



HAL
open science

**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**

Mélissa Morcrette

► **To cite this version:**

Mélissa Morcrette. 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. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAY052 . tel-01292065

HAL Id: tel-01292065

<https://theses.hal.science/tel-01292065>

Submitted on 22 Mar 2016

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 L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Physique / Nanophysique**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

« Mélissa MORCRETTE »

Thèse dirigée par « **Ahmad BSIESY** » et
codirigée par « **Hélène JOISTEN** »

préparée au sein du **Laboratoire SPINTEC**
dans l'**École Doctorale de Physique**

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.

Thèse soutenue publiquement le « **14.12.2015** »,
devant le jury composé de :

Mme, Véronique, DUPUIS

Directrice de recherche Université Claude Bernard, Lyon, Présidente

Mr, Patrick, GUENOUN

Chercheur Senior LIONS CEA-Saclay, Gif sur Yvette, Rapporteur

Mme, Dorothée, PETIT

Chercheur Senior Université de Cambridge, Rapporteur

Mme, Nora, DEMPSEY

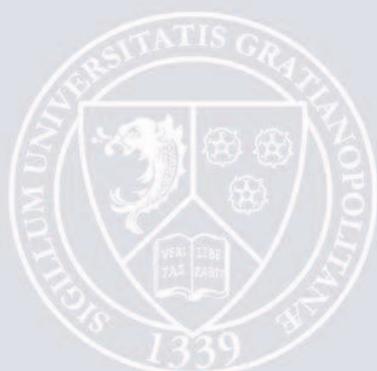
Directrice de recherche Institut Néel, Grenoble, Examineur

M, Ahmad, BSIESY

Professeur CEA-LETI, Grenoble, Directeur de thèse

Mme, Hélène, JOISTEN

Ingénieur Chercheur CEA, Grenoble, Co-encadrante de thèse



Remerciements

Que serait une thèse sans collaborations, sans collègues, sans amis ? Pas grand-chose, je pense. C'est pourquoi je vais essayer de m'appliquer dans ce chapitre (comme dans tous les autres d'ailleurs, notez-le bien) et de n'oublier personne ! Commençons par le commencement : tout a commencé une chaude journée de juillet, alors que j'étais en stage en Allemagne, devant mon ordinateur, à regarder les papillons par la fen... euh, à travailler assidûment. Tout à coup, le téléphone sonna. C'était Bernard Dieny. « Il lui vendit la thèse avec moult arguments, elle accepta avec joie et ils vécurent 3 merveilleuses années de collaboration à Spintec ». Fin de l'histoire. Pour faire un peu plus détaillé, le coup de fil fut suivi d'un échange de mails avec Hélène Joisten, et c'était parti pour trois ans de ski, randonnées, et un peu de boulot. Soyons sérieux : merci à eux pour la confiance qu'ils m'ont accordée, pour avoir suivi les hauts et les bas de mon travail avec intérêt, professionnalisme et enthousiasme, et pour m'avoir fait partager leur expérience de la recherche.

Merci aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail et de venir assister la soutenance en traversant la Manche ou simplement en passant la porte du labo, et qui ont partagé avec moi leur intérêt pour le sujet.

L'histoire continue, jalonnée de réunions périodiques avec Ahmad Bsiesy, mon directeur de thèse, Raluca Tiron, Thierry Baron et Sallomé Tallegas, merci à eux pour m'avoir fourni les plaques qui ont fait toute ma thèse, pour leurs conseils ô combien précieux sur la manipulation des polymères et pour leur réactivité à remplir mes doodles. Et puis petit à petit, des collaborations se sont formées, j'ai rencontré du monde, j'ai fructueusement papoté (sisi) avec nombre de personnes : avec Yanxia Hou et Nora Reinhardt, les plus gentilles chimistes que je connaisse (et ça n'a rien à voir avec le fait qu'elles soient les seules chimistes que je connaisse), jamais à court d'idées, un grand merci à elles pour avoir su me redonner des coups de boost aux moments où j'en avais besoin ; avec Stéphane Lequien, qui a fait preuve d'une remarquable patience avec tous les dépôts et toutes les mesures que je lui ai demandées tout au long de ma thèse, qui a toujours cherché à améliorer la qualité des mesures, un grand merci pour son aide et pour les discussions pendant la rédaction et les répétitions ; avec David Béal et sa science infuse sur la manipulation des cellules (« moi j'aurais pas fait comme ça mais bon »), un grand merci pour sa disponibilité et ses conseils ô combien avisés.

Bien sûr, une grosse partie de ma thèse s'est passée en salle blanche, que serais-je devenue sans tous les membres de la PTA, je vous le demande ! Merci pour leur disponibilité et leur compétence, pour leur réactivité quand une machine tombait en panne, je leur souhaite bon courage avec ces machines capricieuses (au moins une chose qui ne me manquera pas)...!

Un grand merci à tous les membres permanents de Spintec avec qui j'ai interagi de près ou de loin, pour des raisons professionnelles ou à la cafèt !

Allez, soyez sans crainte, je ne vous oublie pas les loulous ! Je parle de tous les thésards, post-docs et stagiaires qui ont été présents pour mettre l'ambiance à Spintec et en dehors de Spintec. A tous ceux qui sont partis trop tôt (pas morts hein, juste partis) : Cécile, Pocahontas colocataire de bureau aventurière co-skieuse-snowboardeuse, toujours un grand sourire aux lèvres; Selma et son rire qu'on entend à l'autre bout du labo ; Thomas, toujours une référence de nanard en tête ; Alex L. et son cynisme à toute épreuve ; Marc et Pierre-Yves, la paire de toutes les conneries, MERCI ! A tous les autres qui sont arrivés en même temps ou après moi, qui m'ont d'abord crue sympathique et se sont

rendus compte qu'avec le stress, je deviens insupportable : Mathieu (et Minette !), merci pour les randos et les chips ; Claire, merci pour les vacances et les soirées PHELMA que l'on a passées ensemble ; Magali, merci pour ta répartie, ta curiosité, ton peps (enfin pas l'hiver parce qu'il fait froid quand même), bravo pour ta persévérance ; Léa bien sûr, colocataire de bureau depuis le début, incroyablement studieuse, patiente, sociable, discrète, compréhensible, j'en passe et des meilleures, merci pour ces 3 ans pendant lesquels on s'est serré les coudes !!

Merci également à tous ceux qui étaient là pour assurer le mélange culturel qui fait la particularité de Spintec : Lamprini, Alexu, Safeer, Kamil, Paulo... Pardon si j'oublie des noms, n'y voyez rien de personnel.

Je voudrais adresser un remerciement très particulier à Tulio « que bonita seniorita hay ! » pour sa patience, son humour, son... KAMOULOX ! Qu'est-ce que je serais devenue sans toi ! Merci pour m'avoir remonté le moral plus d'une fois, pour avoir été si pédagogique, si présent, même hors contrat (toujours pour boire une bière) ! Merci pour nos longues dissertations sur la thèse, la vie, le Mexique, l'amour ☺ , bref, merci pour ton indéfectible soutien, je garderai un excellent souvenir de cette période grâce à toi.

Un deuxième remerciement particulier va à ma ptite Kékile, mon ptit bébé que j'ai vu grandir si vite, elle faisait à peine ses premiers pas comme stagiaire que déjà elle commençait une thèse... Merci pour tout le boulot que tu as abattu, pour avoir pris du recul très vite sur ce que tu faisais (« 1 cm³ ça fait combien en m³ ?? Attends je vais faire un tableau »), pour ton humour, ton dynamisme, ton aide précieuse pour la préparation de la soutenance (spéciale dédicace à tes supers animations), pour l'initiation pole dance, et surtout pour les potins chuchotés par-dessus le bureau ! Keep in touch en tout cas !

Je crois que je n'ai oublié personne... Allez va je déconne : merci AlexLeFruit du fond du cœur, merci pour les kilos que j'ai pris à cause de ton chocolat (ah non mais c'est pas grave de toute façon j'ai que des pantalons moches trop grands, spéciale dédicace à mon jean gris), merci pour les partis de Ruzzle où je te battais à plate couture (on dit qu'un jour l'élève dépasse le maître... un jour Alex, un jour...), merci d'avoir supporté mes moments bulles sans (trop) râler, pour ton infaillible soutien pendant la rédaction de mon manuscrit, merci aussi pour ton aide scientifique, pour les conversations passées à essayer de me convaincre que « mais nooon t'es pas trop nuuuuuulle », merci pour les moult randonnées sous les étoiles ou sous le soleil (« quand est-ce qu'on arrive ? J'ai envie de faire pipi. Aaaaah ya de la neige j'aime pas marcher dans la neige j'ai peur de marcher dans la neige ! Yaurait pas un arbre à pipi ? »), merci pour les soirées passées à philosopher sur le balcon... Bref. On aura compris, merci pour tout.

Pour terminer, un petit mot à mes collègues squasheurs, avec qui j'ai pu me défouler et qui m'ont donc permis de rester zen au boulot, merci pour avoir supporté mes hauts et mes bas, pour avoir toujours été présents pour me faire oublier les soucis professionnels, pour toutes ces compétitions, stages, entraînements, baballes échangées pour le fun et bières grenadines partagées ! Au final, une thèse, c'est comme un match difficile que l'on gagnerait en cinq jeux : c'est dur, il y a des moments où l'on se sent maître de la situation, d'autres où l'on a envie de tout plaquer, et au final on y arrive, et c'est la victoire qui nous attend au bout ! Merci pour m'avoir enseigné la persévérance et la rage de gagner !

Résumé

Les nanoparticules magnétiques sont de nos jours largement exploitées dans le domaine de la recherche pour le biomédical, pour des applications aussi variées que le diagnostic, la thérapeutique ou plus récemment la théranostique. Les nombreuses méthodes de fabrication mises au point à ce jour permettent l'obtention d'une large gamme de nanoparticules en termes de taille, forme, matériaux et donc propriétés magnétiques. Le procédé de fabrication idéal est celui qui permet la fabrication simple, peu coûteuse et à grande échelle de nanoparticules parfaitement monodisperses. En ce sens, le premier volet de la thèse sera consacré à l'étude d'un nouveau procédé de fabrication basé sur la combinaison d'une approche « top-down » et « bottom-up », qui permet d'obtenir des nanoparticules de dispersion en taille très étroite. L'idée est d'exploiter les propriétés d'auto-organisation d'un copolymère dibloc, dont l'une des deux phases peut s'organiser en cylindres verticaux dans la matrice de l'autre phase sous certaines conditions. La gravure sélective des cylindres mène à l'obtention d'un masque de trous dans une matrice de polymère. On peut ensuite déposer le matériau magnétique, puis graver la matrice de polymère pour révéler les nanoparticules attachées au substrat. Si ce procédé est mené sur une couche sacrificielle, les particules peuvent être consécutivement mises en suspension. Les caractéristiques structurales et magnétiques de ces particules obtenues par auto-organisation du copolymère PS-PMMA seront étudiées, montrant que bien que ce procédé de fabrication soit encore à améliorer, il présente des avantages non négligeables en étant versatile, simple à mettre en œuvre et en permettant l'obtention de nanoparticules monodisperses et superparamagnétiques.

