendiculaire (Hellwig et al. 2007).

Dans ce type de multicouches à anisotropie perpendiculaire, trois termes d'énergie jouent un rôle prédominant : l'énergie magnétostatique, l'énergie de parois de domaines et l'énergie de couplage antiferromagnétique entre multicouches à travers le Ru (Hellwig et al. 2007). Suivant les épaisseurs des

multicouches, l'épaisseur totale de matériau magnétique et le nombre de couches de Ru, une de ces énergies peut jouer un rôle mineur face aux deux autres.

C'est le cas pour les multicouches présentées en Figure 16A. Ici, le nombre de répétitions de couches de Co est très important (80) de sorte que l'énergie magnétostatique et l'énergie de parois dominant largement l'énergie de couplage AF à travers le Ru. De ce fait, les cycles avec et sans Ru sont très similaires. Le champ rayonné par les couches de Co les unes sur les autres tend à orienter verticalement les aimantations des couches de Co parallèles les unes aux autres dominant ainsi le couplage antiferromagnétique entre les blocs à travers le Ru. Le nombre de couches de Co/Pt est donc ici trop élevé pour que le couplage AF à travers le Ru joue un rôle apparent (Hellwig et al. 2007).

Cependant, la rémanence faible obtenue indique que la configuration magnétique n'est certainement pas monodomaine à champ nul. En effet, pour des raisons magnétostatiques, nous nous attendons à ce que le système se divise en domaines en bandes comme déjà souvent observé dans les multicouches à anisotropie perpendiculaire (Hellwig et al. 2007). Ceci va être confirmé ci-après par les caractérisations MFM de nos dépôts.

Nous étudions maintenant les particules composées de multicouches de Co/Pt avec trois couches de Ru. Les cycles d'hystérésis en champ perpendiculaire et parallèle sont présentés en Figure 17 pour le dépôt en pleine tranche (A) et sous forme de particules attachées au substrat (B).

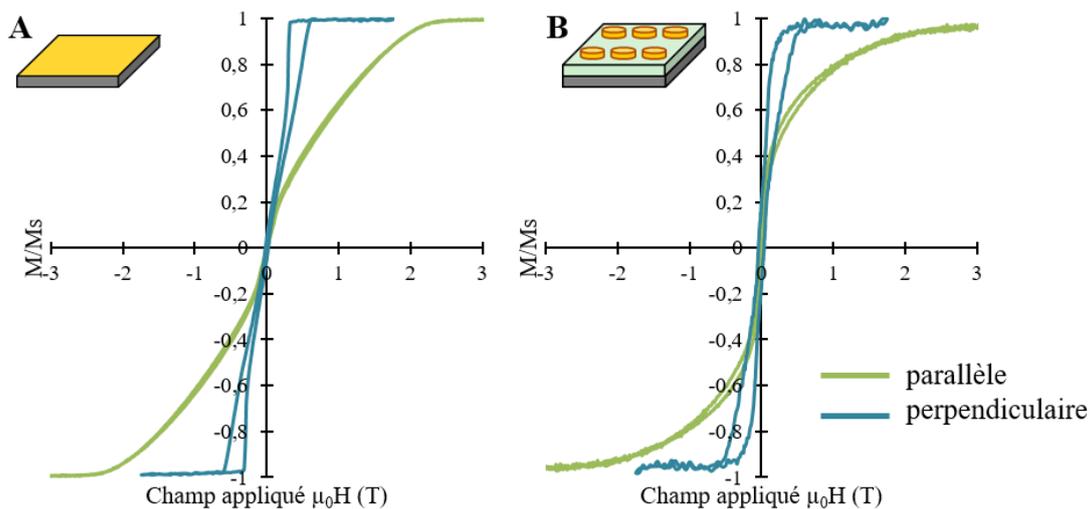


Figure 17 : Cycles d'hystérésis planaire (en vert) et perpendiculaire (en bleu) d'empilements avec trois couches de Ru et 4 blocs de 19 répétitions de Co/Pt plus une couche de Co, pour un total de 80 couches de Co selon la formule : $Ta_{30}/Pt_{50}/[(Co_5/Pt_{2,5})_{19}/Co_5/Ru_9]_3/(Co_5/Pt_{2,5})_{19}/Co_5/Ta_{10}/Pt_{20}$ pour A/ un dépôt pleine tranche et B/ des particules.

Les cycles des particules multicouches de Co/Pt sont très similaires à ceux des dépôts pleine tranche. Ici encore, le couplage AF entre les couches de Ru ne joue pas de rôle apparent dû au trop grand nombre

de couches de Co. Le bruit est cependant beaucoup plus fort car le volume magnétique total pour un échantillon de taille identique est nettement diminué. En effet, les particules ne recouvrent que 15 % de la surface du substrat.

Une légère augmentation de l'hystérésis est observée pour les dépôts en réseau de particules par rapport aux dépôts pleine tranche. Cela peut s'expliquer par la présence de défauts sur les tranches des particules qui peuvent encrer les parois de domaines.

Une diminution de l'aire comprise entre les cycles mesurés en champ perpendiculaire et planaire est observée pour les particules, comparée à l'aire des dépôts en pleine tranche. Cela traduit une diminution de l'énergie d'anisotropie pour les particules, comparée aux dépôts en pleine tranche. Ce phénomène est attendu si on considère la diminution de l'énergie magnétostatique par unité de surface dans le cas des particules. En effet, la variation d'énergie magnétostatique par unité de volume entre la saturation dans le plan et hors du plan est donnée (en SI) par : $\Delta E = \frac{1}{2} \mu_0 M_s^2 (N_{xx} - N_{zz})$, où $(N_{xx} - N_{zz})$ est la différence des coefficients de champ démagnétisant planaire et perpendiculaire. En première approximation, les coefficients de champ démagnétisant sont donnés par, $N_{zz} = 1 - t/l$ et $N_{xx} = t/(2 \cdot l)$, en notant t l'épaisseur et l la dimension latérale. De ce fait $\Delta E \sim -\frac{1}{2} \mu_0 M_s^2 (1 - \frac{3t}{2l})$.

Pour le dépôt pleine tranche, la dimension latérale est infinie de sorte que $\Delta E \sim \frac{1}{2} \mu_0 M_s^2$ alors que dans le cas des particules, la dimension latérale est réduite au diamètre des particules ce qui conduit à une valeur diminuée de l'anisotropie d'origine magnétostatique pour les particules par rapport au dépôt pleine tranche. Un arrondissement des cycles des particules par rapport au dépôt pleine tranche est aussi probablement dû aux différences de propriétés entre chacune des particules, conduisant à des effets de moyenne.

Des acquisitions au MFM sont réalisées pour observer et mieux comprendre la configuration magnétique des multicouches de Co/Pt (Figure 18). Les acquisitions MFM ont été réalisées sur les échantillons tels quel, n'ayant jamais été soumis à un champ magnétique. L'état des échantillons que nous observons ici n'est donc pas un état à rémanence mais avant première aimantation, que nous appellerons « état vierge ».

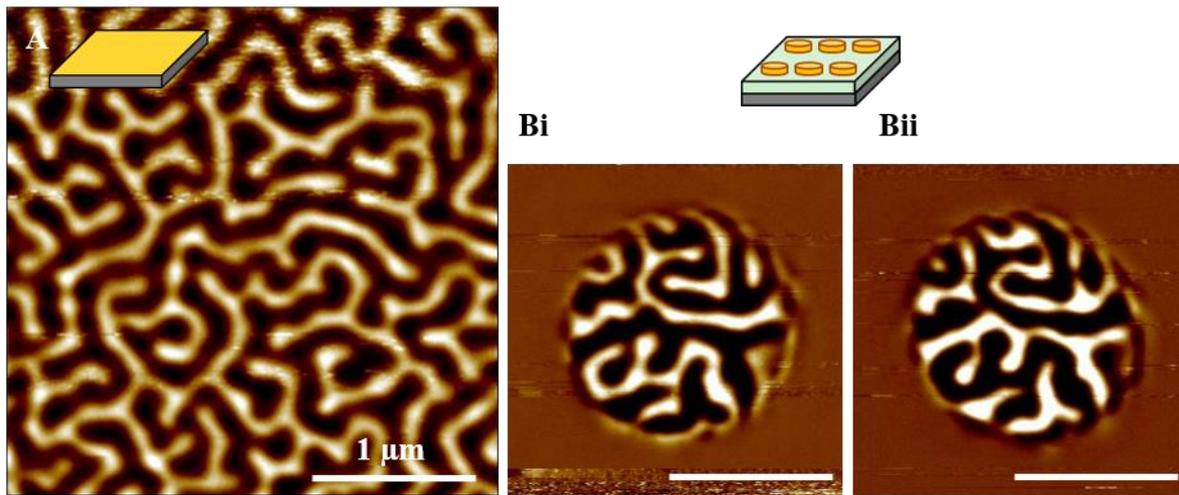


Figure 18: Images MFM de A/ dépôts pleine tranche et Bi&ii/ particule selon la formule $Ta_{30}/Pt_{50}/[(Co_{5}/Pt_{2,5})_{19}/Co_{5}/Ru_{9}]_{3}/(Co_{5}/Pt_{2,5})_{19}/Co_{5}/Ta_{10}/Pt_{20}$. Les images Bi et Bii montrent la même particule après retournement de l'aimantation de la pointe. L'observation de contrastes opposés entre les deux images Bi et Bii prouve que ces contrastes sont bien d'origine magnétique. Les barres d'échelle correspondent à 1 μm .

Les acquisitions MFM font apparaître un motif de labyrinthe très contrasté. Il s'agit d'une alternance de domaines *up* et *down* en rubans, appelés *stripe domains* en anglais. Dans cette configuration, l'énergie magnétique est minimisée par un équilibre entre diminution de l'énergie magnétostatique au prix d'une augmentation de l'énergie de parois (Fruchart 2015).

Le même motif en *stripe domains* est observé pour les particules. La même particule a été observée avant et après le retournement de l'aimantation de la pointe du MFM (Figure 18Bi et Bii). Les images montrent exactement les mêmes domaines avec cependant un contraste inversé. Cela confirme le caractère magnétique de ces motifs. Après son retournement, la pointe magnétique est alors repoussée puis attirée de manière inverse.

La configuration en *stripe domains* de nos dépôts permet d'expliquer la faible rémanence mesurée sur les cycles d'hystérésis. En effet, la surface occupée par des domaines *up* et par des domaines *down* est quasiment identique, ce qui entraîne une compensation globale de l'aimantation. Lorsqu'un champ est appliqué, les domaines orientés dans la direction du champ grossissent au détriment de ceux orientés antiparallèlement au champ, ce qui correspond à la partie linéaire de la courbe, jusqu'à la saturation où tous les domaines inverses au champ ont disparu. Des motifs similaires sont obtenus pour les empilements sans Ru, ce qui confirme encore que le couplage à travers le Ru joue un rôle mineur dans ces multicouches très épaisses par rapport aux termes d'énergie magnétostatique et de parois.

IV.1.2. Particules avec une seule couche de Ru

Nous étudions maintenant des empilements composés d'une seule couche de Ru, avec un nombre de couches de Co/Pt n réduit, compris ici entre 3 et 15 de composition : Ta30/Pt50/(Co5/Pt2,5) $_n$ /Co5/Ru9/(Co5/Pt2,5) $_n$ /Co5/(Ta10)/Pt20. Des échantillons ont été réalisés avec et sans la couche de tantale indiquée en italique et entre parenthèses.

Les matériaux ont été déposés en pleine tranche directement sur un *wafer* de silicium, en réseaux de particules, et aussi déposés sur une couche de PMMA (de rugosité $\sim 0,4$ nm) afin de se placer dans les mêmes conditions que les particules. Cela va permettre de vérifier l'influence de la rugosité de la couche de support et de la géométrie des motifs. En effet, une rugosité trop importante du substrat pourrait entraîner des interfaces moins nettes, et ainsi affecter la qualité du couplage AF ainsi que l'anisotropie perpendiculaire.

Cycles d'hystérésis mesurés par VSM

Les caractéristiques magnétiques des différents dépôts ont d'abord été mesurées par VSM. Les cycles d'hystérésis sont montrés en Figure 19, chaque colonne étant associée à un nombre n de répétitions.

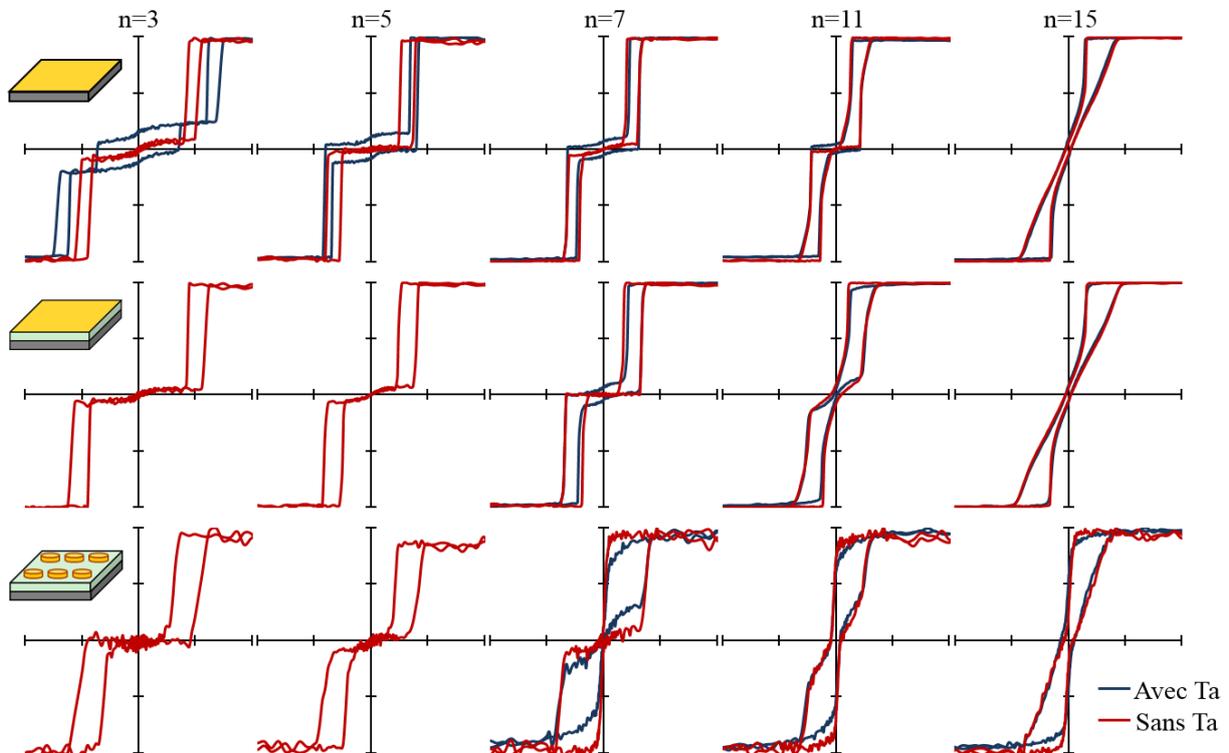


Figure 19 : Cycles d'Hystérésis des multicouches de Co/Pt mesurés au VSM sur substrat de silicium (première ligne) ; en pleine tranche sur de la résine PMMA (deuxième ligne) ; en forme de particules sur de la résine PMMA (troisième ligne) pour un nombre croissant de répétitions n de 3 à 15 dans la formule :

Ta₃₀/Pt₅₀/(Co₅/Pt_{2,5})_n/Co₅/Ru₉/(Co₅/Pt_{2,5})_n/Co₅/(Ta₁₀)/Pt₂₀, avec (bleu) ou sans (rouge) la couche de Ta entre parenthèses. L'axe des abscisses (champ appliqué) va de -0,8 à 0,8 T. L'axe des ordonnées (M/M_s) va de -1 à 1.

Mesure des dépôts sur Si

Pour un nombre de couches suffisamment faible $n \leq 11$ sur Si sans Ta, le comportement AF de l'échantillon est nettement visible. Il se caractérise par les différents paliers correspondant aux retournements de l'aimantation de chacune des couches tel que présenté en Figure 15B/iii. Conformément à ce qui était attendu, le passage d'un état à un autre se fait de manière franche et la rémanence quasi-nulle témoigne ici du couplage AF présent après arrêt du champ et de la compensation des deux couches.

Cependant, une légère pente se dessine pour certains échantillons entre les deux états *down-down* et *up-up*. Ce phénomène peut s'expliquer par l'apparition de domaines dans la configuration AF, au sein de chacune des couches, qui renverserait petit à petit l'aimantation de la couche en augmentant de surface jusqu'à un champ seuil à partir duquel tous les domaines restants changeraient d'aimantation d'un seul coup. Ce champ correspond ici au champ de saturation H_{sat} . Nous observons ici que la valeur de H_{sat} diminue lorsque n augmente. Cela s'explique par la compétition entre d'une part l'énergie Zeeman de couplage de l'aimantation de chacune des multicouches qui augmente linéairement avec le nombre de répétitions n et d'autre part l'énergie de couplage à travers le Ru qui reste constante.

Pour $n = 15$, la pente est continue jusqu'au champ de saturation. Il s'agit ici d'une situation intermédiaire avec celle décrite dans la section précédente avec 80 répétitions. Le rôle relatif de l'énergie de couplage AF diminue par rapport à l'énergie magnétostatique et l'énergie de parois de domaines, qui toutes les deux augmentent avec le nombre de répétitions n . De plus, l'augmentation du nombre de répétitions de Co/Pt augmente le risque défauts aux interfaces, facilitant ainsi la nucléation de domaines. Le retournement de l'aimantation se fait alors à la fois par un passage en configuration AF, mais aussi par la nucléation et le retournement de domaines magnétiques dont la taille augmente progressivement, comme décrit précédemment. De plus, la rémanence est plus élevée pour $n = 15$ (environ 8 %) que pour les autres répétitions de n (inférieure à 2,5 %). Pour $n = 11$, le cycle d'hystérésis montre un état intermédiaire. Le couplage à travers la couche de Ru est bien présent mais une pente subsiste avant que l'échantillon atteigne la configuration AF à rémanence et FM à saturation.

Mesure des dépôts sur PMMA

Les cycles obtenus sur Si et sur PMMA sont assez similaires. La rugosité peut avoir un effet sur la qualité du couplage AF. Cet effet est principalement observé pour $n = 11$ avec une perte de la courbe en palier et l'apparition d'une pente. Pour $n \leq 7$, le couplage est conservé avec une légère augmentation du coercitif, probablement due à des défauts dans le dépôt. Pour $n = 15$, le couplage AF n'étant pas prédominant, la rugosité n'influence que très peu le cycle.

Mesure des particules

Les cycles des particules ont des caractéristiques similaires à ceux en pleine tranche sur PMMA. De même que pour les particules à 80 couches de Co, le bruit est beaucoup plus élevé dû au volume magnétique plus faible comparé à un dépôt en pleine tranche. L'augmentation du rapport surface/volume mais aussi de la superficie des bords augmente le risque de défauts sur les particules. Or ces défauts sont des sources d'ancrage des domaines et font ainsi augmenter le coercitif. Ce phénomène est nettement visible pour nos particules. Pour $n \geq 7$, le champ coercitif est même nul ou négatif, avec comme conséquence une rémanence très élevée. Une rémanence quasi-nulle est une des conditions nécessaires pour notre application, les particules avec un nombre de répétitions supérieur à 7 ne peuvent donc pas être utilisés, en l'état, pour notre application.

Comparaison avec et sans Ta

Pour $n = 3$, le cycle de l'échantillon comportant la deuxième couche de Ta présente une ouverture de cycle en champ nul. Cela peut s'expliquer par la formation d'un alliage non-magnétique de Co-Ta à l'interface entre ces deux couches. Ce phénomène entraîne ce qu'on appelle une couche morte de Co, qui ne prend donc plus part à l'aimantation de la couche. Une différence d'amplitude d'aimantation entre les deux couches apparaît alors, ce qui provoque une mauvaise compensation à champ nul. Il s'agit alors d'un comportement ferrimagnétique.

Cette ouverture du cycle se retrouve pour les valeurs de n plus élevées mais avec une amplitude plus faible. En effet, l'impact de la couche morte diminue quand n augmente car cette couche occupe un plus faible pourcentage de l'aimantation totale. Pour $n = 15$, le Ta n'a plus aucun effet sur le cycle.

Acquisitions MFM

Des acquisitions MFM sont réalisées pour observer les domaines présents dans nos empilements qui permettraient de confirmer nos hypothèses sur la configuration magnétique des différents dépôts. Seuls les échantillons ne contenant pas la deuxième couche de Ta sont présentés en Figure 20. Les acquisitions MFM sont encore réalisés à « l'état vierge », avant première aimantation.

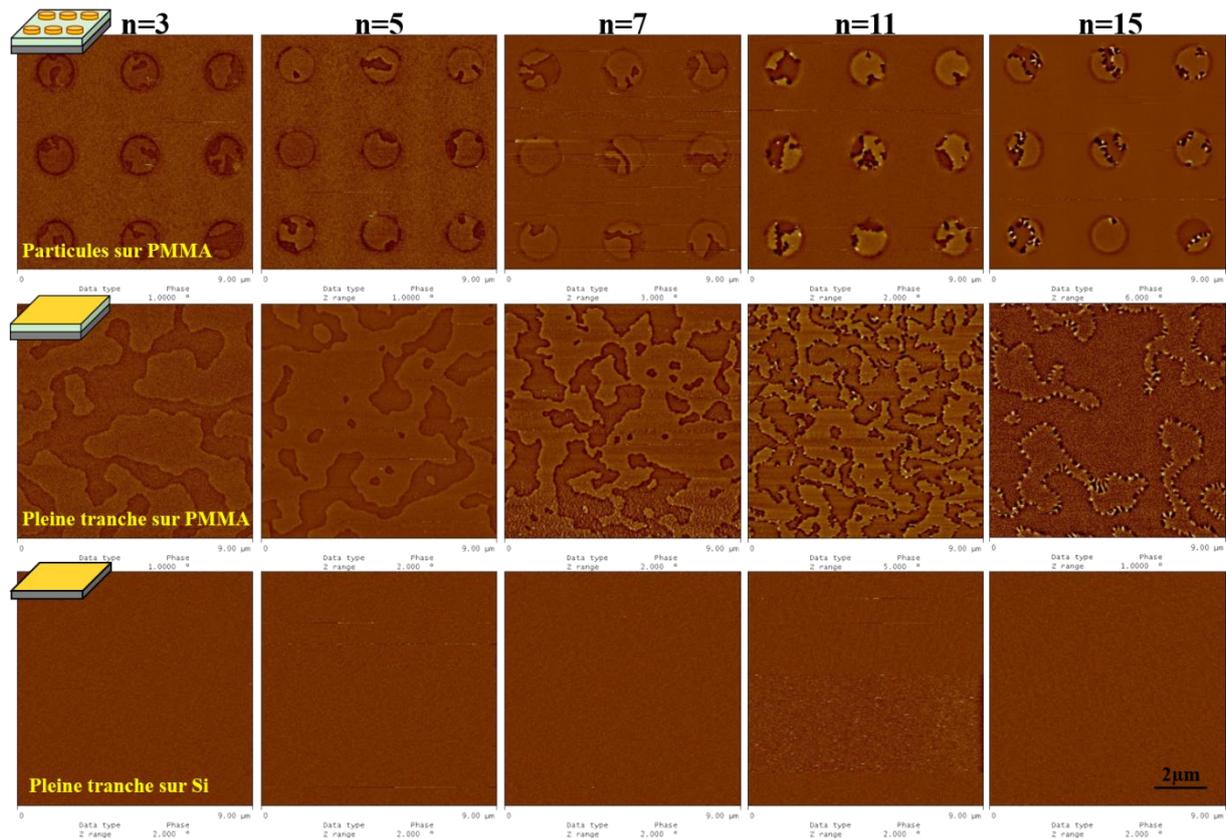


Figure 20 : Images par MFM des dépôts multicouches de Co-Pt sans la deuxième couche de Tantale : $Ta_{30}/Pt_{50}/[(Co_5/Pt_{2,5})_n/Co_5/Ru_9]/(Co_5/Pt_{2,5})_n/Co_5/Pt_{20}$ pour $n=3 ; 5 ; 7 ; 11$ et 15 , et sur différents supports : substrat de silicium, résine PMMA ou en forme de particules sur PMMA. Toutes les acquisitions ont été faites avec une pointe identique (Low Moment), excepté celle pour $n=15$ sur PMMA à cause d'interactions avec la pointe qui déformeraient les stripe domains. L'échelle est la même pour toutes les images.

Les acquisitions obtenues nous confirment la création de domaines au sein de nos échantillons déposés sur PMMA, conformément à l'analyse faite des cycles d'hystérésis. Cependant, les domaines ne sont pas visibles sur les échantillons pleine tranche déposés directement sur Si.

Dépôts sur Si

L'observation d'un dépôt sur Si avec $n=15$ au MFM pendant l'application d'un champ nous montre la formation de domaines à partir d'une faible valeur de champ (Figure 21). En effet, en dessous d'un champ seuil compris entre 64 mT et 120 mT, aucun contraste n'est observé. Ceci est expliqué par le fait que les multicouches du SAF sont en alignement antiparallèles à champ nul et ne rayonnent donc pas de champ. C'est pour cette raison qu'aucun domaine n'est visible pour les échantillons déposés sur Si à l'état vierge. Au-delà du champ seuil, une fois le champ coupé, quelques domaines perdurent. Ces domaines de contraste intense et sombres correspondent à des zones de l'échantillon où l'aimantation arrive à rester saturée car localement, l'énergie de couplage magnétostatique entre les multicouches l'emporte sur l'énergie de couplage antiferromagnétique à travers le Ru.

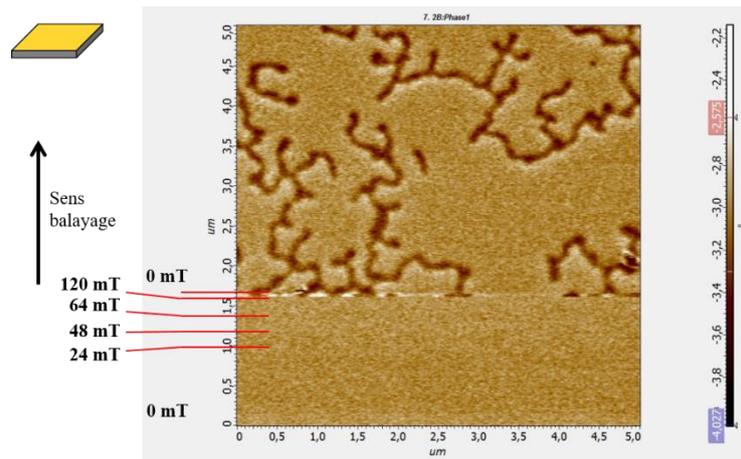


Figure 21 : Image MFM d'un dépôt multicouches de Co/Pt avec $n = 15$ sur Si pendant l'application d'un champ perpendiculaire. L'acquisition commence par le bas de l'image à l'état vierge sans champ. Le champ est ensuite appliqué par paliers jusqu'à 120 mT, et très vite coupé.

Pour les dépôts réalisés sur PMMA, la rugosité du support entraîne des défauts qui favorisent l'apparition de domaines. Cela explique que les domaines soient visibles même à l'état vierge. De manière similaire, des domaines sont aussi observés sur les dépôts en forme de particules.

Dépôts sur PMMA

Pour les dépôts sur PMMA avec $n \leq 7$, le contraste entre les domaines est relativement faible, comparé par exemple aux motifs obtenus avec les particules comprenant 80 couches de Co et une configuration en *stripe domains*. Cela nous montre que les domaines sont en configuration AF. La différence de contraste d'un domaine à l'autre s'explique donc par la configuration *up* ou *down* de la couche du dessus. Si les domaines étaient en configurations FM, *i.e.* avec les deux couches aimantées dans la même direction, chaque domaine apparaîtrait en noir ou en blanc selon qu'il est *up* ou *down*.

On observe à partir de $n = 11$ des parois de domaines plus contrastées qui sont noires dans le cas de $n = 11$ et une alternance de points blancs et noirs pour $n = 15$. Ce phénomène a déjà été observé et très bien expliqué par Olav Hellwig (Hellwig et al. 2007). Les auteurs expliquent que le fort contraste de ces parois est dû à un décalage dans l'alignement des domaines de chacune des couches qui entraîne la formation d'une ligne FM entre deux domaines AF. Cette équipe a effectué des calculs d'énergie totale en fonction de d , définie comme la largeur de la paroi de domaines pour différentes épaisseurs X de Co. Pour des valeurs élevées de X , les calculs d'énergie font apparaître un second minimum local d'énergie pour une épaisseur de paroi de quelques dizaines de nm, qui est plus faible que pour $d = 0$. La formation de paroi FM minimise donc l'énergie totale du système. L'augmentation de l'épaisseur de Co peut être extrapolée dans notre cas à un nombre de répétitions plus élevé, expliquant ainsi la formation de paroi de domaines FM à partir de $n = 11$.

Pour $n = 15$, la ligne FM continue évolue vers une ligne FM successivement *up* et *down*. En effet, la formation d'une paroi FM au milieu de domaines AF génère une augmentation du champ démagnétisant. Pour un plus grand nombre de répétitions, le champ démagnétisant peut être réduit par l'alternance de *stripe domains* successivement *up* puis *down*. Cette observation est par ailleurs cohérente avec le motif de *stripe domains* observés pour 80 couches de Co. Avec un nombre très élevé de couches de Co/Pt, le champ dipolaire augmente nettement, et peut être diminué en étirant les parois de *stripe domains*, jusqu'à recouvrir la totalité de l'échantillon.

Le cycle d'hystérésis du dépôt pour $n = 15$ sur PMMA montre que la configuration magnétique de ce dépôt n'est pas AF. Pour mieux comprendre le comportement des domaines sur la partie linéaire de la courbe, une acquisition MFM est réalisée pendant l'application d'un champ, perpendiculairement à l'échantillon (Figure 22).

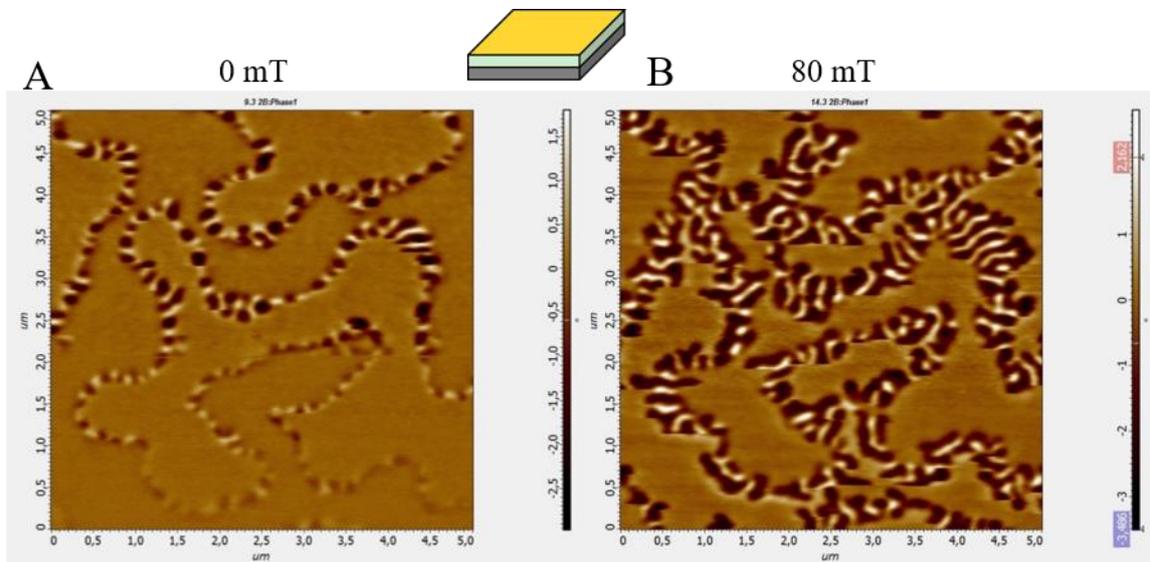


Figure 22 : Images MFM d'un dépôt multicouches de Co/Pt avec $n = 15$ sur PMMA A/ en l'absence de champ et B/ la même zone d'observation pendant l'application d'un champ perpendiculaire de 80 mT.

En l'absence de champ (Figure 22A), nous retrouvons les parois de domaine en configuration FM successivement *up* puis *down*, déjà observée précédemment (Figure 20). Sous l'application d'un champ magnétique perpendiculaire à l'échantillon, les parois s'étirent et deviennent plus large (Figure 22B). Un étirement progressif des parois permet d'expliquer la pente linéaire visible sur le cycle d'hystérésis. En effet, l'étirement des parois se fait en favorisant les zones des parois où l'aimantation est dans la direction du champ appliqué. Le retournement de l'aimantation se fait alors progressivement jusqu'à ce que les zones dirigées antiparallèlement se retournent à leur tour.

Les dépôts sur PMMA ont donc une configuration AF jusqu'à $n = 7$. A partir de 15 répétitions, la configuration AF est perdue et le retournement de l'aimantation se fait alors progressivement par

l'étirement des parois de domaines. Pour $n = 11$, le cycle d'hystérésis montre un état mixte, avec une partie des domaines qui se retournent de manière franche comme en configuration AF, et une partie résiduelle des domaines qui se retournent progressivement, probablement par un étirement des parois tel qu'observé pour $n = 15$.

Dépôts de particules

Les domaines et les différents types de parois présents en pleine tranche se retrouvent aussi sur les particules, avec des nombres de répétitions correspondants. Nous observons cependant une plus grande densité de parois de domaines et des domaines plus petits. Cela peut s'expliquer, ici encore, par les défauts de la topographie, au niveau du support avec la rugosité du PMMA mais aussi sur les bords des particules, qui favorisent la création de parois. Les domaines étant ancrés grâce aux défauts du dépôt, leur retournement nécessite une plus grande énergie, ce qui explique l'augmentation du coercitif observée sur les cycles d'hystérésis.

IV.2. Vortex elliptique

Dans une variante plus proche des particules de permalloy précédemment étudiées, nous avons décidé de conserver le matériau magnétique et la configuration en vortex des particules mais en ajoutant une anisotropie de forme dans le plan de la particule, en créant des particules elliptiques. Dans ce cas, l'aimantation adopte une configuration en vortex elliptique, avec une aimantation moyenne s'orientant préférentiellement le long du grand axe de l'ellipse, qui est l'axe d'aimantation facile. Lors de l'application d'un champ magnétique rotatif, la particule devrait alors conserver son grand axe orienté dans la direction du champ. Ainsi, contrairement à une particule circulaire, la particule elliptique peut être mise en mouvement dans le cas d'un champ rotatif appliqué dans son plan.

Les propriétés géométriques des particules doivent être choisies pour respecter certaines caractéristiques. En effet, la rémanence doit être faible pour que les particules se redispersent après application du champ, ce qui passe ici par une configuration en vortex. De plus, l'anisotropie planaire doit être assez forte pour déclencher une rotation des particules lorsqu'un champ rotatif est appliqué sur une particule libre de se mouvoir. En effet, si l'anisotropie est trop faible, l'aimantation va tourner dans le plan de la particule sans entraîner un mouvement des particules.

Ces caractéristiques s'obtiennent en faisant varier le ratio $R_a = a / b$ avec a , le rayon du petit axe et b le rayon du grand axe. Les données théoriques de la littérature nous montrent que, pour un ratio choisi, plusieurs configurations peuvent être obtenues. Pour $R_a = 3$, la configuration initiale peut être un vortex,

en échelle de perroquet (*cross-tie* en anglais), un diamant ou un double diamant (Figure 23), correspondant respectivement à un simple vortex, un triple vortex, un double vortex et un triple vortex (Warnicke 2007; Felton et al. 2006). Pour des ratios de 1,4 et 2, une saturation des particules le long du grand axe entraîne la formation d'un double vortex (en diamant) tandis qu'une saturation le long du petit axe crée un simple vortex à rémanence (Buchanan, Roy, Fradin, et al. 2006; Buchanan, Roy, Grimsditch, et al. 2006; Vavassori et al. 2004).

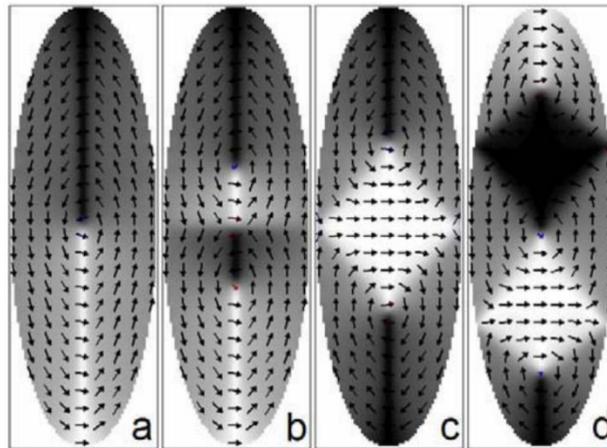


Figure 23 : figure extraite de (Warnicke 2007) montrant des configurations magnétiques en a/ simple vortex ; b/ échelle de perroquet ; c/ diamant ; d/ double-diamant

Pour un ratio de 4, la rémanence a été mesurée expérimentalement à 100% de l'aimantation à saturation (X. Zhu et al. 2002). Cela s'explique par le comportement dipolaire d'une telle structure après application d'un champ. Un ratio trop élevé n'est donc pas souhaitable pour notre application. Des mesures réalisées sur des particules elliptiques avec $Ra = 1,4$ donne une rémanence quasi nulle (Vavassori et al. 2004) alors que des particules elliptiques avec un ratio de 2 donnent une rémanence à 100% (Felton et al. 2004). Compte tenu de toutes ces données, nous avons donc choisi un ratio de 1,5 pour obtenir une faible rémanence tout en ayant une anisotropie de forme suffisante.

La fabrication des particules elliptiques se fait selon le même protocole que celui des disques de permalloy. La seule différence est l'utilisation d'un masque présentant des motifs en forme d'ellipses avec un grand axe de $1,6 \mu\text{m}$ et un petit axe de $1,06 \mu\text{m}$ (Figure 24A).

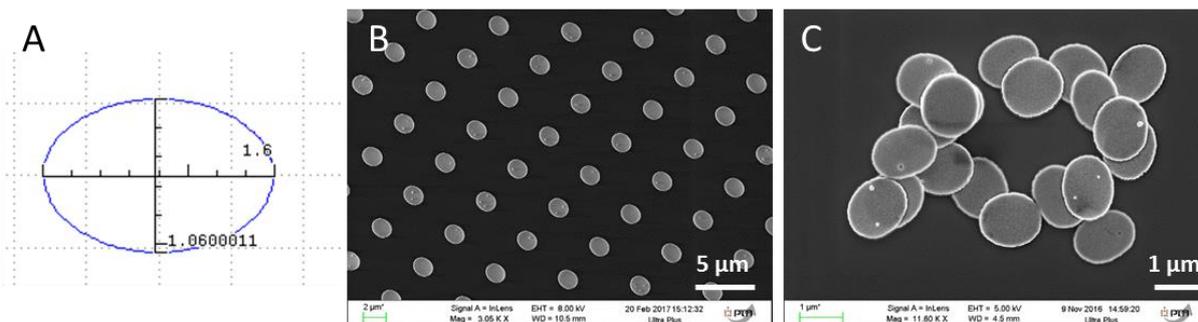


Figure 24 : A/ Motifs du masque des ellipses ; B/ Image au MEB des particules elliptiques sur le substrat ; C/ Image au MEB des particules après dissolution de la PMMA

De même que pour les particules en forme de disque, notre procédé de fabrication nous permet d'obtenir des particules de taille et de forme régulières, comme nous pouvons l'observer sur les images de MEB en Figure 24B. La taille des ellipses est supérieure à celle des motifs du masque. Le grand axe des particules produites est d'environ $1,7 \mu\text{m}$ et le petit axe d'environ $1,4 \mu\text{m}$. Ces dimensions nous donnent un ratio de 1,2 qui est inférieur à celui souhaité. Cependant, le prix d'un nouveau masque étant assez élevé, nous décidons de poursuivre l'étude avec celui-ci. Une acquisition MEB montrant les particules elliptiques après détachement du *wafer* est aussi montrée en Figure 24C.

Afin de vérifier que la configuration en vortex est conservée malgré la forme elliptique des particules, des mesures VSM ainsi que des acquisitions au MFM ont été effectuées (Figure 25).

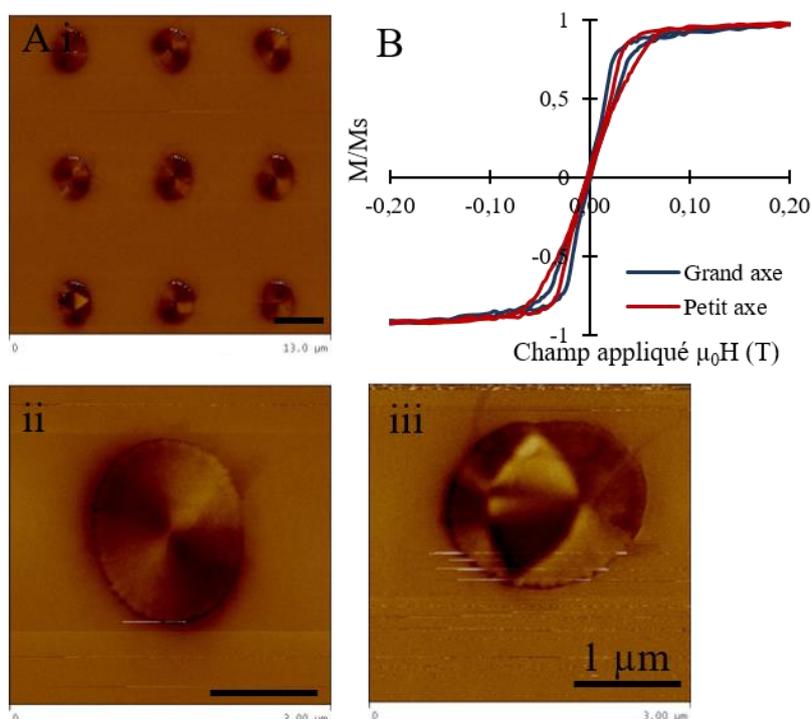


Figure 25 : A/ Images MFM i) de plusieurs particules elliptiques de permalloy; ii) d'une particule avec un simple cœur de vortex iii) d'une particule avec un double vortex ; B/ Cycle d'Hystérésis des particules elliptiques de permalloy, le champ étant appliqué dans le plan. Les barres d'échelle sont de $1 \mu\text{m}$.

La Figure 25A/i montre les motifs obtenus par acquisition MFM sur une particule elliptique. Elle est représentative des résultats obtenus sur plusieurs particules étudiées. La configuration en simple cœur de vortex est confirmée ici par les quatre zones alternativement claires et sombres témoignant de l'enroulement des moments magnétiques autour du centre de la particule où se situe le cœur de vortex (Figure 25A/ii). Il est à noter qu'un faible nombre de particules comportait une structure en double vortex comme la particule en bas à gauche sur la Figure 25A/i ou la particule montrée en Figure 25A/iii. Le cycle d'hystérésis obtenu peut lui aussi correspondre à une configuration en vortex (Figure 25B) avec une rémanence quasi-nulle. La susceptibilité le long du grand axe (26,8 en SI) est plus forte que le long du petit axe (20,3 en SI). Cela confirme bien l'existence d'une anisotropie le long du grand axe de la particule. Une fois libérée en suspension, la particule tendra à aligner son aimantation moyenne le long du grand axe de l'ellipse. Elle pourra ainsi s'orienter dans les trois directions de l'espace selon le sens d'application du champ. Le risque de particules en vortex restant immobiles dans un champ tournant est éliminé.

V. Conclusions du chapitre

Les particules obtenues grâce au procédé développé à SPINTEC sont de taille et de forme régulières. L'utilisation du permalloy combinée à une forme de disque de 1,3 μm de diamètre et 60 nm d'épaisseur entraîne la création d'un vortex magnétique. La faible rémanence, le champ de saturation assez faible (80 mT) et la susceptibilité inférieure au seuil critique permettent une bonne utilisation pour des applications biomédicales. Les particules ne s'agglomèrent pas en l'absence de champ, elles sont capables de réagir mécaniquement à l'application d'un champ externe puis de se redisperser.

Dans une approche similaire, des particules elliptiques de permalloy ont aussi été étudiées. En choisissant le ratio entre le grand axe et le petit axe, la configuration en simple vortex est conservée pour la majorité des particules. Pour certaines particules, la configuration magnétique est en double vortex. Les particules elliptiques en vortex ont l'avantage de pouvoir suivre le champ dans toutes les directions de l'espace. Cependant, elles sont de tailles supérieures aux disques (1,7 μm de longueur du grand axe contre 1,3 μm de diamètre pour les disques), ce qui peut amplifier les problématiques liées à l'injection des particules. Le masque utilisé permet de produire deux fois moins de particules par *wafers*, comparé à la production de disques de permalloy. De plus, l'étude de ces particules a débuté alors que les tests *in-vitro* et *in-vivo* étaient déjà commencés. Ces particules n'ont donc pas encore été testées sur les cellules. Cependant, cette piste semble particulièrement prometteuse et mériterait des approfondissements. Elle permet en effet de garder toutes les caractéristiques des disques de permalloy nécessaires à notre application, tout en augmentant la capacité des particules à exercer un stress

mécanique sur les cellules. Il pourrait alors être intéressant pour des études futures d'optimiser le procédé pour obtenir un ratio de 1,5 et de changer de masque pour produire des particules de plus petite taille.

Pour finir, nous avons étudié des particules multicouches de Co/Pt. Les multicouches de Co/Pt sont couplées au travers de couches minces de ruthénium par un couplage RKKY pour former des SAF. L'anisotropie hors du plan de ces particules permet de les diriger dans les trois directions de l'espace tout en conservant une rémanence très faible grâce à la compensation des deux couches. Différents nombres de répétitions des multicouches de Co/Pt et des couches de Ru ont été testés. Le comportement AF des particules n'a pu être obtenu que pour $n \leq 5$ et une seule couche de ruthénium. En effet, pour un nombre de répétitions supérieur, l'énergie de couplage n'est plus prédominante et les défauts de topographie provoquent une augmentation du coercitif, entraînant ainsi une plus forte rémanence. De plus, le champ de saturation des particules avec un faible nombre de répétitions est de ~ 400 mT (contre 80 mT pour les disques de permalloy). Le champ magnétique à appliquer pour permettre leur mise en mouvement devrait donc être plus élevé. Pour les particules avec 80 couches de Co, bien que la configuration AF ne soit pas obtenue, la condition de faible rémanence est tout de même respectée grâce à la configuration en *stripe domains* des particules. Cependant, le champ de saturation est encore nettement supérieur (~ 700 mT) à celui des particules de permalloy. De plus, une baisse de l'anisotropie perpendiculaire a été observée, et pourrait rendre possible l'aimantation de ces particules dans le plan, contrairement à nos souhaits. En termes de praticité, l'étape de dépôt des matériaux est beaucoup plus longue que pour le permalloy, ce qui est peu compatible avec les quantités dont nous avons besoin. Des optimisations, en jouant sur l'épaisseur des couches notamment, pourraient être réalisées dans une étude ultérieure pour un meilleur couplage AF et un champ de saturation plus faible. Dans ce travail de thèse, les particules de Co/Pt n'ont donc pas été utilisées sur cellules.