Dans une seconde partie, un autre domaine biomédical sera abordé : le traitement du cancer. Une méthode nouvelle et alternative aux techniques d'hyperthermie ou de délivrance ciblée de médicaments avait été initiée par l'Argonne National Laboratory en 2010 et reprise à Spintec en 2011 : l'idée est de réactiver l'apoptose (ou mort programmée) de cellules cancéreuses par vibrations magnéto-mécaniques de microparticules magnétiques attachées à leur membrane. Il avait été démontré qu'avec des champs extérieurs aussi faibles que 30 mT à 20 Hz, des disques de permalloy en configuration magnétique vortex induisent l'apoptose de façon significative. Dans ce contexte et dans l'optique de pouvoir utiliser cette méthode pour des tests cliniques, des microparticules de magnétite, matériau biocompatible, ont été fabriquées par lithographie optique via le même procédé que les disques de permalloy. Leurs propriétés structurales, magnétiques et leur comportement en suspension sont comparés, ainsi que leurs effets sur les cellules *in vitro* via l'application d'un champ magnétique extérieur. A ce jour, les particules de permalloy sont supérieures en termes d'efficacité sur le déclenchement de l'apoptose des cellules cancéreuses. Certains paramètres du protocole tels que l'amplitude du champ doivent être optimisés pour les particules de magnétite, bien que les premiers effets observés soient encourageants pour la suite.

Abstract

Magnetic nanoparticles are now used in a wide range of applications such as diagnostic, therapeutics or more recently theranostics. The numerous and diverse fabrication processes allow the fabrication of a wide range of nanoparticles in terms of size, shape, material and magnetic properties. An ideal fabrication process would allow the simple and cheap fabrication of a great quantity of monodisperse nanoparticles. In this objective, the first part of this work will be focused on a new and original fabrication process based on the combination of a “top-down” and “bottom-up” approach. The idea relies on the special auto organization properties of a diblock copolymer: one of the two phases has the ability to self organize into vertical cylinders in the matrix of the other polymer, provided that the annealing conditions are favourable. The selective etching of the cylinders leads to a mask of holes in a polymer matrix. Then, the deposit of a magnetic material and the etching of the polymer matrix leads to the formation of a hexagonal network of nanoparticles attached to the substrate. If the substrate is composed of a sacrificial layer, the nanoparticles can be released in a solution. The structural and magnetic properties of these nanoparticles fabricated via a PS-PMMA template will be studied. Their characterization will show that the process is still to be optimized but allows already to obtain monodisperse superparamagnetic nanoparticles.

A second part focuses on another biomedical applications of magnetic particles: the cancer treatment. A new technique, which is an alternative to the existing methods such as hyperthermia or drug delivery, was first proposed by the Argonne National Laboratory (2010) and taken over at Spintec (2011). The idea is to reactivate the apoptosis (programmed cell death) of cancer cells via the magneto mechanical vibrations of magnetic microparticles attached to their membranes. It was proved that weak external magnetic fields (30 mT at 20 Hz) applied on permalloy disks in a vortex configuration lead to a significant increase of the apoptotic rate of cancer cells. In the objective of making this method possible for clinical applications, biocompatible magnetite microparticles were fabricated via the same fabrication process than the permalloy disks (optic lithography). Their structural and magnetic properties are compared, as well as their behavior in a suspension and their lethal effect on cancer cells via the application of an external magnetic field. For now, the permalloy microdisks provide better results than the magnetite particles. Some parameters of the experimental set up have to be optimized for the magnetite particles, such as the amplitude of the applied magnetic field. However, the first effects observed with the magnetite particles are quite promising.

Table des matières

Chapitre 1 : Introduction générale	10
1. Utilisation de nanoparticules magnétiques en biomédecine	10
2. Principaux procédés de fabrication de nanoparticules magnétiques	12
2.1. Les voies de synthèse « Bottom-up ».....	12
2.2. Les voies de synthèse « Top-down ».....	14
3. Applications en biomédecine des nanoparticules magnétiques	16
3.1. Imagerie médicale	16
3.1.1. <i>IRM (Imagerie par Résonance Magnétique)</i>	16
3.1.2. <i>MPI (Magnetic Particle Imaging)</i>	20
3.2. Traitement du cancer	22
3.2.1. <i>Délivrance ciblée de médicaments</i>	22
3.2.2. <i>Hyperthermie</i>	24
3.2.3. <i>Réactivation de l'apoptose des cellules cancéreuses</i>	26
4. Objectifs de la thèse et annonce du plan	31
Chapitre 2 : Fabrication de nanoparticules magnétiques en utilisant une matrice réalisée <i>via</i> un copolymère à blocs	34
1. Introduction sur les copolymères à blocs – état de l'art	34
2. Procédé de fabrication	40
2.1. Description des différentes étapes techniques.....	40
2.2. Nature des nanoparticules	47
3. Etude des caractéristiques géométriques et magnétiques des nanoparticules attachées au substrat	51
3.1. Caractérisations géométriques	51
3.1.1. <i>Evolution des caractéristiques géométriques des échantillons avec la première gravure</i>	51
3.1.2. <i>Caractérisations géométriques des nanoparticules</i>	55
3.2. Caractérisations magnétiques.....	63
3.2.1. <i>Caractérisations de la magnétite pleine couche</i>	64

3.2.2.	<i>Caractérisations des nanoparticules</i>	70
3.2.3.	<i>Estimation de l'effet des interactions dipolaires sur les caractéristiques magnétiques des nanoparticules</i>	78
3.3.	Conclusion des caractérisations	84
4.	Mise en suspension et fonctionnalisation	86
4.1.	Mise en suspension	86
4.2.	Fonctionnalisation	90
5.	Conclusion générale du chapitre 2	93

Chapitre 3 : Microparticules pour la destruction de cellules cancéreuses par réactivation de l'apoptose déclenchée par vibrations magnéto-mécaniques . 94

1.	Introduction : rappel des objectifs	94
2.	Procédé de fabrication des particules par lithographie optique	97
3.	Comparaison des caractéristiques magnétiques des microparticules de permalloy et de magnétite attachées au substrat	101
3.1.	Particules de permalloy ($Fe_{20}Ni_{80}$)	101
3.2.	Particules de magnétite (Fe_3O_4)	105
4.	Comparaison des comportements en suspension des microparticules de permalloy et de magnétite	112
5.	Fonctionnalisation des microparticules	119
5.1.	Description du protocole.....	119
5.2.	Tests de vérifications.....	121
5.2.1.	<i>Efficacité de la modification de surface des microparticules mises en suspension</i> .	121
5.2.2.	<i>Problématique de la perte des microparticules</i>	123
5.2.3.	<i>Maintien de la fonction de reconnaissance des anticorps</i>	125
6.	Tests biologiques <i>in vitro</i>	128
6.1.	Culture cellulaire	128
6.2.	Test de cytotoxicité	129
6.3.	Description du protocole expérimental des tests <i>in vitro</i>	130
6.4.	Résultats	132
6.4.1.	<i>Images au microscope optique</i>	132
6.4.2.	<i>Test en fluorescence du déclenchement de l'apoptose : activation des caspases</i> ..	134

6.4.3. Test de cytométrie en flux	138
7. Conclusion générale du chapitre 3	143
Conclusion générale et perspectives	144
Bibliographie	148
Annexe 1	166
Annexe 2	167

Chapitre 1 : Introduction générale

1. Utilisation de nanoparticules magnétiques en biomédecine

L'exploitation des propriétés magnétiques de certains matériaux pour des effets thérapeutiques est l'un de plus anciens modes de guérison décrits dans la littérature, au même titre que l'application d'une source de chaleur sur une zone malade. En effet, on trouve des écrits datant de quelques siècles avant J-C et provenant de plusieurs pays (Grèce, Chine, Egypte...) relatant diverses méthodes de guérison par « fluides magnétiques ». On peut citer par exemple le conseil émis par le physicien et philosophe égyptien Avicenna d'ingérer de la poudre de magnétite (oxyde de fer) avec du lait en cas d'ingestion accidentelle de rouille, afin que la magnétite attire le fer, forme des agrégats et facilite ainsi son élimination naturelle [1].

Plus récemment, le magnétisme s'est réellement imposé en médecine à travers l'invention de l'Imagerie par Résonance Nucléaire, appelée Imagerie par Résonance Magnétique de nos jours (IRM) afin de ne pas effrayer les patients avec le terme « nucléaire » controversé. Cette technique exploite les propriétés magnétiques des protons de l'eau contenue dans le corps pour imager leur réponse à un champ magnétique extérieur. La première image IRM est réalisée en 1973 par Paul Lauterbur [2], et la première image d'un tissu humain par Peter Mansfield en 1975 [3]. Ils recevront tous deux le prix Nobel de physiologie ou médecine en 2003. La première image d'un corps humain en entier est obtenue par Damadian en 1977 [4].

Plus récemment encore, l'essor des nanoparticules magnétiques a également touché la biomédecine, puisque les premiers agents de contraste pour l'imagerie médicale sont commercialisés en France en 1989. Depuis, de nombreux domaines de recherche se concentrent sur le potentiel d'exploitation de ces nano-objets, dont l'attractivité s'explique par la flexibilité de leurs propriétés en termes de taille, forme, recouvrement de leur surface, propriétés magnétiques, etc. Cette polyvalence en fait des outils adaptés pour des domaines aussi variés que la médecine régénérative, le tri cellulaire, le diagnostic (agents de contraste en imagerie médicale), ou encore la thérapeutique (traitement du cancer). En effet, le large éventail de taille accessible par ces nanoparticules en fait des objets privilégiés pour interagir avec une vaste gamme d'éléments biologiques ayant des tailles allant de 10 nm (protéines par exemple) à 100 μ m (cellules). D'autre part, leurs propriétés magnétiques, qui dépendent également de leur taille et de leur forme en plus du matériau, les rendent actionnables par des gradients de champ ou des champs magnétiques. Dès lors, il est possible de les déplacer et de les guider à l'intérieur d'un organisme ou encore de les « activer thermiquement », effet très connu sous le nom d'hyperthermie dans le cas du traitement du cancer.

Cette flexibilité des propriétés des nanoparticules, magnétiques ou non, a donné naissance à une nouvelle plateforme d'applications en biomédecine, appelée théranostique du fait que les nanoparticules soient exploitables pour des usages simultanément en diagnostic et en thérapeutique. Elles sont alors qualifiées d'hybrides. La plupart de ces nanoparticules combinent des performances en imagerie avec des performances en traitement du cancer. Parmi elles on peut citer le produit AGuIX commercialisé par la start-up Nano-H, qui possède les capacités d'un agent de contraste ainsi que des capacités radio thérapeutiques qui ont pour effet d'augmenter l'efficacité d'une irradiation sur la zone traitée avec ces nanoparticules [5] [6]. Dans la même optique de combiner des propriétés différentes,

on peut citer l'idée d'encapsuler dans un même objet plusieurs nano-objets remplissant des fonctions différentes, comme des nanoparticules magnétiques pour guider l'ensemble *via* un champ magnétique, des molécules thérapeutiques ainsi que des nanoparticules fluorescentes pour la visualisation de l'objet [7]. On peut citer un dernier exemple de particules théranostiques pour lesquelles l'effet photothermal est combiné à des propriétés d'imagerie. L'idée est d'exploiter la différence de concentration en glucose dans une cellule saine et dans une cellule cancéreuse afin de modifier la structure et la composition de nanoparticules cœur-coquille Ag/Au et ainsi changer leurs propriétés de fluorescence et de photothérapie [8].

D'une façon générale, un grand nombre de catégories de nanoparticules peut être exploité à des fins théranostiques : liposomes, nanoparticules métalliques ou en polymère, dendrimères, nanotubes de carbone, boîtes quantiques... [9]. Pour chaque catégorie, le défi est de maîtriser la nano-fabrication en termes de taille et distribution de taille, forme, rendement, fonctionnalisation de surface, biocompatibilité, pharmacocinétique, etc. Une fois la fabrication maîtrisée, l'enjeu principal est de contrôler parfaitement le devenir de ces nanoparticules dans le corps, afin de s'assurer qu'elles n'aient pas d'autres effets que celui pour lequel elles sont employées. De nombreuses études sont alors nécessaires et montrent que la biodistribution des nanoparticules ne suit pas de règle générale : le moindre changement de paramètre peut entraîner de grandes différences dans le comportement des particules. Cela explique les nombreuses étapes précliniques et cliniques qu'il est nécessaire de valider avant de pouvoir introduire un nouveau produit sur le marché.

Nous placerons ces travaux de thèse dans leur contexte en prenant spécifiquement l'exemple de deux applications de l'utilisation de nanoparticules magnétiques dans le domaine biomédical : l'utilisation d'agents de contraste en imagerie médicale et l'utilisation de microparticules pour la réactivation de l'apoptose chez les cellules cancéreuses. Afin de définir les besoins et justifier ces travaux, nous détaillerons dans les prochaines parties les différents procédés de fabrication de nanoparticules magnétiques qui existent, ce qui nous amènera à extraire les avantages et inconvénients de chaque méthode en regard des propriétés structurales des nanoparticules. Puis nous nous intéresserons à l'exploitation de ces particules dans les deux domaines de la biomédecine que sont l'imagerie médicale et le traitement du cancer, et qui feront donc l'objet d'un état de l'art un peu plus détaillé.

2. Principaux procédés de fabrication de nanoparticules magnétiques

De nombreuses voies de synthèse de nanoparticules dédiées à des applications biomédicales ont été étudiées et sont référencées dans la littérature, dont on peut trouver quelques revues complètes [10-15], et que l'on peut catégoriser en deux classes : les voies de synthèse « bottom-up » et les voies de synthèse « top-down ».

2.1. Les voies de synthèse « Bottom-up »

Ces voies de synthèse décrivent les procédés de fabrication dans lesquels il y a nucléation puis croissance de la nanoparticule à partir d'un précurseur, et font donc souvent référence à des procédés chimiques. Les procédés les plus utilisés et investis dans la littérature sont décrits ci-dessous :

- *la coprécipitation* : cette méthode fait partie des méthodes les plus simples à mettre en œuvre pour la fabrication de nanoparticules d'oxyde de fer de diamètre inférieur à 20 nm. Lors de ce procédé, il y a précipitation en phase aqueuse d'un mélange stœchiométrique de Fe^{2+} et Fe^{3+} par une base selon la réaction typique : $\text{Fe}^{2+} + 2\text{Fe}^{3+} + 8\text{OH}^- \rightarrow \text{Fe}_3\text{O}_4 + 4\text{H}_2\text{O}$. Ensuite, le précipité d'oxyde de fer est isolé magnétiquement ou par centrifugation et traité par une base ou un acide afin de stabiliser le ferrofluide de façon électrostatique. Sa stabilisation stérique pourra ensuite être assurée en chauffant le milieu en présence d'un agent stabilisant tel que l'acide oléique par exemple [16-22].

La taille et la composition des nanoparticules sont déterminées par des paramètres tels que la nature du solvant, la concentration et la nature des sels présents dans le milieu aqueux, le pH ou encore le temps et la température de la réaction. La dispersion en taille des particules fabriquées par cette méthode est cependant difficile à contrôler, dans la mesure où il est difficile de contrôler la vitesse de nucléation puis de croissance des grains. Les valeurs reportées dans la littérature varient entre 15% [10] et 20% [23]. De plus, bien que facile à réaliser, cette méthode présente comme principal inconvénient une tendance des particules à s'agréger en fin de fabrication [24]. Néanmoins, de plus en plus d'études reportent l'amélioration du procédé de base afin d'éviter les étapes de tri sélectif pour diminuer la dispersion en taille ou encore afin d'éviter les procédés additionnels d'échanges de ligands pour en faire des particules solubles en milieux aqueux [25-27].

- *La décomposition thermique* : il s'agit de la germination et croissance de cristaux à partir de la décomposition d'un précurseur métallique dans un solvant organique ayant des températures d'ébullition élevées et en présence d'agents tensio-actifs stabilisants, qui permettent la stabilisation *in situ* des particules et évitent donc leur agrégation en solution. Cependant, en ce qui concerne la fabrication de particules d'oxyde de fer, leur composition ne peut être que partiellement maîtrisée, dans la mesure où les particules obtenues sont en majeure partie composées d'un mélange de maghémite et de magnétite de concentrations relatives variables. La taille et la morphologie des particules sont maîtrisées par des paramètres tels que la température, la durée de la réaction, la période de vieillissement ainsi que les rapports entre le solvant, les composés précurseurs et les agents tensio-actifs. Avec une dispersion en taille des particules comprise entre 5 et 10%, cette méthode fait actuellement partie des meilleures en ce qui concerne la fabrication de particules monodisperses [28-36].
- *Les microémulsions* : une microémulsion est un mélange thermodynamiquement stable de deux liquides non miscibles, dont l'un ou les deux vont former des microgouttes stabilisées par

un film superficiel d'agent tensio-actif. Ces micelles, si elles contiennent des sels métalliques, peuvent être utilisées en tant que réacteurs pour la fabrication de nanoparticules en fusionnant par collisions, permettant aux sels de former un précipité. L'ajout d'un solvant permet de filtrer la suspension et de récupérer le précipité. Cette technique permet d'obtenir des particules dont la taille peut descendre jusqu'à 4 nm [37] [38] [39] [40]. Outre la complexité de sa mise en œuvre, elle a pour principal inconvénient un faible rendement, dû aux importants volumes de solvant nécessaires pour synthétiser des quantités raisonnables de matériau. Cette technique peut également être employée pour la fonctionnalisation des particules [41].

- *La méthode polyol* : un polyol (« poly-ol ») est un composé possédant plusieurs groupes hydroxyles (-OH). Ces alcools sont encore souvent désignés par le terme glycol. L'hydrolyse de sels métalliques dans des solvants polyols est une technique de fabrication de nanoparticules, dans la mesure où ces solvants présentent une forte permittivité diélectrique ($\epsilon > 30$) et permettent donc la dissolution d'un grand nombre de sels inorganiques [42-46].
- *La voie microbienne* : la dernière méthode que nous citerons ici est la fabrication de particules d'oxyde de fer par certaines bactéries, dites magnétotactiques. Celles-ci ont la capacité de réduire les ions Fer pour synthétiser des particules de magnétite Fe_3O_4 dans certaines conditions d'atmosphère et de température. On parle de magnétosomes, particules magnétiques entourées d'une bicouche lipidique. Il est supposé que les bactéries se servent de ces particules comme boussole pour s'orienter selon le champ magnétique terrestre pendant leur recherche de conditions de vie optimales. Ces particules ont attiré l'attention des chercheurs ces dernières années pour plusieurs raisons: outre leurs propriétés structurales et magnétiques très intéressantes pour des applications dans le biomédical, elles présentent l'avantage d'être biocompatibles et déjà fonctionnalisées en fin de procédé. On peut ainsi directement les exploiter en s'affranchissant d'une étape supplémentaire de fonctionnalisation. Les particules ainsi obtenues possèdent en général un diamètre compris entre 30 et 50 nm [47-49].

De nombreuses autres techniques de fabrication de nanoparticules sont détaillées dans la littérature (méthode sol-gel [50] [51], hydrothermale [52], méthode par aérosol/vapeur [53], méthode électrochimique [54], sonochimique [55]...) et ne seront pas reprises ici, celles-ci étant exploitées à moins grande échelle.

Les principales caractéristiques des particules fabriquées *via* les différentes méthodes décrites ci-dessus sont résumées dans le Tableau 1 :

Méthode	Coprécipitation	Décomposition thermique	Microémulsions	Méthode polyol
Synthèse	Simple	Complexe	Complexe	Simple
Durée de la réaction	Minutes	Heures / Jours	Heures	Heures
Température de réaction (°C)	20-90	100-500	20-50	>180
Taille (nm)	<20	<20	<50	<10
Dispersion en taille	15 - 20%	5 - 10%	15 - 20%	5 - 10%
Rendement	++	++	-	-
Avantages	Simple	Contrôle de la forme et de la taille	Contrôle de la forme	Contrôle de la forme / synthèse de nanocomposites
Inconvénients	Formation d'agrégats / pas de contrôle sur l'état d'oxydation	Difficulté de stabiliser en milieu aqueux / Pas de contrôle de l'état d'oxydation	Difficulté d'extraire le surfactant	Présence d'une matrice

Tableau 1. Comparaison des principaux procédés de synthèse de nanoparticules.

Il est à noter que quelques procédés de synthèse combinant plusieurs techniques sont reportés dans la littérature comme permettant la fabrication de particules (d'oxyde de fer ou d'or le plus souvent) ayant une dispersion en taille de 8% [56], 5% [14] [57], voire 3% [36], ce qui s'avère être la meilleure dispersion en taille reportée à ce jour. Ces procédés restent cependant à ce jour encore marginaux.