Le reste de l'étude a donc été réalisé avec les disques de permalloy. Le procédé développé à SPINTEC nous permet de produire des particules de taille et de forme parfaitement contrôlées et est relativement rapide (environ 7 h pour produire 6 mg de particules) et fiable. Leurs dimensions leur permettent d'interagir avec les entités biologiques et d'être injectées dans les tissus. Leur recouvrement par un matériau biocompatible tel que l'or est compatible pour des applications biomédicales. L'anisotropie de forme des disques de permalloy permet leur mise en mouvement par l'application d'un champ magnétique externe de façon efficace. Les particules peuvent alors être « activées » à distance et produire un stress mécanique sur les cellules. Fabriquées dans un environnement de salle blanche, les particules ont l'avantage d'être relativement propres. De simples lavages à l'éthanol pur suffisent pour leur utilisation *in-vitro* et *in-vivo*.

Pour une utilisation en clinique, les particules devront être stérilisées plus rigoureusement et le suivi de fabrication plus détaillé. Un travail de formalisation a été commencé en ce sens (annexe II). Pour la stérilisation, plusieurs procédés peuvent être envisagés : rayons gamma, autoclave ou encore l'oxyde d'éthylène. Une validation devra être effectuée après cette étape pour vérifier que l'étape de stérilisation ne modifie pas les propriétés des particules.

Chapitre 3

Etude *in-vitro*

I. Culture des cellules

Les différents tests ont été menés en utilisant des cellules de carcinome rénal humain SKRC-59 transfectées pour exprimer l'anhydrase carbonique 9 (CA9) ou des cellules de glioblastome humain U87-WT. La lignée SKRC59 a été utilisée afin de tester la fonctionnalisation spécifique des particules pour cibler la CA9 tandis que la lignée de glioblastome a servi à anticiper l'étude *in-vivo*. De plus, il s'agit dans les deux cas de modèles bien maîtrisés des laboratoires d'accueil. Les lignées sont conservées à l'azote liquide dans des aliquots contenant 1 ml de suspension à 2.10^6 cellules/ml. Le milieu de culture qui apporte les nutriments essentiels à la croissance des cellules est le RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 pour les cellules rénales ou le DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) pour les cellules de glioblastome. Y sont ajoutés 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté et 1 % de Glutamax apportant les protéines et le glucose nécessaires au bon développement cellulaire. Toutes les opérations nécessitant l'ouverture des flasques, Labtek, plaques ou autres supports sont réalisées sous un Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) dans un laboratoire de niveau P2.

Lors de la décongélation des cellules, le contenu de l'aliquot est repris dans 4 ml de milieu de culture puis centrifugé 5 min à 1200 rpm. Le surnageant est alors éliminé et remplacé par 5 ml de milieu de culture. La suspension est homogénéisée et transférée dans une flasque de 75 cm² pour être mise à 37 °C et 5 % de CO₂ dans un incubateur. Les cellules adhérentes poussent et se divisent sur le fond de la flasque. Pour permettre aux cellules de se multiplier, elles doivent être « passées » deux fois par semaine. Pour cela, le milieu est aspiré, les cellules sont lavées au D-PBS (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) puis incubées pendant 3 min avec 2 ml de trypsine-EDTA à 0,25 % afin de décoller les cellules du fond de la flasque. L'effet de la trypsine est stoppé par l'ajout de 8 ml de milieu de culture, grâce à l'action inhibitrice du sérum présent dans le milieu. Les cellules sont comptées avec un hémocytomètre *invitrogen Countess™ Automated Cell Counter* afin de préparer une dilution pour ensemercer 5.10^5 cellules dans 12 ml de milieu de culture, soit une densité de $6,7.10^3$ cellules/cm². La suspension est alors transférée dans une nouvelle flasque de 75 cm² et mise à l'incubateur. Les cellules sont utilisables jusqu'à un maximum de 20 passages.

Afin de conserver des réserves de cellules suffisantes, il est nécessaire de recongeler des cellules. Le milieu est aspiré, les cellules sont lavées avec du D-PBS et trypsinées. Le contenu de la flasque est transféré dans un tube Falcon. Les cellules sont comptées et mises à centrifuger pendant 5 min à 1200 rpm. Le surnageant est aspiré et remplacé par du milieu de congélation (1 ml de DMSO et 9 ml de milieu de culture). Le DMSO permet aux cellules de survivre à la congélation, cette technique étant relativement agressive. La concentration cellulaire doit être d'environ 2.10^6 cellules/ml. La suspension est répartie dans des cryotubes de 1 ml qui sont placés à -80 °C. Le DMSO étant toxique à température

ambiante, ces dernières étapes doivent être réalisées rapidement. Le lendemain, les tubes sont placés dans l'azote liquide à -180 °C.

II. Tests de toxicité intrinsèque des particules

Nos particules étant utilisées pour des applications biomédicales, la non-toxicité intrinsèque des particules doit être vérifiée. En effet, les particules ne doivent déclencher une mort cellulaire que lorsque qu'un stimulus extérieur est appliqué. Il existe de nombreux kits permettant de quantifier la toxicité induite par des particules, des produits chimiques ou autres. Cependant, ces kits interfèrent avec les nanoparticules en cas de hautes concentrations (Kroll et al. 2012; Ong et al. 2014). Nous avons donc choisi d'évaluer la toxicité de nos particules en utilisant des techniques permettant de s'affranchir de ces possibles interférences. Trois méthodes différentes ont été utilisées sur les cellules U87 : le bleu de Trypan pour compter les cellules mortes et vivantes, et des tests LDH et WST-1 qui évaluent la perméabilité de la membrane et l'activité métabolique, respectivement. Les tests ont été réalisés en transférant le surnageant dans une nouvelle plaque après réaction pour éviter que les particules n'interfèrent avec les lectures d'absorbance.

II.1.1. Tests quantitatifs

Méthode

Le bleu de Trypan rentre dans les cellules et est relargué par les cellules vivantes mais reste dans les cellules mortes ; il permet donc de différencier les cellules mortes, en bleu, et les cellules vivantes, incolores. Le mécanisme d'exclusion nécessitant de l'énergie, seules les cellules pouvant synthétiser de l'ATP sont capables de faire sortir le bleu de Trypan. A J1, les cellules U87 sontensemencées dans des plaques 12 ou 24 puits à une concentration de 2,4 ou 1,2.10⁵ cellules/puits, respectivement. Les particules sont ajoutées 24 h après (J2). Pour cela, les particules sont lavées deux fois à l'éthanol puis deux fois au milieu de culture pour une concentration finale de 1,2 g/l. Une dilution en cascade avec un facteur 5 est ensuite réalisée pour obtenir des concentrations de 0 à 1,2 g/l. 250 ou 500 µl de suspension de particules par puits sont ajoutés pour les plaques 24 et 12 puits, respectivement. 24 h plus tard (J3), les cellules sont trypsinées et récoltées dans des tubes. C'est pour cette étape de trypsination qu'il est plus facile d'utiliser des plaques 12 ou 24 puits plutôt que des plaques 96 puits utilisées classiquement. Du bleu de Trypan est ajouté à une dilution [1:1] et les cellules sont déposées sur une lame de Malassez. Les cellules vivantes et mortes sont alors comptées en fonction de leur coloration. L'expérience a été

réalisée trois fois, avec deux comptages pour chaque échantillon, excepté pour la concentration la plus haute, qui n'a été réalisée qu'une fois.

Lors d'un test LDH, la perméabilité de la membrane cellulaire est évaluée par le dosage du lactate déshydrogénase (LDH), enzyme cytoplasmique stable présente dans toutes les cellules, qui est relarguée hors de la cellule lorsque celle-ci perd son intégrité membranaire. Le début du protocole est identique au test avec le bleu de Trypan, les cellules étantensemencées dans une plaque 96 puits avec $5,0 \cdot 10^4$ cellules/puits. A J2 une dilution en cascade avec un facteur 2 est réalisée pour obtenir des concentrations en particules de 0,02 à 1,5 g/l dans du milieu de culture. Le surnageant est enlevé puis remplacé par le milieu de culture contenant les particules. A J3, 50 μ l de surnageant de chaque puits sont prélevés en prenant soin de ne pas créer de mouvements qui décolleraient les particules en fond de plaque, et transférés dans un nouvelle plaque 96 puits. Le transfert du surnageant vers une nouvelle plaque permet de mesurer l'absorbance sans interaction des particules. 100 μ l d'un mélange de réactifs sont ajoutés dans chaque puits. Après 5 min de réaction à température ambiante, 10 μ l de HCl à 1 M sont ajoutés pour stopper la réaction. La lecture de l'absorbance se fait à 490 nm. L'intensité de l'absorbance est mesurée avec un lecteur de plaque (SpectraMax M2, Molecular Devices), et est proportionnelle à la concentration en LDH. Un contrôle avec des cellules seules (I_{saines}) et un contrôle avec des cellules incubées avec 0,1 % de Triton (I_{mortes}) permettent de définir le 100 et le 0 % de viabilité. Le Triton X-100 est un détergent qui provoque la mort des cellules. La viabilité de chaque échantillon est alors calculée de la façon suivante :

$$\%Viabilité = 100 \times \frac{(I_{\text{échantillon}} - moy(I_{\text{mortes}}))}{(moy(I_{\text{saines}}) - moy(I_{\text{mortes}}))}$$

L'expérience a été réalisée 4 fois sur 4 puits.

Le test WST-1 est basé sur le même principe que les tests CCK-8, MTT et MTS. Le sel de tétrazolium WST-1 est réduit par la NADH au cours de la chaîne respiratoire de la cellule et forme ainsi du formazan. La concentration en formazan permet d'évaluer l'activité métabolique des cellules. A J3, après le prélèvement des aliquots destinés au test LDH, le surnageant de chaque puits est aspiré et remplacé par 100 μ l de milieu de culture sans sérum, supplémenté de 10 % de WST-1. Après 1 h d'incubation, la plaque est centrifugée 5 min à 500 rpm et 50 μ l de chaque puits sont transférés dans une nouvelle plaque 96 puits, pour éviter toute interférence lors de la lecture de l'absorbance à 450 nm. L'absorbance est proportionnelle à la concentration en formazan. Un contrôle avec des cellules seules et un contrôle avec des cellules incubées avec 0,1 % de Triton X-100 permettent de définir le 100 et le 0 % de viabilité. La viabilité est calculée de la même façon que pour le test LDH. L'expérience a été réalisée 4 fois sur 4 puits.

Résultats

Les résultats de viabilité cellulaire suite à l'exposition aux particules sont montrés en Figure 26. Pour pouvoir comparer les résultats obtenus avec les trois méthodes dans des supports différents, la concentration en particules est exprimée en g/cm^2 . Cette unité peut être utilisée étant donné que nos particules sédimentent rapidement et tapissent alors la surface du puits.

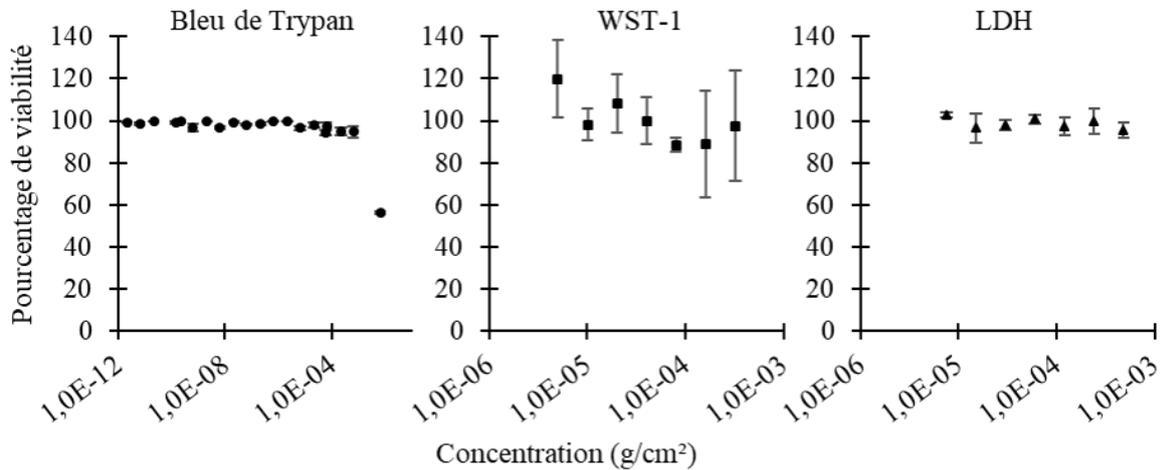


Figure 26 : Pourcentage de viabilité des cellules après 24 h d'incubation avec des concentrations différentes de particules, mesuré par un test au Bleu de Trypan, un test WST-1 ou un test LDH

Avec le marquage au bleu de Trypan, la diminution de la viabilité est au maximum de 5,6 % pour une concentration en particules inférieure à $6,3 \cdot 10^{-4} \text{ g}/\text{cm}^2$. Pour une concentration de $6,3 \cdot 10^{-3} \text{ g}/\text{cm}^2$, le taux de viabilité est de 56,2 %.

Le test WST-1 montre une diminution de la viabilité d'au maximum 12 % pour une concentration de particules comprise entre $5,0 \cdot 10^{-6}$ et $3,2 \cdot 10^{-4} \text{ g}/\text{cm}^2$.

Avec le test LDH, la viabilité est comprise entre 96 et 102 % pour une concentration de particules comprise entre $7,5 \cdot 10^{-6}$ et $4,8 \cdot 10^{-4} \text{ g}/\text{cm}^2$.

Les résultats obtenus avec les différents tests montrent que les particules seules n'induisent pas d'augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire ni de diminution de l'activité mitochondriale des cellules et n'influent pas non plus sur la production d'ATP pour une concentration en particules inférieure à $3,2 \cdot 10^{-4} \text{ g}/\text{cm}^2$. Il est possible qu'une très haute concentration de particules influent sur la production d'ATP, comme le montre le test au bleu de Trypan pour une concentration de $6,3 \cdot 10^{-3} \text{ g}/\text{cm}^2$. Cependant, pour les concentrations plus faibles, la production d'ATP des cellules n'est pas perturbée par les particules. Les trois tests nous permettent donc de conclure à la non-toxicité des particules jusqu'à une concentration de $3,2 \cdot 10^{-4} \text{ g}/\text{cm}^2$. Ce sont donc des concentrations inférieures à cette limite qui seront utilisées pour les tests *in-vitro*.

II.1.2. Observation des cellules à très haute concentration de particules

Nous avons tout de même voulu observer ce qu'il se passait à haute concentration de particules. Pour cela nous avons déposé des particules à haute concentration ($0,5 \text{ g/l} = 3,0 \cdot 10^{-4} \text{ g/cm}^2$) et observé le comportement des cellules pendant 48 h à l'aide d'un vidéomicroscope sous atmosphère contrôlée (station OKOLAB) qui permet d'acquérir une image toutes les 20 min en gardant les cellules dans les conditions optimales ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % de CO_2 et humidité contrôlée). Les images ainsi obtenues permettent de créer un film en vitesse accélérée du comportement des cellules. Des acquisitions correspondant à $t = 0$, $t = 24 \text{ h}$ et $t = 48 \text{ h}$ post injection des particules sont montrées en Figure 27. Après ajout des particules, les cellules qui sont adhérentes, explorent leur environnement et « récupèrent » les particules. La vidéo ne permet pas de distinguer si les particules sont à la surface ou à l'intérieur des cellules. Durant les premières 24 h post-injection des particules, aucune division cellulaire n'est observée, et le nombre de cellules dans le champ de vision reste constant. Durant les 24 h suivantes, les cellules reprennent une activité de croissance cellulaire normale et une augmentation de la population cellulaire est observée.

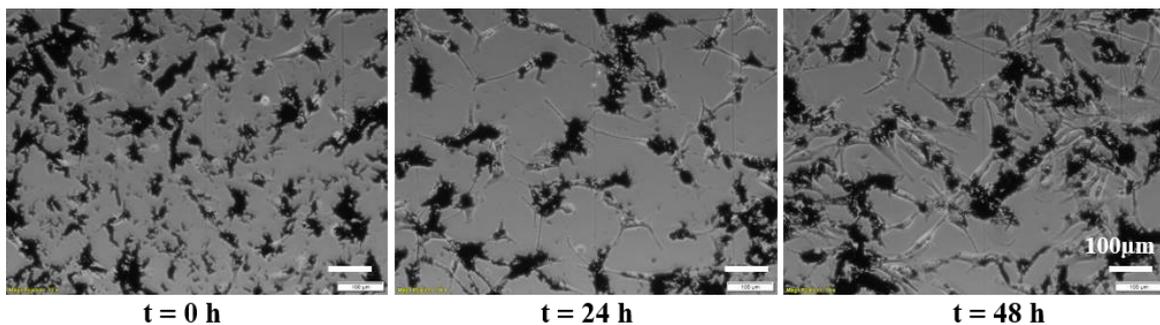


Figure 27 : Observation au microscope optique de cellules soumises à une haute concentration de particules à $t = 0$, $t = 24 \text{ h}$ et $t = 48 \text{ h}$ post injection des particules. Les barres d'échelle sont de $100 \mu\text{m}$.

Il est intéressant de noter que malgré une concentration en particules très élevée, après une acclimatation des cellules, celles-ci sont de nouveau capables de se diviser et retrouvent un comportement cellulaire normal.

III. Interactions des particules avec les cellules

Dans la littérature, les premiers tests visant à évaluer l'efficacité du TEMMP ont été réalisés avec des particules fonctionnalisées pour cibler spécifiquement des récepteurs présents sur les cellules cancéreuses. C'est le cas par exemple de Kim et al. qui travaillaient sur des lignées de glioblastome humain (N10) et utilisaient des anticorps anti-human-IL13 α 2R (D.-H. Kim et al. 2010). Les travaux

présentés ici se placent dans le prolongement d'une étude commencée au laboratoire SPINTEC, réalisée sur des cellules de carcinome humain SKRC59. Le protocole mis au point prévoyait une fonctionnalisation des particules avec l'anticorps anti-hCA9 pour cibler les cellules SKRC59 transfectées pour exprimer l'anhydrase carbonique 9 (CA9) (Leulmi et al. 2015). Le procédé de cette fonctionnalisation est détaillé ci-après.

Le processus de fonctionnalisation spécifique

La fonctionnalisation des particules est facilitée par la présence de couches d'or au-dessous et au-dessus de la particule. L'utilisation de l'or comme base de la fonctionnalisation est largement répandue dans la littérature grâce à sa spécificité de liaison avec les groupes thiols (HS). Le protocole de fonctionnalisation (Figure 28) a été mis au point au SYMMES par Yanxia Hou-Brouin.

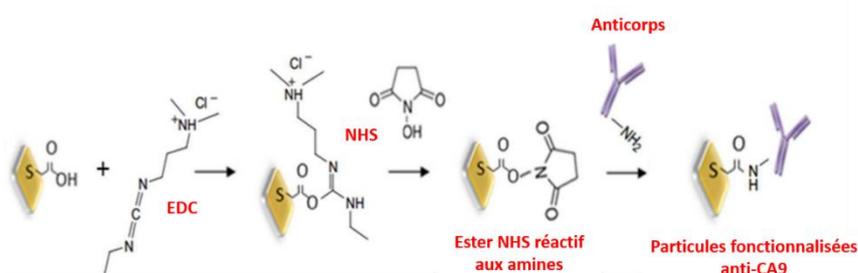


Figure 28 : Schéma de principe de la fonctionnalisation des particules avec des anticorps CA 9, figure extraite de (Leulmi et al. 2015)

Un SAM (*Self-Assembled Monolayer*) mixte de thiols est d'abord attaché à la surface des particules. Afin d'éviter l'encombrement stérique et optimiser les attaches entre anticorps et particules, la solution de thiols est composée pour 4/5 d'hydroxythiols courts (6-mercapto-1-hexanol) et pour 1/5 de carboxythiols longs (acide 11-mercapto-undécanoïque). Les thiols courts vont ainsi permettre de séparer les thiols longs les uns des autres pour que les attaches puissent se faire plus facilement. Après lavages des particules dans de l'éthanol, puis transfert dans une solution de PBS à pH 7,4, les groupements carboxyliques des thiols longs sont activés par ajout de EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide hydrochlorure) qui permet la formation d'un ester intermédiaire actif. Une solution de NHS (*N*-hydroxysuccinimide) est alors ajoutée pour former un ester NHS stable en solution aqueuse et pouvant réagir avec des groupements amine présents sur les anticorps. Des anticorps polyclonaux de lapin CA 9 (H-120) (sc-25599, SantaCruz Biotechnologies) sont ainsi greffés en surface des particules.

Analyse des interactions particules - cellules

Le processus de fonctionnalisation spécifique permet aux particules de cibler les cellules cancéreuses. Il peut être utile lorsque les particules sont injectées à un endroit du corps, généralement en intraveineux, et doivent ensuite se déplacer jusqu'au site d'intérêt pour s'y accumuler. Dans notre cas, la barrière hémato-encéphalique et la taille trop importante de nos particules ne nous permet pas d'envisager une injection par voie intraveineuse. Une injection des particules directement dans la zone ciblée, *i.e.* dans la tumeur devra être envisagée. De plus, le procédé de fonctionnalisation présente des inconvénients pratiques. Il dure sur deux jours et pour des raisons de stabilité, ne doit pas être réalisé plus d'une semaine en avance. De plus, durant le processus, de nombreuses particules sont perdues en s'attachant aux parois des tubes. Dans ce contexte, le bénéfice apporté par la fonctionnalisation spécifique doit être étudié.

Pour cela, les interactions entre les cellules et les particules non-fonctionnalisées et fonctionnalisées ont été étudiées. Nous avons réalisé des acquisitions par Microscopie Electronique à Transmission (TEM) qui permet d'atteindre une résolution jusqu'à 0,08 nm, et ainsi observer les interactions des particules avec les cellules. Les cellules sont fixées 24 h après la mise des particules puis prélevées et mises en gélatine. Des bains d'osmium pour révéler les lipides et d'acétate d'uranyle pour révéler les protéines sont réalisés. Les échantillons sont ensuite insérés dans une résine pour former des blocs solides. Les blocs sont coupés avec un ultramicrotome en tranche ultrafine (40 nm d'épaisseur) et récupérés sur une grille. Le protocole détaillé est présenté en annexe IV. L'expérience a été réalisée sur des cellules SKRC59 avec des particules fonctionnalisées et non-fonctionnalisées. Les particules utilisées ici sont composées de magnétite (Fe_3O_4) au lieu de permalloy. Elles sont issues de précédentes études et sont décrites en annexe III. Leur diamètre est identique aux particules de permalloy ; l'épaisseur est de 20 nm supplémentaire, soit 80 nm. Les deux couches d'or (au-dessus et en-dessous) étant présentes sur les particules de magnétite comme de permalloy, nous considérons que le changement de matériaux n'influe pas les interactions avec les cellules.

Les acquisitions sont réalisées au TEM de la plateforme du GIN (Institut des Neurosciences de Grenoble). Le faisceau d'électrons est transmis à travers l'échantillon. L'interaction entre les électrons et l'échantillon conduit à la formation d'une image contrastée en noir et blanc selon la densité et la nature chimique de l'échantillon. Les zones grises correspondent à des zones de haute densité, les zones plus claires présentent une faible densité. Les différents éléments cellulaires apparaissent donc dans des nuances de gris alors que les particules apparaissent en noir. Les zones blanches correspondent à un déchirement de la résine.

Deux exemples représentatifs d'images obtenues sont donnés en Figure 29 (A/ avec des particules fonctionnalisées et B/ avec des particules non-fonctionnalisées). Afin d'aider à la compréhension des images, des schémas simplifiés sont présentés en Figure 29C&D.

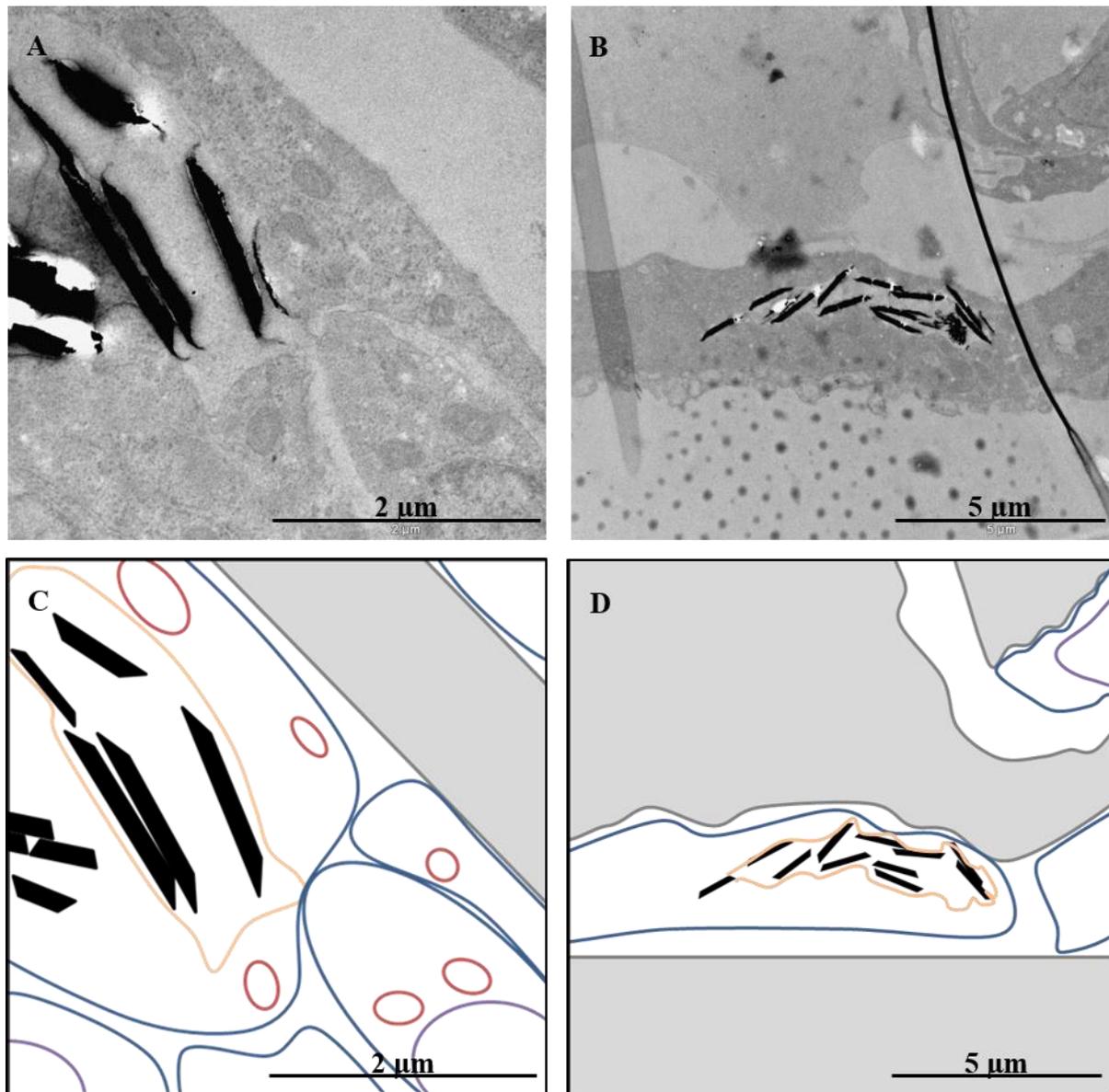


Figure 29 : Images TEM. Particules de magnétite ($\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) déposées sur des cellules SKRC-59 et laissées à incuber pendant 24h ; A/ avec particules fonctionnalisées ; B/ avec particules non fonctionnalisées ; C & D/ Schémas correspondants représentant en noir les particules, en gris la résine, en bleu les membranes cellulaires, en violet les noyaux des cellules, en rouge les mitochondries et en orange le contour de la vésicule

Les images obtenues Figure 29 montrent les particules le plus souvent en coupe sur la tranche. Pour les deux conditions (particules fonctionnalisées et non fonctionnalisées), les particules se situent dans des vésicules à l'intérieur des cellules. Nous observons que plusieurs particules peuvent être présentes dans une même vésicule. L'incubation *in-vitro* de particules fonctionnalisées ou non pendant 24 h avec des cellules SKRC-59 conduit donc à leur internalisation. Néanmoins, nous n'avons pas observé de particules internalisées dans les noyaux cellulaires. Ces observations sont en concordance avec la littérature sur le sujet (Patiño et al. 2012; Butoescu et al. 2009; Y. Cheng et al. 2015).

Bien que les particules de magnétite et de permalloy soient de taille et de forme similaires et soient toutes deux recouvertes d'or, il est nécessaire de vérifier que ce phénomène d'internalisation a lieu aussi avec des particules de permalloy et des lignées de glioblastome.

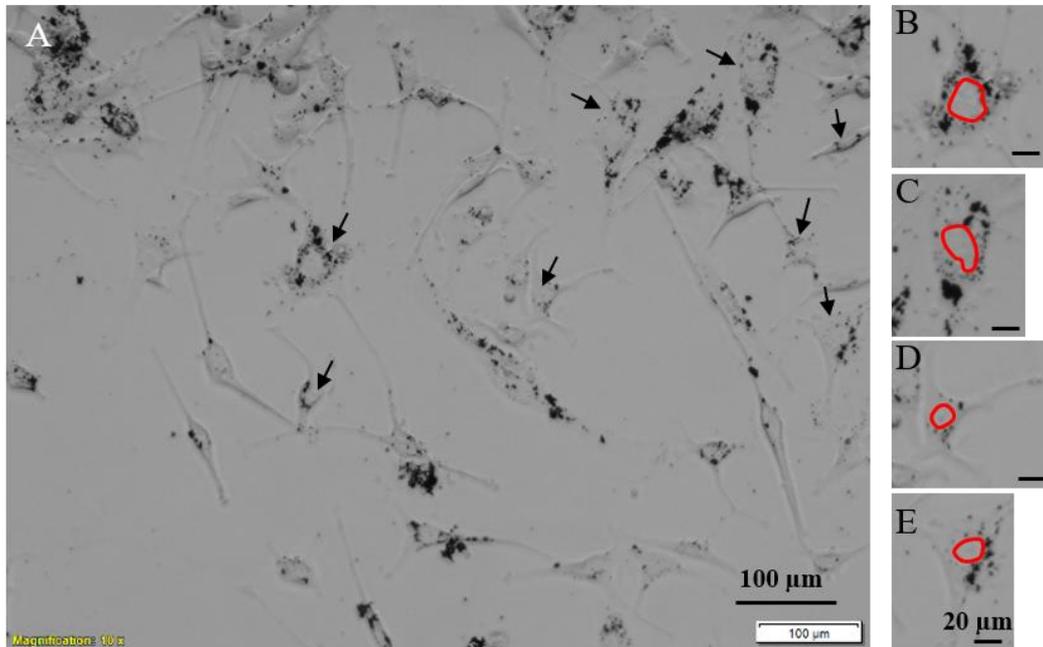


Figure 30 : Image par microscopie optique de particules de permalloy (en noir) et de cellules de glioblastome humain (U87-WT) après 24 h d'incubation A/ grossissement $\times 10$, B, C, D & E/ zones zoomées avec la barre d'échelle égale à $20 \mu\text{m}$.

L'observation au microscope optique (Figure 30) de cellules de glioblastome (U87-WT), 24 h après la mise des particules nous montre une répartition intéressante des particules. En effet, nous observons que l'emplacement des particules coïncide avec celui des cellules. Cependant, sur la plupart des cellules, une zone reste vierge de toutes particules. Cette zone a été entourée en rouge sur les Figure 30B, C, D et E. Or, si les particules étaient accrochées à l'extérieur des cellules, sur la membrane, la répartition des particules serait uniforme. Cette « ombre » observée sur la plupart des cellules correspond en fait au noyau des cellules. Cela nous montre que les particules sont internalisées à l'intérieur des cellules mais qu'elles ne rentrent pas à l'intérieur des noyaux.

Les particules de permalloy pouvant être internalisées *in-vitro* par les cellules de glioblastome après 24 h d'incubation, nous avons décidé d'utiliser ce phénomène pour s'affranchir de l'étape de fonctionnalisation.

IV. Traitement par application d'un champ magnétique rotatif

A ce stade de l'étude, nous sommes maintenant capables de produire des particules dont la configuration magnétique permet un contrôle des particules par application d'un champ externe. Nous avons vu *in-vitro* qu'après 24 h d'incubation les particules sont internalisées et peuvent donc agir mécaniquement sur les cellules. L'objectif est maintenant d'évaluer l'efficacité thérapeutique de la vibration des particules par application d'un champ magnétique rotatif externe et de trouver les paramètres optimaux.

IV.1. Application du champ – Cylindre de Halbach

Nous nous intéressons maintenant à l'application du champ magnétique externe. Nous avons choisi d'utiliser un cylindre de Halbach pour produire le champ magnétique. Un cylindre de Halbach, aussi appelé cylindre magique, est un cylindre composé de plusieurs aimants permanents (classiquement huit ou plus) dont les aimantations sont orientées de façon à produire dans le creux du cylindre un champ homogène. Pendant ces travaux de thèse, deux cylindres différents ont été utilisés :

- un premier pour les études *in-vitro*. Ses dimensions (diamètre intérieur = 3 cm, diamètre extérieur = 11 cm et épaisseur = 4 cm) ont été choisies pour obtenir un champ de l'ordre de grandeur du Tesla, nettement supérieur au champ de saturation des particules étudiées (chapitre 2, III.2). Un support a été fabriqué pour placer un Labtek dans le creux du cylindre. Il s'agit d'une chambre de culture montée sur une lame de microscopie. Le Labtek est centré dans le creux du cylindre et dépasse de 0,5 cm de chaque côté du cylindre.
- un second pour les études *in-vivo* nécessitant une plus grande ouverture pour contenir le berceau destiné à accueillir la souris sans que celui-ci ne frotte les bords du cylindre. Un diamètre interne de 4 cm a donc été utilisé. Afin de compenser la diminution du champ au centre du cylindre, induite par l'agrandissement de l'ouverture, le diamètre extérieur peut lui aussi être augmenté. Cependant, pour que le système mécanique mis au point pour la rotation du cylindre puisse être simplement dupliqué, le diamètre extérieur a été maintenu à 11 cm. Pour ces tests, nous choisissons de placer la tumeur au centre du cylindre, sachant qu'un cerveau de souris ne fait pas plus de 2 cm de long.

L'avantage d'utiliser un tel dispositif est l'homogénéité du champ dans tout le volume du creux du cylindre (Figure 31B), à condition d'utiliser un cylindre infini ou très long. Cependant, à cause de sa relativement faible épaisseur, le champ créé par notre cylindre selon l'axe Ox, (Figure 31A) n'est pas homogène, même en restant à l'intérieur du cylindre. L'influence de cette inhomogénéité sur l'efficacité

du traitement a été étudiée et sera présentée dans la partie suivante. Le cylindre pour les applications *in-vitro* permet d'appliquer un champ compris entre 0,5 T au bord du cylindre et 0,86 T au centre. Le champ induit par le cylindre destiné à des applications *in-vivo* est quant à lui de 0,62 T au centre du cylindre et 0,4 T au bord.

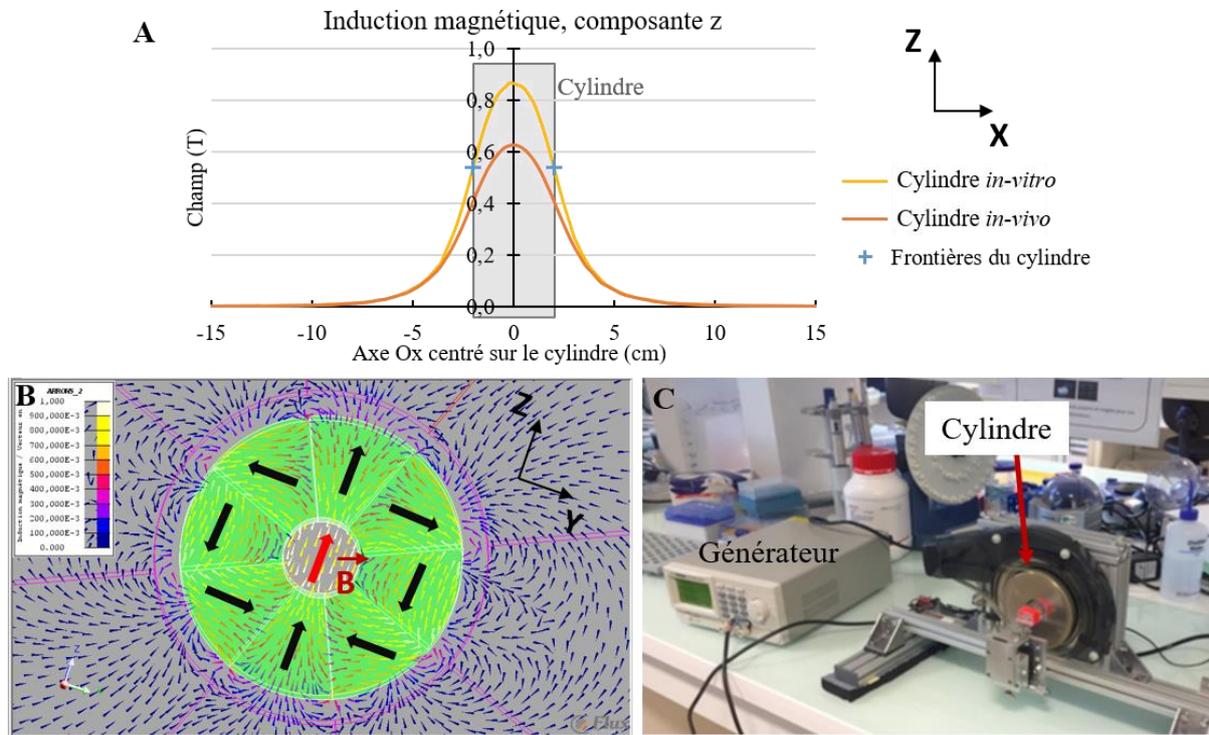


Figure 31 : A/ Courbe de l'induction magnétique créée par le cylindre en son centre selon l'axe Ox ; B/ Simulation de l'induction magnétique créée par le cylindre dans le plan (Ozy) ; C/ Photographie du système de mise en rotation du cylindre et de son générateur

Afin d'obtenir un champ magnétique rotatif, un système composé d'un générateur, d'un moteur et d'une courroie a été construit au sein du laboratoire SPINTEC (Figure 31C). Il permet la rotation du cylindre jusqu'à une fréquence de 40 Hz. Un ventilateur a été placé pour refroidir le moteur et ainsi permettre l'utilisation du cylindre pendant plusieurs heures. Les supports insérés dans le cylindre en rotation, soumis aux variations de flux magnétique, sont isolants pour éviter les courants induits qui pourraient entraîner de forts échauffements.

IV.2. Effet du traitement sur des cellules *in-vitro*

IV.2.1. Méthode

Les cellules U87 sontensemencées dans des Labteks 4 puits à une concentration de 3.10^4 cellules/puits et mises à l'incubateur pour 24 h. Les particules sont lavées deux fois à l'éthanol absolu puis deux fois au milieu de culture. 10 à 100 μl de particules en suspension à 1 g/l sont ajoutés dans chaque puits selon les conditions (correspondant à des concentrations de $5,9.10^{-6}$ à $5,9.10^{-5}$ g/cm²). Les Labteks sont de nouveau mis à l'incubateur pendant 24 h pour laisser aux particules le temps de sédimenter et d'être internalisées par les cellules.

Les Labteks sont ensuite déposés sur le support dans le creux du cylindre. Le cylindre est alors mis en rotation à une fréquence variant entre 5 et 20 Hz pendant 1 à 45 min.

IV.2.2. Acquisitions au microscope et optimisation des paramètres

Vue d'ensemble

Après l'application du champ magnétique, des acquisitions d'images au microscope sont réalisées pendant plusieurs jours pour le suivi des cellules. Pour cela, deux méthodes ont été utilisées à l'aide d'une station OKOLAB. La première consiste à placer les Labteks sous microscope dans une chambre contrôlée en température, en humidité et en gaz. Plusieurs points d'observations sont choisis dans chaque puits et une acquisition est automatiquement réalisée toutes les 20 min. Cette technique permet d'obtenir des films en accéléré pour suivre la croissance et les mouvements des cellules. La deuxième technique utilisée est la réalisation d'un scan du Labtek entier quotidiennement jusqu'à deux jours après le traitement, en remplaçant entre chaque acquisition les Labtek dans l'incubateur. Cette technique permet d'obtenir une image haute résolution de l'ensemble des cellules. Dans notre cas, ces données sont intéressantes pour rendre compte de l'inhomogénéité de l'effet obtenu.

En effet, nous observons après application du champ magnétique rotatif une diminution du nombre de cellules restantes mais l'effet est très différent d'une zone à l'autre. Quelques exemples sont donnés en Figure 32. Alors qu'il n'y a plus aucune cellule après l'application du champ en zone B1, l'effet est moins important en zone B2 qui contient un grand nombre de cellules. De même, en zone C1 il n'y a presque plus de cellules sur la droite de l'image alors qu'en zone C2 les cellules sont présentes sur toute la surface.

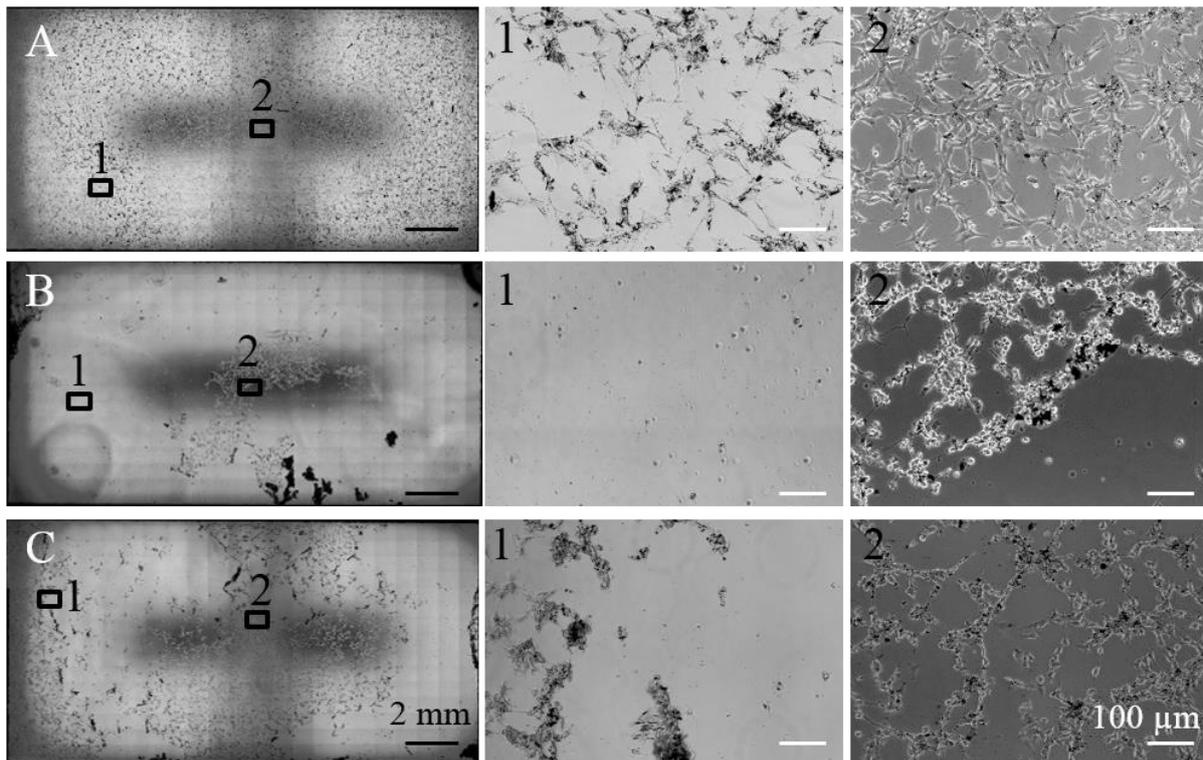


Figure 32 : Scan de Labtek A/ avant application du champ ; B&C/ après application du champ magnétique pendant 45 min, pour des concentrations de particules de 50 (C) et 100 (B) $\mu\text{g/puits}$. Barres d'échelle = 2 mm. 1 & 2 : images extraites du scan depuis les zones encadrées correspondantes. Barres d'échelle = 100 μm .

La répartition des cellules restantes après traitement montre que la plupart des cellules se situent au niveau de l'axe central et sur les bords des puits, notamment sur la droite des puits (c'est-à-dire sur la gauche des images, la caméra étant placée sous les Labteks) (Figure 32). Ce phénomène sera expliqué dans les parties suivantes. Le nombre de cellules restantes après traitement semble nettement diminué, ce qui nous montre un effet létal du traitement sur les cellules. Pour les deux exemples montrés ici, l'effet semble plus important pour une concentration en particules de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Aspects morphologiques

Outre le nombre de cellules qui diminue à la suite de la stimulation magnéto-mécanique des particules, la morphologie des cellules est anormale après TEMMP. Quelques exemples sont présentés en Figure 33. Pour comparaison, la Figure 33A montre des cellules sans particules et la Figure 33B montre des cellules avec particules mais sans application du champ magnétique rotatif.

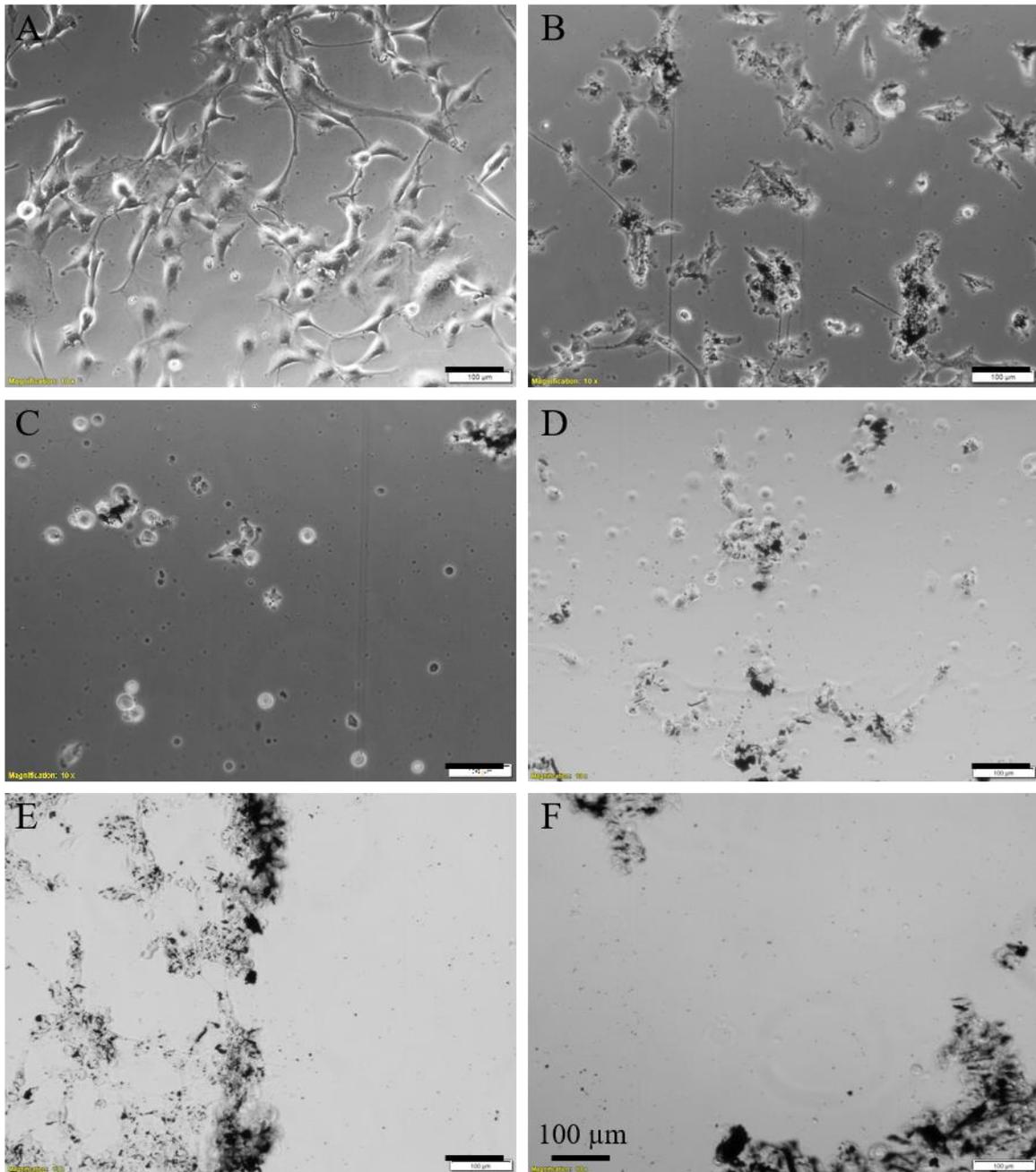


Figure 33 : Images au microscope de cellules U87 A/ seules ; B/ avec des particules de permalloy ; C, D, E, F/ avec des particules et soumises au champ magnétique rotatif avec C/ $f = 20$ Hz pendant 45 min ; D/ $f = 20$ Hz pendant 10 min ; E/ $f = 8$ Hz pendant 22 min ; F/ $f = 20$ Hz pendant 15 min avec un arrêt toutes les 2 min. Les barres d'échelle correspondent à $100 \mu\text{m}$.

Les cellules U87 sont adhérentes et forment des protrusions qui ont un rôle essentiel dans la migration, dans l'exploration du milieu extracellulaire mais aussi dans la communication intercellulaire (Om Ablazi and Siar 2015; Ruiz-Ontañón et al. 2013; Ady et al. 2014). Les cellules présentes en Figure 33C&D après application du champ ne comportent plus de protrusions et sont plus rondes. En Figure 33E&F, des « filets » de cellules riches en particules sont visibles. Ces prises de vue ont été réalisées au niveau du bord des puits. Une hypothèse pouvant expliquer ces phénomènes est le détachement des cellules dû au mouvement des particules. Un détachement des cellules à la suite d'un TEMMP avait

déjà été reporté (Hapuarachchige et al. 2016). La formation de filets pourrait s'expliquer par un mouvement de « *tumbling* » des particules, déjà observé dans une étude précédente (Courcier et al. 2011). Il s'agit d'un déplacement en translation, engendré par la rotation d'amas de particules entraînés par le champ tournant, combinée à leur appui sur la surface du fond du puits, à la manière d'une roue. Les particules étant internalisées dans les cellules, il est possible qu'un tel mouvement des particules se fasse en entraînant les cellules. Ce phénomène expliquerait aussi l'inhomogénéité de la répartition des cellules après l'application du champ. En effet, les filets de cellules entraînés par les particules se déplaceraient petit à petit vers les bords.

De nombreux débris cellulaires tapissent le fond du puit après le traitement. Ils se différencient des cellules par leur taille plus petite. La présence de débris cellulaire juste après l'application du champ nous indique que des cellules sont mortes brutalement et rapidement. Un phénomène de « broyage » des cellules par les particules pourrait expliquer cette destruction rapide. Il est possible que les deux phénomènes (broyage et détachement) aient lieu simultanément ou que l'un soit la cause de l'autre.

Comptage du nombre de cellules

Afin d'évaluer au mieux l'efficacité du traitement malgré l'inhomogénéité de l'effet, nous avons analysé les images acquises et compté le nombre de cellules restantes pour chaque condition sur un minimum de 4 images représentatives par expérience, chaque expérience étant réalisée entre 2 et 6 fois selon les conditions. Les résultats ont été normalisés, 100 % correspondant au nombre de cellules avant traitement. Les comptages réalisés 24 et 48 h après l'application du champ permettent d'évaluer de possibles effets sur les cellules qui se manifesteraient à plus long terme. Pour optimiser les paramètres, la concentration en particules, l'amplitude du champ, la durée d'exposition au champ ainsi que la fréquence ont été testés.

Concentration en particules

Tout d'abord nous avons testé différentes concentrations de particules, de 10 à 100 $\mu\text{g/ml}$ pour un champ à 20 Hz pendant 45 min. Les résultats sont montrés en Figure 34.

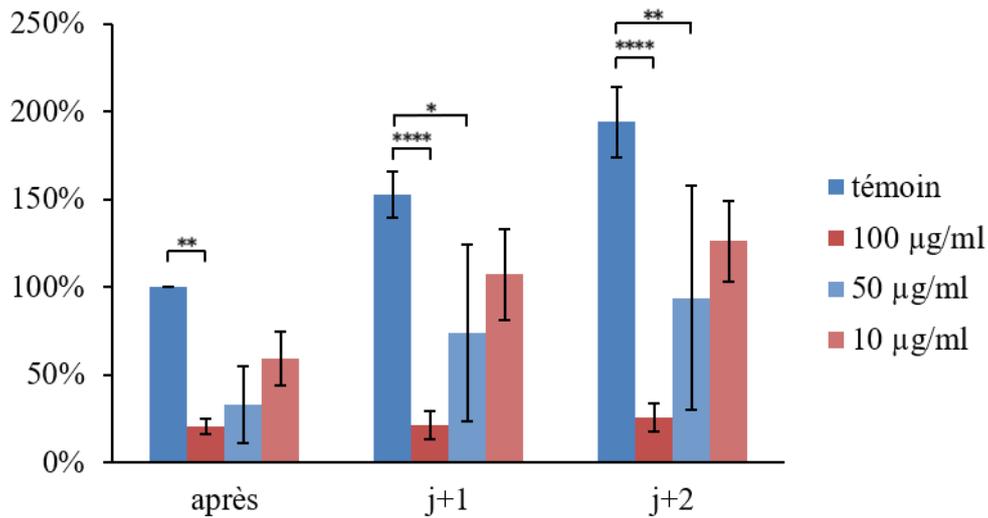


Figure 34 : Pourcentage de cellules restantes après application du champ compris entre 0,4 et 0,87 T à 20 Hz pendant 45 min pour différentes concentrations de particules ; Valeur p calculée selon la méthode 2-way ANOVA : **** $p < 0,0001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

Directement après l'application du champ, il ne reste que 21 % des cellules pour une concentration de 100 µg/ml, 33 % pour une concentration de 50 µg/ml et 60% pour une concentration de 10 µg/ml. Les deux plus hautes concentrations ont donc un effet létal important sur les cellules. Cependant, alors que la quantité de cellules n'atteint que 25 % après deux jours pour une concentration de 100 µg/ml, les cellules traitées avec 50 µg/ml de particules reprennent leur croissance jusqu'à atteindre 94 %. La concentration la plus efficace pour obtenir une diminution du nombre de cellules est donc de 100 µg/ml pour un traitement de 45 min à 20 Hz. C'est donc cette concentration qui est utilisée pour le reste des expérimentations.

La différence du nombre de cellules après traitement avec 100 µg/ml entre j_0 , $j+1$ et $j+2$ est non significative. Cela laisse supposer que certaines cellules sont toujours en vie suite à l'application du traitement mais qu'elles ne sont plus capables de se diviser et de proliférer.

Amplitude du champ

Le cylindre de Halbach choisi pour appliquer le champ magnétique induit un champ d'amplitude fixe. Afin d'étudier l'effet produit par des champs d'amplitude inférieure, nous avons placé un Labtek 4 puits hors du cylindre, sur l'axe Ox, en plus du Labtek situé dans le cylindre (Figure 35A).

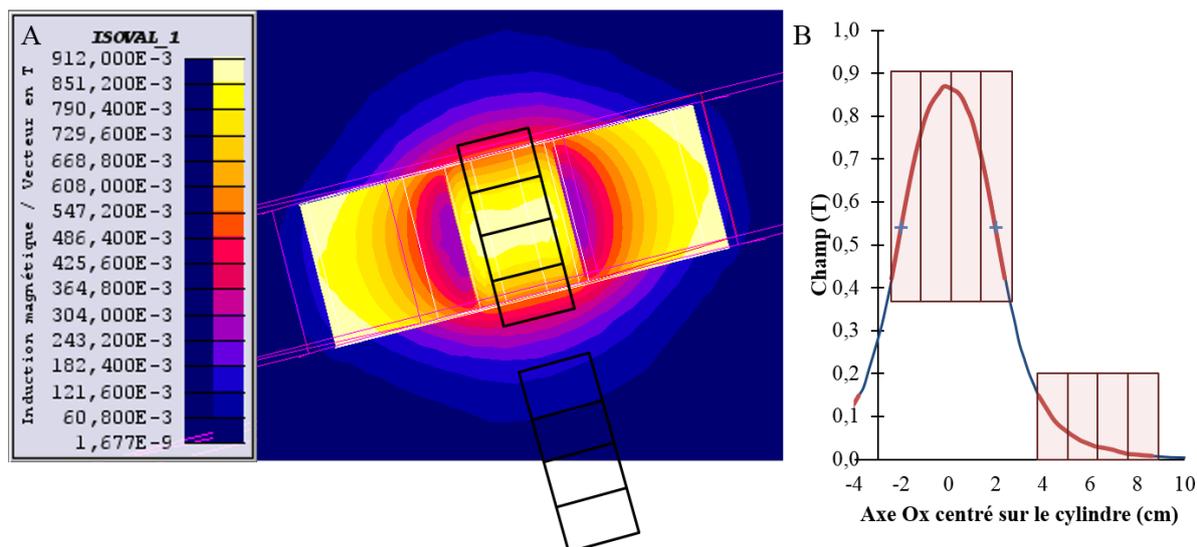


Figure 35 : A/ Simulation réalisée avec le logiciel Flux3D du champ magnétique créé par le cylindre, avec la représentation de l'emplacement des deux Labtek. B/ Courbe selon l'axe Ox extraite de la simulation. Les encadrés rose pâle indiquent l'emplacement des Labtek.

L'inconvénient majeur de cette technique est le fort gradient appliqué sur les particules, qui risque d'attirer les particules vers le centre du cylindre. Le champ appliqué sur les deux puits centraux du Labtek situé dans le cylindre est de 750 à 870 mT (Figure 35B). Les deux puits extérieurs perçoivent un champ entre 400 et 750 mT. Pour le Labtek situé hors du cylindre, le champ appliqué sur le puit le plus proche du cylindre est de 59 à 130 mT et décroît jusqu'à une fourchette de 7 à 12 mT pour le puit le plus éloigné.

Le nombre de cellules restant après l'application du champ à 20 Hz pendant 45 min est compté pour chaque puits (Figure 36).

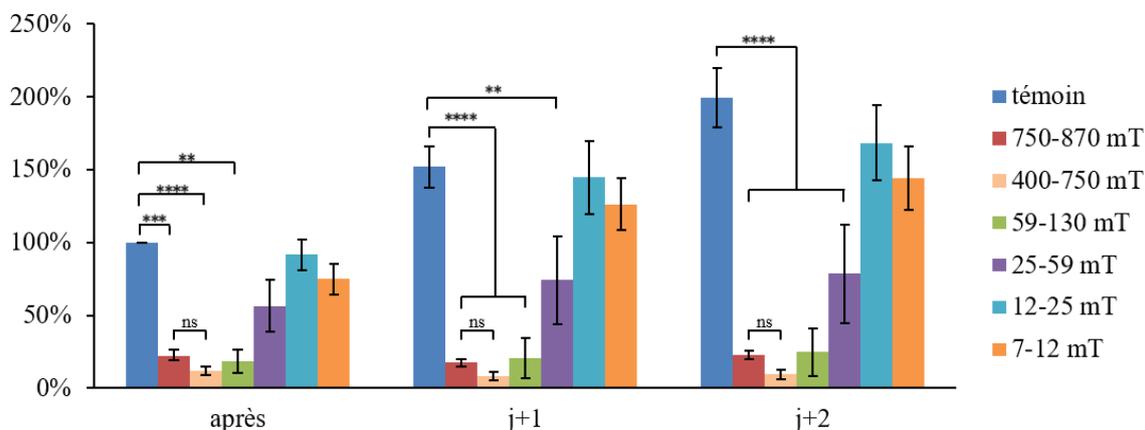


Figure 36 : Pourcentage de cellules restantes avec 100 µg/ml de particules après application du champ à 20 Hz pendant 45 min selon l'amplitude du champ, Valeur p calculée selon la méthode 2-way ANOVA : ****p < 0,0001, ***p < 0,001, **p < 0,01.

Le nombre de cellules juste après traitement diminue significativement pour les puits situés dans le cylindre percevant des champs de 400 à 870 mT et pour le puits percevant un champ de 59 à 130 mT. En effet, il ne reste que 12 % de cellules suite à l'application d'un champ compris entre 400 et 750 mT. Cette forte diminution du nombre de cellules peut être interprétée par un optimum des forces appliquées sur les particules, le gradient de champ étant maximal sur ce puit, bien que l'amplitude de champ ne soit pas à son maximum. La diminution du nombre de cellules pour un champ de 750 à 870 mT et de 59 à 130 mT montre un effet létal important avec 22 et 18 % de cellules restantes, respectivement. Pour un champ entre 25 et 59 mT, le nombre de cellules diminue de manière moins significative, avec 57 % de cellules restantes. Pour un champ inférieur à 25 mT, le nombre de cellules diminue peu avec 92 et 75 % de cellules restantes pour un champ de 12 à 25 mT et de 7 à 12 mT, respectivement. 24 et 48 h après l'application du champ, la différence entre les cellules contrôles et les cellules avec particules soumises à un champ entre 59 et 870 mT est très significative. De manière intéressante, nous observons une diminution du nombre de cellules 24 h après l'application du champ pour le Labtek situé dans le cylindre (8 et 18 % pour les puits extérieurs et intérieurs, respectivement). Cette diminution peut s'expliquer par des débris cellulaires comptés comme des cellules juste après le traitement ou par des cellules mortes pendant les premières 24 h post-traitement. Bien que significativement plus faible que le contrôle, le nombre de cellules pour le puits soumis à un champ de 59 à 130 mT repart légèrement à la hausse avec 21 % de cellules restantes à $j+1$ et 25 % à $j+2$.

Les résultats montrent que le traitement n'a quasiment plus d'effets en dessous de 25 mT avec une viabilité d'au minimum 75 %. Dans la littérature (revoir Tableau 2, page 51), des amplitudes de champ inférieures ont été testées et montrent tout de même un effet létal plus important, diminuant jusqu'à ~10 % de viabilité (D.-H. Kim et al. 2010; Contreras et al. 2015; Martínez-Banderas et al. 2016; Vegerhof et al. 2016; Wong et al. 2017; Chiriach et al. 2018; Zamay et al. 2016). Les études de la littérature effectuées sur des champs compris entre 25 et 59 mT montrent également une viabilité diminuée mais de manière moins importante (Liu et al. 2012; Domenech et al. 2013; E. Zhang et al. 2014), ce qui est cohérent avec les 57 % de cellules restantes. Deux études montrent tout de même une viabilité nettement réduite avec 20 et ~43 % de cellules restantes pour des champs de 30 et 40 mT, respectivement (Leulmi et al. 2015; Shen et al. 2017). Nous obtenons une baisse significative du nombre de cellules pour un champ appliqué supérieur à 59 mT avec 22 % de cellules restantes au maximum. Une viabilité similaire a été obtenue dans une étude appliquant un champ de 124 mT (Master et al. 2015). Les études réalisées avec des champs compris entre 0,07 et 1 T montrent aussi un effet létal du traitement mais moins important que celui obtenu dans notre étude (Liu et al. 2012; D. Cheng et al. 2014; Muroski et al. 2016; Hapuarachchige et al. 2016; Mansell et al. 2017). Les différences de résultats observées peuvent s'expliquer par la diversité des autres paramètres du traitement, qui rendent compliqué une réelle comparaison avec les études déjà publiées.

Les résultats obtenus pour des amplitudes plus faibles, notamment pour le Labtek situé hors du cylindre, sont à regarder avec précautions. De manière attendue, le gradient subi par les particules les entraîne vers la paroi située la plus proche du cylindre. Une expérience menée avec un Labtek 1 puits pour permettre aux particules de se déplacer dans tout le Labtek montre la formation d'un gros amas de particules vers la paroi la plus proche du cylindre (Figure 37B).

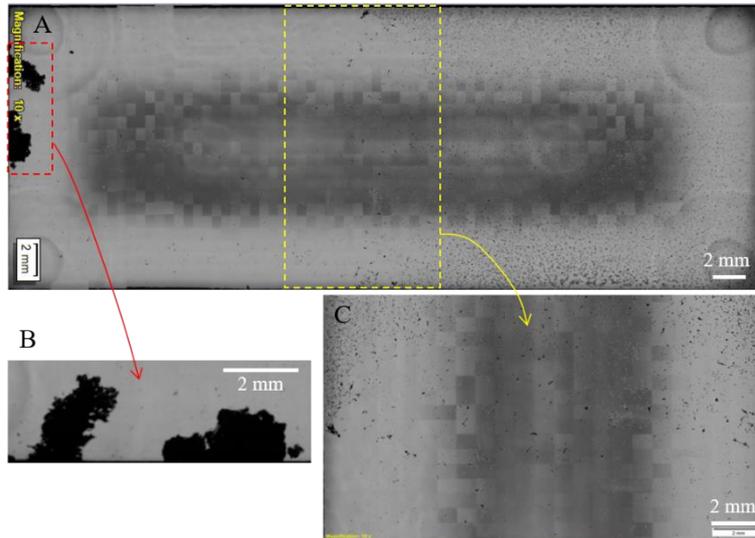


Figure 37 : A/ Scan d'un Labtek 1 puits après application du champ hors du cylindre pendant 45 min, le côté gauche étant placé vers le cylindre ; B/ zoom de la zone comportant des amas de particules, encadrée en rouge et C/ zoom de la délimitation entre les cellules détachées et non détachées, encadrée en jaune.

De plus une démarcation assez nette apparaît vers le centre du Labtek entre une zone où il n'y a presque plus de cellules restantes et une zone qui comporte encore un grand nombre de cellules (Figure 37C). Cela remet en cause les résultats précédemment obtenus. En effet, les effets obtenus peuvent être dus au gradient, et non seulement à l'amplitude du champ. Les particules sont attirées vers le cylindre, et les cellules sont probablement emmenées avec elles. De plus, la concentration en particules dans les puits éloignés du cylindre diminue suite au déplacement des particules vers le cylindre.

Le maximum d'efficacité est donc obtenu pour des champs de 400 à 870 mT. La différence entre les puits intérieurs et extérieurs du Labtek situé dans le cylindre n'est pas significative. La suite des expériences sera donc réalisée sur un Labtek situé dans le cylindre sur au moins un puits intérieur et un puits extérieur pour chaque condition.

Temps d'exposition au champ magnétique

Différents temps d'application du champ ont été testés. Le champ rotatif a été appliqué pendant 10, 15 et 45 min de manière continue et pendant 15 min au total avec un arrêt du cylindre toutes les 2 min (Figure 38).

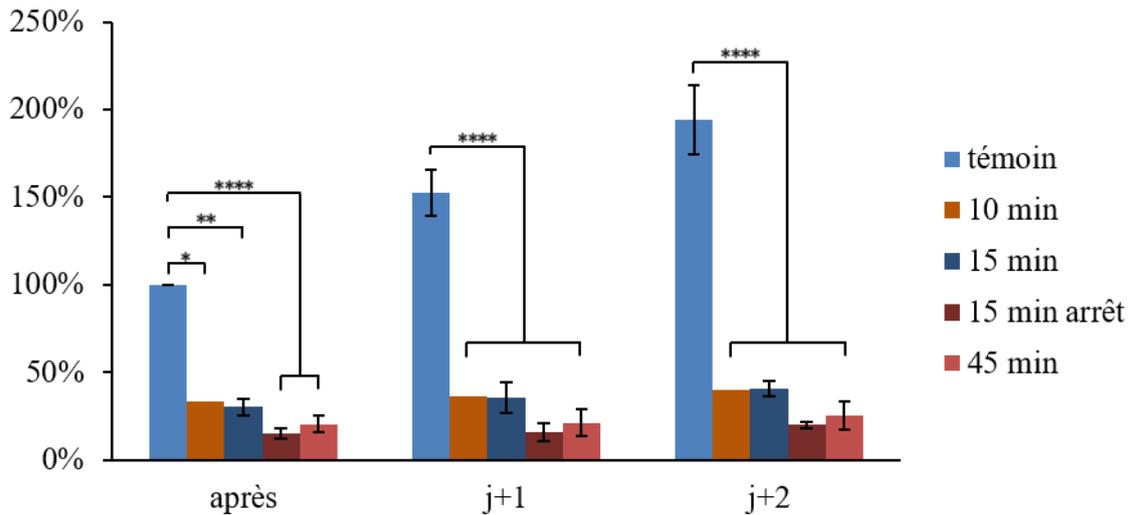


Figure 38 : Pourcentage de cellules restantes avec 100 µg/ml de particules après application du champ compris entre 0,4 et 0,87 T à 20 Hz pendant 10 à 45 min, Valeur p calculée selon la méthode 2-way ANOVA : ****p < 0,0001, **p < 0,01, *p < 0,05

Le traitement avec les différents temps et modes testés provoque une diminution significative du nombre de cellules. L'effet maximum est obtenu pour une application du champ pendant 45 min avec 21 % de cellules restantes et pendant 15 min avec arrêt avec 15 % de cellules restantes juste après traitement. Nous observons 33 % de cellules restantes après 10 min d'application du champ et 30 % après 15 min. De manière attendue, l'effet augmente avec le temps d'application du champ pour le mode continu. Cette relation avait déjà été observée dans de précédentes publications (D. Cheng et al. 2014; Contreras et al. 2015; Vegerhof et al. 2016; Chiriatic et al. 2018). Lorsque le champ rotatif est appliqué pendant 15 min au total, le maximum d'effet est obtenu lorsque la rotation du champ est stoppée toutes les 2 min. Bien que non significativement différent, l'application du champ pendant 15 min avec des arrêts donne de meilleurs résultats que lorsque le champ est appliqué pendant 45 min. Une observation similaire avait été observée (Master et al. 2015) avec un champ alternatif appliqué pendant 10 min puis stoppé pendant 5 min, ce motif étant répété 3 fois. Dans cette étude, l'application du champ avec des arrêts entraîne une diminution de la viabilité plus importante que lorsque le champ est appliqué en mode continu, pour une durée totale d'application du champ identique. Lors de l'application du champ, il est possible que des particules soient remises en suspension à cause de l'agitation créée par le mouvement des particules. Lorsque le champ est arrêté, les particules retombent alors sur d'autres cellules qui n'avaient peut-être pas encore été impactées. En répétant ce motif, le nombre de cellules impactées par le traitement augmente plus rapidement.

Le nombre de cellules augmente légèrement dans les 48 h post-traitement, allant jusqu'à 40 et 41 % pour un temps d'application du champ de 15 et 10 min, respectivement. Pour un temps d'application de 45 min, 25 % de cellules sont comptées 2 jours après l'application du champ et 20 % pour un champ de 15 min avec des arrêts.

Une baisse plus importante de la viabilité des cellules pour un champ appliqué sur une durée plus longue est en accord avec la littérature (Contreras et al. 2015; Chiriac et al. 2018; Vegerhof et al. 2016). De plus, une saturation de l'effet au-delà de 1 h de traitement avait aussi été démontrée (D. Cheng et al. 2014). Pour cette raison, nous n'essayons pas d'appliquer le traitement sur une durée plus longue, le bénéfice apporté n'étant pas significatif.

L'effet maximal est donc obtenu pour une durée de 15 min avec arrêt de la rotation du cylindre toutes les 2 min. Cependant, nous cherchons à optimiser les paramètres pour diminuer le nombre de cellules *in-vitro*, mais aussi *in-vivo*. Or, l'hypothèse d'une agitation des particules qui se déposeraient alors sur de nouvelles cellules, permet de maximiser l'effet dans un cadre *in-vitro* mais n'est pas transposable *in-vivo*. Pour cette raison, nous choisissons de poursuivre l'étude avec un temps d'application de 45 min, qui permet aussi d'obtenir une diminution très significative du nombre de cellules.

Fréquence du champ magnétique

La plupart de nos tests ont été réalisés à une fréquence de 20 Hz. Cette fréquence a été choisie pour comparaison avec les études similaires utilisant un cylindre de Halbach (Y. Cheng et al. 2015; Muroski et al. 2016; Mansell et al. 2017) et avec l'étude déjà effectuée dans le laboratoire (Leulmi et al. 2015). Nous avons tout de même voulu tester des fréquences différentes. Des études comparatives entre des fréquences ayant montré une destruction plus importante des cellules en diminuant la fréquence (D.-H. Kim et al. 2010; Wong et al. 2017), nous choisissons de tester deux fréquences inférieures à 20 Hz. Le champ rotatif a été appliqué pendant 30 min à une fréquence de 5,6 Hz, et pendant 22 min à une fréquence de 8 Hz (Figure 39).

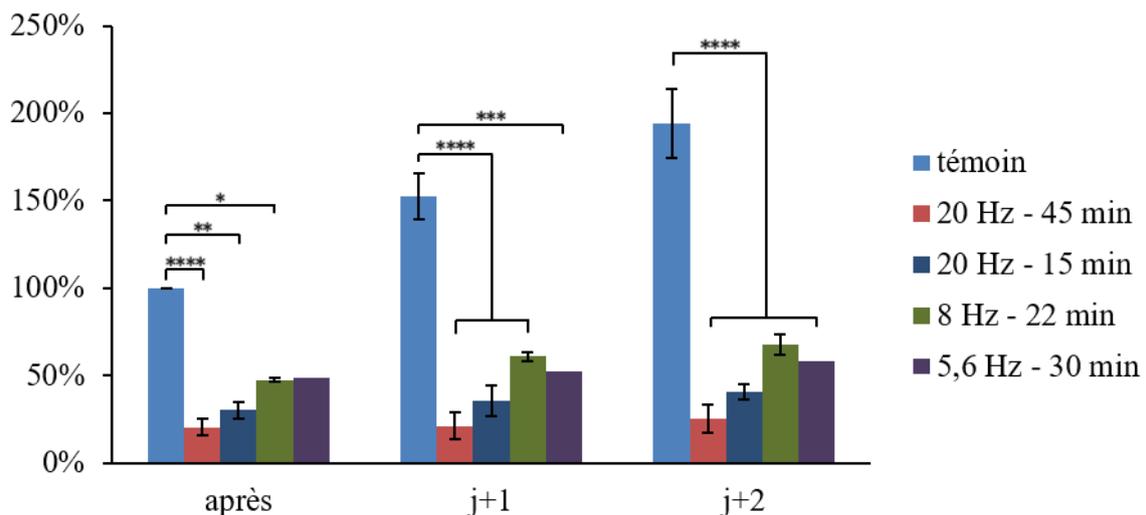


Figure 39 : Pourcentage de cellules restantes avec 100 µg/ml de particules après application du champ compris entre 0,4 et 0,87 T à différentes fréquences pendant 45 min, Valeur p calculée selon la méthode 2-way ANOVA : **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

Le champ rotatif appliqué à des fréquences inférieures à 20 Hz entraîne une diminution du nombre de cellules mais moins importante que pour un champ à 20 Hz. 48 et 49 % de cellules sont comptées après l'application du champ à 8 et 5,6 Hz, respectivement contre 30 % pour un champ à 20 Hz pendant 15 min. L'augmentation de la durée d'application pour « compenser » la diminution de la fréquence ne suffit pas. Les cellules restantes continuent de proliférer après le traitement à plus faible fréquence mais plus lentement que les cellules contrôles. En effet, les cellules soumises à un champ à 8 Hz passent de 48 à 68 % en 2 jours alors que les cellules contrôles passent de 100 à 199 %, soit un doublement de la population.

Dans une étude publiée en 2017 et dans laquelle des fréquences inférieures à 20 Hz ont été testées, les auteurs concluent à une légère augmentation de l'effet létal pour de plus faibles fréquences (Wong et al. 2017). De manière intéressante, nous observons ici un effet contraire avec une augmentation de l'effet létal lorsque la fréquence augmente. L'amplitude du champ appliquée par Wong et al. est en revanche nettement inférieure à la nôtre (14 mT). Il est possible qu'une fréquence plus faible soit préférable avec une plus faible amplitude du champ. En effet, l'énergie nécessaire à la mise en mouvement des particules augmente avec la fréquence. Il faut alors appliquer un champ plus fort pour garder une amplitude de mouvements des particules suffisantes. Si le champ appliqué est faible, une amplitude de mouvements suffisante pour exercer un stress sur les cellules ne peut alors être obtenue que pour de plus faibles fréquences.

Dans notre étude, la fréquence de 20 Hz choisie initialement provoque la plus forte diminution du nombre de cellules avec une croissance des cellules plus lente les jours suivants le traitement. Cette fréquence a donc été maintenue pour la suite des expérimentations.

Notre objectif est ici d'induire la mort des cellules cancéreuses. Après avoir étudié les effets obtenus avec les différents paramètres, nous pouvons maintenant choisir ceux qui provoquent un effet létal plus important pour la suite de notre étude. Les expériences suivantes sont donc réalisées avec une concentration de 100 µg/ml de particules de permalloy déposées 24 h avant l'application du champ. Le Labtek est inséré dans le creux du cylindre de manière centrée et perçoit un champ entre 400 et 870 mT. Le cylindre est mis en rotation à 20 Hz pendant 45 min.

IV.2.3. Marquage au Bleu de Trypan des cellules restantes

Les observations et comptages au microscope ont permis de choisir les paramètres optimaux pour maximiser l'effet en s'intéressant au nombre de cellules restantes, sans distinction entre les cellules vivantes ou mortes. Afin de confirmer l'effet observé au microscope, de mieux le quantifier et de

distinguer les cellules vivantes des cellules mortes ou débris cellulaires, du Bleu de Trypan est utilisé. Le bleu de Trypan rentre dans toutes les cellules mais ressort des cellules vivantes. Les cellules mortes sont alors colorées en bleu alors que les cellules vivantes sont incolores.

Les cellules restantes juste après traitement sont trypsinées puis 10 μ l sont récoltés dans un tube Eppendorf. 10 μ l de Bleu de Trypan sont ajoutés puis le mélange est transféré dans une cellule de Malassez. Il s'agit d'un dispositif comportant un quadrillage qui permet de compter les cellules dans un volume donné. Les cellules mortes, colorées en bleu, et les cellules vivantes, incolores, sont comptées. Le pourcentage de cellules vivantes est exprimé en fonction du nombre de cellules totales avant traitement (Figure 40).

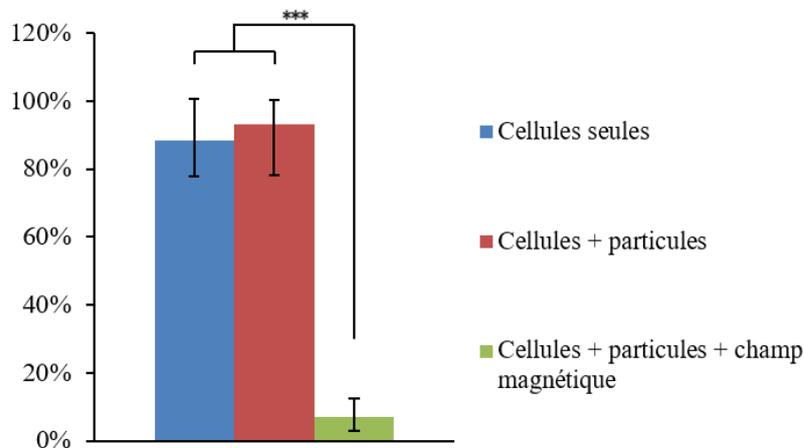


Figure 40 : Pourcentage de cellules vivantes pour des cellules seules, des cellules incubées avec des particules et des cellules incubées avec des particules et soumises au champ magnétique rotatif, comptage réalisé lors de trois expériences différentes. La concentration en particules est de 100 μ g/ml et le champ compris entre 0,4 et 0,87 T à 20 Hz est appliqué pendant 45 min. ***p-value<0.001 calculée d'après le test de Student comme expliqué en annexe VI.

Les différents comptages effectués sur les cellules restantes après traitement montrent que seulement 7 % des cellules sont encore vivantes. Ce chiffre concorde avec les résultats précédents. Les comptages réalisés sans coloration des cellules nous donnaient 21 % de cellules restantes après traitement. Le pourcentage de cellules vivantes, plus faible, nous confirme la présence de cellules mortes et de débris cellulaires parmi les cellules restantes. Ce chiffre est cependant à nuancer à cause du biais dû à la difficulté de compter les cellules en présence de particules. En effet, les particules forment des filets solidaires (déjà montrés en Figure 33E) dans lesquels sont prises des cellules que l'on ne peut donc pas compter. Une observation au microscope avec du bleu de Trypan de ces filets nous montre que la majorité des cellules prisonnières sont colorées en bleu, et sont donc des cellules mortes. Nous pouvons alors estimer que le comptage des cellules vivantes après traitement est cohérent.

Nous avons donc optimisé les paramètres expérimentaux, en comptant les cellules restantes juste après le traitement, et étudié leur viabilité. Le traitement des cellules par une concentration de 100 μ g/ml de

particules vortex et l'application d'un champ magnétique rotatif de $\sim 0,6$ T à 20 Hz pendant 45 min ne laisse que 21 % de cellules restantes. Le marquage au bleu de Trypan nous montre que seulement 7 % des cellules sont encore vivantes après traitement. Nos résultats sont cohérents avec les études utilisant des paramètres similaires. Deux études ont également utilisé un cylindre de Halbach pour appliquer un champ de 1 T à 20 Hz avec des particules en forme de disque. Pour des vortex de permalloy et un champ appliqué pendant 30 min, Cheng et al. obtiennent une viabilité de 40 % par un test MTT et de ~ 13 % par un test 7-AAD (Y. Cheng et al. 2015). Pour des particules SAF et un traitement de 30 min appliqué 3 jours de suite, une viabilité de ~ 37 % est mesurée par la Luciférase (Muroski et al. 2016).

IV.2.4. Observation des cellules restantes après traitement

Les comptages des cellules réalisés 24 et 48 h après le traitement montrent une croissance des cellules diminuée suite au traitement. Pour vérifier cet effet, les résultats sont exprimés en fonction du nombre de cellules juste après traitement (Figure 41). Pour comparaison, le contrôle cellules + particules a été réalisé en ensemençant entre 1 et $3 \cdot 10^4$ cellules/puits, pour rendre compte de la diminution du nombre de cellules suite au traitement. La concentration en particules est cependant identique ($100 \mu\text{g/ml}$), le nombre de particules dans les puits après traitement étant inchangé.

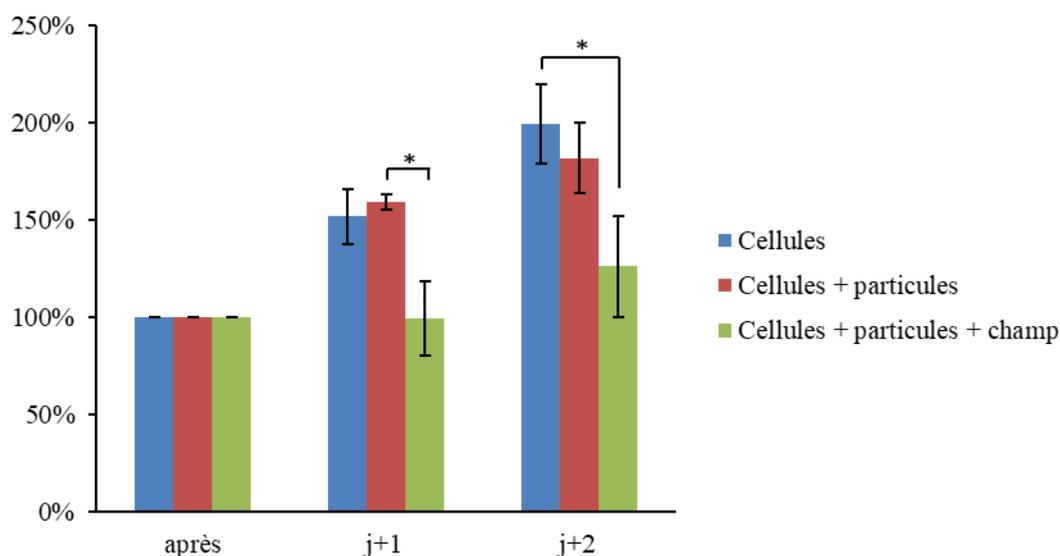


Figure 41 : Pourcentages de cellules les jours suivants le traitement, normalisés à 100 % avec le nombre de cellules juste après traitement. La concentration en particules est de $100 \mu\text{g/ml}$ et le champ compris entre 0,4 et 0,87 T à 20 Hz est appliqué pendant 45 min. Valeur p calculée selon la méthode 2-way ANOVA : $*p < 0,05$.

Les comptages montrent un doublement de la population des cellules seules en 48 h, qui passent de 100 à 199 %. Les cellules avec particules ont une croissance légèrement plus faible avec un nombre de cellules qui évolue de 100 à 182 %. Pour les cellules traitées, la croissance est beaucoup plus faible, le

nombre de cellules passant de 100 à 126 % après 48 h. Ces résultats confirment l'impact du traitement sur la croissance des cellules restantes après traitement.

Nous avons voulu visualiser le devenir des cellules restantes après le traitement. Pour cela, nous avons observé les cellules au microscope optique sur une durée de 48 h.

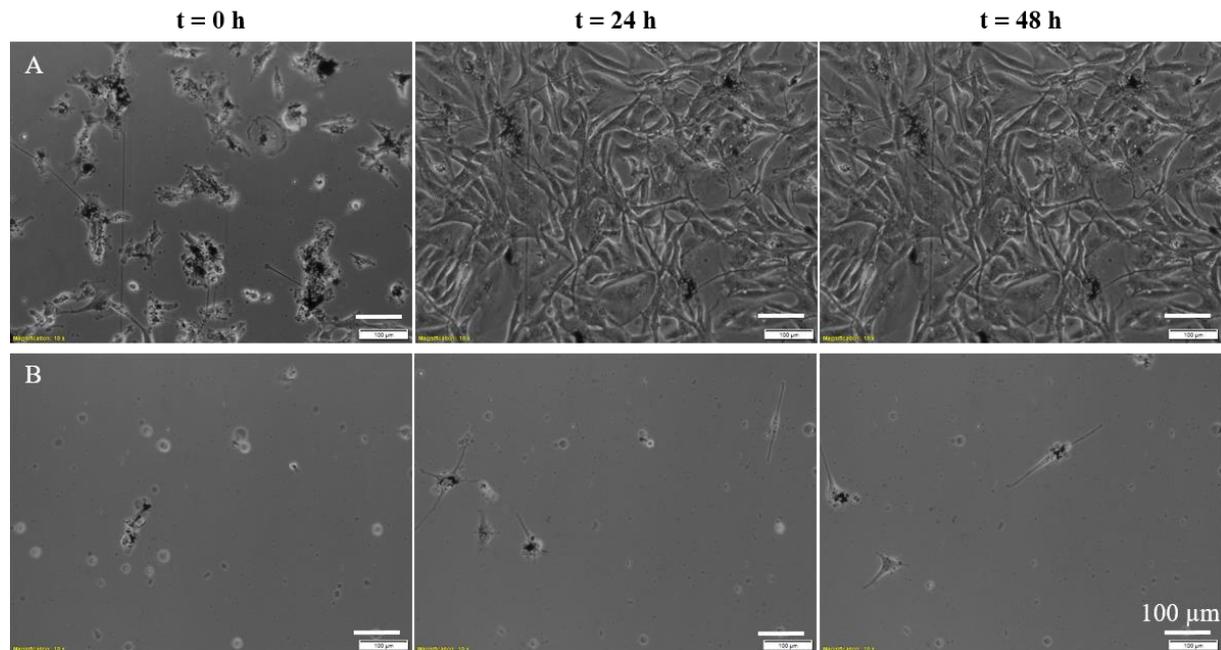


Figure 42 : Observations au microscope optique de A/ cellules en présence de particules, et B/ avec l'application du champ magnétique rotatif à t = 0, 24 et 48 h après l'application du champ. La concentration en particules est de 100 µg/ml et le champ compris entre 0,4 et 0,87 T à 20 Hz est appliqué pendant 45 min. Les barres d'échelle correspondent à 100 µm.

L'analyse des vidéos obtenues montre que les cellules avec particules soumises au champ magnétique qui sont encore vivantes après le traitement sont capables de se déplacer au fond du puits, comme le font des cellules normales. Cependant les cellules traitées ne sont plus capables de se diviser après traitement, le nombre de cellules reste constant et aucune mitose (division cellulaire) n'a lieu. Les cellules avec particules mais non soumises au champ magnétique sont, elles-aussi, capables de se déplacer. En revanche le nombre de cellules augmente et plusieurs mitoses sont observables au cours des 48 h. Le traitement modifie donc le comportement des cellules restantes après traitement en inhibant la prolifération.

Cependant, ce résultat est à nuancer car ce phénomène n'est pas observable sur toutes les cellules restantes. En effet, de nombreuses cellules, notamment celles situées dans les bords latéraux du Labtek ne sont pas affectées par le traitement et sont encore capables de se déplacer et de se diviser. Il est important de préciser que les cellules non affectées reçoivent la même quantité de particules que les cellules affectées.

V. Conclusions du chapitre

L'étude *in-vitro* présentée dans ce chapitre est réalisée sur une lignée cellulaire de glioblastome avec les disques de permalloy et débute par une évaluation de la toxicité des particules. Trois tests basés sur des fonctions métaboliques différentes ont été réalisés. La non-toxicité des particules jusqu'à une concentration de $3,2 \cdot 10^{-4}$ g/cm² a ainsi été démontrée. Les analyses TEM réalisées sur des particules de forme et taille identiques à celle que nous utilisons montrent une internalisation des particules après 24 h d'incubation. Ce phénomène a été confirmé avec des particules de permalloy et des cellules de glioblastome par des observations au microscope optique. Pour le TEMMP, les particules sont alors déposées dans les puits de culture 24 h avant l'application du champ magnétique rotatif à des concentrations non toxiques. Un système composé d'un cylindre de Halbach en rotation a été développé pour l'application du champ magnétique rotatif. Les paramètres tels que la dose de particules, l'amplitude du champ, le temps d'exposition au champ magnétique ainsi que la fréquence d'application ont été variés. Les différentes expériences réalisées ont permis de définir les paramètres optimaux pour une diminution maximale du nombre de cellules après traitement. Avec 100 µg de particules/puits et un champ magnétique de 0,4 à 0,9 T appliqué pendant 45 min à 20 Hz, une diminution de 79 % du nombre de cellules est observée après TEMMP. Des marquages de viabilité cellulaire effectués après le traitement montrent que seulement 7 % des cellules sont encore viables. De plus, nous avons observé une modification du comportement cellulaire avec une inhibition de la prolifération au moins au cours des 48 h suivantes. Cependant, ces très bons résultats semblent provenir d'un décollement des cellules engendré par le mouvement des particules, déjà reporté dans la littérature (Muroski et al. 2016; Hapuarachchige et al. 2016), combiné à une destruction brutale des cellules.

Chapitre 4

Etude *in-vivo* et développement d'un nouveau modèle *in-vitro* 3D

I. Méthode

Toutes les procédures d'expérimentation animale conduites au cours de cette thèse ont été réalisées dans le respect de la directive européenne 2010/63/EU de 2013 et de la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Les demandes d'autorisation de projet ont été soumises au ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur et ont reçu l'approbation du comité local d'Ethique en expérimentation animale (référence 2016081015396104-v3).

L'étude a été réalisée sur des souris femelles athymiques nude ayant 5 semaines à réception. La lignée nude est compatible avec une implantation de cellules cancéreuses humaines car ces souris ont pour particularité une immunodéficience qui permet la greffe de tissus provenant d'autres espèces. L'ensemble de cette étude ayant été réalisée avec des cellules humaines de glioblastome U87, il est préférable de poursuivre avec ces mêmes cellules. Il existe deux modèles tumoraux principaux. Le premier consiste à une implantation de cellules tumorales en sous-cutané : il s'agit d'une greffe hétérotopique. Dans le deuxième modèle, les cellules sont injectées dans l'organe dont elles sont issues (dans notre cas, le cerveau) : il s'agit d'une greffe orthotopique. Le glioblastome est un cancer très agressif dont les difficultés de traitement résident notamment dans le fait qu'il se situe dans le cerveau et est donc protégé par les mécanismes de défense du cerveau (barrière hémato encéphalique, notamment). Il est donc plus pertinent de travailler sur un modèle présentant les mêmes problématiques. Nous avons donc choisi la greffe orthotopique pour notre étude.

Pour notre étude, une IRM est réalisée une dizaine de jours après l'induction tumorale pour localiser les tumeurs et définir les coordonnées d'injection. Les particules sont ensuite injectées à des concentrations différentes. 48 à 72 h après injection, le champ magnétique rotatif est appliqué pendant 45 min. Trois études distinctes ont été réalisées : une étude histologique et deux études de survie. Elles sont détaillées ci-dessous, ainsi que les différentes étapes du protocole.

I.1. Procédures chirurgicales, suivi des animaux et analyses des échantillons

Hébergement des animaux

Les animaux sont stabulés en animalerie conventionnelle respectant les conditions d'hygrométrie et de température standards. Les animaux ont accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture et subissent un cycle d'alternance jour / nuit : 12 h / 12 h. Ils sont également stabulés dans un environnement enrichi où les

éléments d'enrichissement sont renouvelés fréquemment. Une période d'acclimatation de 10 jours est respectée avant toute intervention afin d'habituer les animaux à leur nouvel environnement ainsi qu'à la préhension et au contact de l'expérimentateur.

Implantation stéréotaxique de cellules

L'animal est anesthésié par inhalation d'Isoflurane à 5 % pour l'induction, puis à 1,5 % pour le maintien de l'anesthésie. Une injection de Xylocaïne est effectuée au niveau des oreilles et du crâne afin d'éviter une douleur suite au placement dans le cadre de stéréotaxie. L'animal est ensuite placé dans le cadre de stéréotaxie, maintenu par les deux barres d'oreille et par la barre de gueule. Une goutte de Lacrigel est appliquée dans chaque œil afin d'éviter le dessèchement de ceux-ci. La peau du crâne est désinfectée avec de l'éthanol 70 % puis incisée à l'aide d'un scalpel. Le bregma et le lambda sont repérés afin de vérifier le bon positionnement de l'animal. Ce sont des points de jonction entre les différentes structures osseuses qui servent de repères pour la définition des coordonnées d'injection (Figure 43).

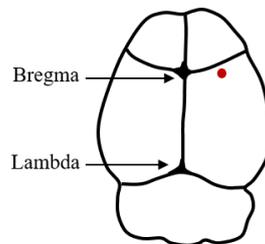


Figure 43 : Schéma du crâne vu du dessus montrant le bregma et le lambda. Le point rouge représente le point d'injection.