En résumé, chaque méthode présente ses avantages et ses inconvénients. Le choix d'une méthode doit donc se faire en établissant le cahier des charges que les particules doivent respecter. Dans le cas d'applications biomédicales, le premier critère à respecter est en général une distribution en taille la plus étroite possible afin que les particules présentent des propriétés les plus homogènes possibles. A ce jour, la technique « bottom-up » la mieux maîtrisée concernant ce paramètre est la décomposition thermique, qui reste tout de même une méthode relativement complexe.

2.2. Les voies de synthèse « Top-down »

Ce terme regroupe les techniques issues de la microélectronique et qui consistent à déposer le matériau en couches minces sur un substrat structuré par des techniques de lithographie. Parmi ces techniques, on peut citer la lithographie optique, la lithographie par faisceau d'électrons (e-beam lithography) ou encore la nanoimpression. Des réseaux de particules peuvent ainsi être formés sur des motifs pré-structurés, et peuvent ensuite être dispersés dans une solution par des techniques de lift-off.

- *La lithographie optique* consiste à exposer une résine photosensible à une radiation lumineuse à travers un masque sur lequel sont dessinés les motifs. La résolution accessible est fonction de la longueur d'onde et peut être au mieux de l'ordre du micron pour la DUV (Deep UltraViolet lithography, de longueur d'onde 250 nm).

- *La lithographie électronique* est en ce sens plus performante, puisque la résolution accessible est d'environ 10 nm. Les motifs sont tracés directement par le faisceau d'électrons sur une résine électrosensible. Elle a cependant l'inconvénient d'être très lente à mettre en œuvre et ne permet donc pas de lithographier de grandes surfaces.
- *La nanoimpression* consiste en la reproduction d'un motif sur un substrat par impression du moule comprenant le motif inversé en relief sur une résine thermoplastique [58] [59]. Bien que les meilleurs résultats jusqu'ici tendent plutôt vers des résolutions de l'ordre de 20-30 nm, il a été montré que la résolution ultime pourrait être inférieure à 10 nm.

Le premier avantage de ces techniques est qu'elles permettent de fabriquer des particules quasi monodisperses. Ensuite, elles rendent possible et facile la fabrication de particules de forme anisotrope. Ce sont cependant des techniques limitées par la résolution accessible. En effet, la meilleure d'entre elle de ce point de vue permet de fabriquer des particules de diamètre minimum égal à 10 nm, contre 2 nm pour certaines techniques « bottom-up ». Elle présente de plus l'inconvénient d'être relativement longue et coûteuse.

En conclusion, toutes ces techniques donnent accès, plus ou moins facilement, à un large éventail de nanoparticules de propriétés structurales différentes en termes de forme, taille et matériau, qui sont modulables en fonction de l'application visée. Ces nanoparticules sont donc exploitables pour une large gamme de domaines de recherche.

3. Applications en biomédecine des nanoparticules magnétiques

Comme nous l'avons déjà évoqué, les nanoparticules sont des objets d'intérêt pour de plus en plus d'applications dans le domaine du biomédical, qu'elles soient composées de matériaux métalliques ou organiques. Afin de placer ces travaux de thèse dans leur contexte, nous décrivons dans ce paragraphe deux de ces principaux domaines de recherche, l'imagerie médicale et le traitement du cancer.

3.1. Imagerie médicale

L'imagerie médicale est un domaine qui a vu le jour à la fin du XIX^{ème} siècle avec les travaux de W. Röntgen sur la radiographie. Elle regroupe de nos jours de nombreuses techniques telles que la radiographie, l'échographie, la tomographie, l'imagerie par résonance magnétique (IRM), l'IRM fonctionnelle, etc. Nous nous intéresserons dans ce paragraphe aux techniques ayant un lien avec l'utilisation de nanoparticules magnétiques : l'IRM et la MPI (Magnetic Particle Imaging).

3.1.1. IRM (Imagerie par Résonance Magnétique)

a - Principe de fonctionnement

L'IRM est basée sur la détection et la cartographie du signal RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) émis par les protons d'hydrogène des tissus biologiques soumis à un champ magnétique extérieur. Ce phénomène a été découvert par Bloch et Purcell en 1946 et leur a valu le prix Nobel en 1952. Un champ magnétique statique est appliqué (typiquement 1,5 T ou 3 T pour la plupart des examens), ce qui a pour effet d'aligner les moments magnétiques de spin des protons parallèlement ou antiparallèlement à ce champ. Cette magnétisation des tissus s'effectue *via* un phénomène de précession à une fréquence appelée fréquence de Larmor, qui dépend du facteur gyromagnétique γ et de l'amplitude du champ B_0 : $f_L = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$.

A l'équilibre thermodynamique et en présence d'un champ magnétique extérieur, les moments magnétiques des protons peuvent prendre deux valeurs correspondant à deux niveaux d'énergie. Ces deux niveaux d'énergie sont séparés par un gap proportionnel à l'amplitude du champ (Figure 1). La meilleure stabilité du niveau fondamental (parallèle) induit un léger surnombre des moments parallèles, rendant possible la mesure de l'aimantation, globalement parallèle au champ :

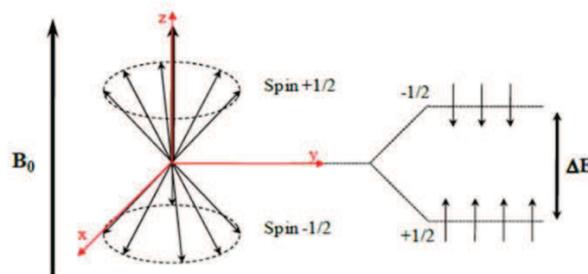


Figure 1. Barrière d'énergie séparant les deux états possibles pour les moments à l'équilibre thermodynamique. Figure extraite de la référence [60].

Par la suite, un champ RF de faible amplitude est appliqué à la fréquence de Larmor perpendiculairement au champ statique, de façon à faire entrer les moments magnétiques de spin des protons en résonance. Lorsque le champ alternatif est coupé, le système retourne à son état

d'équilibre, l'aimantation subit alors un phénomène de relaxation, lequel se traduit par deux constantes de temps (Figure 2):

- le recouvrement de l'aimantation longitudinale est caractérisé par T_1 , temps au bout duquel 63% de l'aimantation parallèle au champ appliqué est récupérée. Il est aussi appelé constante de temps « spin-réseau », puisque ce phénomène est dû à la restitution de l'énergie absorbée par échanges thermiques avec l'environnement du proton. Ces échanges ont lieu à des vitesses différentes selon le type de tissu.
- La diminution de la composante transverse de l'aimantation est caractérisée par T_2 . Cette constante, aussi appelée constante de temps « spin-spin », correspond au temps au bout duquel l'aimantation transverse a baissé de 37%. Elle traduit une décohérence progressive des spins entre eux lors de la relaxation. Elle est due à des inhomogénéités locales du champ magnétique, ce qui cause la perte de cohérence de phase des spins.

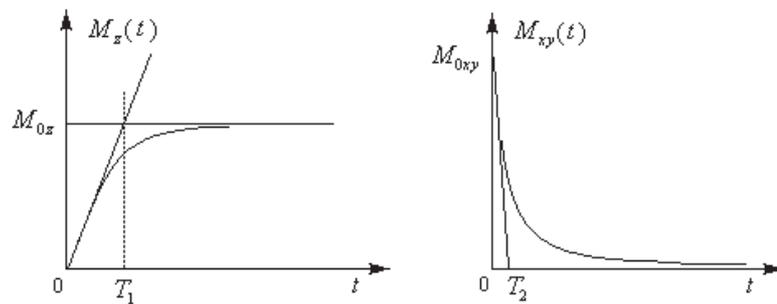


Figure 2. Temps de relaxation longitudinal et transverse caractéristiques du retour de l'aimantation à l'équilibre.

De même que T_1 et T_2 , la densité de spin (correspondant à la densité de protons) est également un paramètre caractéristique du tissu étudié. L'image est créée de façon à accentuer particulièrement l'un de ces trois paramètres, on parle alors d'image pondérée en T_1 , en T_2 ou en densité de spins.

Il y a plusieurs méthodes pour créer une image, mais toutes consistent en une série de pulses dans laquelle le 1^{er} signal RF est suivi d'un ou plusieurs autres pulses avant que la relaxation ne soit achevée (séquence écho de spin ou écho de gradient par exemple). L'image est acquise en appliquant des gradients de champ en plus du champ statique de façon à coder le signal dans l'espace [61].

b - Agents de contraste pour l'IRM

La différence de densité en protons des tissus permet donc d'obtenir des images contrastées. Cependant, cette différence entre deux tissus étant au maximum de 15%, elle peut se révéler insuffisante dans certains cas. Ainsi, le recours à des agents de contraste est nécessaire dans environ 30% des examens IRM. Le but des agents de contraste est d'augmenter la vitesse de relaxation des protons du tissu étudié, effet qui se mesure par leur relaxivité :

$$R_{1,2} = R_{1,2}^0 + r_{1,2}C$$

avec $R_{1,2}$ le taux de relaxation $1/T_1$ ou $1/T_2$ en présence de l'agent de contraste, $R_{1,2}^0$ le taux de relaxation en l'absence de l'agent de contraste, et C la concentration en agent de contraste (en mM.L^{-1}). Le taux de proportionnalité $r_{1,2}$ est appelé relaxivité (en $\text{L.s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$) et traduit l'augmentation du taux de relaxation des protons par unité de concentration d'agent de contraste. C'est donc l'effet de

l'agent de contraste sur les protons environnants qui est mesuré en IRM, et non le moment magnétique de l'agent de contraste en lui-même.

L'agent de contraste agit sur son environnement au travers de deux phénomènes complexes : le principe de sphère interne et le principe de sphère externe. Selon les caractéristiques de l'agent de contraste, l'un ou l'autre de ces phénomènes est en général prédominant. Brièvement, le principe de sphère interne fait référence à des phénomènes d'interactions dipolaires entre le cœur magnétique de l'agent de contraste et les molécules d'eau qui y sont liées par liaisons hydrogène (on parle de molécules situées dans la région de solvatation de l'agent de contraste). S'ensuivent des échanges chimiques entre ces molécules d'eau liées et les molécules libres, permettant le transfert de la relaxation. S'agissant d'un phénomène d'échanges avec l'environnement de l'agent de contraste, l'effet principal de ce phénomène est de diminuer le temps de relaxation T_1 . Le phénomène de sphère externe fait référence à l'effet longue distance de l'hétérogénéité du champ magnétique généré par une particule magnétique. Ce gradient de champ va accélérer le déphasage des moments magnétiques des protons des molécules d'eau situées à proximité de la particule, entraînant une diminution du temps de relaxation T_2 [62].