Les coordonnées du bregma sont relevées. Le point d'injection se situe en antéro-postérieur à +0,4 mm et en médio-latéral à -2 mm du bregma (représenté par un point rouge en Figure 43). La boîte crânienne est percée avec une broche de Kirshner. Les cellules U87 sont prélevées dans une aiguille Hamilton à une concentration de 1.10^8 cellules/ml. L'aiguille Hamilton (26 G) est descendue en dorso-ventrale à -4,5 mm puis remontée à -4 mm. Cette technique permet de faire de la place pour les cellules et ainsi d'éviter les reflux. 5 μ l de cellules (soit 5.10^5 cellules) sont injectées lentement, par pallier. Après 2 min de pause, la seringue est remontée lentement. Cette méthode d'injection lente permet de limiter les phénomènes de reflux. Le trou est rebouché avec de la cire d'os. Le crâne est désinfecté avec un mélange éthanol/Bétadine afin d'éviter une tumeur extra-crânienne. La plaie est suturée puis désinfectée à la Bétadine. L'animal est alors placé sous lampe chauffante pour le réveil.

Suivi des tumeurs par IRM

Afin de connaître les coordonnées précises des tumeurs dans le cerveau, des images IRM sont acquises. Pour cela, l'animal est anesthésié par inhalation d'Isoflurane à 5 % pour l'induction, puis à 1,5 % pour le maintien de l'anesthésie. Une injection de Dotarem® (200 μ l pour une souris de 20 g), qui est un agent de contraste est réalisée en intra-péritonéale, soit avant, soit entre les acquisitions. Les chélates de

Gadolinium présents dans ce produit vont s'accumuler dans les tumeurs et diminuer le temps de relaxation T_1 , augmentant ainsi son contraste. L'animal est placé dans le berceau pour souris et maintenu par une barre de gueule. Le berceau est composé d'une arrivée de gaz pour l'anesthésie et d'un système de circulation d'eau chaude pour maintenir la température corporelle de la souris. Typiquement, après alignement des bobines, une séquence pondérée T_2 et une séquence pondérée T_1 sont acquises. La durée totale de l'acquisition est de 20 à 25 min. Un exemple d'image obtenu est donné en Figure 44.

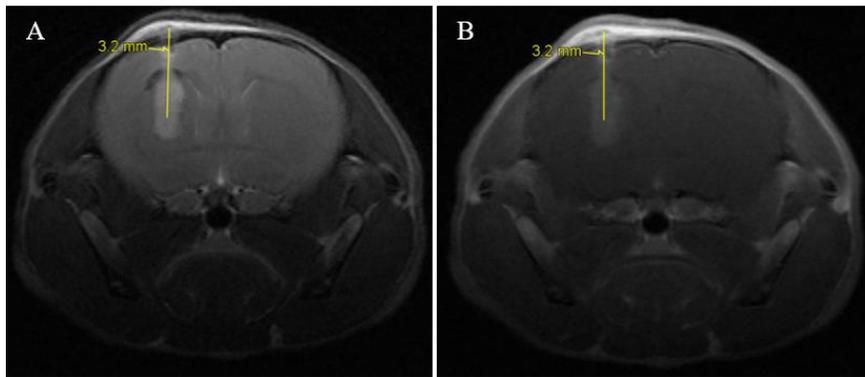


Figure 44 : Acquisitions IRM pondérées en A/ T_2 et B/ T_1 avec Dotarem, et mesure de la coordonnée d'injection.

La distance entre le dessus de la boîte crânienne et un point situé entre un tiers et la moitié du bas de la tumeur est mesurée. Sur l'exemple montré en Figure 44, la mesure est de 3,2 mm.

Injection stéréotaxique de particules

L'animal est anesthésié et installé dans le cadre de stéréotaxie de la même façon que pour l'injection stéréotaxique de cellules. Les coordonnées du bregma sont relevées. Le point d'injection est identique à celui d'injection des cellules. Il se situe en antéro-postérieur à +0,4 mm et en médio-latéral à -2 mm. La cire d'os recouvrant le trou peut être transpercée par une aiguille. 4 à 10 μ l de particules de permalloy à 2 à 20 g/l dans une solution de NaCl ou de PEG₂₀₀ (polyéthylène glycol de poids moléculaire de 200 Da) sont prélevées. Deux doses sont ici étudiées : la première de 100 μ g (soit 5 μ l à 20 g/l) et la deuxième de 8 μ g (soit 4 μ l à 2 g/l). L'extérieur de l'aiguille est nettoyé à l'éthanol 100 % puis descendue entre -4 mm et -2 mm, selon les données de l'IRM. Dans l'exemple montré en Figure 44, l'aiguille est descendue à -3,7 mm puis remontée de 0,5 mm. Les particules sont injectées à l'aide d'un pousse-seringue à un débit de 1 à 5 μ l / min. Le trou est rebouché avec de la cire d'os. La plaie est suturée puis désinfectée à la Bétadine. L'animal est placé sous lampe chauffante pour le réveil.

Application du champ magnétique

L'animal est anesthésié par inhalation d'Isoflurane à 5% pour l'induction, puis à 1,5% pour le maintien de l'anesthésie. L'animal est placé dans le berceau spécialement conçu, maintenu par un tire-dents. La partie supérieure du berceau est enlevée pour le placement de l'animal puis fermée, par soucis de sécurité

en cas de réveil inopiné de l'animal durant la rotation du cylindre. La partie supérieure du berceau est transparente afin de pouvoir contrôler la respiration de l'animal tout au long de l'anesthésie. Le berceau est placé au cœur du cylindre de façon à ce que la tête soit centrée. Une lampe chauffante est placée pour maintenir l'animal à bonne température au cours de l'anesthésie. La rotation du cylindre est lancée à 20 Hz pendant 45 min.

Suivi des animaux

Pour le suivi des animaux, ils sont pesés au minimum deux fois par semaine et inspectés visuellement tous les jours. Pendant les phases plus critiques, ils sont pesés quotidiennement. Les animaux sont scorés cliniquement d'après une grille proposée par le conseil canadien de protection des animaux. Tout score cumulé supérieur ou égal à 3 entraîne l'euthanasie prématurée de l'animal.

Tableau 4 : Grille des caractéristiques à scorer pour évaluer la souffrance animale

	Caractéristique	Score
Changement de poids corporel	Normal	0
	Perte de poids < 10%	1
	Perte de poids entre 10 et 15%	2
	Perte de poids > 20%	3
Apparence physique	Normale	0
	Manque de toilettage	1
	Poil ébouriffé, écoulement nasal/oculaire	2
	Poil très ébouriffé, posture anormale	3
Comportement	Normal	0
	Changements mineurs : démarche boitante	1
	Anormal ; mobilité réduite, inactif	2
	Vocalisations non sollicitées, automutilation, très agité ou immobile	3

Euthanasies, prélèvements et préparation des échantillons

L'animal est d'abord anesthésié par inhalation d'Isoflurane à 5 %. La tête est ensuite coupée puis le cerveau est prélevé. Il est alors très rapidement congelé dans de l'isopentane à -60 °C puis stocké à -80 °C.

Les cerveaux sont coupés en tranche fine de 10 µm avec un cryostat combiné à un microtome et récupéré sur des lames de microscopie. Les lames sont ensuite stockées à -80 °C avant analyse. Les premières lames préparées ont été stockées à -20 °C mais ont été perdues suite à un problème du congélateur.

L'analyse des tissus se fait ensuite par immuno-histo-chimie (IHC). Le marquage HE (hématoxyline – éosine) permet de colorer certains éléments cellulaires et de révéler la morphologie et le type de cellules présentes dans les tissus. Des marquages spécifiques peuvent être réalisés comme le marquage Ki-67 – GFAP – Hoechst. Le principe, schématisé en Figure 45 est de déposer des anticorps sur les coupes qui vont spécifiquement s'attacher à un antigène que l'on cherche à révéler. Un deuxième anticorps couplé à un fluorochrome est ensuite utilisé pour cibler le premier anticorps.

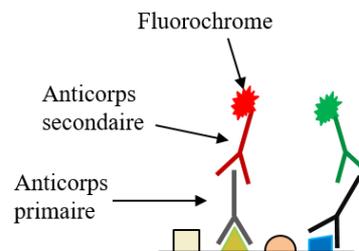


Figure 45 : Schéma de principe d'un marquage spécifique. L'anticorps primaire se lie à l'antigène ciblé. Un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome se lie ensuite à l'anticorps primaire pour le révéler.

L'intérêt de ce type de marquage spécifique est de pouvoir cibler plusieurs antigènes sur une même coupe en utilisant différents fluorochromes.

Les protocoles de marquage sont détaillés en annexe V et brièvement présentés ci-après.

Marquage Hématoxyline – Eosine (HE)

Les coupes sont fixées dans un mélange éthanol/acétone (50/50) pendant 5 min puis rincées dans 3 bains successifs d'eau. Elles sont ensuite immergées dans de l'hématoxyline pendant 4 min pour marquer les éléments cellulaires chargés négativement, et notamment les noyaux en violet, puis rincées dans 3 bains successifs d'eau. Un passage dans une solution contenant 0,5 % d'acide chlorhydrique permet ensuite d'éliminer le marquage non spécifique. Après un rinçage à l'eau, les coupes sont ensuite immergées quelques secondes dans de l'eau ammoniacuée à 0,25 % pour bleuir les noyaux, puis de nouveau rincées à l'eau. Les éléments chargés positivement, notamment le cytoplasme sont ensuite colorés grâce à un bain d'éosine diluée au 1/10 pendant 4 min. Après 4 bains d'eau, les coupes sont déshydratées dans un bain d'éthanol 100 % pendant 5 min. Après séchage, les lames sont recouvertes de quelques gouttes de milieu de montage (Eukitt), puis une lamelle est déposée pour protéger les coupes. Un exemple est donné en Figure 46. La tumeur est ici visible au centre de l'hémisphère à droite de l'image. Elle se différencie par sa couleur violette due à une plus forte densité de noyaux.



Figure 46 : Exemple d'une coupe colorée par un marquage HE.

Marquage Ki-67 – GFAP – Hoechst

La protéine Ki-67 est révélée pour étudier la prolifération. La protéine acide fibrillaire gliale (GFAP pour *glial fibrillary acidic protein*) est un filament intermédiaire qui participe à la forme des cellules. Les noyaux de l'ensemble des cellules sont marqués par du Hoechst. La détection de ces protéines se fait par un marquage spécifique utilisant deux anticorps primaires ciblant les protéines. Ces anticorps sont ensuite révélés par deux anticorps secondaires couplés à des fluorochromes différents, tel que présenté en Figure 45 et détaillé ci-après. Les coupes sont d'abord fixées avec du formalin à 10 % (solution composée de 4 % de formaldéhyde) pendant 15 min puis rincées au PBS. Les tissus sont perméabilisés pendant 30 min grâce à une solution de PBS contenant 0,1 % de TritonX-100 puis de nouveau rincés au PBS. La saturation des sites antigéniques est réalisée par incubation pendant 30 min avec une solution de PBS contenant 5 % de sérum de chèvre (NGS pour *normal goat serum*). La solution d'anticorps primaires (anticorps anti-GFAP à 1/500, anticorps anti-Ki-67 à 1/200 dans une solution de PBS avec 1 % de NGS) est ensuite déposée sur les coupes. L'anticorps anti-Ki-67 utilisé provient de lapins et l'anticorps anti-GFAP de poulet. L'incubation se fait à 4 °C pendant la nuit en milieu humide. L'anti-Ki-67 est alors révélé par un anticorps secondaire anti-lapin-AlexaFluor488 et l'anticorps anti-GFAP est révélé par un anticorps anti-poulet-AlexaFluor546. Ces deux anticorps secondaires sont dilués à 1/500 dans une solution de PBS et déposés sur les coupes pendant 1 h 30. Après des lavages précautionneux au PBS, du Hoechst 33342 à 1/1000 dans une solution de PBS est déposé sur les coupes. Ce produit permet de colorer l'ADN et donc les noyaux des cellules. Après rinçage, du milieu de montage est déposé puis la coupe est protégée par une lamelle.

I.2. Composition des études

Etude histologique pour la mise au point du protocole

Pour les premières expérimentations, une étude histologique est réalisée. Les souris sont euthanasiées à des temps fixes afin de vérifier la validité de notre protocole et de l'affiner, mais aussi pour étudier l'effet du traitement.

100 μg de particules sont injectées entre 12 et 13 jours après l'induction tumorale. L'acquisition IRM est réalisée la veille de l'injection pour déterminer les coordonnées. Le champ magnétique est appliqué 48 h après l'injection des particules, comme schématisé en Figure 47. Les souris sont ensuite euthanasiées à des temps fixes pour le prélèvement des échantillons. Des marquages sont ensuite effectués pour évaluer l'effet du traitement.

Cette étude ayant pour but de bien mettre en place les différentes procédures, les différents groupes n'ont pas été réalisés en même temps.

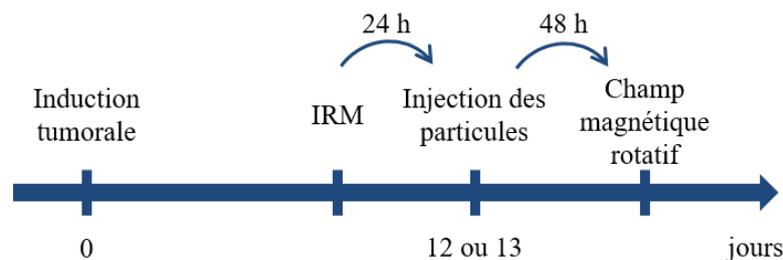


Figure 47 : Chronogramme de l'étude histologique

L'étude est divisée en six groupes principaux. Trois groupes sont composés de souris saines avec injection des particules seules, champ magnétique seul et combinaison particules et champ magnétique. De même, trois groupes sont soumis à une induction tumorale puis injectés avec des particules seules, soumis au champ magnétique rotatif seul ou à la combinaison particules et champ magnétique rotatif. Les animaux sont ensuite euthanasiés à 6 h, 24 h, 48 h ou 7 jours après le dernier acte. Le Tableau 5 récapitule les groupes en fonctions des différentes conditions.

Tableau 5 : Récapitulatif des groupes pour l'étude histologique. La notation CM est utilisée pour le champ magnétique. La notation NP est utilisée pour l'injection des particules. La notation n est utilisée pour le nombre d'animaux par groupe.

Conditions	Groupe	n	Induction tumorale	Injection de particules	Champ magnétique	Euthanasie
CM 6h	1	3	-	-	+	6 h après CM
NP 6h	2a	3	-	+	-	6 h après NP
NP 24h	2b	3	-	+	-	24 h après NP
NP 72h	2c	3	-	+	-	72 h après NP
NP CM 6h	3a	3	-	+	+	6 h après CM
NP CM 24h	3b	3	-	+	+	24 h après CM
NP CM 72h	3c	3	-	+	+	72 h après CM
NP CM 7j	3d	3	-	+	+	7 j après CM
U87 CM 48h	4	3	+	-	+	48 h après CM
U87 NP 48h	5a	3	+	+	-	48 h après NP
U87 NP 72h	5b	3	+	+	-	72 h après NP
U87 NP 7j	5c	3	+	+	-	7 j après NP
U87 NP CM 6h	6a	3	+	+	+	6 h après CM
U87 NP CM 24h	6b	3	+	+	+	24 h après CM
U87 NP CM 72h	6c	3	+	+	+	72 h après CM
U87 NP CM 7j	6d	3	+	+	+	7 j après CM

Etudes de survie

Pour évaluer au mieux l'efficacité du traitement, une étude de survie est réalisée pour déterminer si des souris bénéficiant du traitement vivent plus longtemps que des souris non traitées. Pour cela, une IRM est réalisée 9 jours après l'induction tumorale pour déterminer les coordonnées d'injections. 100 µg de particules dans 5 µl de PEG₂₀₀ ou seulement la solution de PEG₂₀₀ sont injectées à J10. Le champ magnétique est ensuite appliqué à partir du 13^{ème} jour. Différentes répétitions du champ magnétique rotatif ont été testées avec un champ appliqué 1 fois, appliqué 5 fois en 1 semaine ou appliqué 5 fois en 3 semaines (Figure 48). Les souris sont ensuite surveillées quotidiennement. Pour des raisons éthiques, les souris sont euthanasiées lorsqu'elles atteignent leur point limite. Le point limite est défini par un score de 3 selon les critères de suivi déjà présentés précédemment (Tableau 4).

Les différentes procédures à réaliser étant assez longues et le nombre de souris important, cette étude a été réalisée en deux temps. Chaque groupe a été divisé en deux, et toutes les procédures ont été réalisées à une semaine d'intervalle sur ces deux lots. Pour chaque lot, l'induction tumorale est réalisée sur deux jours, avec les cellules issues de la même flasque.

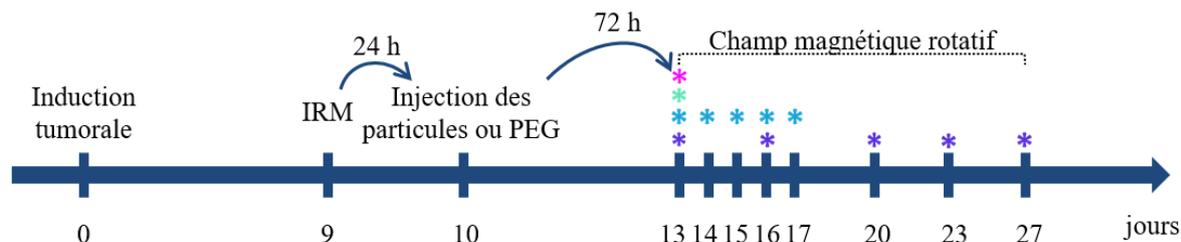


Figure 48 : Chronogramme de la première étude de survie. Les symboles * représentent les jours d'application du champ pour les groupes U87₁ NP CM1 en rose, U87₁ PEG CM en vert turquoise, U87₁ NP CM5/1S en bleu et U87₁ NP CM5/3S en violet.

L'étude est divisée en six groupes. Trois groupes sont des contrôles : un groupe non traité composé de n = 4 souris, un groupe avec particules seules et un groupe avec l'injection de PEG₂₀₀ (véhicule d'injection) et le champ magnétique appliqué 1 fois, mais sans les particules. Trois groupes sont soumis au traitement complet avec l'injection des particules et l'application du champ magnétique, appliqué 1 fois, 5 fois en 1 semaine ou 5 fois en 3 semaines, tel que récapitulé dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Récapitulatif des groupes pour la première étude de survie. La notation n est utilisée pour le nombre d'animaux par groupe.

Conditions	Groupe	n	Induction tumorale	Injection de PEG	Injection de particules/PEG	Champ magnétique
U87 ₁	7	4	+	-	-	-
U87 ₁ NP	8	8	+	-	+	-
U87 ₁ PEG CM	9	8	+	+	-	+ 1 fois
U87 ₁ NP CM1	10	8	+	-	+	+ 1 fois
U87 ₁ NP CM5/1S	11	8	+	-	+	+ 5 fois/1 sem
U87 ₁ NP CM5/3S	12	8	+	-	+	+ 5 fois/3 sem

Cette première étude de survie n'ayant pas permis de conclure à un effet bénéfique ou non du traitement, comme il le sera expliqué dans la partie III.2, une deuxième étude a été réalisée. Les délais entre les différentes procédures sont identiques à la première étude de survie (Figure 49). La concentration en particules ainsi que le volume sont réduits : 8 µg de particules sont injectés dans 4 µl de PEG₂₀₀. Le champ magnétique rotatif est ici appliqué 5 fois en une semaine pour tous les groupes concernés.

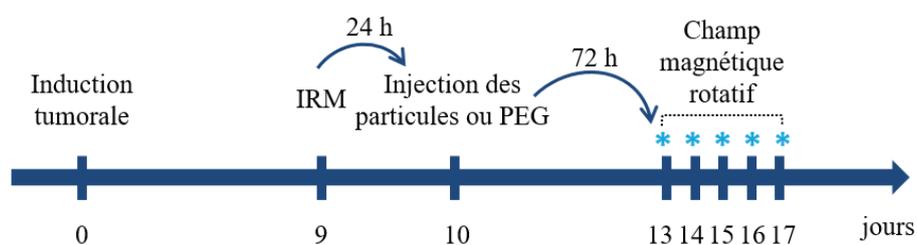


Figure 49 : Chronogramme de la deuxième étude de survie. Les symboles * représentent les 5 jours d'application du champ pour les groupes U87₂ CM5 et U87₂ NP₁₀ CM5.

L'étude est divisée en cinq groupes (Tableau 7). Quatre sont des groupes contrôle qui ne bénéficient pas du traitement : un groupe sans intervention de traitement, un groupe avec injection des particules magnétiques, un groupe avec injection de PEG₂₀₀, et un groupe soumis au champ magnétique sans injection. Le 5^{ème} groupe est soumis à la totalité du traitement : injection des particules (4 µl à 2 g/l) et application du champ magnétique rotatif 5 fois en 1 semaine.

Tableau 7 : Récapitulatif des groupes pour la deuxième étude de survie. La notation n est utilisée pour le nombre d'animaux par groupe.

Conditions	Groupe	n	Induction tumorale	Injection de PEG	Injection de particules/PEG	Champ magnétique
U87₂	13	8	+	-	-	-
U87₂ NP₁₀	14	8	+	-	+	-
U87₂ PEG	15	8	+	+	-	-
U87₂ CM5	16	8	+	-	-	+ 5 fois/1 sem
U87₂ NP₁₀ CM5	17	8	+	-	+	+ 5 fois/1 sem

II. Injection des particules – Toxicité

II.1. Défi de l'injection des particules

Dans une approche simplifiée, la première étude de survie réalisée sur ce sujet (Y. Cheng et al. 2015) s'était affranchie de l'injection intra-tumorale des particules en ajoutant les particules en même temps que les cellules. Une augmentation de la survie avait été obtenue grâce à cette méthode. Afin de se confronter aux problématiques techniques dans un modèle plus pertinent, nous avons choisi d'injecter les particules après développement de la tumeur.

L'injection des particules directement dans la tumeur entraîne des difficultés techniques. En effet, la tumeur présente dans la boîte crânienne provoque une augmentation de la pression. Cela augmente le risque de reflux lors de l'injection des particules. De plus, les aiguilles utilisées pour de telles interventions doivent être très fines, ce qui augmente le risque que la seringue se bouche à cause d'amas de particules. Pour les expériences *in-vitro*, nos particules sont transférées dans du milieu de culture avant ajout dans les puits. Pour une injection *in-vivo*, le milieu de culture n'est pas adapté et devra donc être remplacé par un autre produit. Or, nos particules se dispersent mal dans l'eau et le PBS, ce qui peut augmenter le risque d'agglomération dans l'aiguille. Il faudra donc trouver un produit adéquat pour une injection intra-tumorale sans provoquer d'agrégation des particules.

Notre premier choix s'est porté sur du sérum physiologique (NaCl). 10 μ l de particules sont alors injectés à une concentration de 10 g/l. Cependant, les particules ne sont pas bien dispersées dans le sérum physiologique et sédimentent vite. Cela est problématique étant donné que l'injection dure sur plusieurs minutes et laisse le temps aux particules de sédimer une fois prélevées dans l'aiguille. Du PEG₂₀₀ est ensuite utilisé comme véhicule d'injection. Il permet une très bonne dispersion des particules en suspension, et évite ainsi la sédimentation très rapide de nos particules. Les PEG sont répertoriés comme non-toxiques et non-irritants (Rowe, Sheskey, and Quinn 2009). Ils sont principalement utilisés par voie orale, cutanée ou rectale. Parmi les effets secondaires possibles, des cas d'irritations ou de diarrhée ont été répertoriés, mais aussi de dégradation des reins et d'hyperosmolarité quand appliqués localement sur des patients brûlés. Cependant, nous n'avons pas trouvé de données de toxicité dans le cas d'une injection intracrânienne. De plus, il a été montré une meilleure diffusion des nanoparticules lorsque celles-ci sont injectées dans un milieu plus visqueux, comme les PEG (Perlstein et al. 2008). La quantité administrée étant faible et les PEG étant classés comme non-toxiques, nous décidons d'utiliser ce produit pour disperser et injecter nos particules.

Pour éviter au maximum les reflux et améliorer la diffusion dans la tumeur, la suspension de particules doit être injectée de manière continue et lente (M. Chen et al. 1999; Besse 2010). Pour cela, nous utilisons un pousse-seringue automatique. Nos premières injections ont été réalisées à un débit de 2 μ l/min. Cependant, malgré ce débit d'injection lent, des phénomènes de reflux étaient encore observés. Nous avons ensuite essayé un débit de 1 μ l/min. Une meilleure injection de la suspension de particules a ainsi été observée. Le débit pourrait encore être ralenti, cependant la procédure d'injection des particules est une chirurgie assez lourde et longue. Un compromis doit donc être trouvé entre une injection assez lente pour éviter le reflux, mais pas trop longue pour faciliter le réveil des animaux à la suite de l'anesthésie. Le débit de 1 μ l/min a montré des phénomènes de reflux réduits sans pour autant impacter le réveil et la récupération post-chirurgicale des souris. Il a donc été employé pour la suite des expériences. De plus, nous avons observé une remontée de particules lorsque l'aiguille était remontée à la fin de l'injection. Pour cette raison, nous avons mis en place une remontée de l'aiguille par palier, qui permet d'éviter au maximum les phénomènes de remontées. Une fois l'injection terminée, une pause de 5 min est marquée. La seringue est remontée de 0,5 mm, puis une pause de 1 min est marquée. La seringue est de nouveau remontée de 0,5 mm, avant 1 min de pause. Finalement, la seringue est remontée très lentement. Ces paramètres d'injection nous permettent de minimiser les risques de reflux des particules.

De manière similaire, le volume de 10 μ l choisi initialement a été réduit à 5 μ l pour éviter les phénomènes de reflux. La concentration en particules est alors de 20 g/l pour une quantité de particules identique.

Les seringues couramment utilisées pour des injections stéréotaxiques sont des seringues Hamilton avec une aiguille métallique. Cependant, nous avons remarqué lors des premières injections que les particules s'agrégeaient sur l'aiguille à cause de leurs propriétés magnétiques. Pour cette raison, nous avons utilisé pour la suite des aiguilles composées de fibres de silice, et donc amagnétiques. Ces aiguilles sont plus fines (diamètre intérieure de 75 μm et diamètre extérieur de 150 μm), plus courtes et flexibles mais elles sont aussi très fragiles. Le diamètre réduit de ces aiguilles augmente le risque d'agrégation des particules. Grâce à un bon entretien des aiguilles et notamment des lavages précautionneux en fin de chaque expérience, nous n'avons heureusement pas été confrontés à ce problème.

Pour l'étude histologique qui a permis d'affiner tous ces paramètres d'injection, les particules sont injectées à 12 ou 13 jours après l'induction tumorale. Cependant, le volume de la tumeur déjà important après ce délai, et la pression intracrânienne ainsi provoquée sont une des causes du reflux des particules. De plus, deux souris n'ont pas survécu à la procédure d'injection des particules. Pour les études de survie, nous décidons alors d'injecter les particules 10 jours après l'induction tumorale pour tenter de limiter ces problèmes.

II.2. Diffusion des particules dans la tumeur

Les paramètres d'injection ont donc été optimisés pour permettre une injection des particules sans reflux, et pour éviter un effet léthal de la chirurgie d'injection des particules. Nous cherchons maintenant à déterminer ce qu'il advient des particules injectées dans la tumeur.

Le diamètre de nos particules (1,3 μm) nous permet de les observer au microscope optique avec un grossissement x60. L'analyse des marquages HE effectués sur les coupes de tissus nous montrent que les particules sont bien présentes dans la tumeur (Figure 50).

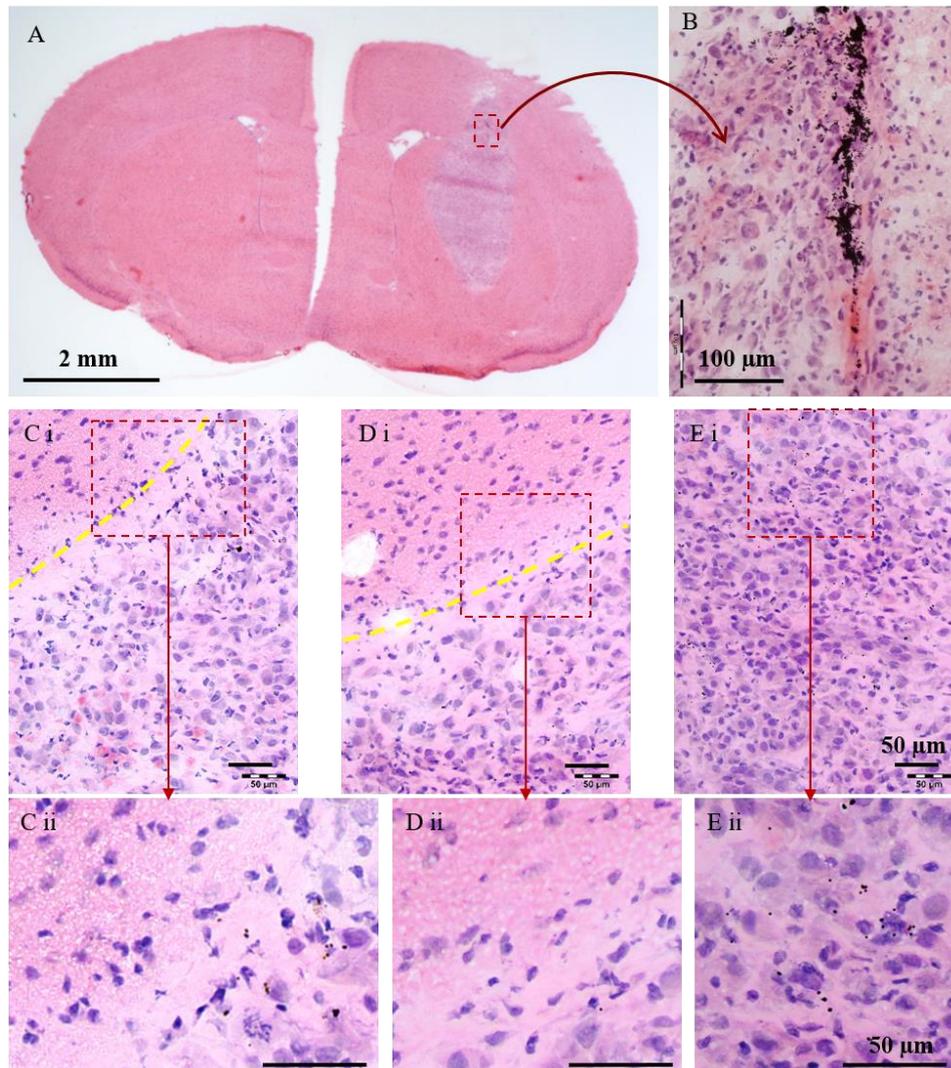


Figure 50 : Marquage HE A/ après injection des particules dans la tumeur ; B/ zoomé, 72 h après l'injection des particules ; C, D & E/i 7 jours après l'injection des particules ; ii/ zoom des parties encadrées en rouge correspondante. Les points noirs correspondent aux particules. Les lignes pointillées jaune correspondent à la frontière entre la tumeur et le tissu sain. La barre d'échelle est de 50 μm pour les images C à E.

Les particules sont essentiellement localisées le long de la trace de l'aiguille (Figure 50B). Une diffusion des particules à une vitesse évaluée à 12 $\mu\text{m}/\text{h}$ a déjà été démontrée mais pour des particules plus petites d'un diamètre de 50 nm (Laprise-Pelletier et al. 2018). La taille de nos particules étant nettement supérieure (1,3 μm de diamètre) et les déplacements de particules, de ce fait très limités, la faible diffusion observée ici est alors cohérente. Cette très faible diffusion des particules au sein de la tumeur peut être un problème pour l'efficacité du traitement. En effet, ne connaissant pas précisément les mécanismes déjà reportés pouvant être impliqués dans les effets positifs de ce type de traitement (Y. Cheng et al. 2015), nous ne savons pas quelle est la portée autour de chacune des particules. Des optimisations pourraient être réalisées pour permettre une diffusion plus large des particules dans la tumeur. La fonctionnalisation de la surface des particules ou une injection en plusieurs points pourraient par exemple être investiguées. Dans ce travail, nous avons conservé l'injection en une fois sans fonctionnalisation des particules. En effet, il est possible que les cellules impactées par le traitement

produisent des signaux qui vont affecter les cellules voisines. Ce phénomène, appelé « effet de témoin » (*bystander effect*, en anglais) a été reporté dans de nombreux cas, comme les expositions aux radiations mais aussi la sénescence cellulaire (arrêt de la prolifération suite au vieillissement des cellules) (Miller et al. 2017; X. Lin et al. 2017; Nelson et al. 2018). De plus, dans le cas d'une exposition au champ magnétique répétée, après l'élimination des cellules les plus proches des particules, des cellules initialement plus éloignées pourraient alors à leur tour être affectées par le traitement.

L'avantage de cette faible diffusion est que les particules restent dans la tumeur et n'envahissent pas les tissus sains. Après 7 jours au sein de la tumeur, certaines particules se dispersent hors de la trace de l'aiguille (Figure 50E). En revanche, aucune particule n'est retrouvée en dehors de la tumeur (Figure 50C&D). Cette caractéristique est très importante pour que le traitement n'affecte pas les cellules saines et vise uniquement les cellules cancéreuses.

II.3. Etude de l'internalisation des particules

Nous avons vu au chapitre précédent que les particules sont internalisées *in-vitro* après 24 h. Afin de vérifier que les particules sont encore internalisées après une injection intra-tumorale *in-vivo*, des acquisitions au TEM sont de nouveau réalisées (Figure 51). Le protocole est détaillé en annexe IV.

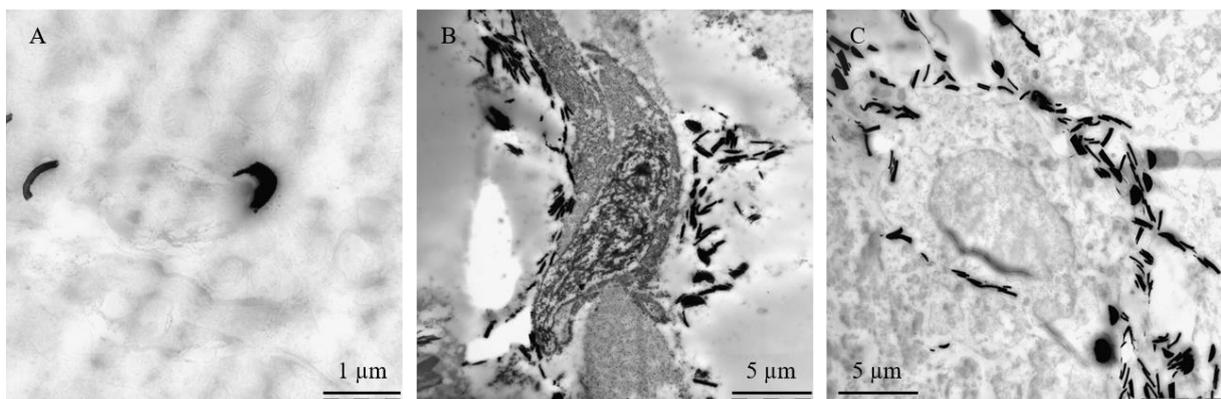


Figure 51 : Images TEM de particules présentes à l'extérieur des cellules pour A/ une souris saine soumise au traitement et euthanasiée 24 h après l'application du champ ; B/ une souris avec tumeur soumise au traitement et euthanasiée 24 h après l'application du champ ; et C/ une souris avec tumeur et injection des particules euthanasiée 72 h après l'injection des particules.

Contrairement aux résultats obtenus *in-vitro*, les particules sont ici retrouvées en périphérie des cellules. Ce phénomène est observé à la fois sur des cellules saines (Figure 51A), sur des cellules tumorales 24 h après application du champ (soit 72 h après l'injection des particules) (Figure 51B) et sur des cellules tumorales 72 h après l'injection des particules, non soumises au champ magnétique (Figure 51C).

Nos particules ne sont donc pas internalisées *in-vivo*. Cela peut potentiellement remettre en cause les résultats du traitement obtenus *in-vitro*, l'impact du mouvement des particules pouvant être différent en fonction de leur emplacement dans ou à côté des cellules.

II.4. Toxicité des particules

Malgré l'optimisation des paramètres d'injection pour limiter les pertes suite à la procédure d'injection des particules, des souris n'ont pas survécu suite à l'injection des particules ou du PEG₂₀₀ et sont mortes pendant le réveil. C'est le cas de deux souris injectées avec des particules et de deux souris injectées avec du PEG₂₀₀ lors de la première étude de survie, et d'une souris injectée avec du PEG₂₀₀ lors de la deuxième étude de survie. Le volume et la concentration réduits pourraient expliquer l'impact réduit de la chirurgie lors de la deuxième étude de survie. Cependant, il serait étonnant que la concentration en particules influe à si court terme. Il est à noter que plus de précautions ont été apportées lors de la deuxième étude de survie lors du réveil notamment, mais aussi pendant la chirurgie avec l'utilisation systématique de tapis chauffant. Ces décès confirment que la procédure d'injection des particules est un acte chirurgical lourd, qui nécessite d'être très précautionneux. Ces souris ne sont pas prises en compte dans le tracé des courbes de survie.

Les jours suivants l'injection des particules, les animaux présentent un comportement normal. Aucun changement dans la mobilité ni signe de souffrance (d'après les critères établis dans le Tableau 4) n'est observé chez les souris saines. Cela nous montre que l'injection des particules n'induit pas de graves effets secondaires à court terme. Pour certaines souris présentant une tumeur, l'injection des particules entraîne une baisse de poids 24 h après l'injection des particules, qui reprend ensuite une croissance normale. Ce phénomène peut s'expliquer par la répétition des chirurgies, d'abord pour l'induction tumorale puis pour l'injection des particules, mais aussi par la pression forte causée par la tumeur et accentuée par l'injection des particules.

Outre l'acte chirurgical, la toxicité de l'injection des particules est évaluée par comparaison des courbes de survie de groupes contrôles et de groupes avec injection de particules (Figure 52).

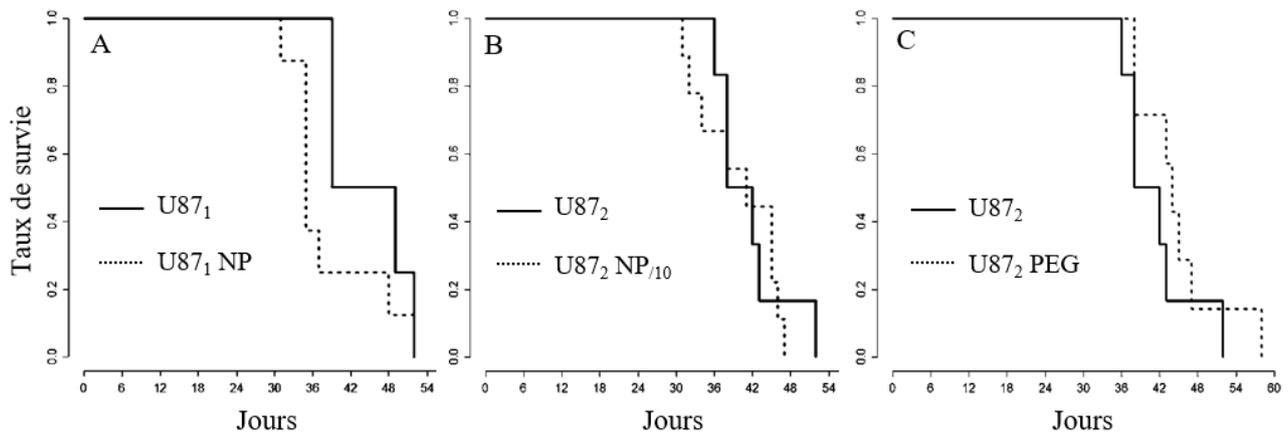


Figure 52 : Courbe de survie de A/ première étude avec un groupe contrôle (U87₁) et un groupe injecté avec 5 µl de particules à 20 g/l (U87₁ NP) ; B et C/ deuxième étude avec un groupe contrôle (U87₂), un groupe injecté avec 4 µl de particules à 2 g/l dans du PEG₂₀₀ (U87₂ NP/10) et un groupe injecté avec 4 µl de PEG₂₀₀ (U87₂ PEG).

Pour la première étude de survie, 5 µl de particules à 20 g/l dans du PEG₂₀₀ sont injectés. Les courbes de survie montrent une survie réduite du groupe injecté avec des particules comparé au groupe contrôle (Figure 52A). Bien que non significative, cette diminution de la survie montre une tendance toxique des particules.

Pour la deuxième étude de survie, la concentration ainsi que le volume d'injection ont été réduits pour limiter la tendance toxique des particules, avec 4 µl à 2 g/l injectés, toujours dans du PEG₂₀₀. Une légère diminution de la survie est observée comparé au groupe contrôle (Figure 52B). L'écart entre les deux groupes est ici encore non significatif, et moins important que lors de la première étude de survie. Le volume et la concentration des particules injectées sont donc moins toxiques.

Pour déterminer si la diminution de survie observée provient des particules elles-mêmes ou de la procédure d'injection, un groupe a été injecté avec une solution de PEG₂₀₀, sans particules avec un protocole strictement identique à l'injection des particules. L'analyse des courbes de survie montre une survie légèrement augmentée pour le groupe injecté avec le PEG₂₀₀ comparé au groupe contrôle (Figure 52C). Cela nous indique que la baisse de survie observée est bien due aux particules et non à la procédure d'injection. La légère amélioration de la survie suite à l'injection de PEG₂₀₀ sera discutée dans la partie suivante.

Les échantillons prélevés lors de l'étude histologique sont colorés par un marquage HE pour analyser les effets de l'injection des particules au sein des tissus. Des exemples sont montrés en Figure 53.

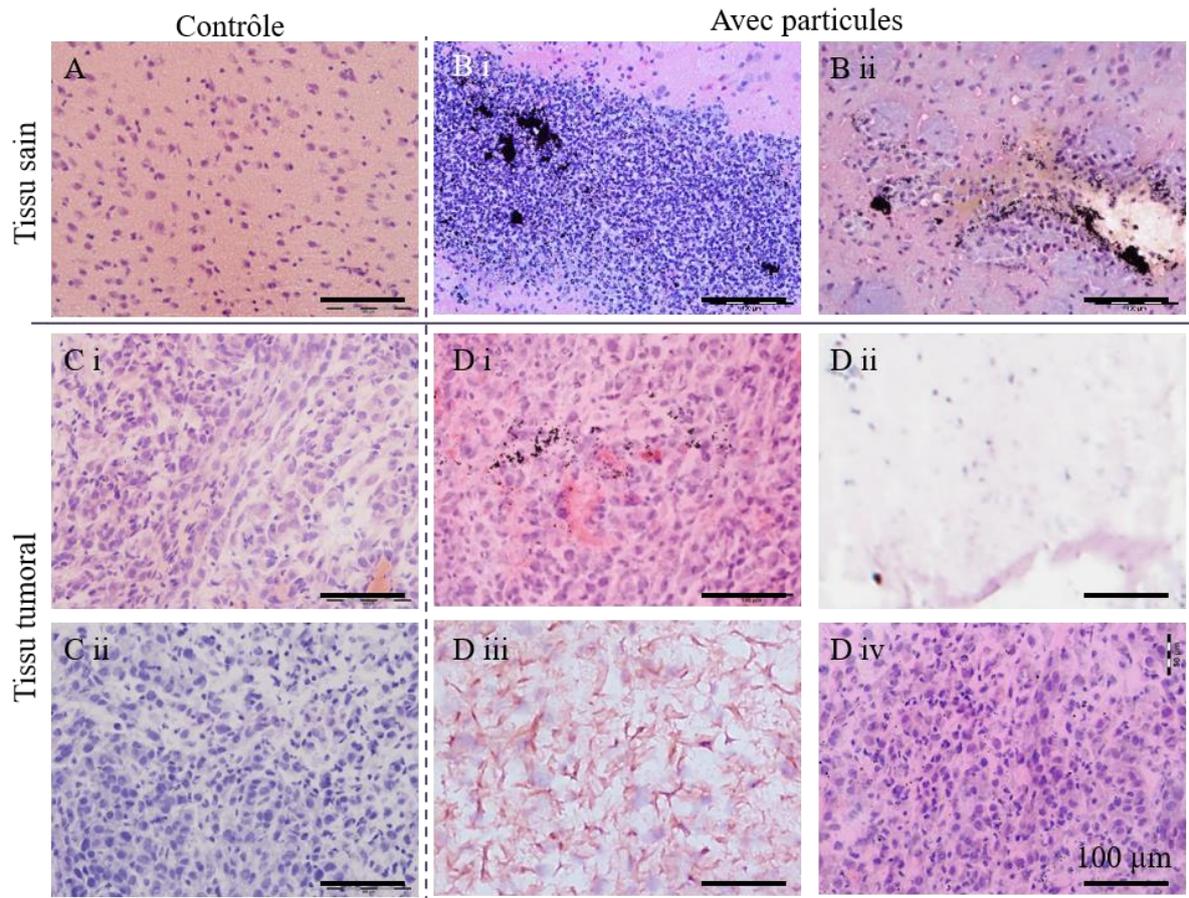


Figure 53 : Marquage HE de coupes de A/ tissu sain ; B/ souris saines injectées avec des particules B/i groupe NP 24 h et B/ii NP 72 h ; C/i et ii : zone tumorale du groupe contrôle U87 CM ; D/ zone tumorale avec injection des particules D/i groupe U87 NP 6h, D/ii groupe U87 NP 24h, D/iii groupe U87 NP 72h, et D/iv groupe U87 NP 7j. Sur toutes les images, la barre d'échelle correspond à 100 µm.

Les marquages HE effectués sur tissu sain montrent une réaction très localisée au niveau du site d'injection des particules. Des granulocytes (aussi appelés polynucléaires) sont par exemple observables en Figure 53B/i. Les granulocytes sont des leucocytes (globules blancs) non spécifiques et participent donc à la réaction immunitaire. Ils sont caractérisés par leur petite taille, leur noyau qui semble divisé, et leur couleur violette. De manière intéressante, aucun macrophage n'a été observé au sein de nos coupes. Il est étonnant de constater l'absence de macrophage, habituel avec la plupart des particules magnétique injectées (Weissleder, Nahrendorf, and Pittet 2014; Herd et al. 2015). Sur la Figure 53B/ii, une lésion peut être observée. Ce type de lésion n'est pas propre aux particules mais est dû à la déchirure des tissus par l'aiguille. Des phénomènes similaires ont été observés sur une injection de sérum physiologique, sans particules (Cunningham et al. 2008).

L'analyse des tissus tumoraux après injection des particules montre ici encore une réaction très locale avec la présence de granulocytes. Le marquage HE révèle un caractère acidophile de certaines cellules (Figure 53D/i). Les cytoplasmes acidophiles sont colorés en rouge-orangée par le marquage HE. Des

zones de nécrose sont aussi observées, comme par exemple en Figure 53D/iii. Elles sont caractérisées par l'aspect « brûlé » et « chiffonné » du tissu. Des œdèmes sont également observés, comme par exemple en Figure 53D/ii. Ils sont caractérisés par une densité de noyaux nettement diminuée est une couleur très pale. De même que dans le cas de tissu sain, aucun macrophage n'a été observé dans les zones tumorales.

Nos différents résultats ne montrent pas de toxicité majeure des particules. A haute concentration, une diminution non significative de la survie est observée, cet effet étant atténué en travaillant à plus basse concentration. La procédure d'injection des particules peut, comme tout acte chirurgical, être risquée. Localement, l'injection des particules peut provoquer une nécrose de la tumeur et de l'œdème. Une réaction inflammatoire très localisée caractérisée par la présence de granulocytes, mais pas de macrophages, intervient suite à l'injection. Bien que non significative, la possible toxicité des particules pourrait être problématique. Cependant, la balance bénéfice/risque doit être étudiée. En effet, dans le cas du glioblastome, cancer avec un très faible pronostic, la toxicité mineure des particules est à confronter au possible bénéfice du traitement, évalué dans la partie suivante.

III. Evaluation du traitement

III.1. Etude histologique

Une première évaluation de l'impact du traitement sur les tissus est réalisée par des marquages HE. Des exemples de coloration obtenus pour un groupe contrôle sans particules et des groupes traités sont montrés en Figure 54.

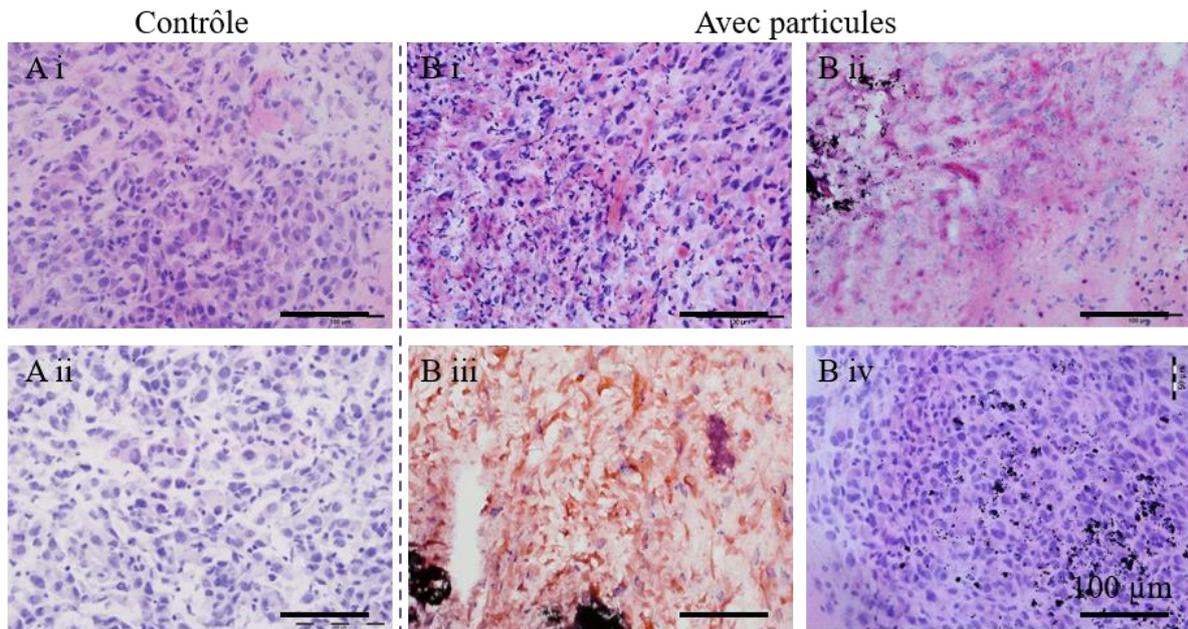


Figure 54 : Marquages HE d'échantillons soumis au champ magnétique pour A/ le groupe contrôle U87 CM 48h et B/ les groupes avec injection de particules : B/i groupe U87 NP CM 6h, B/ii groupe U87 NP CM 24h, B/iii groupe U87 NP CM 72h, B/iv groupe U87 NP CM 7j. Sur toutes les images, la barre d'échelle correspond à 100 μm .

Les colorations obtenues sur les tissus traités sont assez similaires à celles des tumeurs injectées avec des particules, comme vu précédemment. Des cellules acidophiles sont encore présentes comme montré en Figure 54B/i et ii. Des zones nécrotiques au centre de la tumeur sont encore observables sur certaines coupes (Figure 54B/iii). De même, quelques cas d'œdèmes sont encore répertoriés. La réaction inflammatoire est encore principalement effectuée par des granulocytes (Figure 54B/i). De même que pour les tissus injectés avec des particules mais non soumis au champ magnétique, aucun macrophage n'a été observé autour de la trace d'injection.

Les colorations histologiques ne montrent pas de différence significative entre les tissus traités et ceux seulement injectés avec des particules.

L'analyse macroscopique des colorations effectuées 7 jours après l'application du champ magnétique nous renseignent sur la repousse de la tumeur après traitement (Figure 55).

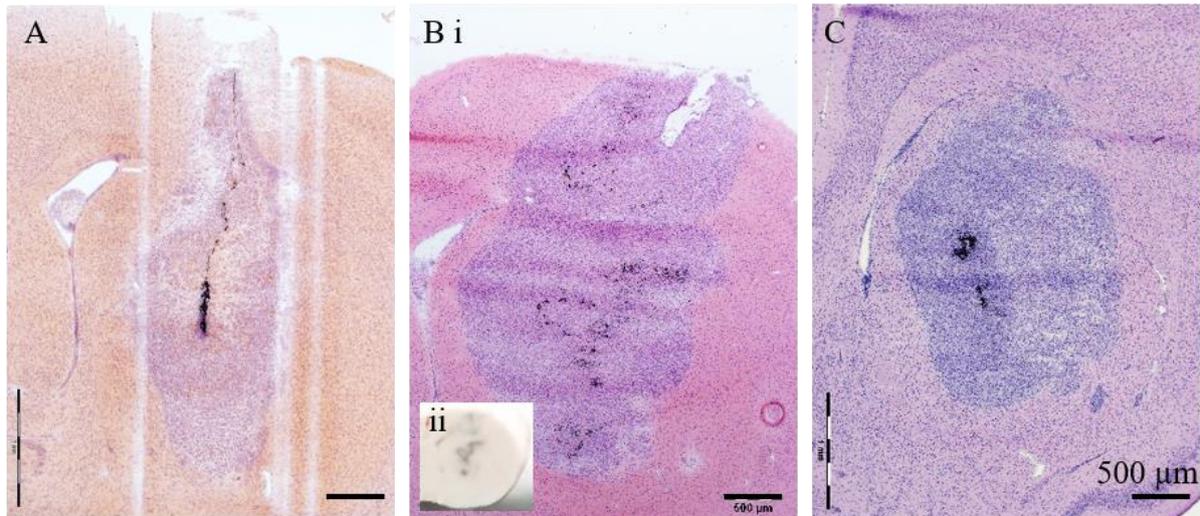


Figure 55 : Marquages HE de A/ groupe U87 NP 72h et B et C/ groupe U87 NP CM 7j. B/ii photographie de l'échantillon prise pendant la coupe. Les rayures visibles sur l'image A sont des artefacts dus à la préparation de l'échantillon. Sur toutes les images, la barre d'échelle correspond à 100 μm .

En effet, dans la plupart des cas, les particules restent le long de la trajectoire d'injection, comme montré par exemple en Figure 55A. 7 jours après le traitement, les particules ne sont plus le long d'une ligne droite mais sont dispersées de manière moins linéaire (Figure 55B/i). Cette dispersion peut s'expliquer par la trace d'injection qui a été déplacée, comme nous pouvons le voir lors de la coupe (Figure 55B/ii). Ce phénomène peut s'expliquer par une poussée des cellules tumorales de part et d'autre de la trace d'injection, qui aurait alors déplacé les particules de manière non uniforme.

Sur la Figure 55C, la densité de noyaux est plus importante autour des particules. Ici encore, ce phénomène peut s'expliquer par une croissance des cellules tumorales dans cette zone, 7 jours après l'application du champ magnétique.

La repousse des cellules observée 7 jours après l'application du champ magnétique devra être prise en compte pour définir les fréquences de répétition du traitement.

Les résultats obtenus lors de l'étude *in-vitro* ont fait apparaître un possible effet du traitement sur la prolifération. Pour étudier ce mécanisme *in-vivo*, un marquage de l'antigène Ki-67 est réalisé (Figure 56). Le Ki-67 est une protéine présente dans le noyau des cellules prolifératives. En complément du marquage de la prolifération, un marquage de la GFAP est effectué. La GFAP est une protéine appartenant à la famille des filaments intermédiaires qui est surexprimée dans les gliomes et pendant la gliose (prolifération des cellules gliales) suite à un traumatisme (Ding, Haglid, and Hamberger 2000; Yang and Wang 2015). Elle est présente dans certaines cellules gliales et notamment les astrocytes, et participe au maintien de la forme cellulaire. Une contre-coloration est effectuée avec du Hoechst33342 pour colorer tous les noyaux. Les noyaux des cellules prolifératives sont ici marqués en vert, la GFAP est marquée en rouge et les noyaux de toutes les cellules sont marqués en bleu.

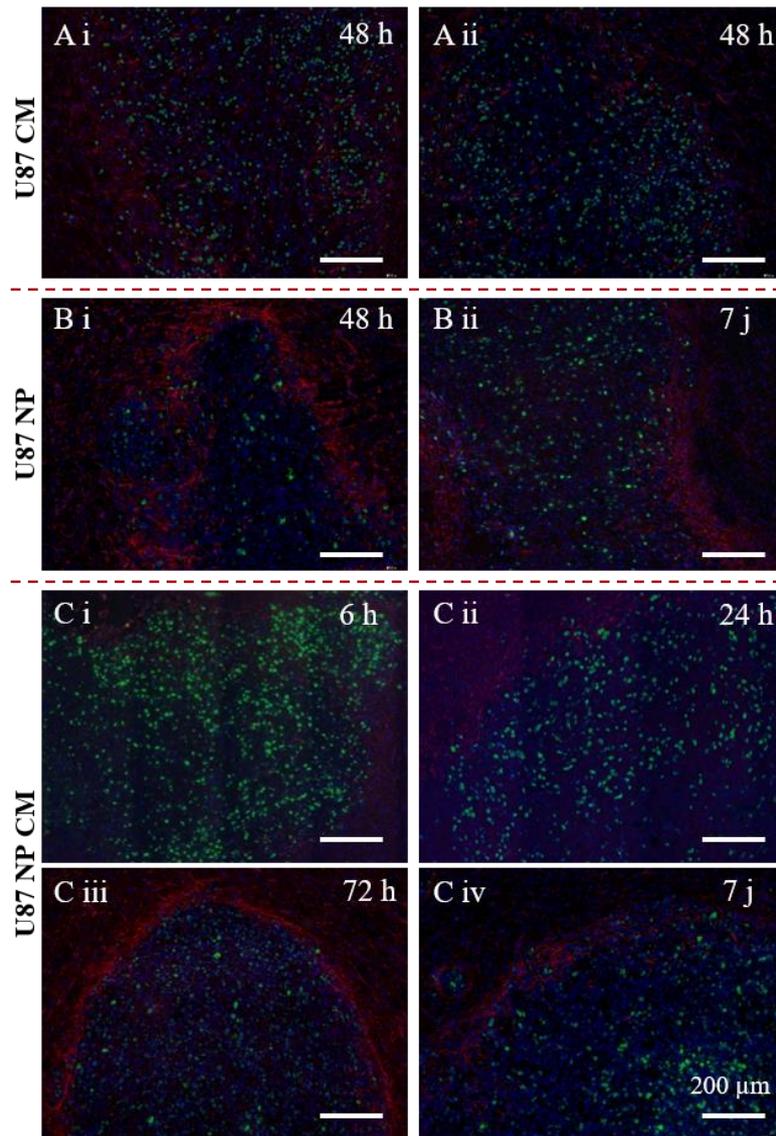


Figure 56 : Marquage Ki-67 – GFAP – DAPI de coupes montrant la zone tumorale pour les groupes A/ U87 CM 48h ; B/i U87 NP 48h ; B/ii U87 NP 7j ; C/i U87 NP CM 6h ; C/ii U87 NP CM 24h ; C/iii U87 NP CM 72h ; C/iv U87 NP CM 7j. Les protéines Ki-67, présentes dans les noyaux des cellules proliférantes sont marquées en vert. Les protéines GFAP, filaments faisant partie du cytosquelette, sont marquées en rouges. Les noyaux sont marqués en bleu. Sur toutes les images, la barre d'échelle correspond à 200 μm .

Les marquages de la protéine Ki-67 ne montrent pas de différence significative entre les tumeurs contrôles, les tumeurs injectées avec des particules et les tumeurs soumises au traitement. Il semblerait que le Ki-67 soit surexprimé à 6 et 24 h après l'application du champ magnétique (Figure 56C/i et ii). Cependant, cette surexpression est observée à distance des particules et le Ki-67 n'est pas exprimé dans la zone nécrotique au centre de la tumeur. Il est peu probable que l'activation de la prolifération dans une zone aussi éloignée des particules soit causée par le traitement. A cause d'un problème de conservation des échantillons, ce marquage n'a pu être réalisé que sur un seul échantillon pour les groupes U87 NP CM 6h et U87 NP CM 24h, une éventuelle surexpression du Ki-67 à proximité des particules dans les 24 h suivant le traitement n'a donc pas pu être confirmée. La zone présentant une plus forte densité de cellules autour de l'injection des particules 7 jours après l'application du champ

magnétique est aussi caractérisée par une surexpression du Ki-67, comme nous pouvons le voir en Figure 56C/iv en bas à droite de l'image.

La GFAP est principalement exprimée en bordure de la tumeur. L'aspect morphologique et l'expression est similaire pour le groupe contrôle, pour les groupes injectés avec des particules et pour les groupes traités. Une surexpression de la GFAP avait été reportée dans la zone lésionnelle de l'injection de l'aiguille, dans le cas d'aiguilles de 28 Gauge (360 μm de diamètre externe) (Cunningham et al. 2008). Nous n'observons pas ce phénomène sur nos coupes, probablement grâce à la petite taille de l'aiguille utilisée.

L'étude réalisée *in-vitro* nous a montré une forte diminution du nombre de cellules cancéreuses après traitement et un comportement cellulaire très affecté, avec notamment une inhibition de la prolifération (chapitre 3, IV). Notre étude histologique *in-vivo* ne montre pas de diminution de la taille de la tumeur ni de différence morphologique des cellules après traitement TEMMP. La prolifération cellulaire n'est pas non plus diminuée suite au traitement. La différence d'effets obtenus entre les résultats *in-vitro* et *in-vivo* peut s'expliquer par un problème de pertinence du modèle. En effet, la viscosité du milieu est très différente entre ces deux modèles, aboutissant à un stress mécanique subi par les cellules et des mécanismes impliqués très distincts. Les problématiques liées au modèle *in-vitro* seront discutées dans la partie suivante (chapitre 4, IV). Des marquages complémentaires pourraient être réalisés pour étudier d'autres mécanismes activés par le traitement. L'activation de l'apoptose déjà répertoriée dans certaines publications (Y. Cheng et al. 2015) ou le comportement des filaments d'actine pourraient par exemple être investigués.

III.2. Etudes de survie

Des études de survie ont été réalisées pour déterminer si le traitement a un effet bénéfique sur la durée de vie. Plusieurs délais de répétition de l'application du champ magnétique ont été testés. Cheng et al. ont démontré une augmentation de la survie par TEMMP en appliquant le champ magnétique quotidiennement pendant 5 jours (Y. Cheng et al. 2015). Nous avons donc aussi testé une application quotidienne du champ pendant 5 jours. Pour comparaison, un groupe est soumis au champ magnétique une seule fois. De plus, les marquages HE effectués au cours de l'étude histologique ont montré une repousse entre 72 h et 7 jours après l'application du champ. Pour tenter de limiter la repousse, un groupe est soumis au champ magnétique tous les 3 à 4 jours avec un total de 5 applications du champ. Pour tous les groupes, la première application du champ a lieu 3 jours après l'injection des particules (Figure 48 et Figure 49).

En plus des souris n'ayant pas survécu à l'injection et enlevées de l'étude, comme déjà évoqué au chapitre 4, II.4, une souris du groupe U87₁ NP CM5/1S a dû être euthanasiée au cours de l'étude et deux souris du groupe U87₂ n'ont pas développé de tumeur. Ces souris ont donc été retirées des études.

III.2.1. Première étude de survie

La représentation standard d'une étude de survie se fait en représentant le taux de survie au cours du temps. Les courbes de survie, aussi appelées courbes de Kaplan-Meier, de la première étude sont présentées en Figure 57.

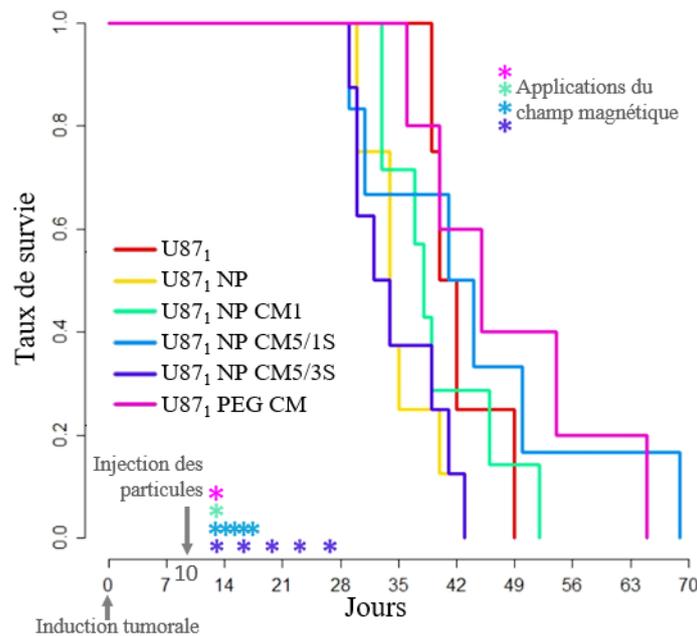


Figure 57 : Courbes de survie de tous les groupes de la première étude de survie.

Parmi les résultats obtenus, seules les courbes des groupes U87₁ NP et U87₁ PEG CM sont significativement différentes avec une valeur $p < 0,05$. Bien que visuellement, plusieurs courbes sont nettement différentes, le manque de différence significative s'explique par un groupe U87₁ composé de seulement 4 souris et par les pertes dans les groupes injectés avec du PEG₂₀₀ ou des particules, ayant entraîné une réduction d'effectif.

Pour une analyse plus claire des différents groupes, les courbes d'intérêt sont extraites et représentées séparément. Pour étudier l'effet de l'exposition des particules au champ magnétique, les courbes des groupes U87₁ NP, U87₁ NP CM1, U87₁ NP CM5/1S et U87₁ NP CM5/3S sont présentées en Figure 58.

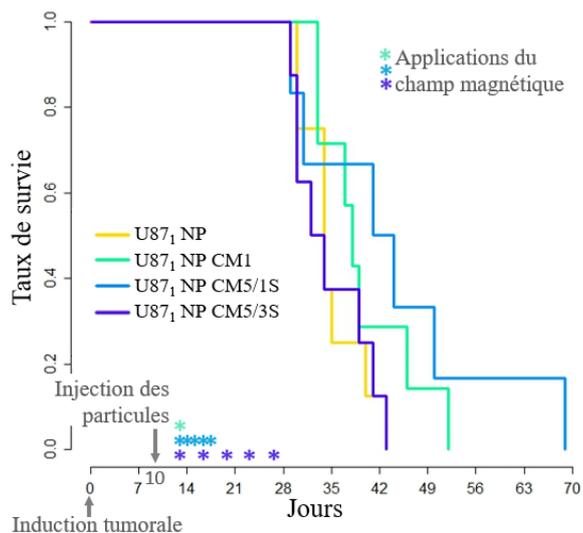


Figure 58 : Courbes de survie des groupes U87₁ NP, U87₁ NP CM1, U87₁ NP CM5/1S et U87₁ NP CM5/3S de la première étude de survie.

La toxicité de l'injection des particules a déjà été discutée au chapitre 4, II.4. Nous nous intéressons maintenant à l'effet des différentes fréquences d'application du champ magnétique rotatif sur des tumeurs injectées avec des particules. Le groupe U87₁ NP CM5/3S soumis au champ magnétique rotatif 5 fois en 3 semaines présente une courbe de survie très similaire à celle du groupe U87₁ NP non soumis au champ magnétique. Le groupe soumis à une seule application du champ magnétique a en revanche une survie légèrement améliorée comparé au groupe U87₁ NP. La survie du groupe soumis à une application quotidienne du champ magnétique est encore améliorée, notamment pour une souris qui a vécu 26 jours de plus que la dernière souris du groupe U87₁ NP.

Ces résultats montrent que l'application du champ magnétique rotatif a bien un effet bénéfique sur la survie. Le meilleur effet, bien que non significatif, est obtenu pour une répétition quotidienne du traitement pendant 5 jours. De manière intéressante, le groupe exposé au champ magnétique sur trois semaines a une survie inférieure au groupe soumis une seule fois au champ magnétique. Cela pourrait s'expliquer par un effet néfaste de l'anesthésie couplé à une stimulation moins efficace, les particules étant plus diffuses dans la tumeur au fur et à mesure que celle-ci pousse. Une répétition quotidienne permettrait alors d'impacter de plus en plus de cellules sans que la tumeur ait le temps de pousser ni de s'adapter entre chaque exposition.

De manière intéressante et inattendue, le groupe U87₁ PEG CM, qui est un contrôle traité sans particules, a un profil différent du groupe contrôle U87₁ (Figure 59).

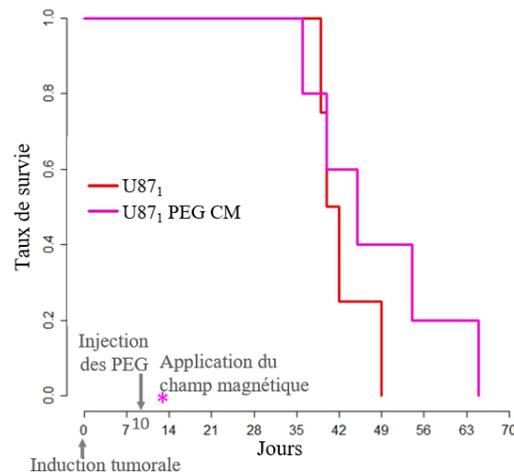


Figure 59 : Courbes de survie des groupes U871 et U871 PEG CM de la première étude de survie.

En effet, le groupe U871 PEG CM a une médiane de survie plus grande que le groupe contrôle. La différence avec le groupe contrôle U871 n'est pas significative. En revanche, elle l'est avec le groupe U871 NP à cause de la toxicité induite des particules.

Trois hypothèses pourraient expliquer l'effet bénéfique de l'injection de PEG₂₀₀ en combinaison du champ magnétique rotatif. Il est possible que le PEG₂₀₀ injecté au centre de la tumeur ait un effet létal sur les cellules. Bien que surprenant, un effet du champ magnétique rotatif pourrait expliquer cette augmentation de la survie. En effet, un effet létal sur des cellules cancéreuses de l'exposition à un champ magnétique basse fréquence, sans particules, a déjà été reporté (Ju et al. 2016). La troisième hypothèse serait due à un biais de l'expérience. En effet, l'injection de PEG₂₀₀ a été réalisée après l'injection des particules en utilisant les mêmes aiguilles. Bien que plusieurs lavages des seringues à l'éthanol soient réalisés entre les deux injections, la présence de particules à faible concentration dans l'aiguille qui seraient donc injectées avec le PEG₂₀₀ est une possibilité non négligeable. Des marquages HE ont été effectués sur plusieurs tissus de ce groupe pour tenter de déterminer si des particules étaient présentes dans les tumeurs. Cependant, cette recherche est très difficile, même pour les groupes injectés avec des particules car la taille de la tumeur au moment de l'euthanasie est très importante et les particules ne sont plus regroupées dans une même zone. Il est alors peu évident de distinguer une particule seule d'un dépôt ou autre parasite dû à la coloration. Une nouvelle expérience avec des groupes contrôle mieux défini doit alors être réalisée.

La distribution des durées de survie peut aussi être représentée grâce à des boîtes à moustaches (Figure 60). La médiane est représentée par le trait situé dans la boîte. La moyenne correspond au petit carré. Les frontières de la boîte délimitent le premier et le troisième quartile.

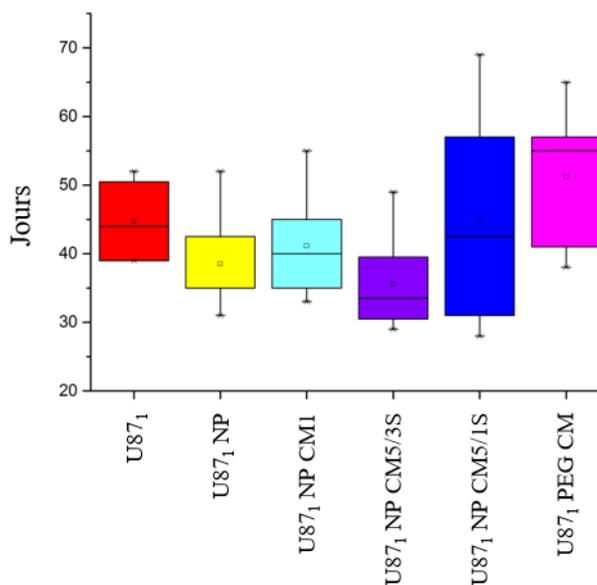


Figure 60 : Représentation en boîtes à moustaches de la durée de vie de tous les groupes de la première étude de survie.

Cette représentation permet notamment de visualiser la médiane de chaque groupe ainsi que la distribution dans chacun des groupes. L'effet toxique de l'injection des particules est ici confirmé par une médiane de survie plus basse. Pour le groupe U87₁ NP CM5/1S exposé au champ magnétique quotidiennement pendant 5 jours, une plus large distribution est observée comparé au groupe contrôle U87₁. La médiane de survie est en revanche quasi-identique. Cela explique la différence non statistiquement significative avec les autres groupes. En effet, la distribution obtenue fait apparaître un effet bénéfique du traitement sur certaines souris mais qui s'avère toxique pour d'autres. Les données IRM des tumeurs avant traitement ne montrent pas de corrélation entre la taille de la tumeur avant injection des particules et la durée de survie. Il est possible que des caractéristiques propres aux souris influent l'efficacité du traitement. Le seul groupe avec une médiane de survie plus élevée est le groupe U87₁ PEG CM, dont la cause de l'effet bénéfique reste à déterminer.

En conclusion, l'analyse des courbes de survie montre une tendance bénéfique du traitement quotidien comparé à une injection de particules seules. Bien que non significatif, ce résultat est cohérent avec une augmentation de la survie déjà observée par Cheng et al. mais qui n'avaient pas montré de résultats sur un groupe contrôle sans aucun traitement (Y. Cheng et al. 2015). Cependant, cet effet est à nuancer compte-tenu de la toxicité de l'injection des particules. De plus, la médiane de survie est quasiment identique à celle du groupe contrôle U87₁ avec une large distribution dans la durée de survie. Cela fait apparaître une sélectivité dans le traitement. Un traitement avec une unique exposition au champ ou une exposition sur 3 semaines ne montrent pas d'effets bénéfiques. Une augmentation de la survie a aussi été observée pour le groupe U87₁ PEG CM mais une nouvelle étude doit être réalisée pour en déterminer la cause.

III.2.2. Deuxième étude de survie

Nous décidons donc de réaliser une nouvelle étude de survie avec une concentration en particules diminuée, à la fois pour limiter l'effet toxique des particules, mais aussi pour tester l'hypothèse d'un meilleur effet à faible concentration. La première étude nous a permis de conclure à un meilleur effet avec une exposition au champ magnétique rotatif quotidienne pendant 5 jours. C'est donc cette fréquence de répétition du champ qui est appliquée dans cette deuxième étude. Les contrôles sont composés d'un groupe non traité U87₂, d'un groupe injecté avec des particules dans du PEG₂₀₀ à une concentration divisée par 10 et un volume injecté réduit par rapport à la première étude U87₂ NP_{/10}, d'un groupe injecté avec seulement du PEG₂₀₀ avec des seringues dédiées U87₂ PEG et un groupe soumis au champ magnétique rotatif quotidiennement U87₂ CM5. Les résultats sont donnés en Figure 61.

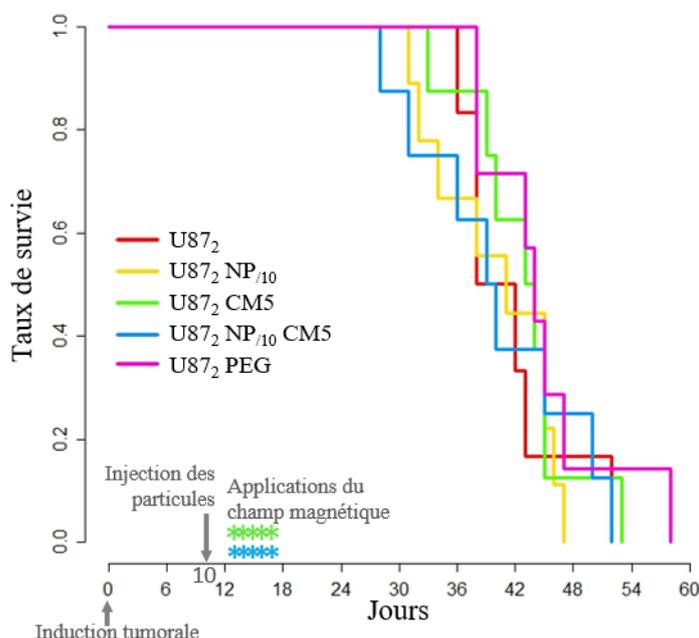


Figure 61 : Courbes de survie de tous les groupes de la deuxième étude de survie.

Les courbes obtenues sont assez similaires et aucune différence significative n'est observée. Comme déjà discuté au chapitre 4, II.4, la toxicité des particules est quasi-nulle à plus faible concentration.

Pour déterminer la cause d'une augmentation de la survie pour le groupe U87₁ PEG CM, les trois hypothèses émises précédemment (effet du champ magnétique rotatif seul, effet de l'injection du PEG₂₀₀, ou effet d'un traitement avec une faible quantité de particules) sont confrontées en Figure 62.

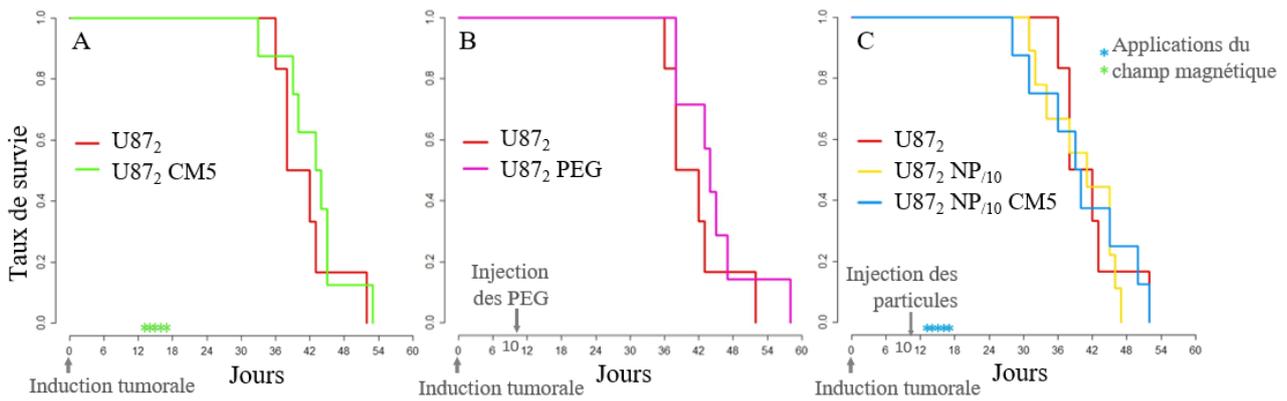


Figure 62 : Courbes de survie des groupes de la deuxième étude U87₂ et A/ U87₂ CM5, B/ U87₂ PEG et C/ U87₂ NP₁₀ et U87₂ NP₁₀ CM5.

La première hypothèse d'un possible effet de l'exposition au champ magnétique rotatif est ici réfutée (Figure 62A). En effet, les profils des deux courbes de survie sont très similaires et ne font pas apparaître d'effet bénéfique sur la survie grâce à une exposition au champ.

La deuxième hypothèse concerne l'injection du PEG₂₀₀. La Figure 62B montre un léger décalage vers la droite de la courbe de survie du groupe injecté avec du PEG₂₀₀. Il est donc possible que l'injection de PEG₂₀₀ améliore la survie. Cependant la différence entre les deux groupes est non significative. De plus, l'effet sur la survie est ici plus modéré que pour le groupe U87₁ PEG CM dans la précédente étude.

La comparaison du groupe contrôle U87₂, du groupe injecté avec des particules à faible concentration U87₂ NP₁₀ et du groupe traité à faible concentration U87₂ NP₁₀ CM5 de la deuxième étude de survie montre des courbes de survie assez similaires (Figure 62C). L'impact bénéfique de l'application du champ magnétique rotatif sur les tumeurs injectées avec des particules semble être nettement diminué quand les particules sont injectées à faible dose. L'hypothèse de particules injectées en faibles doses pendant l'injection de PEG₂₀₀ pour le groupe U87₁ PEG CM n'est ici pas confirmée.

De même que pour la première étude, les médianes ainsi que la distribution des durées de survie sont représentées en Figure 63.

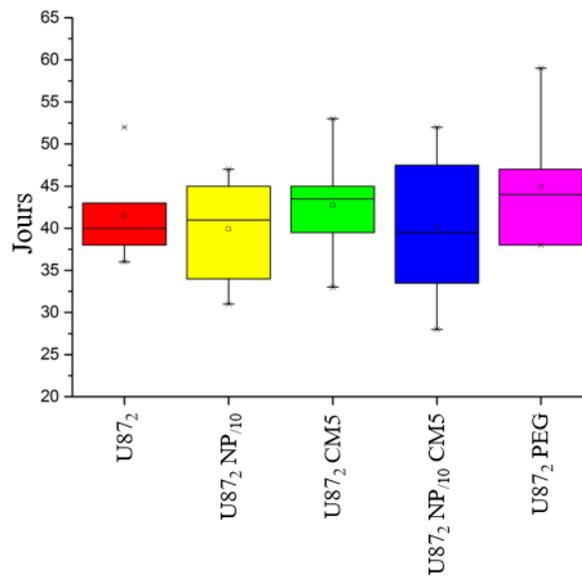


Figure 63 : Représentation en boîtes à moustaches de la durée de vie de tous les groupes de la deuxième étude de survie.

Aucune différence significative entre les différents groupes n'est observée ici. La distribution du groupe traité à faible concentration de particules U87₂ NP₁₀ CM5 est moins importante que pour le groupe U87₁ NP CM5/1S avec une dose plus élevée de particules mais la médiane ainsi que la moyenne de la durée de survie sont encore très similaires au groupe contrôle. Seuls les groupes U87₂ CM5 et U87₂ PEG ont une médiane de survie légèrement améliorée, mais qui reste inférieure à celle du groupe U87₁ PEG CM de la première étude. Cependant, le manque de statistique ne permet malheureusement pas de conclure.

III.3. Conclusions

L'étude histologique réalisée *in-vivo* nous a permis de mettre au point et d'affiner toutes les procédures nécessaires pour l'application du traitement. En particulier, des ajustements ont été effectués avec succès pour l'injection des particules. Cependant, concernant l'efficacité du traitement, les colorations HE ne montrent pas de différences majeures entre les tissus seulement injectés avec des particules et les tissus avec particules et exposés au champ magnétique. De plus, les marquages de la prolifération ne montrent pas non plus de diminution de l'activité proliférative des cellules cancéreuses. Au contraire, une possible augmentation de la prolifération à 6 et 24 h après l'application du champ magnétique rotatif a été observée. Cependant, ce résultat n'a pas pu être confirmé à cause d'un problème de conservation des échantillons.

Les études de survie ont permis de choisir la meilleure fréquence d'application du champ magnétique rotatif. Bien que non significative, une augmentation de la survie a en effet été observée pour certaines souris exposées quotidiennement au champ magnétique pendant 5 jours. Cependant, la tendance toxique

des particules injectées se retrouve également dans ce groupe traité. Alors que certaines souris voient leur durée de vie augmenter grâce au traitement, une autre partie a une durée de vie inférieure au groupe contrôle soumis à aucun traitement. Dans ce cas, l'effet bénéfique du traitement ne permet pas de compenser la toxicité des particules. Cela nous indique une sélectivité du traitement, sujet-dépendant.

De manière intéressante, la première étude de survie montre une médiane de survie significativement augmentée pour le groupe injecté avec du PEG₂₀₀ et soumis au champ magnétique rotatif, comparé au groupes injecté avec des particules. Une étude de survie complémentaire a alors été réalisée pour tester les trois hypothèses pouvant expliquer cet effet : impact du champ magnétique rotatif seul, impact de l'injection de PEG₂₀₀ seule ou encore impact d'un traitement à très faible concentration. Aucune différence significative n'est alors obtenue entre les différents groupes dans la deuxième étude. La médiane de survie est tout de même légèrement augmentée pour les groupes soumis au champ magnétique rotatif seul et à l'injection de PEG₂₀₀ seule. Le groupe injecté avec une faible dose de particules et exposé au champ magnétique rotatif présente une médiane de survie légèrement diminuée, mais certaines souris du groupe ont vécu plus longtemps. Il n'est alors pas possible de valider ni réfuter un effet bénéfique de chacun de ces paramètres, ni d'un effet combiné. De plus, il reste une probabilité non-nulle que l'augmentation de survie observée lors de la première expérience soit due au hasard.

Tous ces résultats ne concordent pas avec les résultats obtenus *in-vitro* (chapitre 3). En effet, nos expériences *in-vitro* ont montré que seulement 7 % des cellules sont encore vivantes après le traitement par TEMMP et une affectation de la prolifération des cellules avait été observée. Les résultats obtenus ici sont beaucoup plus mitigés et font apparaître un besoin d'optimisation. Bien qu'une optimisation des paramètres ait déjà été effectuée *in-vitro*, la pertinence du modèle choisi peut être remise en cause et sera discutée dans la partie suivante (chapitre 4, IV.1). Dans une volonté de mieux contrôler et anticiper la réponse des particules au champ magnétique rotatif, un nouveau modèle *in-vitro* a donc été développé.

Il est à noter que, de par les propriétés immunodéficientes de ces souris, l'étude des mécanismes inflammatoires n'a pas pu être réalisée ici. Or, l'inflammation joue un rôle important dans la progression des tumeurs. Pour cette raison, il pourrait être intéressant dans de futures études de réaliser de nouvelles expérimentations sur un modèle syngénique immunocompétent, une fois l'optimisation des paramètres du TEMMP réalisée *in-vitro*.

IV. Développement d'un modèle *in-vitro* 3D

IV.1. Les limites du modèle *in-vitro* classique – Nécessité du développement d'un nouveau modèle

Les différents tests menés *in-vitro* nous montrent un effet très bénéfique du traitement avec une diminution importante du nombre de cellules cancéreuses vivantes et une altération de la prolifération des cellules restantes, qui n'a pas pu être reproduit *in-vivo*. Cela peut s'expliquer par de trop nombreuses différences entre ces deux modèles. En effet, le modèle *in-vitro* classique avec des cellules adhérentes dans des boîtes de Pétri est une version très simplifiée de la réalité. En plus des différences habituelles entre un modèle *in-vitro* et un modèle *in-vivo* (Gillet, Varma, and Gottesman 2013), les propriétés mécaniques de ces deux modèles, qui ont une grande importance pour notre étude, présentent peu de points communs. En effet, la réponse mécanique des particules au champ magnétique va être très différente lorsque les particules sont dans un liquide, dans le cas de l'*in-vitro*, ou lorsqu'elles sont dans un milieu avec une forte viscoélasticité tel que le cerveau. Les paramètres d'application du champ ainsi que la dose de particules à injecter ne peuvent être correctement évalués avec ce modèle.

Une des problématiques majeures de la technique que nous utilisons pour cette étude est l'injection des particules directement au centre de la tumeur et la diffusion des particules injectées. Cependant, ces thématiques ne peuvent pas être abordées avec un modèle *in-vitro* classique.

De plus, nous avons noté de nombreux points discréditant l'utilisation de ce modèle pour une évaluation fiable de l'efficacité ou des mécanismes de notre technique. En effet, il semblerait que les effets observés *in-vitro* soient le résultat d'un décollement des cellules qui se font « arrachées » par les particules. Or, un tel phénomène n'a pas d'équivalent *in-vivo*. De plus, les particules se retrouvent souvent agglomérées et nous pouvons observer la présence de cellules bloquées entre ces particules en grande quantité. Ici encore, un tel phénomène est peu probable *in-vivo*. Nous avons aussi remarqué une capacité des gros amas de particules à tourner en rond dans un plan vertical dans le Labtek, suggérant que les amas retrouvés en fond de puits à la fin de l'expérience sont en fait en train de tourner dans le milieu de culture pendant la majorité de la durée d'application du champ. Ces amas de particules se sont même retrouvés deux fois hors du milieu de culture, accrochés au parafilm qui recouvre le Labtek.

Afin de travailler avec un modèle plus pertinent pour mieux optimiser les paramètres du traitement et étudier les phénomènes impliqués, nous avons décidé de développer un nouveau modèle *in-vitro* 3D. L'idée est alors de faire pousser les cellules en forme de sphère puis d'insérer cette sphère dans un gel

d'agarose, de viscosité similaire à celle du cerveau. Ce sphéroïde peut ensuite être traité comme une tumeur. Les particules peuvent être injectées de manière similaire au modèle *in-vivo* et le champ magnétique rotatif peut également être appliqué.

L'utilisation de sphéroïdes pour l'étude du cancer et de ses traitements est aujourd'hui en plein essor. Prenant en compte l'importance des propriétés mécaniques dans le développement des tumeurs (Mierke 2014), ce modèle à cheval entre la culture de cellules en 2D et les expérimentations animales permet de mimer l'architecture et l'hétérogénéité du microenvironnement tumoral (Rodrigues et al. 2018). En effet, il est par exemple possible d'insérer des cellules différentes dans un même sphéroïde (Costa et al. 2016). Plus proche de l'environnement tumoral *in-vivo*, cette technique permet de mieux optimiser et tester les traitements *in-vitro* avant de passer à la phase préclinique, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés dans la recherche médicale. Les sphéroïdes sont par exemple utilisés pour la recherche de nouveaux médicaments, prenant en compte les différences telles que le pH, l'apport en nutriments et en oxygène ou encore les forces mécaniques entre les cellules situées à l'extérieur de la sphère et celles situées à l'intérieur (Sant and Johnston 2017). D'autres modèles existent pour simuler un environnement 3D tels que les hydrogels ou les inserts pour cellules, par exemple (Kimlin, Casagrande, and Virador 2013; Costa et al. 2016). Dans notre cas, le modèle de sphère est le plus adapté car il nous permet de traiter le sphéroïde comme une tumeur, par exemple en injectant les particules directement à l'intérieur. Afin que le stress mécanique subi par les cellules soit le même en périphérie de la sphère, nous le combinons à une technique de culture de cellules en gel d'agarose. Des produits enrichis existent pour ce type d'application, comme le Matrigel® ou le QGel® Matrix ; cependant, ces produits sont très chers et le gel d'agarose a déjà prouvé son efficacité pour la culture cellulaire en 3D (G. Cheng et al. 2009; Harrington et al. 2014).

IV.2. Mise au point de la méthode

Pour notre modèle, les cellules sontensemencées de sorte à former des sphères puis insérées dans un gel. L'injection des particules ainsi que l'application du champ magnétique peut alors se faire de manière similaire aux expérimentations *in-vivo*. Le protocole est résumé en Figure 64, et détaillé ci-après.

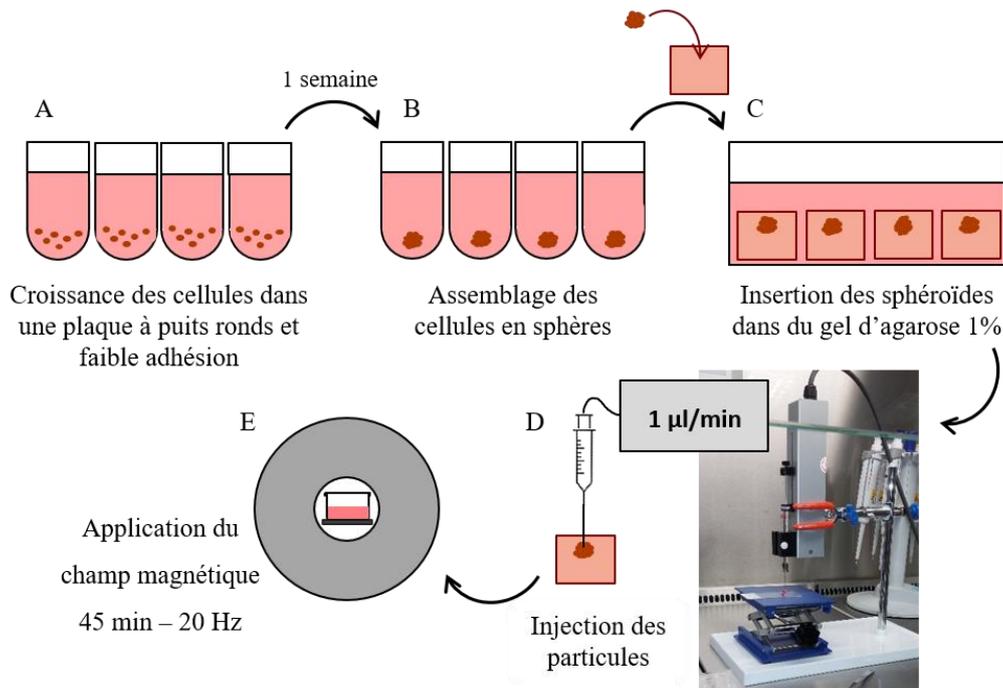


Figure 64 : Schéma présentant le protocole de culture de cellules en 3D. A/ Les cellules sontensemencées dans une plaque faible adhésion à fond rond. B/ Les cellules s'assemblent les unes aux autres pour former une sphère. C/ Les sphéroïdes sont insérés dans un gel d'agarose. D/ Les particules sont injectées. E/ Le champ est appliqué.

Création des sphéroïdes

Les cellules sontensemencées dans une plaque 96 puits faible adhésion à fond rond à une concentration de $5 \cdot 10^5$ cellules/ml et 200 µl/puits (Figure 64A). Le milieu de culture est changé deux fois par semaine, en prenant soin de ne pas aspirer la sphère. Les puits en périphérie sont remplis d'eau ou de D-PBS afin de limiter l'évaporation du milieu de culture. Le fond de la plaque étant non-adhérent, les cellules vont progressivement s'assembler les unes aux autres (Figure 64B). La concentration des cellules est choisie pour maximiser la taille de la sphère tout en conservant la forme sphérique. En effet, si la concentration en cellules est trop importante, les cellules vont s'assembler en formant une coupole. Il est aussi possible de former des sphéroïdes en utilisant des plaques à fond rond adhérentes en recouvrant le fond d'une couche de gel d'agarose pour bloquer l'adhésion des cellules. Cependant, l'utilisation de plaques faible adhésion est préférable car elle permet d'obtenir plus rapidement des sphéroïdes présentant une meilleure homogénéité, des tailles plus importantes et une structure plus compacte (Vinci et al. 2012).