De nombreux modèles théoriques aboutissent à des formules qui donnent les temps de relaxation en fonction des temps caractéristiques de diffusion des molécules d'eau, de relaxation électronique ou encore en fonction des propriétés magnétiques et structurales des agents de contraste. Quel que soit le modèle, il en ressort que les temps de relaxation sont toujours dépendants des propriétés structurales et magnétiques des particules utilisées en tant qu'agent de contrastes, telles que leur diamètre ou leur moment magnétique [62] [63]. Or, ces paramètres sont sensibles à la dispersion en taille des particules, qui se traduit par une dispersion des temps de relaxation des protons. Cette dispersion influe directement sur le contraste obtenu, qui montre des différences liées aux différences entre agents de contraste et non plus aux différences de milieu tissulaire. D'où l'importance du critère de dispersion en taille étroite pour les nanoparticules utilisées en tant qu'agent de contraste pour l'imagerie médicale afin d'éviter ces effets d'amoindrissement de la qualité des images.

Pour finir, les agents de contraste sont en général classés en fonction de leur effet sur les temps de relaxation: on parle d'agent de contraste « positif » pour une particule qui augmente la vitesse de relaxation longitudinale $1/T_1$, et « négatif » si elle augmente la vitesse de relaxation transverse $1/T_2$. Plusieurs types de particules sont conçus pour avoir l'effet désiré sur ces temps de relaxation, les plus utilisés étant les agents de contraste paramagnétiques pour les agents « positifs » (type chélates de gadolinium Gd^{3+}) et les agents de contraste superparamagnétiques pour les agents « négatifs », que nous allons décrire brièvement.

Agents de contraste paramagnétiques :

Ces particules sont appelés agents de contraste positifs dans la mesure où leur principe d'action correspond au phénomène de sphère interne. Ils ont pour effet principal de diminuer T_1 , ce qui augmente le signal mesuré et fait apparaître en blanc la zone concernée.

Les 1^{ers} agents de contraste commercialisés en 1988/1989 sont les chélates de Gadolinium Gd-DTPA (agents linéaires) et Gd-DOTA (agents macrocycliques).

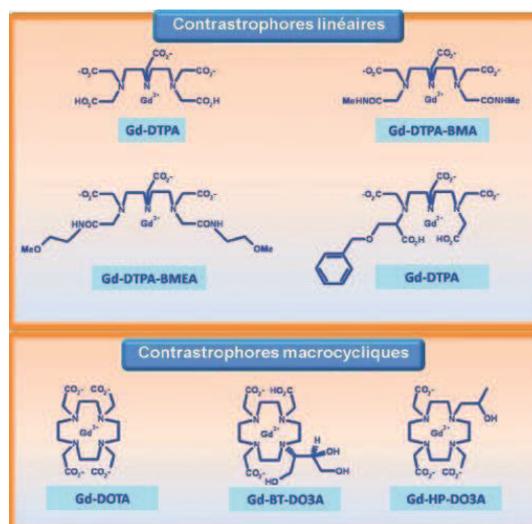


Figure 3. Schéma des différentes stratégies de stabilisation des ions Gd^{3+} en vue de leur utilisation en tant qu'agents de contraste. Figure extraite de la référence [64].

L'ion Gd^{3+} est très approprié en tant qu'agent de contraste puisqu'il possède 7 électrons non appariés et donc un fort signal paramagnétique. Cependant, son rayon ionique, très proche de celui de l'ion calcium, le rend toxique en lui permettant d'entrer en compétition avec le calcium présent dans le corps. C'est pourquoi il est nécessaire de le fonctionnaliser de façon très stable. Plusieurs structures sont possibles, la plus stable étant la structure macrocyclique (Figure 3).

Ces agents de contraste ne sont pas spécifiques, c'est-à-dire qu'après leur injection orale ou intraveineuse, ils se dispersent dans le milieu biologique sans cibler d'organe spécifique. Selon leur taille, ils sont plus ou moins rapidement éliminés par les reins. Le Tableau 2 recense quelques agents de contraste paramagnétiques commerciaux à base de gadolinium et leur relaxivité.

Nom de marque	Nom de marque européen	Relaxivité r_1 à 0,47 T ($L \cdot mmol^{-1} \cdot s^{-1}$)	Société / pays
Gadobutrol	Gadovist®	3,7	Bayer-Schering / Allemagne
Gadoteridol	Prohance®	3,7	Bracco / Italie
Gadopentetate dimeglumine	Magnevist®	3,8	Bayer-Schering / Allemagne
Gadoterate meglumine	Dotarem®	3,5	Guerbet / France
Gadodiamide	Omniscan®	3,8	Nycodem / Norvège
Gadobenate dimeglumine	Multihance®	4,8	Bracco / Italie

Tableau 2. Agents de contrastes paramagnétiques commerciaux à base de gadolinium et leur relaxivité. Extrait de la référence [60].

Agents de contraste superparamagnétiques :

Ces particules sont appelées agents de contraste négatifs dans la mesure où leur principe d'action correspond au phénomène de sphère externe. Ils ont donc pour effet principal de diminuer T_2 , ce qui diminue le signal mesuré, et fait apparaître en noir la zone concernée.

Ce sont pour la plupart des oxydes de fer et sont eux-mêmes classés en différents groupes selon leur diamètre hydrodynamique :

- Les SPIO (Super Paramagnetic Iron Oxydes) ont un diamètre hydrodynamique supérieur à 50 nm. Ils sont assez gros pour être rapidement détectés par le système immunitaire et on les retrouve donc principalement dans le foie ou dans le système réticuloendothélial (RES). Ils sont par exemple utilisés pour imager les tumeurs du foie, lesquelles sont déficientes en cellules immunitaires et donc contrastées par rapport au reste du foie.
- Les USPIO (Ultra small Super Paramagnetic Iron Oxydes) ont un diamètre hydrodynamique inférieur à 50 nm. Ils sont assez petits pour éviter la détection massive par les macrophages du système immunitaire et ont donc une durée de vie dans le sang plus longue par rapport aux SPIO. Ils peuvent être utilisés en angiographie (imagerie des vaisseaux sanguins).

Le Tableau 3 recense quelques agents de contraste superparamagnétiques commerciaux et leur relaxivité.

Nom de marque européen	Diamètre hydrodynamique (nm)	Voie d'administration	Dose	Relaxivité r_2 à 0,47 T ($L \cdot mmol^{-1} \cdot s^{-1}$)
^a Lumirem®	300	Orale	1,5-3,9 mM ¹ (400-600 mL)	72
^a Endorem®	80-150	SPIO injecté	15 $\mu mol_{Fe} \cdot kg^{-1}$	98-107
^b Resovist® ou Clavist®	62	SPIO injecté	8 $\mu mol_{Fe} \cdot kg^{-1}$	151-188
^a Sinerem® (abandonné en 2007)	20-40	USPIO injecté	14-30 $\mu mol_{Fe} \cdot kg^{-1}$	35-53

Tableau 3. Agents de contraste commerciaux superparamagnétiques et leur relaxivité. Extrait de la référence [60].

3.1.2. MPI (Magnetic Particle Imaging)

Le principe de « l'imagerie à particules magnétiques » a été proposé en premier par Gleich & Weizenecker en 2005 [65] et présente plusieurs avantages par rapport à l'IRM, entre autres la possibilité d'atteindre de meilleures résolutions et sensibilités avec l'application de champs de moindre amplitude. Cette technique est basée sur la réponse non linéaire d'un matériau ferromagnétique ou superparamagnétique à un champ magnétique appliqué.

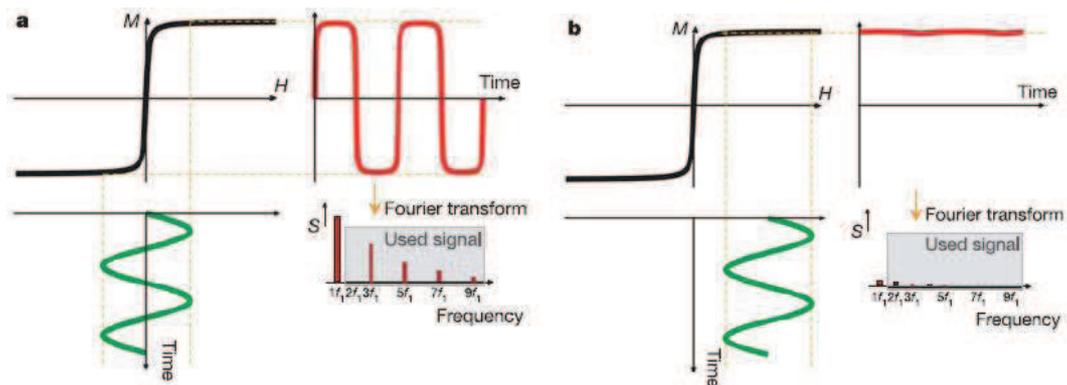


Figure 4. Principe de la MPI : un matériau présentant une courbe d'aimantation avec une forte susceptibilité peut être détecté par les harmoniques générés par la partie linéaire de son cycle. Image extraite de la référence [65].

L'idée est donc de mesurer directement la présence de « traceurs » magnétiques dans le corps, contrairement à l'IRM, dans lequel c'est l'effet de la particule qui est mesuré. La sensibilité est donc bien meilleure dans le cas de la MPI.

Principe : si le champ appliqué reste dans la zone où le matériau n'est pas saturé, son aimantation varie en fonction du temps et sa transformée de Fourier génère des harmoniques significatives (Figure 4 a). Si en revanche le champ appliqué est dans le domaine de saturation, l'aimantation est quasiment indépendante du temps et les harmoniques générés sont beaucoup plus faibles (Figure 4 b). Pour coder l'image dans l'espace, un gradient de champ est créé (entre 2 et 8 T.m⁻¹), de façon à saturer toutes les particules sauf celles présentes en un « point » (la taille du « point » étant relative à la résolution de la méthode). En scannant la zone à imager par ce gradient de champ et en cartographiant les harmoniques générés, il est possible de créer une image.

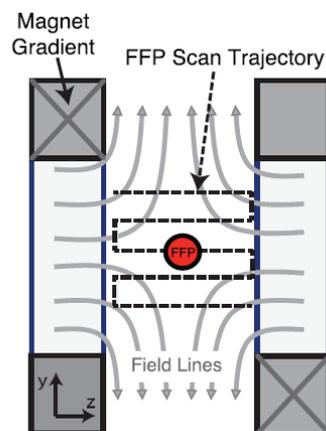


Figure 5. Principe de la MPI : un fort gradient de champ magnétique est créé, de manière à obtenir l'extinction du champ en un point définissant une zone appelée FFP (Field Free Point), où l'amplitude du champ magnétique est plus faible que celle du champ de saturation de la particule magnétique. Les particules situées en ce point et dans son voisinage ne sont pas saturées et émettent un signal mesurable. Hors de cette zone, les particules sont saturées et n'émettent aucun signal. Image extraite de la référence [66].

En ce qui concerne le cahier des charges des particules, celui-ci dépend d'une part du matériau utilisé et est d'autre part un compromis entre l'optimisation de plusieurs paramètres. Le cycle d'hystérésis

idéal pour cette application est un cycle avec une très forte susceptibilité à l'origine (un faible champ de saturation) et une forte aimantation à saturation, afin de générer autant d'harmoniques que possible en appliquant un champ aussi faible que possible. Pour cela, il semble logique de se tourner vers des volumes magnétiques importants. Cependant, les particules doivent également être capables de suivre les changements du champ appliqué, dont la fréquence doit être la plus élevée possible afin d'améliorer la résolution spatiale et temporelle. Or, plus le diamètre est élevé, plus les relaxations de Brown et de Néel sont élevées, ce qui va donc à l'encontre du premier critère [67] [68]. C'est pourquoi les particules étudiées jusqu'ici ont un diamètre compris entre 30 et 60 nm en fonction du matériau.

D'autre part, de la même façon que pour des agents de contraste pour l'IRM, la taille n'est pas le seul critère essentiel, mais la dispersion en taille joue également un rôle important : plus les particules sont dispersées autour de la taille optimale (qui donne le meilleur signal dans les conditions de concentration et de champ choisies), moins il y aura de matière magnétique contribuant au signal harmonique, ce qui réduit donc la sensibilité de la mesure pour une concentration donnée [69] [70].

En résumé, on retiendra que l'efficacité des agents de contraste et des traceurs magnétiques en imagerie médicale, qu'ils soient paramagnétiques ou superparamagnétiques, dépend non seulement de leurs propriétés magnétiques mais également structurales, et en particulier de leur dispersion en taille, qui doit être la plus étroite possible. Nous avons vu dans la section 2.1 que les meilleures dispersions en taille facilement accessibles par les voies de synthèse les plus communes sont comprises entre 5% et 10%.

Ces techniques d'imagerie IRM sont de nos jours largement utilisées dans le domaine du diagnostic médical, la technique MPI étant plus récente. En particulier, ces techniques visent la détection de cellules et tumeurs cancéreuses présentes dans un organisme vivant et le suivi de leur évolution. Pour cela, les nanoparticules magnétiques utilisées peuvent être fonctionnalisées de manière à cibler spécifiquement les cellules cancéreuses et permettre leur localisation.

Au-delà du diagnostic, les micro ou nanoparticules magnétiques sont également étudiées pour leur utilisation dans les thérapies ciblées du cancer, présentées dans le paragraphe suivant. Les particules exploitées pour l'imagerie et celles utilisées pour le traitement du cancer vont répondre à des impératifs différents, avec des propriétés adaptées.

3.2. Traitement du cancer

Nous résumons dans cette partie les techniques les plus investies dans le domaine des traitements ciblés du cancer, avant de terminer par les techniques les plus récentes et les plus prometteuses.

3.2.1. Délivrance ciblée de médicaments

De nombreux articles font référence à l'utilisation de nanoparticules pour la délivrance ciblée de médicaments, laquelle peut être soit passive soit active. La délivrance de médicaments passive fait référence au transport par diffusion ou convection de nanoparticules à travers le réseau capillaire entourant la tumeur, lequel présente une porosité plus élevée qu'un réseau capillaire sain. Ces nanoparticules sont introduites dans l'interstitium de la tumeur, où elles s'accumulent sous l'effet EPR (Enhanced Penetration and Retention) dû au dysfonctionnement du réseau lymphatique dans une tumeur cancéreuse. Les spécifications en terme de taille et de charge de surface dépendent dans ce

cas de la tumeur visée : des particules de diamètre hydrodynamique inférieur à 10 nm sont sujettes à élimination par voie rénale, tandis que des particules de diamètre supérieurs à 100 nm sont sujettes à opsonisation, c'est-à-dire adsorption de protéines à leur surface et détection par les macrophages (phagocytes), ce qui conduit à leur évacuation par le RES (Reticulum Endothelial System, système réticulo-endothélial). Elles se répartissent alors entre le foie, les poumons, la rate et la moelle osseuse.

Pour éviter cette reconnaissance immédiate par le système immunitaire et prolonger la demi-vie des particules dans le sang, différentes stratégies de fonctionnalisation ont été étudiées [71]. La plus connue et la plus efficace d'entre elles consiste à modifier la surface de la particule en y greffant des PEG (PolyEthylène Glycol), chaînes carbonées qui favorisent la stabilisation stérique des nanoparticules et limitent l'adsorption de protéines, limitant ainsi leur reconnaissance par les cellules du système immunitaire (Figure 6).

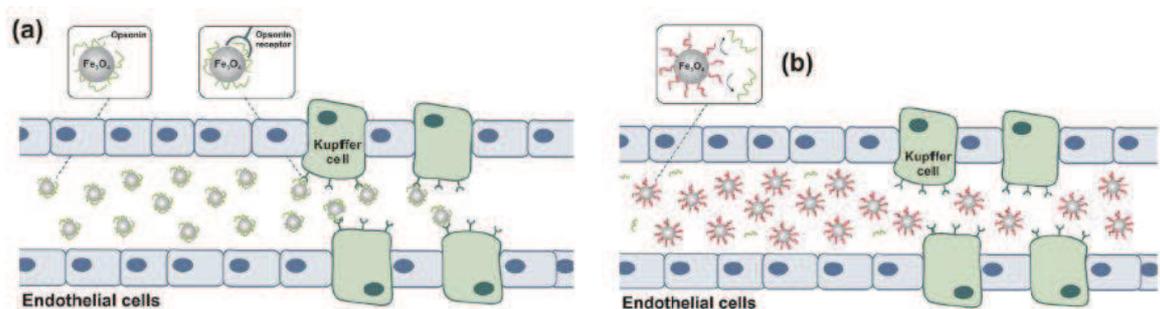


Figure 6. Schéma de principe de l'augmentation de la furtivité des particules en fonction de leur fonctionnalisation. (a) Nanoparticules non fonctionnalisées et adsorbées par les cellules du système immunitaire (b) Nanoparticules fonctionnalisées, non reconnues par le système immunitaire. Figure extraite de la référence [11].

De plus, les différentes stratégies de fonctionnalisation permettent de faire de la délivrance de médicaments active ou ciblée, qui fait référence au greffage à la surface des particules de molécules type anticorps qui vont permettre la reconnaissance spécifique de certaines cellules. Enfin, on peut également distinguer la délivrance de médicaments physique, qui fait référence au guidage des particules à l'aide d'une source extérieure, notamment un champ magnétique si les particules sont magnétiques [72-75].

De nombreux types de nanoparticules ont également été étudiés pour cette application, que l'on peut classer en plusieurs catégories : les dendrimères, les micelles, les nanosphères, les nanocapsules, les fullerènes et nanotubes et les liposomes. On peut également classifier ces particules en fonction du matériau utilisé : polymère, matériau inorganique non magnétique tel que l'or ou la silice mésoporeuse, matériau inorganique magnétique tel que l'oxyde de fer ou encore matériau à base de carbone comme le graphène. A ce jour, relativement peu de systèmes nanométriques ont passé les étapes cliniques et ont été approuvés par la FDA (Food and Drug Administration). Parmi ceux-là, on peut citer le liposome PEG-doxorubicin (Doxil) et le liposome daunorubicin (DaunoXome) approuvés aux Etats-Unis et le liposome doxorubicin sans PEG (Myocet) approuvé en Europe [76].

Les enjeux actuels en ce qui concerne l'élaboration de nanoparticules pour la délivrance de médicaments est de comprendre en détail les paramètres qui influencent leur biodistribution une fois qu'elles ont été injectées, lesquels sont extrêmement nombreux (taille, forme, matériau, charge de surface, voie d'administration...) [11] [77] [78].

3.2.2. Hyperthermie

Le terme d'origine grecque « hyperthermie » signifiant surchauffe désigne la technique médicale qui consiste à appliquer une source de chaleur à l'endroit de la zone à guérir. En ce qui concerne le traitement du cancer, c'est sans doute une des méthodes de guérison la plus ancienne référencée dans la littérature. Elle est en effet mentionnée dès 5000 avant JC dans le Papyrus chirurgical d'Edward Smith [79] qui proposait alors de cautériser la tumeur d'un cancer du sein en appliquant sur la peau une source chaude. Le principe de l'hyperthermie est de chauffer la zone tumorale jusqu'à obtenir une destruction de la tumeur en préservant au mieux les tissus sains avoisinants. La méthode profite du fait qu'une tumeur cancéreuse est moins bien irriguée qu'un tissu sain, les vaisseaux sanguins étant plus serrés entre eux et présentant une architecture plus chaotique. Ainsi, alors que les vaisseaux sanguins d'un tissu sain peuvent se dilater et dans une certaine mesure dissiper la chaleur à laquelle ils sont soumis si besoin, les vaisseaux sanguins d'un tissu malade en sont beaucoup moins capables, ce qui résulte en une augmentation de la température au sein de la tumeur, une accumulation de produits métaboliques nocifs, une augmentation de l'acidité et peut aboutir à la destruction des cellules cancéreuses.

L'hyperthermie la plus concernée par les recherches actuelles est celle qui permet d'atteindre un chauffage des cellules compris entre 41°C et 45°C et qui est souvent utilisée en combinaison avec les méthodes bien connues de radio ou chimiothérapie. L'efficacité de cette méthode dépend du temps de traitement ainsi que du type de tissu traité et de son ciblage.

On peut distinguer différents types d'hyperthermie en fonction de la méthode de chauffage. Nous nous intéresserons particulièrement à l'hyperthermie magnétique, qui fait référence à l'utilisation de particules magnétiques pour produire la chaleur au sein de la tumeur, lesquelles peuvent être sous forme de ferrofluides ou de suspensions contenant les micro ou nanoparticules magnétiques. Cette méthode se justifie par le besoin de traiter des zones très locales, et donc d'aller vers des méthodes certes invasives, mais qui n'affectent que la tumeur.