Préparation du gel d'agarose

Afin que les cellules situées en périphérie de la sphère soient elles-aussi dans un environnement de viscosité similaire à celui du cerveau, les sphéroïdes sont encapsulés dans un gel d'agarose (Figure 64C). Des études ont montré qu'un gel d'agarose à 0,6 % est de viscosité similaire à celle du cerveau (Pomfret,

Miranpuri, and Sillay 2013). Cependant, les tumeurs cérébrales sont plus dures que le tissu sain. De plus, nos premiers essais réalisés à 0,6 % ont abouti à des gels trop fragiles. Pour ces raisons, nous réalisons pour la suite des gels à 1 %. Après une semaine de culture des sphéroïdes, de l'agarose est dissout au bain-marie ou au micro-onde dans du DMEM+GlutaMax (équivalent à du milieu de culture sans SVF, le SVF étant sensible à la chaleur) à une concentration de 2 % (w/v). Après refroidissement jusqu'à 37°C au bain-marie, un volume de milieu de culture identique à celui de la solution est ajouté afin d'obtenir un gel final à 1% (w/v). La solution de gel est maintenue au bain-marie à 37 °C puis est rapidement déposée dans un moule (profondeur ~7 mm, diamètre ~4 mm). Les sphères sont alors doucement prélevées à la micropipette avec un cône 1 ml puis déposées au centre du moule, en évitant le plus que possible l'ajout de milieu de culture au centre du gel. Après démoulage, les gels sont déposés dans une plaque 6 puits à raison de 3 à 7 gels par puits, et immergés de milieu de culture. L'intérêt d'utiliser un tel moule est d'obtenir des gels individuels, facilement manipulables et qui peuvent être transférés d'un support à un autre.

Injection des particules

Afin de se rapprocher au mieux des conditions de l'*in-vivo*, nous utilisons une seringue Hamilton avec une aiguille en fibre de verre identique à celle utilisées pour les injections *in-vivo*. Les particules sont mises en suspension dans du PEG₂₀₀. Le gel est déposé sur un élévateur placé en dessous de l'aiguille (Figure 64D). Le gel est alors élevé jusqu'à ce que l'aiguille pénètre le sphéroïde. Cette opération est assez délicate et nécessite de s'y reprendre à plusieurs fois. En effet, cette expérience est réalisée sous poste de sécurité microbiologique (PSM), contraignant la visibilité sur la sphère et l'aiguille. De plus les sphéroïdes sont un peu mobiles dans le gel. Si l'aiguille n'est pas située pile au centre de la sphère, celle-ci va glisser sur les côtés pour éviter l'aiguille. Cela nous renseigne sur une certaine élasticité des sphéroïdes. Le déplacement des sphéroïdes dans le gel peut s'expliquer par le fait qu'un faible volume de milieu de culture est inséré en même temps que le sphéroïde pendant la mise en gel et formerait ainsi une bulle de liquide autour du sphéroïde. Pour tenir compte de la plus petite taille du sphéroïde, un volume de 2 µl est injecté (contre 5 µl *in-vivo*) à l'aide d'un pousse-seringue à très faible débit (1 µl/min), cette vitesse d'injection ayant été optimisée lors des expérimentations *in-vivo*.

Pour comparaison avec une méthode simplifiée, les particules sont ajoutées en même temps que les cellules dans la plaque 96 puits à fond rond.

Application du champ magnétique

Les gels sont déposés au centre d'un Labtek 1 puits puis immergés de milieu de culture. Afin d'assurer une homogénéité du champ reçu par tous les sphéroïdes, nous disposons au maximum 9 gels au centre

du Labtek. Celui-ci est ensuite placé au centre du cylindre de Halbach et le champ est appliqué pendant 45 min à une fréquence de 20 Hz (Figure 64E).

Analyse des échantillons

Un des avantages majeurs de cette méthode est qu'elle permet d'analyser les sphéroïdes avec les mêmes protocoles que les tissus *in-vivo*. Les gels sont congelés dans de l'isopentane à -60 °C. Ils sont ensuite coupés en tranches de 12 µm à l'aide d'un Cryostat maintenu à -20 °C, et récupérés sur des lames de verre appropriées.

Des marquages sont ensuite effectués afin de révéler certains éléments des cellules. Les marquages HE et Ki-67 sont réalisés selon le même protocole que pour les échantillons *in-vivo* (annexe V). Des analyses au TEM ont également été réalisées d'après le protocole présenté en annexe IV.

IV.3. Validation de la méthode

IV.3.1. Sphéroïdes obtenus

Les sphéroïdes obtenus ont des tailles comprises entre 0,8 et 1 mm (Figure 65A et B/i). Bien que plus petits que les tailles de tumeur que nous chercherons à traiter par la suite, ils offrent une configuration similaire pour appréhender les problématiques d'injection des particules.

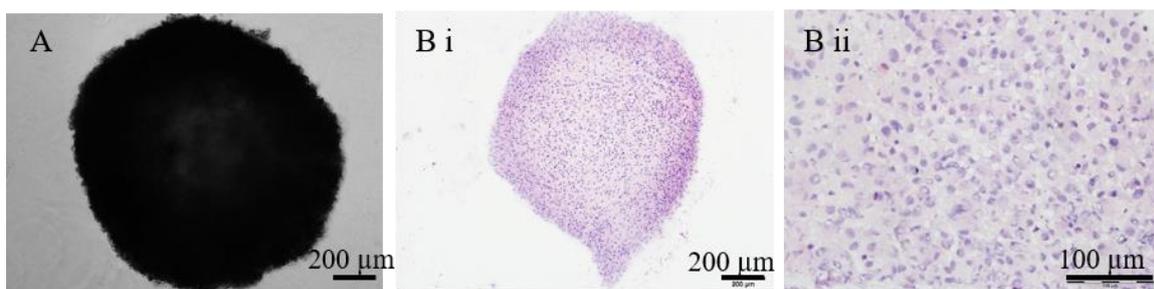


Figure 65 : A/ Image au microscope optique d'un sphéroïde pris en gel et B/ marquages HE de sphéroïdes en gel.

Les marquages HE permettent de visualiser la morphologie des cellules, de manière similaire à ceux réalisés sur les coupes *in-vivo* (Figure 65B/ii).

IV.3.2. Injection des particules dans les sphéroïdes

Diffusion des particules

La différence dans la répartition des particules selon que les particules soient mises avec les cellules à J0 ou soient injectées dans le sphéroïde à J8 peut s'observer par un marquage HE (Figure 66).

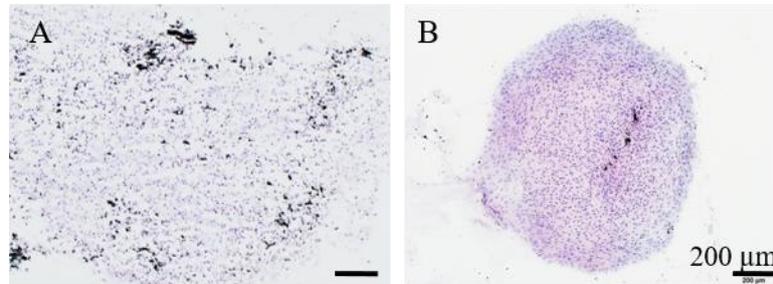


Figure 66 : Marquages HE de sphéroïde en gel A/ avec particules mises à J0 et B/ avec particules injectées à J8. La concentration en particules est ici identique à la première étude de survie : 20 g/l et la congélation a été réalisée 3 jours après la mise des particules. La barre d'échelle correspond à 200 µm.

De manière attendue, les particules sont dispersées dans le sphéroïde lorsqu'elles sont mises en même temps que les cellules (Figure 66A). En revanche, lorsqu'elles sont injectées après formation de la sphère, les particules restent principalement le long de la trajectoire de l'aiguille (Figure 66B).

Bien qu'une meilleure diffusion soit préférable pour un traitement plus efficace, l'injection dans le sphéroïde permet de mieux se rapprocher d'une situation *in-vivo*. En effet, l'observation de particules après leur injection intracrânienne montre que celles-ci diffusent peu et restent proche de la trajectoire de l'aiguille (chapitre 4,II II.2). Ce nouveau modèle pourrait donc être utilisé pour optimiser la diffusion des particules dans le sphéroïde, puis dans la tumeur.

Etude de l'internalisation des particules

Nous cherchons maintenant à savoir si les particules sont internalisées avec ce modèle. Nous avons remarqué que les particules sont internalisées après 24 h dans le modèle *in-vitro* classique et qu'elles ne sont pas internalisées dans le modèle *in-vivo* 72 h après l'injection des particules. Le modèle étudié ici étant un mélange entre les deux modèles, car artificiel et composé d'une lignée cellulaire, mais présentant une structure 3D assimilable à du tissu, la question de l'internalisation se pose de nouveau.

Dans une première approche, les sphéroïdes ont été observés au microscope optique. En faisant varier le plan focal, il est possible de déterminer si la (ou les) particules observées sont dans ou hors des cellules. Nous avons remarqué que les particules sont plus souvent internalisées lorsqu'elles sont ajoutées en même temps que les cellules. Au contraire, lorsque les particules sont injectées directement dans le sphéroïde, les particules sont plus souvent entre deux cellules. Cependant, ce microscope ne

permet d'observer que les cellules les plus en périphéries. De plus, la résolution ne permet pas d'exclure catégoriquement une internalisation lorsque la particule se trouve entre deux cellules, car elle pourrait se trouver à l'intérieur d'une des cellules, collée à la paroi.

Pour confirmer nos premières observations et mieux analyser l'internalisation des particules, des acquisitions ont été réalisées au TEM (Figure 67) d'après le protocole présenté en Annexe IV.

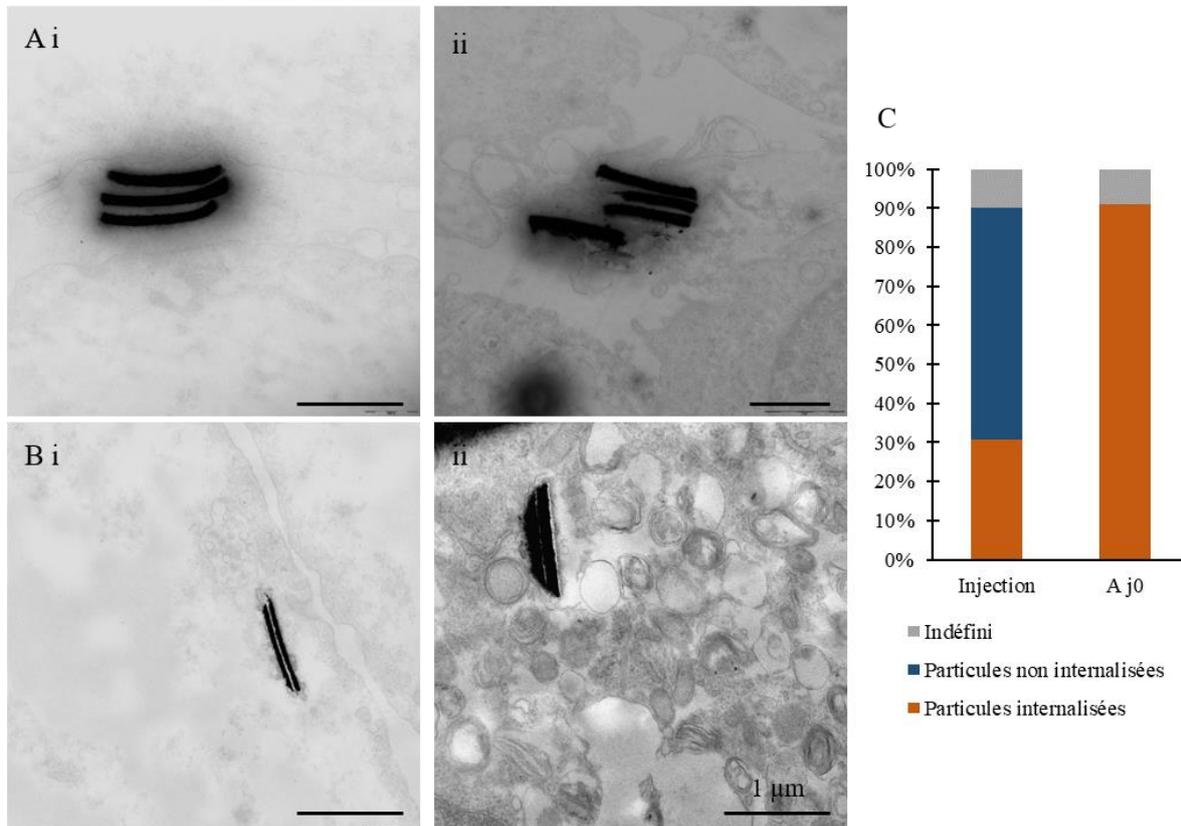


Figure 67 : Images TEM à J11 de particules dans des sphéroïdes A/ injectées dans la sphère à J8 et B/ ajoutées à J0 avec les cellules; C/ quantification des particules internalisées et non internalisées en fonction de la méthode d'injection des particules. La barre d'échelle correspond à 1 μ m.

Les acquisitions au TEM permettent de définir si les particules sont à l'intérieur des cellules ou à l'extérieur. Par exemple, les trois particules présentes en Figure 67A/i sont situées entre deux cellules. Les membranes ainsi que le cytoplasme de deux cellules sont visibles au-dessus ainsi qu'en dessous des particules. De même, les particules visibles en Figure 67A/ii sont entourées par quatre cellules, situées aux quatre coins de l'image. Ces deux acquisitions ont été réalisées sur des sphéroïdes injectés avec des particules à J8. Au contraire, les particules de la Figure 67B/i sont situées à l'intérieur d'une cellule dont la membrane est visible sur la droite de l'image. Les particules en Figure 67B/ii sont elles aussi situées à l'intérieur d'une cellule et entourées par de nombreux organites. Ces deux acquisitions ont été réalisées sur des sphéroïdes avec mises des particules à J0

Pour confirmer la validité de ces observations, une quantification a été réalisée sur toutes les particules présentes sur nos coupes (Figure 67C). Nous avons ainsi déterminé que lorsque les particules sont mises

en même temps que les cellules, au moins 90 % d'entre elles sont internalisées à J11. En revanche, lorsque les particules sont injectées avec un protocole similaire à l'étude *in-vivo*, seulement 30 % des particules sont internalisées à J11.

L'injection des particules après formation de la sphère permet donc de reproduire plus finement les conditions *in-vivo*. Pour notre application, le stress subi par les cellules et provoqué par la vibration des particules dépend de si celles-ci sont internalisées ou non. Il est donc important que le modèle choisi permette de se placer dans une situation similaire. Bien que laborieuse, l'injection des particules dans le sphéroïde est donc nécessaire pour notre étude.

IV.3.3. Application du traitement

De même que pour l'étude *in-vivo*, des marquages ont été effectués pour observer l'effet du TEMMP sur les sphéroïdes pris en gel. Des marquages HE pour voir la morphologie des cellules et Ki-67 pour étudier la prolifération sont présentés en Figure 68.

Les marquages HE réalisés sur des tissus *in-vivo* permettent à la fois de vérifier la morphologie des cellules mais aussi de déterminer quels types de cellules se trouvent dans la zone d'intérêt. Ici, seule la morphologie des cellules de culture peut être étudiée.

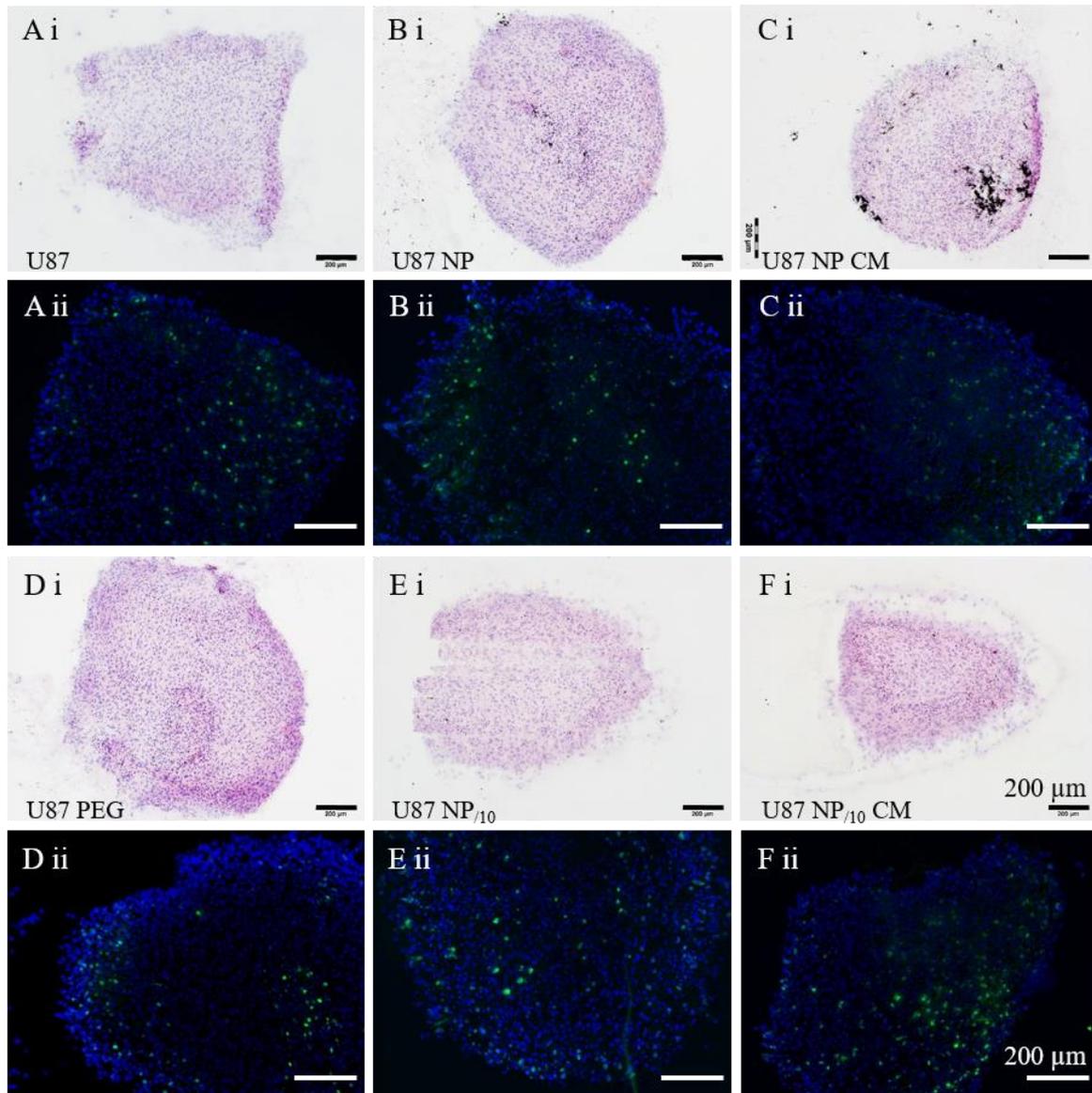


Figure 68 : i/ Marquages HE et ii/ Marquages Ki-67 – Hoechst de sphéroïde en gel 6 h après application du champ A/ sans traitement ; B/ injectés avec des particules à une concentration de 20 g/l ; C/ injectés avec des particules à une concentration de 20 g/l et exposé au champ magnétique rotatif ; D/ injectés avec du PEG₂₀₀ ; E/ injectés avec des particules à une concentration de 2 g/l ; F/ injectés avec des particules à une concentration de 2 g/l et exposé au champ magnétique rotatif. Les rayures observées sur l'image E/i sont des artefacts dus à la préparation de l'échantillon. La barre d'échelle correspond à 200 µm.

Nos marquages HE montrent une plus grande densité de noyaux et un caractère acidophile des cellules dans les zones d'injection comme en Figure 68B/i et C/i autour des particules ou en Figure 68D/i en bas de l'image. Ces observations sont en concordance avec les résultats obtenus *in-vivo* (chapitre 4, III.1). Le caractère acidophile des cellules avait en effet déjà été remarqué dans les zones proches des particules. Ce phénomène est ici observable aussi dans le cas d'injection de PEG₂₀₀. Une augmentation de la densité de noyaux avait été remarquée *in-vivo* 7 jours après le traitement autour de la zone d'injection. Ce phénomène est ici présent dans les sphéroïdes injectés 6 h après l'application du champ (soit 3 jours après l'injection), même sans particules ni exposition au champ.

Les marquages de prolifération montrent également une surexpression du Ki-67 dans les zones d'injection (Figure 68B/ii, C/ii et D/ii). Au cours de l'étude *in-vivo*, une surexpression du Ki-67 avait été observée 7 jours après traitement dans la zone d'injection et à distance des particules 6 et 24 h après injection (Figure 56C/i, ii et iv). Cependant, les nécroses au centre de certaines tumeurs, et donc au niveau des zones d'injection, ne permettent pas d'étudier *in-vivo* la prolifération des cellules autour des particules. Nos observations réalisées grâce au modèle *in-vitro* 3D nous font émettre l'hypothèse d'une augmentation de la prolifération des cellules suite à l'injection.

Les résultats obtenus avec ce nouveau modèle *in-vitro* de sphéroïdes en gel sont très différents de ceux obtenus par les expériences *in-vitro* classique. L'effet létal très important et la diminution de la prolifération des cellules après TEMMP observés au chapitre 2 ne sont pas reproduits ici. En revanche, nos résultats sont beaucoup plus cohérents avec ceux obtenus *in-vivo*. De plus, ce nouveau modèle permet d'observer la réaction à l'injection des particules ou de PEG₂₀₀ ainsi que la diffusion des particules. Il va donc pouvoir être utilisé pour mieux optimiser les paramètres du traitement en tenant compte de la viscosité du milieu.

IV.3.4. Utilisation du modèle de sphéroïdes en gel et pistes d'optimisation

Jusqu'à présent, la plupart des tests effectués pour observer le comportement des particules soumises à un champ magnétique rotatif ont été réalisés dans du liquide et ont montré que les particules étaient capables d'effectuer un mouvement. Pour évaluer la réponse mécanique des particules au champ magnétique rotatif dans un environnement plus rigide et plus complexe, nous avons utilisé notre nouveau modèle de sphéroïde en gel et observé les particules pendant l'application d'un champ magnétique rotatif.

Le cylindre de Halbach tel qu'il a été configuré et dimensionné ne permet pas une observation au microscope en même temps que l'application du champ. Nous avons donc utilisé un système composé de quatre bobines positionnées sous un microscope optique. Le champ appliqué peut être rotatif, alternatif ou constant ; il varie entre 15 et 90 mT à une fréquence entre 0,1 et 20 Hz.

Deux modes d'observation sont utilisés selon la fréquence choisie. Pour les fréquences les plus faibles (<10 Hz), l'échantillon est illuminé par des diodes électroluminescentes (LEDs) et le signal est recueilli par la caméra placée au-dessus de l'échantillon. Dans ce mode, appelé champ clair, les particules apparaissent alors en noir et le contour des cellules, bien que peu contrasté, peut être distingué (Figure 69A). L'image recueillie ne montre qu'un seul plan, il est parfois nécessaire de faire varier le plan focal pour mieux distinguer les contours des cellules. Pour des fréquences plus élevées (>10 Hz), le

mouvement trop rapide des particules n'est plus perceptible. Un mode champ sombre est utilisé en stoppant, grâce un cache, une partie des rayons réfléchis par l'échantillon pour ne recueillir que les rayons se réfléchissant sur les particules orientées dans un axe. L'image observée correspond à la lumière réfléchie par les particules (Figure 69B). Les cellules ne sont alors plus visibles et les mouvements, même de faible amplitude des particules peuvent être observés. Dans les deux cas, nous n'avons pu observer que les particules et les cellules situées en périphérie du sphéroïde (environ trois couches de cellules).

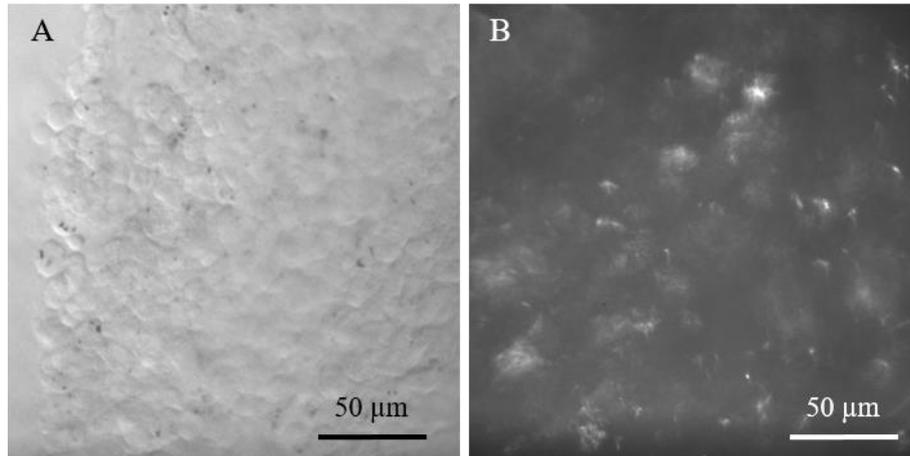


Figure 69 : Images de sphéroïdes en gel avec des particules obtenues avec le microscope en mode A/ champ clair permettant de voir le contour des cellules en couleur clair et les particules en noir et B/ champ sombre permettant de visualiser la réflexion de la lumière par les particules.

Influence du gel sur le modèle

Certaines expériences ont été réalisées sur des sphéroïdes sortis de leur gel. Dans ce cas, nous avons observé que les cellules en périphérie bougeaient beaucoup en réponse à la stimulation des particules, allant même jusqu'à se détacher et être expulsées de la sphère. Ce phénomène nous montre l'importance de la prise en gel dans notre modèle. En effet, si le champ est appliqué sur une longue période, les cellules en périphérie se détacheraient les unes après les autres, perdant l'intérêt d'un milieu contraint avec une forte viscosité. De plus, nous avons également observé que les sphères s'aplatissaient lorsqu'elles ne sont plus disposées dans une plaque à fond rond, non compatible avec l'application du champ dans le cylindre de Halbach.

Observations préliminaires des particules en fonction des paramètres d'application du champ

Pour tenter de définir des axes d'amélioration pour maximiser l'effet du traitement, nous avons fait varier les différents paramètres d'application du champ et observé le comportement des particules. Nous

reportons ici certaines caractéristiques ressorties de nos expériences préliminaires, et qui pourraient être approfondies dans de futures études pour une bonne optimisation des paramètres.

Nous avons observé un mouvement de certaines particules en réaction au champ tournant appliqué dès 15 mT (champ plus faible non testé) pour de faibles fréquences (0,5 Hz). Augmenter l'amplitude du champ permet alors d'augmenter le nombre de particules qui entrent en mouvement pour suivre le champ. Même pour les amplitudes les plus élevées testées (90 mT), nous n'avons pas pu observer de mouvement pour certaines particules.

Nous avons fait varier à la fois la fréquence et l'amplitude du champ et avons observé que l'amplitude des mouvements des particules diminue lorsque la fréquence augmente. Pour garder une amplitude de mouvement similaire, il faut alors augmenter l'amplitude du champ.

Nous avons remarqué que, pour une fréquence donnée, le champ nécessaire pour faire bouger un petit amas de particules est plus faible que pour faire bouger une particule seule. Ce phénomène est en concordance avec une étude théorique réalisée par Carrey et al. qui montrent que dans un champ rotatif, le torque produit par un amas de nanoparticules monodomaines augmente drastiquement (Carrey and Hallali 2016). Ce point pourra notamment être pris en compte lors de l'optimisation de la diffusion des particules dans les tissus. Il est possible qu'une dispersion trop homogène soit finalement préjudiciable pour maximiser l'effet du traitement.

En faisant varier le plan focal de haut en bas, il est possible dans certains cas de savoir si une particule se situe à l'intérieur ou à l'extérieur d'une cellule. Nous avons constaté que les particules bougent plus facilement lorsqu'elles sont internalisées dans les cellules que lorsqu'elles sont hors des cellules. Cela peut s'expliquer par les contraintes subies par les particules situées entre les membranes des cellules. A l'inverse, il semblerait que les particules situées dans les cellules arrivent à bouger plus librement. Cependant, ces observations ne signifient pas forcément que le stress subi par les cellules est plus fort lorsque les particules sont internalisées. En effet, il est possible que les particules arrivent plus facilement à tourner lorsqu'aucun organite cellulaire n'est sur leur chemin. Dans ce cas, les particules ne pourraient pas non plus appliquer directement un stress mécanique sur les organites de la cellule.

Pour conclure, les différentes expériences menées nous confirment que les particules sont capables de répondre mécaniquement au champ appliqué pour agir sur les cellules malgré les contraintes mécaniques de ce modèle. Les observations réalisées ici font apparaître un possible effet bénéfique d'une fréquence plus faible qui permet d'amplifier l'amplitude des mouvements des particules. Une augmentation de l'effet lorsque la fréquence diminue a déjà été reportée dans la littérature (Wong et al. 2017). Une amplitude de champ plus élevée permet d'augmenter le nombre de particules réceptives et d'amplifier les mouvements des particules. La diffusion des particules dans les tissus, qui devra être optimisée pour

de futures études, pourra être limitée afin de permettre la formation de petits amas de particules, plus réceptifs au champ appliqué.

IV.3.5. Conclusions

La non-pertinence du modèle *in-vitro* classique révélée au cours de notre étude nous a poussé à développer un nouveau modèle *in-vitro* 3D. Les cellules poussent en s'auto-assemblant pour former une sphère. Le sphéroïde obtenu après une semaine de culture est encapsulé dans un gel d'agarose. Les différentes procédures du TEMMP comme l'injection des particules et l'application du champ magnétique rotatif peuvent alors être testées dans ce modèle. Nous avons pu valider les différentes étapes du modèle. Notamment, l'injection des particules directement dans la sphère après sa formation présente plusieurs avantages. Elle permet à la fois d'envisager *in-vitro* les problématiques techniques de l'injection des particules, mais aussi d'éviter l'internalisation des particules par les cellules, en cohérence avec le modèle *in-vivo*. En effet, les analyses au TEM montrent que seulement 30 % des particules sont internalisées avec ce modèle. L'encapsulation en gel permet de mimer les propriétés mécaniques du cerveau, même pour les cellules situées en périphérie de la sphère. De plus, la configuration en gels individuels est pratique pour les différentes étapes à réaliser. L'analyse de ces sphéroïdes peut alors être réalisée de façon similaire aux analyses *in-vivo*. Nous avons soumis les sphéroïdes au TEMMP et avons obtenu des résultats cohérents avec l'étude histologique réalisée *in-vivo*, venant ainsi confirmer la pertinence de ce modèle.

Ce modèle *in-vitro* 3D pourra maintenant être utilisé pour l'optimisation des paramètres du TEMMP, avant de refaire d'éventuels tests *in-vivo*, et va ainsi permettre de limiter le nombre d'animaux utilisés. La dose et la diffusion des particules pourront par exemple être ajustés pour maximiser l'effet du TEMMP tout en limitant la toxicité. Ce modèle pourra également être utilisé afin de prendre en compte le comportement différent des particules en réponse à l'application d'un champ magnétique dans un milieu visqueux et ainsi optimiser les paramètres d'application du champ magnétique. Nos observations préliminaires font apparaître un possible effet bénéfique d'une fréquence réduite et d'une amplitude de champ élevée pour maximiser l'amplitude du mouvement des particules.

Ce modèle pourra également être utilisé pour étudier les mécanismes liés au stress mécanique induit par les particules sur les cellules. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la prolifération des cellules. L'apoptose ou le dérèglement du cytosquelette pourraient par exemple être également étudiés.

Chapitre 5

Conclusions, discussion et perspectives

Cette étude s'inscrit dans une volonté de proposer des thérapies innovantes du cancer en tirant profit des larges possibilités que les nano et microparticules magnétiques offrent pour les applications biomédicales. Émergeant d'une collaboration entre un laboratoire spécialisé dans le nanomagnétisme, la spintronique et ses applications, et d'un laboratoire spécialisé dans le cerveau et ses pathologies, ce travail pluridisciplinaire se focalise sur le traitement du glioblastome, cancer du cerveau aujourd'hui incurable. La thérapie étudiée dans ces travaux consiste à provoquer un stress mécanique sur des cellules cancéreuses par la vibration de particules magnétiques, exposées à un champ magnétique rotatif basse fréquence (TEMMP). Pour développer ce travail, nous avons suivi la stratégie classique de la recherche biomédicale de façon progressive, qui commence par le développement de la technologie répondant au besoin biomédical, se poursuit par l'évaluation de son efficacité *in-vitro*, puis par des tests précliniques chez l'animal.

Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à la fabrication et à la caractérisation des particules magnétiques nécessaires au TEMMP. Des particules en forme de disque, composées de permalloy et recouvertes d'or ont d'abord été produites en salle blanche, ce qui leur assure une parfaite reproductibilité et homogénéité dans un environnement très propre. Les dimensions choisies leur permettent d'interagir avec les entités biologiques et entraînent une configuration magnétique en vortex. Leur faible rémanence et leur susceptibilité sous un seuil critique évitent ainsi leur agrégation en suspension et permettent leur redispersion suite à l'application d'un champ magnétique. Leur recouvrement par un matériau biocompatible tel que l'or est compatible pour des applications biomédicales. L'anisotropie de forme des disques de permalloy permet leur mise en mouvement par l'application d'un champ magnétique externe de façon efficace. Les particules peuvent alors être « activées » à distance et produire un stress mécanique sur les cellules plus important qu'avec les SPIONs plus couramment utilisés.

Dans une optique d'amélioration, des particules pouvant être activées par des champs magnétiques d'orientation quelconque ont été étudiées. Des particules multicouches de Co/Pt, couplées au travers de couches minces de ruthénium par un couplage RKKY pour former des SAF, ont pour cela été produites. L'avantage de telles particules réside dans leur structure magnétique qui leur confère à la fois une faible rémanence due à la compensation des couches, mais aussi une forte aimantation perpendiculaire lorsqu'un champ est appliqué. Nous avons testé différents nombres de répétitions de multicouches de Co/Pt et de couches de Ru et nos caractérisations ont montré que les propriétés magnétiques de nos particules ainsi produites sont moins favorables pour le TEMMP.

Un deuxième type de particules alternatives a été étudié. Pour cela, les particules de permalloy sont produites en forme d'ellipse pour conserver la configuration en vortex des particules tout en ajoutant une anisotropie de forme dans le plan de la particule. Ainsi, les particules seraient capables de se mouvoir

en suspension, même lorsque le champ magnétique rotatif est appliqué dans le plan de la particule. Les caractérisations magnétiques nous confirment la persistance du vortex avec cette nouvelle géométrie. Cependant, des optimisations restent à effectuer avant une utilisation pour le TEMMP.

Nous avons donc pu réaliser l'étude *in-vitro* sur une lignée cellulaire de glioblastome avec les disques de permalloy. Nous avons pu démontrer la non-toxicité des particules jusqu'à une concentration de $3,2 \cdot 10^{-4}$ g/cm² ainsi qu'une internalisation des particules après 24 h d'incubation. Pour le TEMMP, un système composé d'un cylindre de Halbach en rotation a été développé pour l'application du champ magnétique rotatif. Les paramètres tels que la dose de particules, l'amplitude du champ, le temps d'exposition au champ magnétique ainsi que la fréquence d'application ont été optimisés. Les tests d'efficacité du TEMMP montrent alors un très fort effet anti-tumoral. En effet, avec 100 µg de particules/puits et un champ magnétique de 0,4 à 0,9 T appliqué pendant 45 min à 20 Hz, une diminution de 79 % du nombre de cellules et de 93 % de la viabilité cellulaire est mesurée. Une inhibition de la prolifération a également été observée sur les cellules restantes. Tous ces résultats montrent un effet létal important du TEMMP sur les cellules de glioblastome dans un modèle *in-vitro* 2D, et viennent compléter la littérature déjà existante sur le sujet.

Forts de cette première validation *in-vitro*, nous avons poursuivi notre travail par la validation de l'effet thérapeutique dans le cadre du modèle orthotopique de glioblastome chez la souris nude. La première étape a consisté à mettre au point le protocole d'injection des particules en intra-tumoral. Pour cela, le véhicule d'injection, le volume, le débit, le type d'aiguille ainsi que les délais entre les différentes procédures ont été optimisés. Les particules diffusent peu, ce qui est cohérent avec leur taille, mais restent localisées dans la tumeur. L'injection des particules n'induit pas de toxicité majeure mais entraîne une réaction localisée avec notamment un effet œdémateux et une réaction des polynucléaires. Aucune réaction macrophagique n'est observée, ce qui devrait assurer leur persistance à long terme. Nos analyses ont également montré que les particules ne sont pas internalisées *in-vivo*, ce qui vient remettre en cause les résultats d'efficacité du TEMMP obtenus *in-vitro*. Les colorations histologiques réalisées sur les tissus *in-vivo* après TEMMP ne montrent pas de différences majeures avec le groupe injecté avec des particules. Au contraire, une possible augmentation de la prolifération à 6 et 24 h après l'application du champ magnétique rotatif a été observée, mais n'a pas pu être confirmée à cause d'un problème de conservation des échantillons. La première étude ne montre pas d'effet significatif sur la survie, mais la médiane de survie du groupe soumis à une application quotidienne du champ magnétique rotatif est tout de même améliorée. De façon inattendue, la médiane de survie du groupe soumis à une injection de PEG₂₀₀ et à une exposition au champ magnétique rotatif est significativement améliorée par rapport au groupe injecté avec des particules. Trois hypothèses ont été formulées pour expliquer ce phénomène :

un effet du champ magnétique rotatif seul, un effet de l'injection de PEG₂₀₀ seule, ou un effet dû à de possibles particules injectées en même temps que le PEG₂₀₀ à très faible dose et exposées au champ magnétique. La deuxième étude réalisée dans le but d'éclaircir ce point n'a malheureusement pas permis d'approuver ni réfuter formellement ces hypothèses, la différence entre les groupes étant non-significative.

L'effet mitigé obtenu par le TEMMP dans notre étude *in-vivo*, très contrasté par rapport aux résultats obtenus avec le modèle *in-vitro* vient remettre en cause la pertinence du modèle *in-vitro* classique. Cela s'ajoute à la non-internalisation des particules *in-vivo* en désaccord avec les résultats obtenus *in-vitro*, aux différences de viscosité et de contraintes mécaniques entre un modèle *in-vitro* classique et un modèle *in-vivo*. Cette critique des modèles *in-vitro* classiques est d'actualité et a poussé au développement de modèles 3D qui miment les cellules tumorales dans leur microenvironnement (Mierke 2014; Rodrigues et al. 2018; Costa et al. 2016). Disposer d'un tel modèle pour tester les stratégies locales dans le domaine de la nanomédecine peut apporter de nombreuses réponses. Nous avons donc développé et validé un modèle basé sur des sphéroïdes en gel d'agarose permettant de mimer *in-vitro* l'injection intra-tumorale. Dans ces conditions, la majorité des particules ne sont pas internalisées, en concordance avec les résultats *in-vivo*. Nous avons vérifié que l'exposition au champ magnétique provoquait bien une rotation des particules, qui pouvait ainsi transmettre un stress mécanique aux tissus. Mais comme pour les expériences *in-vivo*, les modifications morphologiques sont discrètes et peu significatives. Les marquages de prolifération laissent suspecter une augmentation de la prolifération cellulaire suite à l'injection, en accord avec un possible effet identique obtenu *in-vivo*.

Ce modèle *in-vitro* 3D pourra maintenant être utilisé pour optimiser les différents paramètres du TEMMP. Il va permettre de limiter le nombre d'animaux utilisé pour le développement de cette technique. Pour optimiser la diffusion des particules, plusieurs pistes sont à envisager. La première concerne une fonctionnalisation de la surface des particules. En effet, plusieurs études mentionnent l'importance de la chimie de surface dans la diffusion des particules (Parodi et al. 2014; Jin et al. 2013). Cependant, à cause de la taille de nos particules, plus élevée que pour les nanoparticules couramment utilisées dans les applications biomédicales, le bénéfice apporté par la fonctionnalisation risque de ne pas être suffisant. Ce procédé pourrait alors être combiné à une injection des particules en points multiples. Concernant les paramètres d'application du champ magnétique rotatif, des observations préliminaires font apparaître un possible effet bénéfique d'une fréquence réduite en maximisant l'amplitude du mouvement des particules. Nos observations nous incitent à appliquer un champ le plus fort possible, tout en tenant compte des problématiques techniques que cela engendre. Il semblerait que le champ appliqué au centre du cylindre de Halbach soit suffisant pour la mise en mouvement de nos particules. Si l'optimisation des paramètres permet d'observer un effet bénéfique du TEMMP, ce modèle

pourra aussi être utilisé pour tenter de définir les mécanismes impliqués. Dans notre étude nous nous sommes intéressés notamment à la prolifération des cellules. L'apoptose ou le dérèglement du cytosquelette pourraient par exemple être également étudiés. De plus, une analyse transcriptomique pourrait par exemple permettre de mieux cibler les différents mécanismes.

Les données de la littérature qui appuyaient notre approche du TEMMP sont essentiellement des résultats expérimentaux *in-vitro* et aucune évaluation du TEMMP n'avait encore été réalisée sur un modèle *in-vitro* 3D. Seuls quelques articles montrent une efficacité *in-vivo*, mais le seul bénéfice sur la survie a été obtenu avec des particules injectées en même temps que les cellules et plusieurs groupes contrôles sont manquants (Y. Cheng et al. 2015). Plusieurs articles de la littérature montrent que les stimulations vibratoires peuvent aussi induire la prolifération cellulaire et moduler la différenciation des cellules souches (Weinheimer-haus et al. 2014; Pongkitwitoon et al. 2016; H. Zhang et al. 2018; Maredziak et al. 2017).

Pour conclure, notre travail n'a pas permis de valider le traitement par effet magnéto-mécanique de particules. Notre apport a été de montrer qu'il fallait revoir de façon majeure la validation *in-vitro* en utilisant des modèles 3D plus pertinents. Notre travail pointe aussi un domaine en plein essor, qu'est la compréhension du rôle des propriétés physiques et mécaniques du microenvironnement tumoral.

Bibliographie

- Ady, Justin W, Snider Desir, Venugopal Thayanithy, Rachel I Vogel, André L Moreira, Robert J Downey, Yuman Fong, Katia Manova-Todorova, Malcolm a S Moore, and Emil Lou. 2014. "Intercellular Communication in Malignant Pleural Mesothelioma: Properties of Tunneling Nanotubes." *Frontiers in Physiology* 5 (October): 400. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00400>.
- Al-Jamal, Wafa T., and Kostas Kostarelos. 2011. "Liposomes: From a Clinically Established Drug Delivery System to a Nanoparticle Platform for Theranostic Nanomedicine." *Accounts of Chemical Research* 44 (10): 1094–1104. <https://doi.org/10.1021/ar200105p>.
- Alifieris, Constantinos, and Dimitrios T. Trafalis. 2015. "Glioblastoma Multiforme: Pathogenesis and Treatment." *Pharmacology and Therapeutics* 152: 63–82. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.05.005>.
- Bandiera, Sébastien, Ricardo C. Sousa, Stéphane Auffret, Bernard Rodmacq, and Bernard Dieny. 2012. "Enhancement of Perpendicular Magnetic Anisotropy Thanks to Pt Insertions in Synthetic Antiferromagnets." *Applied Physics Letters* 101 (7). <https://doi.org/10.1063/1.4745924>.
- Bandiera, Sébastien, Ricardo C. Sousa, Y. Dahmane, Clarisse Ducruet, C. Portemont, Vincent Baltz, Stéphane Auffret, Ion Lucian Prejbeanu, and Bernard Dieny. 2010. "Comparison of Synthetic Antiferromagnets and Hard Ferromagnets as Reference Layer in Magnetic Tunnel Junctions with Perpendicular Magnetic Anisotropy." *IEEE Magnetics Letters* 1: 1–4. <https://doi.org/10.1109/LMAG.2010.2052238>.
- Bañobre-López, Manuel, Antonio Teijeiro, and Jose Rivas. 2013. "Magnetic Nanoparticle-Based Hyperthermia for Cancer Treatment." *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy* 18 (6): 397–400. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2013.09.011>.
- Bean, C. P., and J. D. Livingston. 1959. "Superparamagnetism." *Journal of Applied Physics* 30 (4): S120–29. <https://doi.org/10.1063/1.2185850>.
- Bent, Martin J. Van Den, Michael Weller, Patrick Y. Wen, Johan M. Kros, Ken Aldape, and Susan Chang. 2017. "A Clinical Perspective on the 2016 WHO Brain Tumor Classification and Routine Molecular Diagnostics." *Neuro-Oncology* 19 (5): 614–24. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now277>.
- Besse, Sébastien. 2010. "Écoulement et Transport Convectif Lors d'injections Locales Dans Le Tissu Cérébral Sain et Tumoral : Quantifications Par Imagerie et Développements Prédicatifs." Université Joseph-Fourier.
- Bhattacharjee, Sourav. 2016. "DLS and Zeta Potential - What They Are and What They Are Not?" *Journal of Controlled Release* 235: 337–51. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
- Bodhinayake, Imithri, Malte Ottenhausen, and John A. Boockvar. 2014. "Targeting a Heterogeneous Tumor: The Promise of the Interleukin-13 Receptor A2." *Neurosurgery* 75 (2): 18–19. <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000452316.07108.d2>.
- Boissenot, Tanguy, Alexandre Bordat, Elias Fattal, and Nicolas Tsapis. 2016. "Ultrasound-Triggered Drug Delivery for Cancer Treatment Using Drug Delivery Systems: From Theoretical Considerations to Practical Applications." *Journal of Controlled Release* 241: 144–63. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.026>.
- Bree, Eelco De, John Romanos, and Dimitris D. Tsiftsis. 2002. "Hyperthermia in Anticancer Treatment." *European Journal of Surgical Oncology* 28 (1): 95.