En ce qui concerne le principe de fonctionnement de l'hyperthermie magnétique, il est basé sur la production de chaleur par les particules magnétiques lorsque celles-ci sont soumises à un champ magnétique alternatif de suffisamment fortes fréquences (centaine de kHz à GHz) et d'amplitudes d'une dizaine de mT. On peut expliquer théoriquement ce phénomène par deux principaux mécanismes, qui peuvent avoir lieu en même temps bien que l'un des deux soit en général dominant en fonction des dimensions des particules, de leur composition et des conditions expérimentales :

- la chaleur est produite par la variation de l'aimantation dans les particules magnétiques;
- la chaleur est générée par la rotation mécanique des particules elles-mêmes dans le fluide s'échauffant alors par frottements visqueux.

Dans le premier cas, de façon plus détaillée, on peut encore séparer deux mécanismes à l'origine de la production de chaleur : on parle de pertes par hystérésis ou de pertes par susceptibilité ou relaxation [80-83]. Ces mécanismes sont dus d'une façon générale au couplage entre les moments magnétiques atomiques et le réseau cristallin et dépendent en premier lieu de la configuration magnétique de la particule (liée à ses dimensions, forme, et composition) mais également du champ appliqué

relativement au champ d'anisotropie de la particule, de l'environnement fluide ou fixe, de la température...

- Pertes par hystérésis : un matériau sous forme de micro ou nanoparticules a une configuration magnétique qui dépend du diamètre de ces particules. Au-dessus d'un certain diamètre, généralement micrométrique, il est en configuration multi-domaines et son cycle d'hystérésis présente une ouverture de cycle avec un champ coercitif et une rémanence non nuls, dépendants de la fréquence. Pour des diamètres inférieurs, les particules deviennent monodomaines, leur cycle étant décrit par le modèle de Stoner Wohlfarth. L'énergie dissipée par ces types de particules lorsque l'on parcourt le cycle en retournant l'aimantation est proportionnelle à son aire. Elle dépend de l'amplitude du champ ainsi que de l'anisotropie magnétocristalline des particules, puisqu'elle dépend en réalité des mécanismes de retournement de l'aimantation (mode uniforme ou non). Pour une même amplitude et fréquence de champ, la capacité d'échauffement de particules d'un même matériau sous forme de nanoparticules peut varier de plusieurs ordres de grandeur en fonction de leur taille, leur forme et leur microstructure.
- Pertes par relaxation de Néel (rotation de l'aimantation dans la particule) : en diminuant encore la taille des particules, on atteint un volume critique en dessous duquel la particule nanométrique devient superparamagnétique. Le parcours du cycle d'hystérésis statique ou « en phase » n'engendre plus de pertes de chaleur, puisque la rémanence et le champ coercitif sont nuls. Le retournement de l'aimantation se fait alors par le phénomène de relaxation de Néel. De même que pour les pertes par hystérésis, la perte d'énergie est due au retard entre le retournement de l'aimantation et les changements du champ, si ceux-ci ont lieu en un temps plus court que le temps de relaxation effectif des nanoparticules, cas des hautes fréquences de l'hyperthermie.

Dans l'approximation des régimes linéaires où la susceptibilité est indépendante du champ appliqué, l'énergie magnétique dissipée thermiquement dans les particules est proportionnelle à la fréquence du champ, qui doit donc être la plus élevée possible et qui est généralement au moins de l'ordre de 100 kHz. Pour ces fréquences, le déphasage entre l'aimantation de la particule et le champ appliqué donne lieu à une importante composante imaginaire χ'' responsable de la production de chaleur. Elle est représentée sur la Figure 7, qui précise les origines de production de chaleur par les particules en fonction de la fréquence [84].

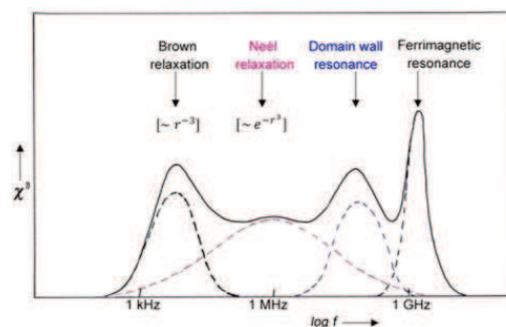


Figure 7. Schéma du spectre en fréquence de la partie imaginaire de la susceptibilité de particules magnétiques en champ faible. Figure extraite de la référence [84].

Jusqu'ici, les recherches sur ce domaine tendent à montrer que bien que certaines particules d'oxyde de fer (les SPIONs en particulier) soient prometteuses, cette technique reste limitée par des efficacités

relativement faibles, des effets secondaires non négligeables dus à la localisation non parfaite du traitement et donc aux dommages causés sur les cellules saines, et surtout par le défi technique que représente la réalisation des équipements d'hyperthermie encombrants (par ailleurs coûteux) nécessaires à l'application de champs de fortes fréquences, dans de grands volumes tels que celui d'un être humain.

3.2.3. Réactivation de l'apoptose des cellules cancéreuses

Définition de l'apoptose : l'apoptose décrit le procédé de « mort programmée » d'une cellule, et correspond à la capacité naturelle qu'a une cellule de mourir. Ce phénomène est à l'origine de nombreuses transformations lors du développement d'un être vivant, comme par exemple la perte de la queue chez un têtard lors du passage à l'âge adulte, la différenciation des doigts chez un être humain ou encore la suppression d'un grand nombre de neurones « inutiles » lors du développement du fœtus. La perturbation de cette capacité entraîne le développement de maladies telles que les cancers et les maladies auto immunes (perte de l'apoptose) ou encore les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (excès d'apoptose). C'est pourquoi de nombreuses recherches consistant à comprendre et maîtriser ce phénomène sont lancées de nos jours.

On distingue deux façons de déclencher l'apoptose : la voie intrinsèque ou mitochondriale, et la voie extrinsèque par réception de ligands sur des « récepteurs de mort » (Figure 8).

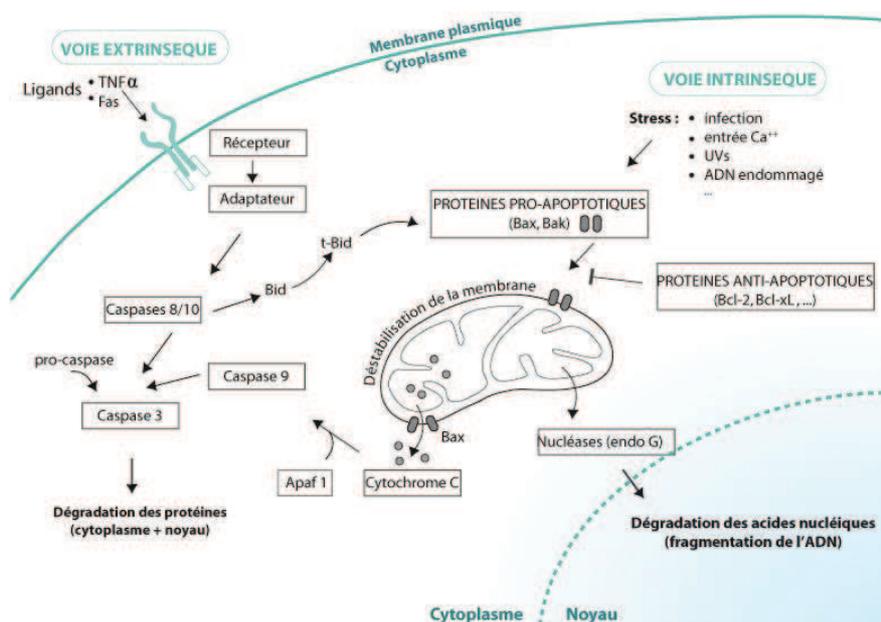


Figure 8. Schéma de la chaîne de réaction en cascade qui fait suite au signal de déclenchement de l'apoptose selon la voie employée, extrinsèque ou intrinsèque.

La voie extrinsèque, qui est la voie naturelle, résulte de l'accrochage de ligands spécifiques sur des récepteurs de mort localisés sur la membrane cellulaire. Une fois ces récepteurs activés, ils forment ce que l'on appelle des DISC (Death Inducing Signalling Complex), qui initient l'activation des pro-caspases en caspases, enzymes qui se divisent en deux familles : les caspases initiatrices (caspases 8, 9, 10), qui activent elles-mêmes les caspases exécutrices (caspases 3 et 7). Ces dernières sont directement responsables de la mort cellulaire par fragmentation de l'ADN [85].

La voie intrinsèque ou voie mitochondriale, quant à elle, est causée par des éléments extérieurs de nature pathologique. Elle résulte d'un stress causé sur un élément intracellulaire, d'un dommage causé sur l'ADN, d'une hypoxie ou encore d'un dérèglement d'une protéine responsable de la maintenance du cycle de vie d'une cellule. En effet, la régulation du phénomène d'apoptose est gérée par un groupe de protéines appartenant à la famille Bcl-2, comprenant les protéines pro-apoptotiques (favorisant le déclenchement de l'apoptose) et les protéines anti-apoptotiques (ayant l'effet inverse). Leur dérèglement induit la libération par la mitochondrie du cytochrome C dans le cytoplasme, lequel modifie le flux du calcium Ca^{2+} au sein de la cellule. Cela a pour effet la formation d'un élément biologique appelé apoptosome, lequel active les caspases initiatrices. S'ensuit l'activation des caspases exécutrices et le clivage de l'ADN de la même façon que dans la voie extrinsèque [85] [86].

Tout au long de ce phénomène, la membrane devient bulbeuse, la cellule se divise en plusieurs corps apoptotiques, lesquels sont ensuite phagocytés par des éléments du système immunitaire, en tout cas lors du processus naturel d'apoptose. Dans le cas de son déclenchement artificiel en tant que traitement anti cancer, cette réponse immunologique n'est cependant pas acquise avec certitude. Plusieurs études rapportent que les phagocytes n'agissent pas nécessairement aussi efficacement que lors du procédé naturel, ce qui amène les cellules apoptotiques non phagocytées à perdre l'intégrité de la membrane et tendre vers un état nécrotique (« seconde nécrose »). De plus, selon le type de phagocyte agissant sur la cellule apoptotique, celui-ci peut soit éliminer la cellule dans son ensemble, soit n'éliminer qu'une fraction de celle-ci. Dans ce dernier cas, plusieurs phagocytes agissent sur la même cellule, mais celle-ci n'est alors pas entièrement éliminée. Il reste donc à déterminer ce que devient le reste la cellule [87].

Pourquoi déclencher l'apoptose ?

Ces questions sur l'élimination des corps cellulaires interviennent dans la mesure où la justification première des recherches sur l'apoptose dans le cas du traitement du cancer est que contrairement au cas de la mort par nécrose, il n'y a pas d'inflammation de la zone locale, puisque le contenu cytoplasmique n'est pas déversé dans le milieu extracellulaire. La mort par nécrose, qui résulte d'évènements uniquement pathologiques, a pour conséquences la dégradation de la membrane cellulaire et le déversement du contenu intracellulaire, et est donc un phénomène inflammatoire (Figure 9).