Bibliographie

- <https://doi.org/10.1053/ejso.2001.1220>.
- Brossel, Rémy, Alexandre Yahi, Stéphane David, Laura Moreno Velasquez, and Jean-Marc Guinebretière. 2016. “Mechanical Signals Inhibit Growth of a Grafted Tumor In Vivo: Proof of Concept.” Edited by Suzie Chen. *PLOS ONE* 11 (4): e0152885. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152885>.
- Brouland, Jean Philippe, and Andreas F. Hottinger. 2017. “Nouvelle Classification OMS 2016 Des Gliomes : Quels Changements ?” *Revue Medicale Suisse* 13 (579): 1805–9.
- Bruno, P, and C Chappert. 1992. “Ruderman-Kittel Theory of Oscillatory Interlayer Exchange Coupling.” *Physical Review B* 46 (1).
- Buchanan, Kristen S, Pierre E Roy, Frank Y Fradin, Konstantin Yu Guslienko, Marcos Grimsditch, Samuel D Bader, and Valentyn Novosad. 2006. “Vortex Dynamics in Patterned Ferromagnetic Ellipses.” *Journal of Applied Physics* 99 (8): 08C707. <https://doi.org/10.1063/1.2175602>.
- Buchanan, Kristen S, Pierre E Roy, Marcos Grimsditch, Frank Y Fradin, Konstantin Yu Guslienko, Samuel D Bader, and Valentyn Novosad. 2006. “Magnetic-Field Tunability of the Vortex Translational Mode in Micron-Sized Permalloy Ellipses: Experiment and Micromagnetic Modeling.” *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics* 74 (6): 1–5. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.74.064404>.
- Burger, Michael C., Stella Breuer, Hans C. Cieplik, Patrick N. Harter, Kea Franz, Oliver Bähr, and Joachim P. Steinbach. 2017. “Bevacizumab for Patients with Recurrent Multifocal Glioblastomas.” *International Journal of Molecular Sciences* 18 (11): 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms18112469>.
- Burri, Stuart H., Vinai Gondi, Paul D. Brown, and Minesh P. Mehta. 2018. “The Evolving Role of Tumor Treating Fields in Managing Glioblastoma: Guide for Oncologists.” *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials* 41 (2): 191–96. <https://doi.org/10.1097/COC.0000000000000395>.
- Butoescu, Nicoleta, Christian A. Seemayer, Michelangelo Foti, Olivier Jordan, and Eric Doelker. 2009. “Dexamethasone-Containing PLGA Superparamagnetic Microparticles as Carriers for the Local Treatment of Arthritis.” *Biomaterials* 30 (9): 1772–80. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.017>.
- Carrat, F, A Mallet, and V Morice. 2007. “Biostatistique,” 1–179.
- Carrey, Julian, Vincent Connord, and M Respaud. 2013. “Ultrasound Generation and High-Frequency Motion of Magnetic Nanoparticles in an Alternating Magnetic Field: Toward Intracellular Ultrasound Therapy?” *Applied Physics Letters* 102 (23). <https://doi.org/10.1063/1.4810972>.
- Carrey, Julian, and Nicolas Hallali. 2016. “Torque Undergone by Assemblies of Single-Domain Magnetic Nanoparticles Submitted to a Rotating Magnetic Field.” *Physical Review B* 94 (18): 184420. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.94.184420>.
- Carrey, Julian, B. Mehdaoui, and M. Respaud. 2011. “Simple Models for Dynamic Hysteresis Loop Calculations of Magnetic Single-Domain Nanoparticles: Application to Magnetic Hyperthermia Optimization.” *Journal of Applied Physics* 109 (8). <https://doi.org/10.1063/1.3551582>.
- Chen, Michael, Russell R Lonser, Paul Morrison, Lance Governale, and Edward Oldfield. 1999. “Variables Affecting Convection-Enhanced Delivery to the Striatum: A Systematic Examination of Rate of Infusion, Cannula Size, Infusate Concentration, and Tissue-Cannula Sealing Time.” *Journal of Neurosurgery* 90 (2): 315–20. <https://doi.org/10.3171/jns.1999.90.2.0315>.
- Cheng, Dengfeng, Xiao Li, Guoxin Zhang, and Hongcheng Shi. 2014. “Morphological Effect of Oscillating Magnetic Nanoparticles in Killing Tumor Cells.” *Nanoscale Research Letters* 9 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-195>.
- Cheng, Gang, Janet Tse, Rakesh K. Jain, and Lance L. Munn. 2009. “Micro-Environmental Mechanical

Bibliographie

- Stress Controls Tumor Spheroid Size and Morphology by Suppressing Proliferation and Inducing Apoptosis in Cancer Cells.” *PLoS ONE* 4 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004632>.
- Cheng, Yu, Ramin A. Morshed, Brenda Auffinger, Alex L. Tobias, and Maciej S Lesniak. 2014. “Multifunctional Nanoparticles for Brain Tumor Imaging and Therapy.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 66 (February): 42–57. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.09.006>.
- Cheng, Yu, Megan E. Muroski, Dorothée C.M.C. Petit, Rhodri Mansell, Tarun Vemulkar, Ramin A. Morshed, Yu Han, et al. 2015. “Rotating Magnetic Field Induced Oscillation of Magnetic Particles for in Vivo Mechanical Destruction of Malignant Glioma.” *Journal of Controlled Release* 223 (February): 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.028>.
- Chiriac, H., E. Radu, M. Țibu, G. Stoian, G. Ababei, L. Lăbușcă, D.-D. Herea, and N. Lupu. 2018. “Fe-Cr-Nb-B Ferromagnetic Particles with Shape Anisotropy for Cancer Cell Destruction by Magneto-Mechanical Actuation.” *Scientific Reports* 8 (1): 11538. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30034-3>.
- Cho, Mi Hyeon, Eun Jung Lee, Mina Son, Jae Hyun Lee, Dongwon Yoo, Ji Wook Kim, Seung Woo Park, Jeon Soo Shin, and Jinwoo Cheon. 2012. “A Magnetic Switch for the Control of Cell Death Signalling in in Vitro and in Vivo Systems.” *Nature Materials* 11 (12): 1038–43. <https://doi.org/10.1038/nmat3430>.
- Chow, Daniel, Peter Chang, Brent D. Weinberg, Daniela A. Bota, Jack Grinband, and Christopher G. Filippi. 2018. “Imaging Genetic Heterogeneity in Glioblastoma and Other Glial Tumors: Review of Current Methods and Future Directions.” *American Journal of Roentgenology* 210 (1): 30–38. <https://doi.org/10.2214/AJR.17.18754>.
- Clerc, Pascal, Pauline Jeanjean, Nicolas Hallali, Michel Gougeon, Bernard Pipy, Julian Carrey, Daniel Fourmy, and Véronique Gigoux. 2018. “Targeted Magnetic Intra-Lysosomal Hyperthermia Produces Lysosomal Reactive Oxygen Species and Causes Caspase-1 Dependent Cell Death.” *Journal of Controlled Release* 270 (November 2017): 120–34. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.050>.
- Contreras, M F, R Sougrat, A Zaher, T Ravasi, and Jürgen Kosel. 2015. “Non-Chemotoxic Induction of Cancer Cell Death Using Magnetic Nanowires.” *International Journal of Nanomedicine* 10: 2141–53. <https://doi.org/10.2147/IJN.S77081>.
- Corchero, José Luis, and Antonio Villaverde. 2009. “Biomedical Applications of Distally Controlled Magnetic Nanoparticles.” *Trends in Biotechnology* 27 (8): 468–76. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.04.003>.
- Costa, Elisabete C., André F. Moreira, Duarte de Melo-Diogo, Vítor M. Gaspar, Marco P. Carvalho, and Ilídio J. Correia. 2016. “3D Tumor Spheroids: An Overview on the Tools and Techniques Used for Their Analysis.” *Biotechnology Advances* 34 (8): 1427–41. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.002>.
- Courcier, T., Hélène Joisten, Philippe Sabon, Selma Leulmi, Thomas Dietsch, J. Faure-Vincent, Stéphane Auffret, and Bernard Dieny. 2011. “Tumbling Motion Yielding Fast Displacements of Synthetic Antiferromagnetic Nanoparticles for Biological Applications.” *Applied Physics Letters* 99 (9): 9–11. <https://doi.org/10.1063/1.3633121>.
- Cowburn, Russell P., D. K. Koltsov, A. O. Adeyeye, M. E. Welland, and D. M. Tricker. 1999. “Single-Domain Circular Nanomagnets.” *Physical Review Letters* 83 (5): 1042–45. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.83.1042>.
- Cuchet, Léa, Bernard Rodmacq, Stéphane Auffret, Ricardo C. Sousa, Ioan L. Prejbeanu, and Bernard Dieny. 2016. “Perpendicular Magnetic Tunnel Junctions with a Synthetic Storage or Reference Layer: A New Route towards Pt- and Pd-Free Junctions.” *Scientific Reports* 6 (February): 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep21246>.
- Cunningham, Miles Gregory, Heather Marion Ames, Rachael Ann Donalds, and Francine Mary Benes.

Bibliographie

2008. "Construction and Implantation of a Microinfusion System for Sustained Delivery of Neuroactive Agents." *Journal of Neuroscience Methods* 167 (2): 213–20. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.08.016>.
- Daalderop, G. H. O., P. J. Kelly, and M. F. H. Schuurmans. 1990. "First-Principles Calculation of the Magnetic Anisotropy Energy of (Co)_n(X)_m Multilayers." *Physical Review B* 42 (11): 7270–73.
- Decuzzi, P., B. Godin, T. Tanaka, S. Y. Lee, C. Chiappini, X. Liu, and M. Ferrari. 2010. "Size and Shape Effects in the Biodistribution of Intravascularly Injected Particles." *Journal of Controlled Release* 141 (3): 320–27. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.014>.
- Defossez, Gautier, Sandra Le Guyader-Peyrou, Zoé Uhry, Pascale Grosclaude, Laurent Remontet, Marc Colonna, Emmanuelle Dantony, et al. 2019. "Estimation Nationale de l'incidence et de La Mortalité Par Cancer En France Entre 1990 et 2018. Etude à Partir Des Registres Des Cancers Du Réseau Francim. Résultats Préliminaires. Synthèse." *Saint-Maurice : Santé Publique France*.
- Dieny, B., and M. Chshiev. 2017. "Perpendicular Magnetic Anisotropy at Transition Metal/Oxide Interfaces and Applications." *Reviews of Modern Physics* 89 (2). <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.89.025008>.
- Ding, Mei, Kenneth G. Haglid, and Anders Hamberger. 2000. "Quantitative Immunochemistry on Neuronal Loss, Reactive Gliosis and BBB Damage in Cortex/Striatum and Hippocampus/Amygdala after Systemic Kainic Acid Administration." *Neurochemistry International* 36 (4–5): 313–18. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(99\)00139-4](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(99)00139-4).
- Dobson, Jon P. 2008. "Remote Control of Cellular Behaviour with Magnetic Nanoparticles." *Nature Nanotechnology* 3 (3): 139–43. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.39>.
- Domenech, Maribella, Ileana Marrero-Berrios, Madeline Torres-Lugo, and Carlos Rinaldi. 2013. "Lysosomal Membrane Permeabilization by Targeted Magnetic Nanoparticles in Alternating Magnetic Fields." *ACS Nano* 7 (6): 5091–5101. <https://doi.org/10.1021/nn4007048>.
- Dreaden, Erik C., Alaaldin M. Alkilany, Xiaohua Huang, Catherine J. Murphy, and Mostafa A. El-Sayed. 2012. "The Golden Age: Gold Nanoparticles for Biomedicine." *Chemical Society Reviews* 41 (7): 2740–79. <https://doi.org/10.1039/c1cs15237h>.
- Dutz, Silvio, and Rudolf Hergt. 2014. "Magnetic Particle Hyperthermia - A Promising Tumour Therapy?" *Nanotechnology* 25 (45). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/45/452001>.
- Ermolli, Monica, Charlotte Menné, Giovanni Pozzi, Miguel ángel Serra, and Libero A. Clerici. 2001. "Nickel, Cobalt and Chromium-Induced Cytotoxicity and Intracellular Accumulation in Human Haca Keratinocytes." *Toxicology* 159 (1–2): 23–31. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00373-5](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00373-5).
- Felton, S, K Gunnarsson, Pierre E Roy, P Svedlindh, and A Quist. 2004. "MFM Imaging of Micron-Sized Permalloy Ellipses." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 280 (2–3): 202–7. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2004.03.013>.
- Felton, S, P Warnicke, K Gunnarsson, Pierre E Roy, H Lidbaum, and P Svedlindh. 2006. "Domain Configuration of Permalloy Ellipses in a Rotating Magnetic Field." *Journal of Physics D: Applied Physics* 39 (4): 610–14. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/39/4/002>.
- Ferris, Robert L., Jerome Fayette, Stefan Kasper, Makoto Tahara, Lisa Licitra, William J. Geese, Joel Guigay, et al. 2016. "Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck." *New England Journal of Medicine* 375 (19): 1856–67. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1602252>.
- Filley, Anna C., Mario Henriquez, and Mahua Dey. 2017. "Recurrent Glioma Clinical Trial, CheckMate-143: The Game Is Not over Yet." *Oncotarget* 8 (53): 91779–94. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21586>.
- Fruchart, Olivier. 2015. "Lecture Notes on Nanomagnetism." <http://perso.neel.cnrs.fr/olivier.fruchart/>.

Bibliographie

- Fung, Andrew O., Vishal Kapadia, Erik Pierstorff, Dean Ho, and Yong Chen. 2008. "Induction of Cell Death by Magnetic Actuation of Nickel Nanowires Internalized by Fibroblasts." *Journal of Physical Chemistry C* 112 (39): 15085–88. <https://doi.org/10.1021/jp806187r>.
- Furnari, Frank B., Tim Fenton, Robert M. Bachoo, Akitake Mukasa, Jayne M. Stommel, Alexander Stegh, William C. Hahn, et al. 2007. "Malignant Astrocytic Glioma: Genetics, Biology, and Paths to Treatment." *Genes and Development* 21 (21): 2683–2710. <https://doi.org/10.1101/gad.1596707>.
- Gao, Yu, Jing Lim, Swee-Hin Teoh, and Chenjie Xu. 2015. "Emerging Translational Research on Magnetic Nanoparticles for Regenerative Medicine." *Chem. Soc. Rev.* 44 (17): 6306–29. <https://doi.org/10.1039/C4CS00322E>.
- García-Pérez, Javier, Virginia Lope, Gonzalo López-Abente, Mario González-Sánchez, and Pablo Fernández-Navarro. 2015. "Ovarian Cancer Mortality and Industrial Pollution." *Environmental Pollution* 205: 103–10. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.05.024>.
- Gillet, Jean-pierre, Sudhir Varma, and Michael M Gottesman. 2013. "The Clinical Relevance of Cancer Cell Lines" 105 (7). <https://doi.org/10.1093/jnci/djt007>.
- Goffart, Nicolas, Jérôme Kroonen, and Bernard Rogister. 2013. "Glioblastoma-Initiating Cells: Relationship with Neural Stem Cells and the Micro-Environment." *Cancers* 5 (3): 1049–71. <https://doi.org/10.3390/cancers5031049>.
- Goiriena-Goikoetxea, Maite, A. García-Arribas, M. Rouco, A. V. Svalov, and J. M. Barandiaran. 2016. "High-Yield Fabrication of 60 Nm Permalloy Nanodiscs in Well-Defined Magnetic Vortex State for Biomedical Applications." *Nanotechnology* 27 (17): 175302. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/17/175302>.
- Golovin, Yuri I., Natalia L. Klyachko, Alexander G. Majouga, Marina Sokolsky, and Alexander V. Kabanov. 2017. "Theranostic Multimodal Potential of Magnetic Nanoparticles Actuated by Non-Heating Low Frequency Magnetic Field in the New-Generation Nanomedicine." *Journal of Nanoparticle Research* 19 (2): 63. <https://doi.org/10.1007/s11051-017-3746-5>.
- Guha, Neela, Kurt Straif, Laurent Galichet, Béatrice Lauby-Secretan, Fatiha El Ghissassi, Lamia Benbrahim-Tallaa, Robert Baan, Farhad Islami, Véronique Bouvard, and Yann Grosse. 2011. "Carcinogenicity of Radiofrequency Electromagnetic Fields." *The Lancet Oncology* 12 (7): 624–26. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(11\)70147-4](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(11)70147-4).
- Guslienko, Konstantin Yu, Valentyn Novosad, Y Otani, H Shima, and K Fukamichi. 2001. "Field Evolution of Magnetic Vortex State in Ferromagnetic Disks." *Applied Physics Letters*. <https://doi.org/10.1063/1.1377850>.
- Hadjipanayis, Costas G., Revaz Machaidze, Milota Kaluzova, Liya Wang, Albert J. Schuette, Hongwei Chen, Xinying Wu, and Hui Mao. 2010. "EGFRvIII Antibody-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging-Guided Convection-Enhanced Delivery and Targeted Therapy of Glioblastoma." *Cancer Research* 70 (15): 6303–12. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1022>.
- Hai, Nguyen Hoang, Nguyen Hoang Luong, Nguyen Chau, and Ngo Quy Tai. 2009. "Preparation of Magnetic Nanoparticles Embedded in Polystyrene Microspheres." *Journal of Physics: Conference Series* 187. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/187/1/012009>.
- Hamard, Lauriane, David Ratel, Laurent Selek, François Berger, Boudewijn van der Sanden, and Didier Wion. 2016. "The Brain Tissue Response to Surgical Injury and Its Possible Contribution to Glioma Recurrence." *Journal of Neuro-Oncology* 128 (1). <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2096-y>.
- Hanahan, Douglas, and Robert A Weinberg. 2000. "The Hallmarks of Cancer." *Cell* 100: 57–70.
- . 2011. "Hallmarks of Cancer: The Next Generation." *Cell* 144 (5): 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

Bibliographie

- Hapuarachchige, Sudath, Yoshinori Kato, Ethel J. Ngen, Barbara Smith, Michael Delannoy, and Dmitri Artemov. 2016. "Non-Temperature Induced Effects of Magnetized Iron Oxide Nanoparticles in Alternating Magnetic Field in Cancer Cells." *PLoS ONE* 11 (5): 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156294>.
- Harrington, Helen, Paul Cato, Fabian Salazar, Malcolm Wilkinson, Alan Knox, John W. Haycock, Felicity Rose, Jon W. Aylott, and Amir M. Ghaemmaghami. 2014. "Immunocompetent 3D Model of Human Upper Airway for Disease Modeling and in Vitro Drug Evaluation." *Molecular Pharmaceutics* 11 (7): 2082–91. <https://doi.org/10.1021/mp5000295>.
- Hartmann, Hanna, and Rumen Krastev. 2017. "Biofunctionalization of Surfaces Using Polyelectrolyte Multilayers." *BioNanoMaterials* 18 (1–2). <https://doi.org/10.1515/bnm-2016-0015>.
- Hellwig, Olav, Andreas Berger, Jeffrey B Kortright, and Eric E Fullerton. 2007. "Domain Structure and Magnetization Reversal of Antiferromagnetically Coupled Perpendicular Anisotropy Films." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 319 (1–2): 13–55. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2007.04.035>.
- Herd, Heather L., Kristopher T. Bartlett, Joshua A. Gustafson, Lawrence D. McGill, and Hamidreza Ghandehari. 2015. "Macrophage Silica Nanoparticle Response Is Phenotypically Dependent." *Biomaterials* 53 (June): 574–82. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.070>.
- Hervault, Aziliz, and Nguyen Thi Kim Thanh. 2014. "Magnetic Nanoparticle-Based Therapeutic Agents for Thermo-Chemotherapy Treatment of Cancer." *Nanoscale* 6 (20): 11553–73. <https://doi.org/10.1039/c4nr03482a>.
- Hildebrandt, Bert, Peter Wust, Olaf Ahlers, Anette Dieing, Geetha Sreenivasa, Thoralf Kerner, Roland Felix, and Hanno Riess. 2002. "The Cellular and Molecular Basis of Hyperthermia." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 43 (1): 33–56. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00179-2](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00179-2).
- Hobbs, Susan K, Wayne L Monsky, Fan Yuan, W. Gregory Roberts, Linda Griffith, Vladimir P Torchilin, and Rakesh K Jain. 1998. "Regulation of Transport Pathways in Tumor Vessels: Role of Tumor Type and Microenvironment." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 95 (April): 4607–12. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.8.4607>.
- Hu, Shang Hsiu, and Xiaohu Gao. 2010. "Nanocomposites with Spatially Separated Functionalities for Combined Imaging and Magnetolytic Therapy." *Journal of the American Chemical Society* 132 (21): 7234–37. <https://doi.org/10.1021/ja102489q>.
- Hu, Wei, Robert J. Wilson, Aileen Koh, Aihua Fu, Anthony Z. Faranesh, Christopher M. Earhart, Sebastian J. Osterfeld, et al. 2008. "High-Moment Antiferromagnetic Nanoparticles with Tunable Magnetic Properties." *Advanced Materials* 20 (8): 1479–83. <https://doi.org/10.1002/adma.200703077>.
- Hughes, Steven, Stuart McBain, Jon P. Dobson, and Alicia J. El Haj. 2008. "Selective Activation of Mechanosensitive Ion Channels Using Magnetic Particles." *Journal of the Royal Society Interface* 5 (25): 855–63. <https://doi.org/10.1098/rsif.2007.1274>.
- Ivanov, Y. P., M. Vázquez, and O. Chubykalo-Fesenko. 2013. "Magnetic Reversal Modes in Cylindrical Nanowires." *Journal of Physics D: Applied Physics* 46 (48). <https://doi.org/10.1088/0022-3727/46/48/485001>.
- Jain, Kewal K. 2018. "A Critical Overview of Targeted Therapies for Glioblastoma." *Frontiers in Oncology* 8 (October): 1–19. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00419>.
- Jin, Shubin, Xiaowei Ma, Huili Ma, Kaiyuan Zheng, Juan Liu, Shuai Hou, Jie Meng, Paul C. Wang, Xiaochun Wu, and Xing-Jie Liang. 2013. "Surface Chemistry-Mediated Penetration and Gold Nanorod Thermotherapy in Multicellular Tumor Spheroids." *Nanoscale* 5 (1): 143–46. <https://doi.org/10.1039/C2NR31877F>.

Bibliographie

- Johnson, M. T., R. Jungblut, P. J. Kelly, and F. J.A. den Broeder. 1995. "Perpendicular Magnetic Anisotropy of Multilayers: Recent Insights." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 148 (1–2): 118–24. [https://doi.org/10.1016/0304-8853\(95\)00174-3](https://doi.org/10.1016/0304-8853(95)00174-3).
- Joisten, Hélène, T. Courcier, Paul Balint, Philippe Sabon, J. Faure-Vincent, Stéphane Auffret, and Bernard Dieny. 2010. "Self-Polarization Phenomenon and Control of Dispersion of Synthetic Antiferromagnetic Nanoparticles for Biological Applications." *Applied Physics Letters* 97 (25): 2–4. <https://doi.org/10.1063/1.3518702>.
- Joshi, Smita S., Steven B. Maron, and Daniel V. Catenacci. 2018. "Pembrolizumab for Treatment of Advanced Gastric and Gastroesophageal Junction Adenocarcinoma." *Future Oncology* 14 (5): 417–30. <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0436>.
- Ju, Huixiang, Yubao Cui, Zhiqiang Chen, Qinqing Fu, Mingzhong Sun, and Ying Zhou. 2016. "Effects of Combined Delivery of Extremely Low Frequency Electromagnetic Field and Magnetic Fe₃O₄nanoparticles on Hepatic Cell Lines." *American Journal of Translational Research* 8 (4): 1838–47.
- Kafrouni, Lina, and Oumarou Savadogo. 2016. "Recent Progress on Magnetic Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia." *Progress in Biomaterials* 5 (3–4): 147–60. <https://doi.org/10.1007/s40204-016-0054-6>.
- Kasuya, Tadao. 1956. "A Theory of Metallic Ferro- and Antiferromagnetism on Zener's Model." *Progress of Theoretical Physics* 16 (1): 45–57. <https://doi.org/10.1143/ptp.16.45>.
- Kaur, Punit, Maureen L. Aliru, Awalpreet S. Chadha, Alexzander Asea, and Sunil Krishnan. 2016. "Hyperthermia Using Nanoparticles - Promises and Pitfalls." *International Journal of Hyperthermia* 32 (1): 76–88. <https://doi.org/10.3109/02656736.2015.1120889>.
- Kerr, Jacqueline, Cheryl Anderson, and Scott M. Lippman. 2017. "Physical Activity, Sedentary Behaviour, Diet, and Cancer: An Update and Emerging New Evidence." *The Lancet Oncology* 18 (8): e457–71. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30411-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30411-4).
- Kilinc, Devrim, Anna Lesniak, Suad A. Rashdan, Dhruv Gandhi, Agata Blasiak, Paul C. Fannin, Alex von Kriegsheim, Walter Kolch, and Gil U. Lee. 2015. "Mechanochemical Stimulation of MCF7 Cells with Rod-Shaped Fe-Au Janus Particles Induces Cell Death Through Paradoxical Hyperactivation of ERK." *Advanced Healthcare Materials* 4 (3): 395–404. <https://doi.org/10.1002/adhm.201400391>.
- Kim, Dong-Hyun, Elena A Rozhkova, Ilya V Ulasov, Samuel D Bader, Tijana Rajh, Maciej S Lesniak, and Valentyn Novosad. 2010. "Biofunctionalized Magnetic-Vortex Microdiscs for Targeted Cancer-Cell Destruction." *Nature Materials* 9 (2): 165–71. <https://doi.org/10.1038/nmat2591>.Biofunctionalized.
- Kim, Dong Hyun, Pavel Karavayev, Elena A Rozhkova, John Pearson, Volodymyr Yefremenko, Samuel D Bader, and Valentyn Novosad. 2011. "Mechanoresponsive System Based on Sub-Micron Chitosan-Functionalized Ferromagnetic Disks." *Journal of Materials Chemistry* 21 (23): 8422–26. <https://doi.org/10.1039/c1jm10272a>.
- Kimlin, Lauren C., Giovanna Casagrande, and Victoria M. Virador. 2013. "In Vitro Three-Dimensional (3D) Models in Cancer Research: An Update." *Molecular Carcinogenesis* 52 (3): 167–82. <https://doi.org/10.1002/mc.21844>.
- Klei, Taylla, Felix Souza, Mariana Penteado Nucci, Javier Bustamante Mamani, Rodrigues Silva, Daianne Maciely, Carvalho Fantacini, et al. 2018. "Image and Motor Behavior for Monitoring Tumor Growth in C6 Glioma Model." *PLoS ONE* 13 (7): 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201453>.
- Koutros, Stella, Debra T. Silverman, Michael Cr Alavanja, Gabriella Andreotti, Catherine C. Lerro, Sonya Heltshe, Charles F. Lynch, Dale P. Sandler, Aaron Blair, and Laura E. Beane Freeman. 2016. "Occupational Exposure to Pesticides and Bladder Cancer Risk." *International Journal of*

Bibliographie

- Epidemiology* 45 (3): 792–805. <https://doi.org/10.1093/ije/dyv195>.
- Kralj, Slavko, and Darko Makovec. 2015. “Magnetic Assembly of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Clusters into Nanochains and Nanobundles.” *ACS Nano* 9 (10): 9700–9707. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b02328>.
- Krishnan, K. M., A. B. Pakhomov, Y. Bao, P. Blomqvist, Y. Chun, M. Gonzales, K. Griffin, et al. 2006. “Nanomagnetism and Spin Electronics: Materials, Microstructure and Novel Properties.” *Journal of Materials Science* 41 (3): 793–815. <https://doi.org/10.1007/s10853-006-6564-1>.
- Kroll, Alexandra, Mike Hendrik Pillukat, Daniela Hahn, and Jürgen Schneckeburger. 2012. “Interference of Engineered Nanoparticles with in Vitro Toxicity Assays.” *Archives of Toxicology* 86 (7): 1123–36. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0837-z>.
- Laprise-Pelletier, Myriam, Yunzhi Ma, Jean Lagueux, Marie France Côté, Luc Beaulieu, and Marc André Fortin. 2018. “Intratatumoral Injection of Low-Energy Photon-Emitting Gold Nanoparticles: A Microdosimetric Monte Carlo-Based Model.” *ACS Nano* 12 (3): 2482–97. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08242>.
- Lemarchand, Clémentine, Séverine Tual, Mathilde Boulanger, Noémie Levêque-Morlais, Stéphanie Perrier, Bénédicte Clin, Anne Valérie Guizard, et al. 2016. “Prostate Cancer Risk among French Farmers in the AGRICAN Cohort.” *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health* 42 (2): 144–52. <https://doi.org/10.5271/SJWEH.3552>.
- Leulmi, Selma, Xavier Chauchet, MéliSSa Morcrette, Guillermo Ortiz, Hélène Joisten, Philippe Sabon, Thierry Livache, et al. 2015. “Triggering the Apoptosis of Targeted Human Renal Cancer Cells by the Vibration of Anisotropic Magnetic Particles Attached to the Cell Membrane.” *Nanoscale* 7 (38): 15904–14. <https://doi.org/10.1039/C5NR03518J>.
- Leulmi, Selma, Hélène Joisten, Thomas Dietsch, Cécile Iss, MéliSSa Morcrette, Stéphane Auffret, Philippe Sabon, and Bernard Dieny. 2013. “Comparison of Dispersion and Actuation Properties of Vortex and Synthetic Antiferromagnetic Particles for Biotechnological Applications.” *Applied Physics Letters* 103 (13): 8–13. <https://doi.org/10.1063/1.4821854>.
- Li, Weitao, Yangyang Liu, Zhiyu Qian, and Yamin Yang. 2017. “Evaluation of Tumor Treatment of Magnetic Nanoparticles Driven by Extremely Low Frequency Magnetic Field.” *Scientific Reports* 7 (1): 46287. <https://doi.org/10.1038/srep46287>.
- Lima-Ten  rio, Michele K., Edgardo A. G  mez Pineda, Nasir M. Ahmad, Hatem Fessi, and Abdelhamid Elaissari. 2015. “Magnetic Nanoparticles: In Vivo Cancer Diagnosis and Therapy.” *International Journal of Pharmaceutics* 493 (1–2): 313–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.059>.
- Lin, Cheng Kuan, Huei Yang Hung, David C. Christiani, Francesco Forastiere, and Ro Ting Lin. 2017. “Lung Cancer Mortality of Residents Living near Petrochemical Industrial Complexes: A Meta-Analysis.” *Environmental Health: A Global Access Science Source* 16 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1097/00007611-199509000-00011>.
- Lin, Xiaozeng, Fengxiang Wei, Pierre Major, Khalid Al-Nedawi, Hassan Al Saleh, and Damu Tang. 2017. “Microvesicles Contribute to the Bystander Effect of DNA Damage.” *International Journal of Molecular Sciences* 18 (4): 788. <https://doi.org/10.3390/ijms18040788>.
- Ling, Daishun, and Taeghwan Hyeon. 2013. “Chemical Design of Biocompatible Iron Oxide Nanoparticles for Medical Applications.” *Small* 9 (9–10): 1450–66. <https://doi.org/10.1002/sml.201202111>.
- Liu, Dun, Lijun Wang, Zhigang Wang, and Alfred Cuschieri. 2012. “Magnetoporation and Magnetolysis of Cancer Cells via Carbon Nanotubes Induced by Rotating Magnetic Fields.” *Nano Letters* 12 (10): 5117–21. <https://doi.org/10.1021/nl301928z>.
- Lynes, John, Anthony Nwankwo, Gifty Dominah, Victoria Sanchez, and Edjah Nduom. 2018. “Current Options and Future Directions in Immune Therapy for Glioblastoma.” *Frontiers in Oncology* 8

Bibliographie

- (December): 1–22. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00578>.
- Maele-Fabry, Geneviève Van, Laurence Gamet-Payraastre, and Dominique Lison. 2017. “Residential Exposure to Pesticides as Risk Factor for Childhood and Young Adult Brain Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Environment International* 106 (May): 69–90. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.05.018>.
- Maenosono, Shinya, and Soichiro Saita. 2006. “Theoretical Assessment of FePt Nanoparticles as Heating Elements for Magnetic Hyperthermia.” *IEEE Transactions on Magnetics* 42 (6): 1638–42. <https://doi.org/10.1109/TMAG.2006.872198>.
- Maier-Hauff, Klaus, Frank Ulrich, Dirk Nestler, Hendrik Niehoff, Peter Wust, Burghard Thiesen, Helmut Orawa, Volker Budach, and Andreas Jordan. 2011. “Efficacy and Safety of Intratumoral Thermotherapy Using Magnetic Iron-Oxide Nanoparticles Combined with External Beam Radiotherapy on Patients with Recurrent Glioblastoma Multiforme.” *Journal of Neuro-Oncology* 103 (2): 317–24. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0389-0>.
- Mannix, Robert J, Sanjay Kumar, Flávia Cassiola, Martín Montoya-Zavala, Efraim Feinstein, Mara Prentiss, and Donald E Ingber. 2008. “Nanomagnetic Actuation of Receptor-Mediated Signal Transduction.” *Nature Nanotechnology* 3 (1): 36–40. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.418>.
- Mansell, Rhodri, Tarun Vemulkar, Dorotheé C.M.C. Petit, Yu Cheng, Jason Murphy, Maciej S. Lesniak, and Russell P. Cowburn. 2017. “Magnetic Particles with Perpendicular Anisotropy for Mechanical Cancer Cell Destruction.” *Scientific Reports* 7 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04154-1>.
- Maredziak, Monica, Daniel Lewandowski, Krzysztof A Tomaszewski, Krzysztof Kubiak, and Krzysztof Marycz. 2017. “The Effect of Low-Magnitude Low-Frequency Vibrations (LMLF) on Osteogenic Differentiation Potential of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells.” *Cellular and Molecular Bioengineering* 10 (6): 549–62. <https://doi.org/10.1007/s12195-017-0501-z>.
- Martínez-Banderas, Aldo Isaac, Antonio Aires, Francisco J. Teran, Jose Efrain Perez, Jael F. Cadenas, Nouf Alsharif, Timothy Ravasi, Aitziber L. Cortajarena, and Jürgen Kosel. 2016. “Functionalized Magnetic Nanowires for Chemical and Magneto-Mechanical Induction of Cancer Cell Death.” *Scientific Reports* 6 (October): 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep35786>.
- Master, Alyssa M., Philise N. Williams, Nikorn Pothayee, Rui Zhang, Hemant M. Vishwasrao, Yuri I. Golovin, Judy S. Riffle, Marina Sokolsky-Papkov, and Alexander V. Kabanov. 2015. “Remote Actuation of Magnetic Nanoparticles for Cancer Cell Selective Treatment Through Cytoskeletal Disruption.” *Scientific Reports* 1 (919): 1–13. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Mehdaoui, B., A. Meffre, L. M. Lacroix, Julian Carrey, S. Lachaize, M. Gougeon, M. Respaud, and B. Chaudret. 2010. “Large Specific Absorption Rates in the Magnetic Hyperthermia Properties of Metallic Iron Nanocubes.” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 322 (19): L49–52. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2010.05.012>.
- Messaoudi, Khaled, Anne Clavreul, and Frédéric Lagarce. 2015. “Toward an Effective Strategy in Glioblastoma Treatment. Part I: Resistance Mechanisms and Strategies to Overcome Resistance of Glioblastoma to Temozolomide.” *Drug Discovery Today* 20 (7): 899–905. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.02.011>.
- Mierke, Claudia Tanja. 2014. “The Fundamental Role of Mechanical Properties in the Progression of Cancer Disease and Inflammation.” *Reports on Progress in Physics* 77 (7). <https://doi.org/10.1088/0034-4885/77/7/076602>.
- Miller, Alexandra C, Rafael Rivas, Leonard Tesoro, Gregor Kovalenko, Nikola Kovaric, Peter Pavlovic, and David Brenner. 2017. “Radiation Exposure from Depleted Uranium : The Radiation Bystander Effect.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 331: 135–41. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.06.004>.
- Mohammed, Leena, Hassan G. Gomaa, Doaa Ragab, and Jesse Zhu. 2017. “Magnetic Nanoparticles for

Bibliographie

- Environmental and Biomedical Applications: A Review.” *Particuology* 30: 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2016.06.001>.
- Morcrette, Mélissa. 2016. “Micro et Nanoparticules Pour Des Applications Biotechnologiques : Fabrication de Nanoparticules Par Copolymère Dibloc Pour l’imagerie Médicale ; Destruction de Cellules Cancéreuses Par Vibrations Magnéto-Mécaniques de Microparticules Magnétiques.”
- Morcrette, Mélissa, Guillermo Ortiz, Salomé Tallegas, Hélène Joisten, Raluca Tiron, Thierry Baron, Yanxia Hou, Stéphane Lequien, Ahmad Bsiesy, and Bernard Dieny. 2017. “Fabrication of Monodisperse Magnetic Nanoparticles Released in Solution Using a Block Copolymer Template.” *Journal of Physics D: Applied Physics* 50 (29): 295001. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aa790b>.
- Morgan, L. Lloyd, Anthony B. Miller, Annie Sasco, and Devra Lee Davis. 2015. “Mobile Phone Radiation Causes Brain Tumors and Should Be Classified as a Probable Human Carcinogen (2A) (Review).” *International Journal of Oncology* 46 (5): 1865–71. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2908>.
- Muroski, Megan E., Ramin A. Morshed, Yu Cheng, Tarun Vemulkar, Rhodri Mansell, Yu Han, Lingjiao Zhang, Karen S. Aboody, Russell P. Cowburn, and Maciej S. Lesniak. 2016. “Controlled Payload Release by Magnetic Field Triggered Neural Stem Cell Destruction for Malignant Glioma Treatment.” *PLoS ONE* 11 (1): 4–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145129>.
- Néel, Louis. 1954. “Anisotropie Magnétique Superficielle et Surstructures d’orientation.” *Journal de Physique et Le Radium* 15 (4): 225–39. <https://doi.org/10.1051/jphysrad:01954001504022500>.
- Negishi, Yoichi, Yoko Endo-Takahashi, and Kazuo Maruyama. 2016. “Gene Delivery Systems by the Combination of Lipid Bubbles and Ultrasound.” *Drug Discoveries & Therapeutics* 10 (5): 248–55. <https://doi.org/10.5582/ddt.2016.01063>.
- Nelson, Glyn, Olena Kucheryavenko, James Wordsworth, and Thomas von Zglinicki. 2018. “The Senescent Bystander Effect Is Caused by ROS-Activated NF-KB Signalling.” *Mechanisms of Ageing and Development* 170 (August 2017): 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.08.005>.
- Nørøxe, Dorte Schou, Hans Skovgaard Poulsen, and Ulrik Lassen. 2016. “Hallmarks of Glioblastoma: A Systematic Review.” *ESMO Open* 1 (6): 1–9. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2016-000144>.
- Oh, Nuri, and Ji Ho Park. 2014. “Endocytosis and Exocytosis of Nanoparticles in Mammalian Cells.” *International Journal of Nanomedicine* 9 (SUPPL.1): 51–63. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26592>.
- Okhai, Timothy A, and Cedric J Smith. 2013. “Principles and Application of RF System for Hyperthermia Therapy.” In *Hyperthermia*, 2:64. InTech. <https://doi.org/10.5772/55108>.
- Om Alblazi, Kamila Mohamed, and Chong Huat Siar. 2015. “Cellular Protrusions - Lamellipodia, Filopodia, Invadopodia and Podosomes - and Their Roles in Progression of Orofacial Tumours: Current Understanding.” *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 16 (6): 2187–91. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.6.2187>.
- Ong, Kimberly J, Tyson J. MacCormack, Rhett J Clark, James D Ede, Van A Ortega, Lindsey C Felix, Michael K M Dang, et al. 2014. “Widespread Nanoparticle-Assay Interference: Implications for Nanotoxicity Testing.” Edited by Salik Hussain. *PLoS ONE* 9 (3): e90650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090650>.
- Pankhurst, Q A, J Connolly, S K Jones, and Jon P. Dobson. 2003. “Applications of Magnetic Nanoparticles in Biomedicine.” *Journal of Physics D: Applied Physics* 36 (03): 167–81. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/36/13/201>.
- Park, Andrew S., Beate Ritz, Chenxiao Ling, Myles Cockburn, and Julia E. Heck. 2017. “Exposure to Ambient Dichloromethane in Pregnancy and Infancy from Industrial Sources and Childhood Cancers in California.” *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 220 (7): 1133–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.06.006>.

Bibliographie

- Parkin, S. S P, N. More, and K. P. Roche. 1990. "Oscillations in Exchange Coupling and Magnetoresistance in Metallic Superlattice Structures: Co/Ru, Co/Cr, and Fe/Cr." *Physical Review Letters* 64 (19): 2304–7. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.64.2304>.
- Parodi, Alessandro, Seth G. Haddix, Nima Taghipour, Shilpa Scaria, Francesca Taraballi, Armando Cevenini, Iman K. Yazdi, et al. 2014. "Bromelain Surface Modification Increases the Diffusion of Silica Nanoparticles in the Tumor Extracellular Matrix." *ACS Nano* 8 (10): 9874–83. <https://doi.org/10.1021/nn502807n>.
- Patiño, Tania, Carme Nogués, Elena Ibáñez, and Leonardo Barrios. 2012. "Enhancing Microparticle Internalization by Nonphagocytic Cells through the Use of Noncovalently Conjugated Polyethyleneimine." *International Journal of Nanomedicine* 7: 5671–82. <https://doi.org/10.2147/IJN.S34635>.
- Perlstein, Benny, Zvi Ram, Dianne Daniels, Aharon Ocherashvilli, Yiftach Roth, Shlomo Margel, and Yael Mardor. 2008. "Convection-Enhanced Delivery of Maghemite Nanoparticles: Increased Efficacy and MRI Monitoring." *Neuro-Oncology* 10 (2): 153–61. <https://doi.org/10.1215/15228517-2008-002>.
- Polivka, Jiri Jr, Jiri Polivka, Lubos Holubec, Tereza Kubikova, Vladimir Priban, Ondrej Hes, Kristyna Pivovarcikova, and Inka Treskova. 2017. "Advances in Experimental Targeted Therapy and Immunotherapy for Patients with Glioblastoma Multiforme." *Anticancer Research* 37 (1): 21–33. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11285>.
- Pomfret, Roland, Gurwattan Miranpuri, and Karl Sillay. 2013. "The Substitute Brain and the Potential of the Gel Model." *Annals of Neurosciences* 20 (3): 118–22. <https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.200309>.
- Pongkitwitoon, Suphannee, Eileen M Weinheimer-haus, Timothy J Koh, and Stefan Judex. 2016. "Low-Intensity Vibrations Accelerate Proliferation and Alter Macrophage Phenotype in Vitro." *Journal of Biomechanics* 49 (5): 793–96. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2016.01.027>.
- Prats-Alfonso, Elisabet, and Fernando Albericio. 2011. "Functionalization of Gold Surfaces: Recent Developments and Applications." *Journal of Materials Science* 46 (24): 7643–48. <https://doi.org/10.1007/s10853-011-5812-1>.
- Prejbeanu, Ion Lucian, Sébastien Bandiera, J Alvarez-Hérault, Ricardo C. Sousa, Bernard Diény, and Jean-Pierre Nozières. 2013. "Thermally Assisted MRAMs: Ultimate Scalability and Logic Functionalities." *Journal of Physics D: Applied Physics* 46 (8). <https://doi.org/10.1088/0022-3727/46/7/074002>.
- Rabin, Y. 2002. "Is Intracellular Hyperthermia Superior to Extracellular Hyperthermia in the Thermal Sense?" *International Journal of Hyperthermia: The Official Journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 18 (3): 194–202. <https://doi.org/10.1080/02656730110116713>.
- Rebouissou, Sandra, Jessica Zucman-Rossi, Richard Moreau, Zhixin Qiu, and Lijian Hui. 2017. "Note of Caution: Contaminations of Hepatocellular Cell Lines." *Journal of Hepatology* 67 (5): 896–97. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.08.002>.
- Riss, Terry L, Richard A Moravec, Andrew L Niles, Helene A Benink, Tracy J Worzlla, and Lisa Minor. 2004. "Cell Viability Assays." *Assay Guidance Manual*, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_6.
- Rodrigues, Tânia, Banani Kundu, Joana Silva-Correia, S. C. Kundu, Joaquim M. Oliveira, Rui L. Reis, and Vitor M. Correló. 2018. "Emerging Tumor Spheroids Technologies for 3D in Vitro Cancer Modeling." *Pharmacology and Therapeutics* 184 (October 2017): 201–11. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.018>.
- Romagnolo, Alberto, Donato Romagnolo, and Ornella Selmin. 2014. "BRCA1 as Target for Breast Cancer Prevention and Therapy." *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 15 (1): 4–14.

Bibliographie

<https://doi.org/10.2174/1871520614666141020153543>.

- Roosbroeck, Ruben Van, Willem Van Roy, Tim Stakenborg, Jesse Trekker, Antoine D Hollander, Ruben Van Roosbroeck, Willem Van Roy, et al. 2014. "Synthetic Antiferromagnetic Nanoparticles as Potential Contrast Agents in MRI." *ACS Nano* 8 (3): 2269–78. <https://doi.org/10.1021/nn406158h>.
- Rousset-Jablonski, Christine, and Anne Gompel. 2017. "Screening for Familial Cancer Risk: Focus on Breast Cancer." *Maturitas* 105 (August): 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2017.08.004>.
- Rowe, R, P Sheskey, and M Quinn. 2009. "Handbook of Pharmaceutical Excipients." *Handbook of Pharmaceutical Excipients, Sixth Edition*, 549–53. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00243-7](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00243-7).
- Roy, Vincent. 2013. "Introduction Aux Neurosciences Cognitives, Licence 1 Ère Année de Psychologie – S1UE1 I." <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2017.094501>.
- Rozhkova, Elena A, Valentyn Novosad, Dong-Hyun Kim, J Pearson, R Divan, T Rajh, and Samuel D Bader. 2009. "Ferromagnetic Microdisks as Carriers for Biomedical Applications." *Journal of Applied Physics* 105 (7): 58–61. <https://doi.org/10.1063/1.3061685>.
- Ruderman, M.A., and C. Kittel. 1954. "Indirect Exchange Coupling of Nuclear Magnetic Moments." *Physical Review* 96 (1): 99–102. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRev.96.99>.
- Ruiz-Ontañón, Patricia, Jose L. Orgaz, Beatriz Aldaz, Alberto Elosegui-Artola, Juan Martino, Maria T. Berciano, Juan A. Montero, et al. 2013. "Cellular Plasticity Confers Migratory and Invasive Advantages to a Population of Glioblastoma-Initiating Cells That Infiltrate Peritumoral Tissue." *Stem Cells* 31 (6): 1075–85. <https://doi.org/10.1002/stem.1349>.
- Samadishadlou, Mehrdad, Masoud Farshbaf, Nasim Annabi, Taras Kavetsky, Rovshan Khalilov, Siamak Saghfi, Abolfazl Akbarzadeh, and Sepideh Mousavi. 2018. "Magnetic Carbon Nanotubes: Preparation, Physical Properties, and Applications in Biomedicine." *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* 46 (7): 1314–30. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1389746>.
- Sanchez, Claire, Darine El Hajj Diab, Vincent Connord, Pascal Clerc, Etienne Meunier, Bernard Pipy, Bruno Payré, et al. 2014. "Targeting a G-Protein-Coupled Receptor Overexpressed in Endocrine Tumors by Magnetic Nanoparticles to Induce Cell Death." *ACS Nano* 8 (2): 1350–63. <https://doi.org/10.1021/nn404954s>.
- Sanden, Boudewijn van der, David Ratel, François Berger, and Didier Wion. 2016. "Glioma Recurrence Following Surgery: Peritumoral or Perilesional?" *Frontiers in Neurology* 7 (10): 1322–32. <https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00052>.
- Sant, Shilpa, and Paul A. Johnston. 2017. "The Production of 3D Tumor Spheroids for Cancer Drug Discovery." *Drug Discovery Today: Technologies* 23: 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2017.03.002>.
- Saria, Marlon, and Santosh Kesari. 2016. "Efficacy and Safety of Treating Glioblastoma With Tumor-Treating Fields Therapy." *Clinical Journal of Oncology Nursing* 20 (5): S9–13. <https://doi.org/10.1188/16.CJON.S1.9-13>.
- Scherer, F, M Anton, U Schillinger, J Henke, C Bergemann, A Krüger, B Gänsbacher, and C Plank. 2002. "Magnetofection: Enhancing and Targeting Gene Delivery by Magnetic Force in Vitro and in Vivo." *Gene Therapy* 9 (2): 102–9. <https://doi.org/10.1038/sj/gt/3301624>.
- Shen, Yajing, Congyu Wu, Taro Q.P. Uyeda, Gustavo R. Plaza, Bin Liu, Yu Han, Maciej S Lesniak, and Yu Cheng. 2017. "Elongated Nanoparticle Aggregates in Cancer Cells for Mechanical Destruction with Low Frequency Rotating Magnetic Field." *Theranostics* 7 (6): 1735–48. <https://doi.org/10.7150/thno.18352>.
- Shevtsov, Maxim A., Boris P. Nikolaev, Ludmila Y. Yakovleva, Yaroslav Y. Marchenko, Anatolii V.

Bibliographie

- Dobrodumov, Anastasiya L. Mikhrina, Marina G. Martynova, Olga A. Bystrova, Igor V. Yakovenko, and Alexander M. Ischenko. 2014. "Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Conjugated with Epidermal Growth Factor (SPION-EGF) for Targeting Brain Tumors." *International Journal of Nanomedicine* 9 (1): 273–87. <https://doi.org/10.2147/IJN.S55118>.
- Shukla, Ravi, Vipul Bansal, Minakshi Chaudhary, Atanu Basu, Ramesh R. Bhonde, and Murali Sastry. 2005. "Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview." *Langmuir* 21 (23): 10644–54. <https://doi.org/10.1021/la0513712>.
- Sieri, S., and V. Krogh. 2017. "Dietary Glycemic Index, Glycemic Load and Cancer: An Overview of the Literature." *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 27 (1): 18–31. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2016.09.014>.
- Smoll, Nicolas R., Zoe Brady, Katrina Scurrah, and John D. Mathews. 2016. "Exposure to Ionizing Radiation and Brain Cancer Incidence: The Life Span Study Cohort." *Cancer Epidemiology* 42 (June): 60–65. <https://doi.org/10.1016/J.CANEP.2016.03.006>.
- Song, Chang W. 1984. "Effect of Local Hyperthermia on Blood Flow and Microenvironment: A Review." *Cancer Research* 44 (10 SUPPL.): 4721s–4730s. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L14000088>.
- Spirou, Spiridon, Martina Basini, Alessandro Lascialfari, Claudio Sangregorio, and Claudia Innocenti. 2018. "Magnetic Hyperthermia and Radiation Therapy: Radiobiological Principles and Current Practice †." *Nanomaterials* 8 (6): 401. <https://doi.org/10.3390/nano8060401>.
- Stenehjem, J. S., T. E. Robsahm, M. Bråtveit, S. O. Samuelsen, J. Kirkeleit, and T. K. Grimsrud. 2017. "Ultraviolet Radiation and Skin Cancer Risk in Offshore Workers." *Occupational Medicine* 67 (7): 569–73. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqx110>.
- Stupp, Roger, Warren P Massen, Martin J. Van Den Bent, Michael Weller, Barbara Fisher, Martin J.B. Taphoorn, Karl Belanger, et al. 2005. "Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma." *The New England Journal of Medicine* 352 (10): 987–96.
- Stupp, Roger, Sophie Taillibert, Andrew Kanner, William Read, David M. Steinberg, Benoit Lhermitte, Steven Toms, et al. 2017. "Effect of Tumor-Treating Fields plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients with Glioblastoma a Randomized Clinical Trial." *JAMA - Journal of the American Medical Association* 318 (23): 2306–16. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.18718>.
- Tosoni, Alicia, Enrico Franceschi, Rosalba Poggi, and Alba A. Brandes. 2016. "Relapsed Glioblastoma: Treatment Strategies for Initial and Subsequent Recurrences." *Current Treatment Options in Oncology* 17 (9). <https://doi.org/10.1007/s11864-016-0422-4>.
- Tsapis, Nicolas. 2017. "Agents de Contraste Pour l'imagerie Médicale." *Médecine/Sciences* 33 (1): 18–24. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173301004>.
- Vavassori, P, N Zaluzec, V Metlushko, Valentyn Novosad, B Ilic, and Marcos Grimsditch. 2004. "Magnetization Reversal via Single and Double Vortex States in Submicron Permalloy Ellipses." *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics* 69 (21): 3–8. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.69.214404>.
- Vegerhof, A., E.A. Barnoy, M. Motiei, D. Malka, Y. Danan, Z. Zalevsky, and R. Popovtzer. 2016. "Targeted Magnetic Nanoparticles for Mechanical Lysis of Tumor Cells by Low-Amplitude Alternating Magnetic Field." *Materials* 9 (11). <https://doi.org/10.3390/ma9110943>.
- Vemulkar, Tarun, Rhodri Mansell, Dorothée C.M.C. M C Petit, Russell P. Cowburn, and Maciej S. Lesniak. 2015. "Highly Tunable Perpendicularly Magnetized Synthetic Antiferromagnets for Biotechnology Applications." *Applied Physics Letters* 107 (1): 012403. <https://doi.org/10.1063/1.4926336>.

Bibliographie

- Vemulkar, Tarun, E. N. Welbourne, Rhodri Mansell, Dorothée C.M.C. M C Petit, and Russell P. Cowburn. 2017. "The Mechanical Response in a Fluid of Synthetic Antiferromagnetic and Ferrimagnetic Microdiscs with Perpendicular Magnetic Anisotropy." *Applied Physics Letters* 110 (4): 042402. <https://doi.org/10.1063/1.4974211>.
- Villanueva, A., P. De La Presa, J. M. Alonso, T. Rueda, A. Martínez, P. Crespo, M. P. Morales, M. A. Gonzalez-Fernandez, J. Valdés, and G. Rivero. 2010. "Hyperthermia Hela Cell Treatment with Silica-Coated Manganese Oxide Nanoparticles." *Journal of Physical Chemistry C* 114 (5): 1976–81. <https://doi.org/10.1021/jp907046f>.
- Vinci, Maria, Sharon Gowan, Frances Boxall, Lisa Patterson, Miriam Zimmermann, William Court, Cara Lomas, Marta Mendiola, David Hardisson, and Suzanne A. Eccles. 2012. "Advances in Establishment and Analysis of Three-Dimensional Tumor Spheroid-Based Functional Assays for Target Validation and Drug Evaluation." *BMC Biology* 10 (March). <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-29>.
- Vinson, Florence, Maysaloun Merhi, Isabelle Baldi, Hélène Raynal, and Laurence Gamet-Payrastré. 2011. "Exposure to Pesticides and Risk of Childhood Cancer: A Meta-Analysis of Recent Epidemiological Studies." *Occupational and Environmental Medicine* 68 (9): 694–702. <https://doi.org/10.1136/oemed-2011-100082>.
- Vo, D. D., R. M. Prins, J. L. Begley, T. R. Donahue, L. F. Morris, K. W. Bruhn, P. de la Rocha, et al. 2009. "Enhanced Antitumor Activity Induced by Adoptive T-Cell Transfer and Adjunctive Use of the Histone Deacetylase Inhibitor LAQ824." *Cancer Research* 69 (22): 8693–99. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1456>.
- Wang, Biran, Céline Bienvenu, Juan Mendez-Garza, Pascal Lançon, Alexandra Madeira, Pierre Vierling, Christophe Di Giorgio, and Georges Bossis. 2013. "Necrosis of HepG2 Cancer Cells Induced by the Vibration of Magnetic Particles." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 344 (October): 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2013.05.043>.
- Warnicke, P. 2007. "Magnetization of Thin-Film Permalloy Ellipses Used for Programmable Motion of Magnetic Particles." *International Journal of Chemical and Molecular Engineering* 1 (11): 925–27.
- Weinheimer-haus, Eileen M, Stefan Judex, William J Ennis, and Timothy J Koh. 2014. "Low-Intensity Vibration Improves Angiogenesis and Wound Healing in Diabetic Mice." *PLoS ONE* 9 (3): 3–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091355>.
- Weiss, Pierre. 1907. "L'hypothèse Du Champ Moléculaire et La Propriété Ferromagnétique." *Journal de Physique Théorique et Appliquée* 6 (1): 661–90. <https://doi.org/10.1051/jphysap:019070060066100>.
- Weissleder, Ralph, Matthias Nahrendorf, and Mikael J. Pittet. 2014. "Imaging Macrophages with Nanoparticles." *Nature Materials* 13 (2): 125–38. <https://doi.org/10.1038/nmat3780>.
- Wong, De Wei, Wei Liang Gan, Ning Liu, and Wen Siang Lew. 2017. "Magneto-Actuated Cell Apoptosis by Biaxial Pulsed Magnetic Field." *Scientific Reports* 7 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11279-w>.
- Wyde, Michael, Mark Cesta, Chad Blystone, Susan Elmore, Paul Foster, Michelle Hooth, Grace Kissling, et al. 2018. "Report of Partial Findings from the National Toxicology Program Carcinogenesis Studies of Cell Phone Radiofrequency Radiation in Hsd: Sprague Dawley® SD Rats (Whole Body Exposure)." *BioRxiv*, 055699. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/055699>.
- Yang, Zhihui, and Kevin K.W. Wang. 2015. "Glial Fibrillary Acidic Protein: From Intermediate Filament Assembly and Gliosis to Neurobiomarker." *Trends in Neurosciences* 38 (6): 364–74. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.003>.
- Yosida, Kei. 1957. "Magnetic Properties of Cu-Mn Alloys." *Physical Rev* 106 (5): 893–98. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.106.893>.

Bibliographie

- Zamay, Tatiana N, Galina S Zamay, Irina V Belyanina, Sergey S Zamay, Valery V Denisenko, Olga S Kolovskaya, Tatiana I Ivanchenko, et al. 2016. "Noninvasive Microsurgery Using Aptamer-Functionalized Magnetic Microdisks for Tumor Cell Eradication." *Nucleic Acid Therapeutics* 27 (2): 105–14. <https://doi.org/10.1089/nat.2016.0634>.
- Zeng, Fanhua, Catherine C. Lerro, Jérôme Lavoué, Huang Huang, Jack Siemiatycki, Nan Zhao, Shuangge Ma, et al. 2017. "Occupational Exposure to Pesticides and Other Biocides and Risk of Thyroid Cancer." *Occupational and Environmental Medicine* 74 (7): 502–10. <https://doi.org/10.1136/oemed-2016-103931>.
- Zhang, Enming, Moritz F Kircher, X Martin Koch, Lena Eliasson, S Nahum Goldberg, and Erik Renstrom. 2014. "Dynamic Magnetic Fields Remote-Control Apoptosis via Nanoparticle Rotation." *ACS Nano* 8 (4): 3192–3201. <https://doi.org/10.1021/nn406302j>.
- Zhang, Hao, Zhong-IL Li, Fei Yang, Qiang Zhang, Xiang-zheng Su, Ji Li, Ning Zhang, Chun-Hui Liu, Ning Mao, and Heng Zhu. 2018. "Radial Shockwave Treatment Promotes Human Mesenchymal Stem Cell Self-Renewal and Enhances Cartilage Healing." *Stem Cell Research & Therapy* 9 (54): 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13287-018-0805-5>.
- Zhou, Zhuxian, Xiangrui Liu, Dingcheng Zhu, Yue Wang, Zhen Zhang, Xuefei Zhou, Nasha Qiu, Xuesi Chen, and Youqing Shen. 2017. "Nonviral Cancer Gene Therapy: Delivery Cascade and Vector Nanoproperty Integration." *Advanced Drug Delivery Reviews* 115: 115–54. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.07.021>.
- Zhu, Ping, and Jay-Jiguang Zhu. 2017. "Tumor Treating Fields: A Novel and Effective Therapy for Glioblastoma: Mechanism, Efficacy, Safety and Future Perspectives." *Chinese Clinical Oncology* 6 (4): 41–41. <https://doi.org/10.21037/cco.2017.06.29>.
- Zhu, Xiaobin, P Grütter, V Metlushko, and B Ilic. 2002. "Magnetic Force Microscopy Study of Electron-Beam-Patterned Soft Permalloy Particles: Technique and Magnetization Behavior." *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics* 66 (2): 244231–37. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.66.024423>.

Annexes

I. Protocole détaillé de fabrication des particules

Ce protocole a été principalement mis au point pendant la thèse de Selma Leulmi avec l'aide de Philippe Sabon. Quelques optimisations ont été réalisées par Mélissa Morcrette et moi-même.

- **En arrivant en salle**

Allumer le MJB4 : ON / Sur la lampe : Power ON puis CP puis START, 30 min de chauffe

Allumer les plaques chauffantes : une à 90 °C, une à 180 °C. Monter la puissance de chauffe à 90-100 % puis la baisser à 30-40 % une fois proche de la valeur cible

Allumer la tournette en suivant les instructions, la laver avec de l'acétone, fixer le support adéquat, vérifier que le vide fonctionne, préparer 2 chronomètres sur 5 min

Programmer la tournette pour la PMMA 2% : 2000 rotations/minute - 60 secondes - 4000 accélération

- **Résines**

Utiliser des wafers de Si pur, non oxydés. Passer la soufflette sur le substrat de silicium

Positionner le wafer, de manière centrée sur la tournette

Déposer la PMMA 2% : ~0.6ml pour un wafer 2 pouces ou ~1.2ml pour un wafer 4pouces avec une pipette

Enclencher le vide et lancer la tournette, sans attendre

Dès que la tournette s'arrête, désenclencher le vide, récupérer le wafer et le déposer sur la plaque à 180°C. Déclencher de suite le chrono : 5 min

Dès que le chrono est fini, déposer le wafer sur une lingette, le laisser refroidir

Nettoyer la tournette avec de l'acétone

Programmer la tournette pour la ma-N 2403 : 4000 rotations/minute - 30 secondes - 2000 accélération.

Positionner le wafer, de manière centrée sur la tournette

Déposer la ma-N 2403 : ~0,6 ml pour un wafer 2 pouces ou ~1,2 ml pour un wafer 4 pouces avec une pipette

Enclencher le vide et lancer la tournette, sans attendre

Préparer un chrono à 1 min 30

Dès que la tournette s'arrête, désenclencher le vide, récupérer le wafer et le déposer sur la plaque à 90 °C. Déclencher de suite le chrono : 1 min 30

Dès que le chrono est fini, déposer le wafer sur une lingette, le laisser refroidir

Nettoyer la tournette avec de l'acétone

- **Insolation – MJB4 deep UV**

Se badger

Utiliser le masque 4 pouces (Vortex ou ellipse). Positionner le masque, face chromée vers le haut, sur le porte-masque en le calant contre les 3 vis. Enclencher le vide, vérifier. Positionner le tout sur le MJB4, serrer les vis. (Remarque : La face chromée doit être en contact avec l'échantillon)

Mettre en place le porte-substrat à la bonne taille et avec le joint, le petit trou vers nous

Par sécurité, descendre de 2 la molette. Vérifier l'alignement : X à 10, Y à 10 et θ à 0.

Passer un coup de soufflette sur le wafer et le positionner selon les marques du porte substrat (côté droit vers nous)

Sélectionner « WEC settings », suivre les indications. Un réglage suffit pour plusieurs wafers de même taille & résines

Régler les paramètres :

Choisir « 1-Align + exposure » et « 4-vacuum contact » durée 20 secondes, temps d'exposition de la MAN = 2.2 secondes.

Insoler la MAN : monter le substrat tout doucement et appuyer sur « Exposure »

Redescendre le substrat, récupérer le wafer

Desserrer les vis, récupérer le masque. Nettoyer le masque : mettre le bain de « Remove » dans le bac à ultra son, y plonger le masque avec la pince blanche, vérifier que le bac n'est pas en mode chauffage, allumer le bac pour 15-20min. Rincer le masque en le plongeant dans le bac de lavage pour un cycle. Sécher le masque avec la soufflette en le tenant par les bords pour ne pas laisser de traces. Le ranger.

Penser à éteindre l'appareil s'il ne sera plus utilisé dans la journée Se débadger

- **Développement**

Préparer un cristallisateur de AZ 326 MIF pur, et un cristallisateur d'eau.

Plonger le wafer dans le cristallisateur de AZ326MIF. 35 secondes pour les wafers 2 pouces, 40 secondes pour les 4 pouces

Plonger le wafer dans le cristallisateur d'eau

Rincer le wafer au jet pendant 1 à 2 min, le sécher avec la soufflette

On peut vérifier au microscope optique que l'on a bien le réseau.

- **Dépôt – Evap**

Se badger

Appuyer sur « LL Vent »

Installer le wafer sur le porte substrat. Passer un coup de soufflette.

Quand le voyant « ATM sas » est allumé, positionner rapidement le porte substrat dans le sas et appuyer au plus vite sur « LL pump ».

Lancer « Run process » en choisissant la bonne recette

Une fois le process terminé, appuyer sur « LL vent ». Sortir l'échantillon quand le voyant « ATM sas » est allumé.

Se débadger

- **Lift-off de la ma-N**

De préférence, le lift-off est à faire dans la même journée que le dépôt.

Positionner le wafer dans un cristallisateur, l'asperger d'isopropanol jusqu'à ce qu'il soit immergé. Des « copeaux » de matériau se détachent, visibles à l'œil nu. Mettre le cristallisateur dans le bac à ultrasons pour détruire les copeaux. Sortir le wafer tout en l'aspergeant d'isopropanol pour éviter que des morceaux restent accrochés. Rincer le wafer au jet d'eau. Si des zones n'ont pas été insolées et que le dépôt reste, gratter précautionneusement la zone avec la pince pour faire partir le dépôt en trop. Sécher le wafer avec la soufflette.

- **Mise en suspension des particules – Lift-off de la PMMA**

Si besoin, cleaver les bords s'ils ne sont pas « propres ». Si possible, la mise en suspension doit se faire au maximum un mois après le dépôt de résines. Sinon le lift-off se fera plus difficilement.

Placer le wafer dans un cristallisateur. Mouiller le wafer avec de l'acétone. Dès que la résine commence à se dissoudre, incliner le cristallisateur et passer le jet d'acétone sur le wafer, de haut en bas. Les particules qui descendent doivent se voir à l'œil nu. Mettre le cristallisateur quelques secondes au bac à ultrasons. Le sortir, l'incliner de nouveau et aspirer tout l'acétone avec une pipette, le transvaser dans un tube de 50 ml. Réasperger le wafer avec un peu d'acétone, l'aspirer et le transvaser dans le tube Falcon.

!\ Le tube n'est pas tout à fait étanche et doit rester vertical : utiliser un portoir et utiliser du parafilm.

Placer le tube Falcon sur un aimant et laisser les particules sédimenter (~30 min).

Au choix :

Préparer un tube Eppendorf 2 ml. Aspirer l'acétone en trop et le jeter, en prenant soin de maintenir l'aimant contre le Falcon pour ne pas aspirer les particules. Quand il reste peu d'acétone, disperser les particules avec la micropipette ou à l'aide du bac à ultrason. Transvaser le tout dans le tube Eppendorf avec la micropipette. (facile mais long)

ou Préparer un tube Eppendorf 2 ml. Plonger le cône de la micropipette au fond du Falcon. Au dernier moment, laisser tomber l'aimant et aspirer le fond du Falcon contenant les particules. Transvaser de suite dans le tube Eppendorf, avant que des gouttes ne tombent. Utiliser l'aimant pour regrouper de nouveau les particules restantes au fond du Falcon. Répéter l'opération.

(plus technique mais plus rapide)

Ne pas oublier d'annoter le tube, le placer dans le bac à ultrason pour bien disperser les particules.

- Utilisation des particules

Pour une utilisation des particules *in-vitro* ou *in-vivo*, les étapes suivantes sont à réaliser sous PSM.

Utiliser l'aimant ou un portoir aimanté pour condenser les particules, aspirer tout l'acétone et le jeter.

En gardant l'aimant contre le tube, ajouter de l'éthanol pur. Disperser les particules (micropipette ou

US). Recommencer une nouvelle fois : condenser les particules avec l'aimant. Aspirer tout l'éthanol et

le jeter. En gardant l'aimant contre le tube, ajouter de l'éthanol pur. Disperser de nouveau les particules.

Pour une utilisation dans du milieu de culture ou du PEG, refaire la même opération deux fois en remplaçant l'éthanol par le milieu de culture ou le PEG. Bien disperser les particules avec le bac à ultrasons (ou à défaut avec la micropipette).

Dans les deux cas, répéter l'opération deux fois est très important pour une bonne dispersion des particules !

Pour une utilisation dans du NaCl, ne faire l'opération qu'une seule fois et ne plus attirer les particules avec l'aimant sous peine d'agrégats.

II. Protocole pré-règlementaire de fabrication des particules

Ce protocole, en cours d'élaboration, a été rédigé avec Vera Aiello et Robert Morel.

Au/NiFe/Au Nanoparticles Fabrication Protocol

1 Aim

The purpose of this document is to describe the Au/NiFe/Au nanoparticles (NPs) fabrication protocol that was developed for the European project (EURONANOMED II) NanoViber. The products of this protocol are magnetic nanoparticles intended for cancer therapy. It is expected that the mechanical action of nanoparticles submitted to an external magnetic field induce modification in ionic transport through the cellular membrane. In particular, the low frequency vibration (≈ 20 Hz) of the nanoparticles, locally injected in a brain tumor, can destroy glioblastoma cancer cells.

2 Generalities

The NPs are in the form of disks, typically $1.3 \mu\text{m}$ in diameter and 80 nm in thickness. They are fabricated using a top-down approach by a process of metal deposition and optical lithography on silicon substrates. Four inches silicon substrates are individually processed in a clean room facility, each processed wafer allowing for the fabrication of 1 mg of NPs.

2.1 Environment

The NPs fabrication process is achieved in a controlled environment, in an ISO 6 (or less) Clean Room facility. All tools and equipment used for the manufacture of particles are subject to regular maintenance and calibration. A detailed list of the tools and the reagents used for the NPs production and characterization is reported hereafter.

2.2 Traceability

Each NPs batch is associated with a lot number and a fabrication sheet with the fabrication procedure, characterizations results and possible modifications. The fabrication sheet also reports information about the type and quantity of NPs.

3 Fabrication Procedure

3.1 Photoresist deposition by spin coating

A 2 % 950 K molecular weight PMMA (polymethyl methacrylate) positive tone photoresist is spin coated at 2000 rpm, 4000 rpm/s for 60 s, on a 4" Si wafer. Wafer is then heated at 180 °C for 5 min for resist curing.

A ma-N 2403 Deep UV negative tone photoresist is spin coated at 4000 RPM, 2000 RPM/sec for 30 sec. Wafer is then heated at 90°C for 30 sec for resist curing.

3.2 Photolithography

The $1.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$ diameter circular disk pattern for the NPs is transferred in the ma-N resist by a photolithography process, using a specific mask. Once the mask is correctly aligned ($X=10$; $Y=10$; $\theta=0$), selecting parameters to obtain the vacuum for 20 s, the wafer is exposed to 240 nm deep UV light for 2.2 s.

3.3 Development

The removal of unexposed ma-N 2403 is achieved by wafer immersion in AZ 326 MIF developer (aqueous solutions of 2.38% tetramethyl-ammonium-hydroxide) for 40 s, after which it is rinsed under running H₂O for 1 min 30 s. Wafer is then dried by a jet of dry nitrogen gas.

3.4 Metal deposition

Selecting the specific program, a 10 nm thick Au bottom layer is deposited, then a 60 nm thick NiFe layer, and finally a 10 nm thick Au capping layer.

3.5 ma-N 2403 Lift-off

The lift-off of the ma-N 2403 is achieved by wafer immersion in isopropanol for a few seconds, after which it is rinsed with running isopropanol and H₂O to remove any residual ma-N resist. Wafer is then dried by a jet of dry nitrogen gas. After the ma-N resist lift-off is completed, the NPs are resting the Si substrate, still attached by the underlying PMMA resist.

At this stage, SEM microscopy allows verifying the homogeneity in NPs size and shape, and magnetic measurement allows verifying their intrinsic magnetic properties.

3.6 PMMA lift-off and NPs releasing

The lift-off of the PMMA allows for the releasing of the NPs from the substrate and their transfer in a storage liquid. PMMA lift-off is achieved by immersing the wafer in a beaker with acetone, to initiate the lift-off, after which it is rinsed with acetone to fully release the NPs. After NPs sedimentation in the acetone beaker (~ 30 min), acetone is removed and NPs are rinsed several times with ethanol. At the end of this stage, the particles are re-dispersed in ethanol, for storage.

At this stage, optical microscopy and response to applied magnetic field with NPs in liquid allow to assess particles interaction, and notably their polarizability and ability to disperse.

4 Storage

Prior to the PMMA lift-off, wafers of NPs can be stored up to 1 month at room temperature in dry atmosphere. Otherwise, released NPs in ethanol can be kept at room temperature for longer time.

5 Tools and reagents

5.1 Tools

The tools and equipments used for the nanoparticles production and characterization are hereafter listed. Calibration parameters and risks are described for each equipment. All modifications likely to result in a change in the NPs must be validated before they are implemented and reported in the fabrication protocol.

Spin-coating

The spin processor used for NPs fabrication is a SPIN150i from SPS-europe. Possible contamination can result from traces of photoresists and chemicals processed with the same equipment. These include AZ 5214 E, AZ 1512 HS, AZ 40 XT, AZ 4562, AZ XT 1311, AZ 2070, HMDS promoter, LOR 10A, ma-N 2410, ma-N 2410, PMMA 4% 950K, PMMA 4% 200K, PMMA-MMA 8%, ZEP 1:1, UV5, VM652 promoter, AznLOF 2070, SU8-2005, Omnicoat, and ZEP 520A.

Wafer heater

The hot plate used for wafer heating is a PRAZITHERM from Harry Gestigkeit GmbH.

Deep UV lithography

DUV lithography is achieved with a MJB4 Mask Aligner system from SÜSS Microtec (ZE350-30VP/173432).

Metal deposition

Metal thin films are deposited by thermal evaporation, using a MEB550S Evaporator from PLASSYS Bestek. Possible contamination can result from traces of other metallic elements processed with the same equipment. These include Al, Ti, Cr, Cu, Ag, CoFe, and Pd.

5.2 Materials and reagents

The materials and reagents used for the nanoparticles production and characterization are hereafter listed.

- 4" silicium wafers substrates;
- Positive tone photoresist: PMMA 2%;
- Negative tone photoresist: ma-N 2403 from micro resist technology GmbH;
- Fused silica lithographic photomask;
- AZ 326 MIF developer from Merck Performance Materials GmbH;
- Deionized water;
- Isopropanol, provided by KGB;
- Acetone, provided by BASF;
- Absolute ethanol, provided by VWR;
- MicroChem 1112A remover.

III. Particules de magnétite

Les particules de magnétite ont été réalisées dans le cadre de la thèse de Mélissa Morcrette et de mon stage de fin d'études (Morcrette 2016). L'objectif était de produire et tester des particules de mêmes tailles et formes que les particules de permalloy mais en utilisant un matériau présentant une meilleure biocompatibilité et des propriétés magnétiques intéressantes : la magnétite (Fe_3O_4).

Les particules de magnétite sont réalisées selon le même protocole que les particules de permalloy, présenté au chapitre 2,II et détaillé en annexe I, excepté l'étape de dépôt. Les matériaux ont été déposés ici par pulvérisation cathodique au laboratoire CEA/INAC/SP2M/NM par Stéphane Lequien qui a mis au point ce procédé. Pour les deux couches d'or, une cible d'or positionnée en face du *wafers* est bombardée par de l'argon. La réaction va décrocher des particules d'or qui vont se condenser sur le substrat. Dans le cas de la magnétite, un gaz réactif est ajouté à 2,76 % dans le plasma d'argon : du dioxygène. Celui-ci réagit avec les atomes de fer d'une deuxième cible décrochés par le bombardement mécanique des atomes d'argon et produit du Fe_3O_4 . Cette technique a l'avantage de produire de la magnétite pure, non contaminée par d'autres oxydes de fer, à condition que la teneur en oxygène dans le gaz neutre d'argon soit parfaitement maîtrisée.

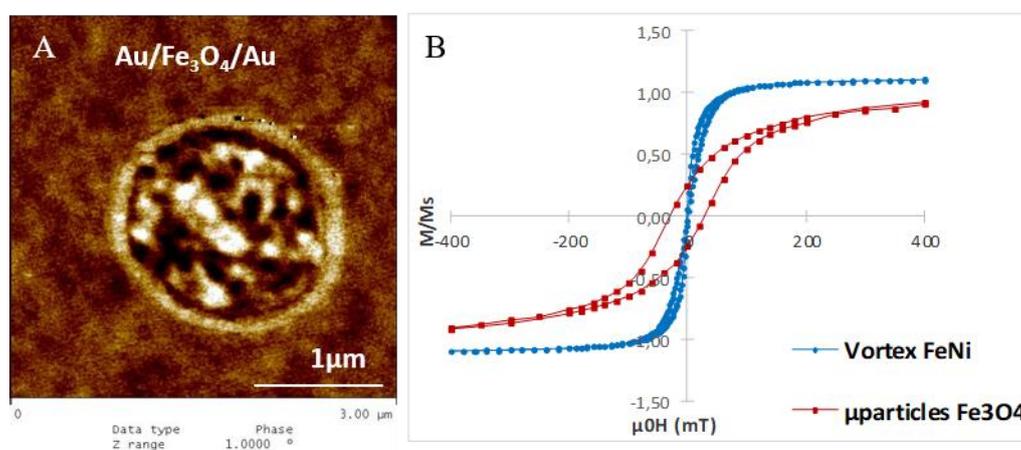


Figure 70 : A/ Image MFM d'une particule de magnétite et B/ cycles d'hystérésis en bleu de particules de permalloy et en rouge de particules de magnétite (Morcrette 2016)

Les images MFM de particules de magnétite montrent des grains ou domaines présentant un contraste magnétique d'orientation aléatoire (Figure 70A). Le cycle d'hystérésis montre une légère rémanence et un champ de saturation de 200 mT. La comparaison des deux cycles montre que les particules de magnétite ont une susceptibilité plus faible que les particules de permalloy.

IV. Protocole de préparation des échantillons pour le TEM

Ce protocole a été mis au point à l'Institut des Neurosciences de Grenoble (GIN) par Anne Bertrand et Karin Pernet-Gallay.

IV.1. Préparation des échantillons

Fixation des cellules ou tissus

- Pour les cellules *in-vitro* en culture classique :

Le milieu de culture est remplacé par du fixateur (2% glutaraldéhyde, 2% cacodylate) pendant au moins 2 h.

Deux lavages au cacodylate 0,1 M sont ensuite réalisés.

Les cellules sont détachées avec un *cell scriper* (sorte de raclette), transférées dans des tubes puis centrifugées à 1500 rpm pendant 4-8min.

Le surnageant est enlevé puis remplacé par de la gélatine à 37°C. Les cellules sont de nouveau centrifugées 5 min à 1500 rpm puis la gélatine surnageante est enlevée. Les tubes sont ensuite mis dans de la glace pour le durcissement de la gélatine.

En restant sur la glace, les blocs de cellules et gélatine ainsi formés sont coupés en petits bouts et préservés dans du cacodylate.

- Pour les sphéroïdes en gel :

Les sphéroïdes en gel sont mis dans un bain de fixateur (paraformaldéhyde (PFA) 2% + glutaraldéhyde 2% + cacodylate 0,1 M + eau) pendant au moins 2 h. Ils sont ensuite lavés 3 fois dans du cacodylate.

- Pour les tissus *in-vivo* :

Il est à noter que le protocole utilisé ici n'est pas optimal. En effet, une perfusion des animaux est nécessaire pour obtenir une bonne qualité d'images. Les analyses effectuées ici sont faites sur des échantillons congelés à l'isopentane.

Les échantillons sont mis dans du fixateur (PFA 2% + glutaraldéhyde 2% + cacodylate 0,1M + eau) pendant au moins 3 h. La zone tumorale est ensuite découpée et remise au moins 1 h dans du fixateur. Trois lavages au cacodylate sont ensuite réalisés.

Post fixation

Les échantillons sont mis pendant 1 h sur la glace et sous la hotte avec une solution composée de 1% tétroxyde d'osmium et du cacodylate (0,1 M et pH 7,2) pour révéler les lipides. Les échantillons sont ensuite lavés 3 fois en restant à chaque fois 20 min sur roue tournante dans de l'eau distillée.

Coloration

Un bain d'acétate d'uranyle à 1 % est ensuite réalisé pour révéler les protéines. Pour cela les échantillons sont laissés 1 h sur roue tournante dans la solution d'acétate d'uranyle dans l'obscurité.

Trois rinçages à l'eau distillée sont ensuite réalisés et les échantillons sont laissés pour la nuit dans de l'eau distillée sur roue tournante.

Mise en résine

En chambre froide, les échantillons sont déshydratés par des bains successifs sur roue tournante de 10 min d'éthanol à 30 %, puis 60 % puis 90 %. Trois bains dans de l'éthanol à 100 % sont réalisés pour finaliser la déshydratation.

Afin de former des blocs qui vont ensuite pouvoir être coupés, les échantillons sont mis dans de la résine. Une solution A de 5 ml d'époxy et de 8 ml de *Dodeceny Succinic Anhydride* et une solution B composées de 8 ml d'époxy et 7 ml de *Nadic Methyl Anhydride* sont homogénéisées séparément sur roue tournante pendant 1 h. 12 ml de solution A et 12 ml de solution B sont alors mélangées avec 1,7 % d'accélérateur pour former la résine.

Les échantillons sont d'abord mis dans un mélange composé de 50 % de résine et 50 % d'éthanol pendant 2 h sur roue tournante. Ils sont ensuite imprégnés de résine pure pendant au moins 2 h sur roue tournante.

Inclusion et polymérisation

Les échantillons sont insérés avec un peu de résine dans des capsules puis mis à 60 °C pendant 2 jours.

IV.2. Préparation des blocs et coupe

Une première coupe en forme de pyramide est d'abord réalisée grâce à une lame de rasoir. L'objectif est d'avoir l'échantillon centré avec les pans uniformes, parallèles et de taille adéquate.

Les coupes sont ensuite réalisées avec un ultra-microtome. Un premier couteau en diamant est d'abord utilisé pour aplanir parfaitement la surface de l'échantillon en réalisant des coupes de 400 nm à 50 mm/s. Un deuxième couteau en diamant est ensuite utilisé. Des coupes de 50 nm sont alors réalisées à une vitesse de 1 mm/s. Les coupes ainsi formées flottent sur l'eau disposée dans le bac entourant le diamant. Une grille est alors plongée dans l'eau pour récupérer une ou plusieurs coupes en surface.

Les grilles sont laissées séchées quelques jours puis observées avec le Microscope à Transmission Electronique.

V. Protocoles de marquage

Ces protocoles ont été mis au point avec l'aide de Céline Le Clec'h.

V.1. Marquage à l'Hématoxyline-Eosine

Fixation des coupes dans un mélange éthanol/acétone (50/50)	5 min
Rinçage à l'eau courante	3 bains
Hématoxyline	4 min
Rinçage à l'eau courante	3 bains
HCl 0,5% dans H ₂ O	passage
Rinçage à l'eau courante	1 bain
Eau ammoniacquée NH ₄ 0,25% dans H ₂ O	passage
Rinçage à l'eau courante	1 bain
Eosine	2 à 3 s
Ou Eosine 1/10	4 min
Rinçage à l'eau courante	3 à 4 bains
Ethanol 100 %	5 min
Séchage sous hotte	

Montage en lame et lamelle avec milieu Eukitt.

V.2. Marquage Ki-67 – GFAP – Hoechst

1. Préparation des solutions (à garder au frais)

- Solution de Perméabilisation : PBS/0,1 % Triton (Tx100)
- Solution de saturation : PBS/10 % NGS (Bien vortexer le NGS avant prélèvement)
- Solution de dilution de l'anticorps primaire : PBS/1 % NGS
- Solution de dilution de l'anticorps secondaire : PBS
- Solution de rinçage des anticorps : PBS

2. Fixation - Formalin 10%

- Recouvrir les coupes de tissu de formalin 10%. Laisser incuber 15 min à température ambiante.
- Rincer au PBS 2 x 5 min.

3. Perméabilisation - PBS/0.1 % Tx100

- Recouvrir les coupes de tissu de solution de perméabilisation. Laisser incuber 30 min à température ambiante.
- Rincer au PBS 2 x 5 min.

4. Cercler les coupes de tissus

Contourer les coupes avec le stylo « gras » d'immunomarquage en prenant soin de ne pas toucher le tissu. Ce film hydrophobe permet de réduire les volumes de réactifs déposés sur les coupes.

5. Saturation des sites antigéniques - PBS/5% NGS

- Déposer sur les coupes environ 200 µl de solution de saturation par coupe (volume à adapter en fonction de la taille des coupes).
- Laisser incuber 30 min à température ambiante.

6. Anticorps primaire – anti-GFAP 1/500 + anti-Ki67 1/200 dans PBS/1% NGS

- Préparer la solution d'anticorps : vortexer puis diluer les anticorps dans une solution de PBS/1% NGS. Vortexer et centrifuger la solution à la centrifugeuse de paillasse.
- Bien enlever la solution de saturation sans rincer
- Déposer la solution des anticorps sur les coupes.
- Laisser incuber toute la nuit (ou minimum 12 h) à 4 °C.

7. Anticorps secondaire – anti-Chicken-546 + anti-Rabbit-488 dilués au 1/500 dans PBS

- Remettre lame à température ambiante le temps de la préparation
- Oter la solution d'anticorps primaire.
- Rincer au PBS 2 x 10 min
- Préparer la solution d'anticorps : vortexer puis diluer les anticorps secondaires dans une solution de PBS. Vortexer et centrifuger à la centrifugeuse de paillasse.
- Déposer la solution sur les coupes.
- Laisser incuber 1 h 30 à température ambiante.

et contre coloration Hoechst33342

- Oter la solution d'anticorps secondaire.
- Rincer au PBS 2 x 10 min
- Préparer la contre-coloration : vortexer puis diluer Hoechst33342 à 1/1000 dans du PBS
- Déposer la solution sur les coupes.
- Laisser incuber 10 min à température ambiante.
- Rincer au PBS 2 x 10 min

8. Montage entre lame et lamelle

- Oter l'excédent de liquide et essuyer les bords de la lame. Déposer 1 goutte de milieu de montage aqueux par coupe (attention à ne pas en mettre trop).
- Déposer la lamelle et la fixer avec du vernis transparent à chaque extrémité.

Observation et conservation

Observer avec microscope à fluorescence et si besoin, conserver à + 4 °C. Dans le cas d'une conservation longue (plus d'une semaine), retarder le séchage du milieu aqueux en cerclant la totalité de la lamelle avec du vernis.

VI. Etude statistique

Pour comparer les résultats obtenus entre un groupe contrôle et un groupe traité, par exemple, on émet l'hypothèse nulle que la valeur « vraie » étudiée est identique entre les deux groupes. Un résultat est alors statistiquement différent lorsque la valeur p, aussi appelée degré de signification, est inférieure à la probabilité α de rejeter l'hypothèse nulle alors qu'elle est vraie. De manière conventionnelle, le risque α , appelé risque de première espèce, est fixé à 0,05. Si la valeur p calculée est supérieure à 0,05, on dit alors que le résultat n'est pas significatif.

Dans cette étude, les valeurs p ont été calculées grâce au logiciel GraphPad ou à la main avec les méthodes suivantes (Carrat, Mallet, and Morice 2007) :

Test de Student

Le test de Student permet de comparer deux moyennes observées sur des échantillons indépendants avec une distribution normale. Considérons deux groupes A et B constitués de n_A et n_B échantillons. On émet alors les deux hypothèses suivantes, que l'on va tester :

L'hypothèse nulle H_0 que les moyennes coïncident entre les deux échantillons $\bar{x}_A = \bar{x}_B$.

L'hypothèse H_1 que les moyennes ne coïncident pas $\bar{x}_A \neq \bar{x}_B$.

On calcule alors le nombre de degré de liberté : $ddl = n_A + n_B - 2$ puis le paramètre du test Z :

$$Z = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{\sqrt{\frac{s_A^2}{n_A} + \frac{s_B^2}{n_B}}} \text{ avec } s_j = \frac{1}{n_j} \sum_{i=1}^{n_j} (x_i - \bar{x}_j)^2$$

On définit alors l'intervalle $[-t_\alpha; t_\alpha]$, dépendant du risque α choisi et du nombre de degré de liberté selon les valeurs de t_α définies par la table du test du Student. Si la valeur Z ainsi calculée n'est pas comprise dans cet intervalle, on pourra alors conclure que les deux moyennes sont significativement différentes, vérifiant ainsi l'hypothèse H_1 . La valeur p correspond alors à la valeur minimale que peut prendre α pour vérifier cette condition.

Test de Mann-Whitney-Wilcoxon

Le test de Mann-Whitney-Wilcoxon est un test de comparaison de deux distributions observées. Considérons deux groupes A et B constitués de n_A et n_B échantillons, respectivement et de densités de

probabilité f_A et f_B . Par convention, on considère que $n_A \leq n_B$. On émet alors les deux hypothèses suivantes, que l'on va tester :

L'hypothèse nulle H_0 que les densités de probabilité coïncident entre les deux échantillons : $f_A = f_B$.

L'hypothèse H_1 que les densités de probabilités ne coïncident pas : $f_A \neq f_B$.

On classe les échantillons des deux groupes par ordre croissant et on calcule la somme des rangs occupés par les données du groupe A : T_A .

On peut alors calculer le paramètre du test Z, lorsque n_A et $n_B \leq 10$, ce qui est notre cas dans cette étude :

$$Z = \frac{T_A - \frac{n_A(n_A + n_B + 1)}{2}}{\sqrt{\frac{n_A n_B (n_A + n_B + 1)}{12}}}$$

On définit alors l'intervalle $[-M_\alpha; M_\alpha]$ dépendant du risque α choisi. La valeur M_α est donnée par la table du test de Mann-Whitney-Wilcoxon. Si la valeur Z ainsi calculée est comprise dans l'intervalle de pari, on pourra alors conclure qu'au risque $\alpha = 0,05$, « la densité de probabilité de la variable étudiée n'est pas la même dans les populations A et B ». On dira alors que les deux populations sont significativement différentes, vérifiant ainsi l'hypothèse H_1 . La valeur p correspond alors à la valeur minimale que peut prendre α pour que le paramètre Z soit compris dans l'intervalle $[-M_\alpha; M_\alpha]$.

Test ANOVA

Le test ANOVA pour *ANalysis Of VAriance*, est un test de comparaison des moyennes observées de deux populations ou plus distribuées normalement et de variance identique. Les calculs ont ici été réalisés avec le logiciel GraphPad.

Considérons K groupes composés de chacun de n_i échantillons et notons $N = \sum n_i$.

Le paramètre du test est calculé comme suit :

$$F = \frac{\frac{\sum_{i=1}^K (\bar{Y}_i - \bar{Y})^2}{K - 1}}{\frac{\sum_{i=1}^K \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2}{N - K}}$$

De manière similaire aux tests déjà présentés, la paramètre F est ensuite comparé aux valeurs de la table et les résultats sont dits significativement différents si F est supérieur au seuil critique, pour $\alpha = 0,05$. La valeur p est alors calculée comme la plus petite valeur pour laquelle F reste supérieure au seuil critique.

Résumé

Le glioblastome est un cancer du cerveau très agressif dont les thérapies actuelles n'augmentent que très peu la durée de vie. Dans cette thèse, nous étudions un nouveau traitement par effet magnéto-mécanique de particules (TEMMP). Un champ magnétique rotatif à faible fréquence (20 Hz) est appliqué pour faire vibrer des particules magnétiques en contact avec les cellules cancéreuses. Les particules développées sont produites par une approche *top-down* en salle blanche. Les disques de permalloy utilisés présentent une configuration en vortex avec une faible rémanence et une bonne dispersion en suspension. Des particules multicouches de Co/Pt avec une anisotropie perpendiculaire et des vortex de permalloy en forme d'ellipses sont aussi étudiés. L'efficacité du TEMMP est évaluée *in-vitro* sur des cellules de glioblastome et les différents paramètres sont optimisés. Une forte diminution du nombre de cellules après traitement est alors observée et le comportement des cellules restantes est affecté. Le TEMMP est ensuite adapté pour une étude *in-vivo* dans un modèle orthotopique de glioblastome chez la souris nude. L'injection des particules en intra-tumoral est mise au point. Les tissus sont peu affectés par le TEMMP comparé à une injection de particules, et une faible augmentation de la survie est observée. Pour mimer les propriétés mécaniques du cerveau de manière plus pertinente, un modèle *in-vitro* 3D est alors développé et validé. Conçu avec des sphéroïdes de cellules pris dans un gel d'agarose, ce modèle apporte des pistes d'optimisation.

Mots clés : Particules magnétiques – Cancer – Glioblastome – Effet magnéto-mécanique des particules – Sphéroïde – *In-vitro* 3D

Abstract

Glioblastoma is a brain cancer with a very poor prognosis. Existing therapies improve only slightly the median survival. In this work, we study a new treatment by magneto-mechanical actuation of particles (TMMAP). A low frequency (20 Hz) rotating magnetic field is applied to stimulate magnetic particles localized near cancer cells. Magnetic particles are produced by a top-down approach in clean room. Permalloy disks with a vortex configuration have a low remanence and are well dispersed in suspension. Multilayers of Co/Pt with a perpendicular anisotropy and permalloy vortex particles with an ellipse shape are also studied. TMMAP efficiency is tested *in-vitro* on glioblastoma cell line and the parameters are optimized. A huge diminution of living cells and an affected behavior of the remaining cells are observed after treatment. TMMAP is then adapted to an *in-vivo* study on glioblastoma orthotopic model on nude mice and the intratumoral injection of the particles is developed. Few differences are observed between tissues submitted to TMMAP or injected with particles, and survival is slightly increased. To mimic mechanical properties of the brain in a more relevant model, an *in-vitro* 3D model is proposed and validated. Based on cells grown as a spheroid and encapsulated in an agarose gel, this model brings optimization tracks.

Keywords: Magnetic particles – Cancer – Glioblastoma – Magneto-mechanical actuation of particles – Spheroid – 3D *in-vitro*

Résumé

Le glioblastome est un cancer du cerveau très agressif dont les thérapies actuelles n'augmentent que très peu la durée de vie. Dans cette thèse, nous étudions un nouveau traitement par effet magnéto-mécanique de particules (TEMMP). Un champ magnétique rotatif à faible fréquence (20 Hz) est appliqué pour faire vibrer des particules magnétiques en contact avec les cellules cancéreuses. Les particules développées sont produites par une approche *top-down* en salle blanche. Les disques de permalloy utilisés présentent une configuration en vortex avec une faible rémanence et une bonne dispersion en suspension. Des particules multicouches de Co/Pt avec une anisotropie perpendiculaire et des vortex de permalloy en forme d'ellipses sont aussi étudiés. L'efficacité du TEMMP est évaluée *in-vitro* sur des cellules de glioblastome et les différents paramètres sont optimisés. Une forte diminution du nombre de cellules après traitement est alors observée et le comportement des cellules restantes est affecté. Le TEMMP est ensuite adapté pour une étude *in-vivo* dans un modèle orthotopique de glioblastome chez la souris nude. L'injection des particules en intra-tumoral est mise au point. Les tissus sont peu affectés par le TEMMP comparé à une injection de particules, et une faible augmentation de la survie est observée. Pour mimer les propriétés mécaniques du cerveau de manière plus pertinente, un modèle *in-vitro* 3D est alors développé et validé. Conçu avec des sphéroïdes de cellules pris dans un gel d'agarose, ce modèle apporte des pistes d'optimisation.

Mots clés : Particules magnétiques – Cancer – Glioblastome – Effet magnéto-mécanique des particules – Sphéroïde – *In-vitro* 3D

Abstract

Glioblastoma is a brain cancer with a very poor prognosis. Existing therapies improve only slightly the median survival. In this work, we study a new treatment by magneto-mechanical actuation of particles (TMMAP). A low frequency (20 Hz) rotating magnetic field is applied to stimulate magnetic particles localized near cancer cells. Magnetic particles are produced by a top-down approach in clean room. Permalloy disks with a vortex configuration have a low remanence and are well dispersed in suspension. Multilayers of Co/Pt with a perpendicular anisotropy and permalloy vortex particles with an ellipse shape are also studied. TMMAP efficiency is tested *in-vitro* on glioblastoma cell line and the parameters are optimized. A huge diminution of living cells and an affected behavior of the remaining cells are observed after treatment. TMMAP is then adapted to an *in-vivo* study on glioblastoma orthotopic model on nude mice and the intratumoral injection of the particles is developed. Few differences are observed between tissues submitted to TMMAP or injected with particles, and survival is slightly increased. To mimic mechanical properties of the brain in a more relevant model, an *in-vitro* 3D model is proposed and validated. Based on cells grown as a spheroid and encapsulated in an agarose gel, this model brings optimization tracks.

Keywords: Magnetic particles – Cancer – Glioblastoma – Magneto-mechanical actuation of particles – Spheroid – 3D *in-vitro*