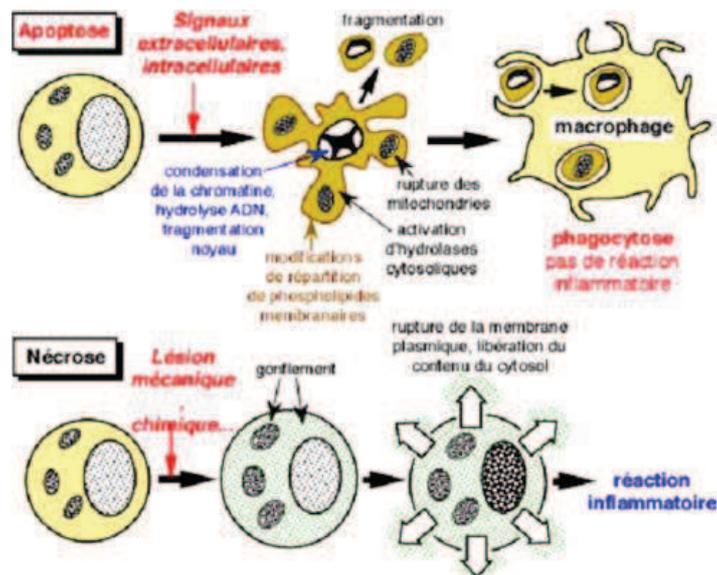


Figure 9. Schéma de principe des différences morphologiques d'une cellule nécrotique et d'une cellule apoptotique.

C'est pourquoi les recherches actuelles tendent à privilégier la mort cellulaire par apoptose plutôt que par nécrose. Cependant, quelques études récentes tendent à montrer que l'apoptose n'est pas forcément le phénomène qui doit être privilégié dans la recherche d'une voie anti cancéreuse, puisque son déclenchement présente également des inconvénients dans certains cas: outre le problème du "nettoyage" des corps apoptotiques mentionné plus haut, il semblerait que certaines cellules cancéreuses puissent développer des mutations génétiques conférant à la cellule une résistance à l'apoptose [88].

C'est pourquoi on peut également citer plusieurs travaux sur le déclenchement de la mort cellulaire par nécrose *via* l'utilisation de nano-objets. Ainsi, des nanotubes de carbone paramagnétiques de 100 nm de diamètre pour 1 μm de long, fonctionnalisés avec un polymère, mis en contact avec des cellules d'un cancer du sein humain et soumis à un champ alternatif de quelques dizaines de mT provoquent la rupture membranaire des cellules et donc une baisse significative de leur viabilité [89]. La forme anisotrope de particules magnétiques est également utilisée dans la référence [90] : des nano-aiguilles de fer/silice (environ 580 nm de long et 80 nm de diamètre) sont mises en contact avec des cellules d'un carcinome hépatocellulaire du foie et soumises à un champ magnétique oscillant d'une dizaine de Hertz. Leur agrégation cumulée à leurs vibrations provoque une rupture de la membrane et l'augmentation du taux de mortalité des cellules. Enfin, il est possible de faire internaliser des nanofils de nickel de 35 nm de diamètre et 4 μm de long par des cellules d'un cancer du côlon. L'application d'un champ magnétique alternatif de faible fréquence provoque leur mouvement oscillatoire, ce qui a pour effet de tuer les cellules [91].

Méthodes de déclenchement de l'apoptose :

En ce qui concerne la réactivation de l'apoptose, on trouve diverses approches dans la littérature. Une des premières méthodes abordées est le ciblage et l'inhibition des différentes protéines anti-apoptotiques : cela peut concerner aussi bien les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ou alors directement le gène qui code pour la formation de ces protéines, ou encore un autre type de protéines appelées IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins). Cette méthode est toujours réalisée en

complément d'un traitement de délivrance de médicaments. A ce jour, de nombreuses molécules visant à cibler ces protéines sont en phase clinique I ou II [85] [92].

Le deuxième type d'approche consiste à utiliser des nanoparticules magnétiques pour la réactivation de l'apoptose. A ce titre, nous nous intéresserons aux phénomènes de transduction, qui font référence à la transformation d'un signal extérieur en signal biochimique intracellulaire. Dans la référence [93], ce sont des agrégats de nanoparticules magnétiques qui sont exploités pour déclencher une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire.

Dans la même optique, on peut citer une étude montrant qu'il est possible de reproduire l'effet d'un ligand biochimique : des nanoparticules magnétiques sont fonctionnalisées de façon à s'attacher spécifiquement à un récepteur présent sur la membrane de la cellule. Puis, un champ magnétique statique est appliqué, ce qui provoque leur agglomération, et donc celle des récepteurs. C'est cette aggrégation qui imite la configuration du récepteur de mort activé lors de l'accrochage du ligand biochimique, et qui induit donc l'apoptose de la cellule (Figure 10) [94].

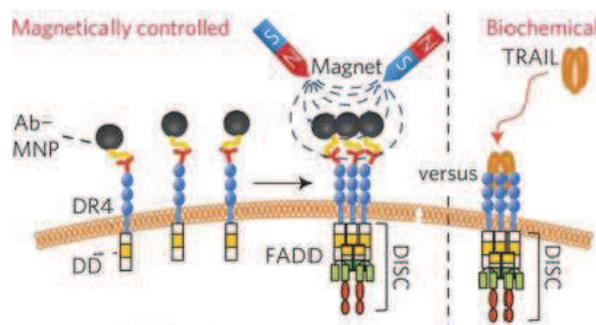


Figure 10. Déclenchement de l'apoptose via l'agrégation de nanoparticules magnétiques sur un récepteur de mort. Figure extraite de la référence [94].

Les effets qui nous intéresseront davantage dans ce manuscrit sont les effets magnéto-mécaniques qui mènent au déclenchement de l'apoptose. En ce sens, une autre équipe s'est attachée à internaliser des SPIONs (Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles) fonctionnalisés de façon à les attacher aux membranes des lysosomes, éléments biologiques présents dans la cellule et responsables de la digestion intracellulaire. Il a été démontré que l'application d'un champ magnétique alternatif favorise leur internalisation en les faisant tourner autour d'eux-mêmes. Après leur greffage sur la membrane des lysosomes, ce même champ est appliqué à nouveau, ce qui provoque un stress mécanique sur la membrane et finit par la rompre : le milieu contenu dans le lysosome est déversé dans le milieu intracellulaire, provoquant une modification du pH et par la suite le déclenchement de l'apoptose (Figure 11) [95].

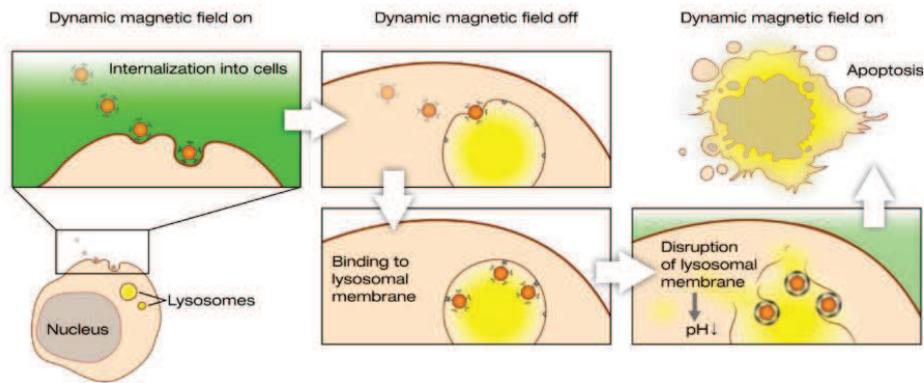


Figure 11. Schéma de principe du déclenchement de l'apoptose via la rupture de la membrane des lysosomes provoquée par l'effet magnéto-mécanique de SPIONs. Figure extraite de la référence [95].

A la base de notre étude, une technique novatrice de destruction de cellules cancéreuses par magnéto-transduction a été développée, en premier lieu par Kim *et al.* à l'Argonne National Laboratory [96], puis à SPINTEC sur une autre lignée de cellules cancéreuses et avec d'autres particules magnétiques [97] [98]. L'idée développée, schématisée Figure 12, est de déclencher l'apoptose des cellules malades par vibrations magnéto-mécaniques engendrées par les particules attachées à la membrane des cellules elles-mêmes: comme expliqué plus haut, le stress correspondant à ces vibrations est *a priori* assez fort pour engendrer une cascade chimique responsable du déclenchement de l'apoptose (voie intrinsèque).

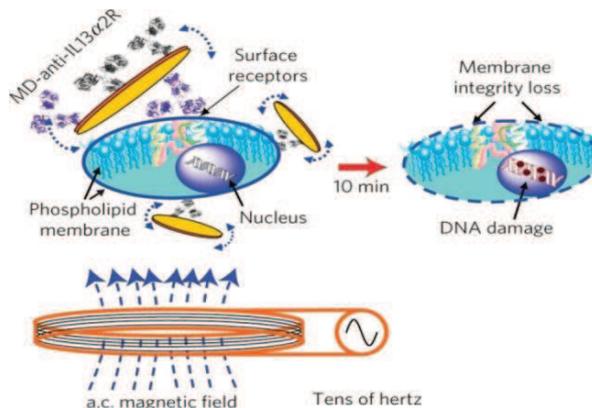


Figure 12. Schéma de principe du déclenchement de l'apoptose de cellules cancéreuses par effet magnéto-mécanique de particules magnétiques attachées à la membrane des cellules. Figure extraite de la référence [96].

Pour cette application, les particules doivent répondre à plusieurs spécifications. Elles doivent notamment posséder une anisotropie magnétique, par exemple être de forme anisotrope, de façon à pouvoir être actionnées par un champ magnétique. Les particules utilisées par l'équipe d'Argonne et par SPINTEC sont des disques plats de FeNi qui présentent une structure magnétique en vortex. Elles ont ainsi l'avantage d'avoir une rémanence nulle, ce qui évite leur agglomération en suspension en champ nul. De plus, il a été démontré qu'un champ alternatif d'environ 10 mT à quelques dizaines de Hz est suffisant pour les faire vibrer et pour induire l'apoptose dans 90% de cellules cancéreuses d'un glioblastome multiforme (cancer du cerveau) *in vitro* [96]. De même, un champ alternatif de 30 mT à environ 20 Hz a pu augmenter par 5 le taux d'apoptose de cellules provenant d'un cancer rénal humain [97] [98].

4. Objectifs de la thèse et annonce du plan

Nous avons vu qu'en fonction de l'application biomédicale visée, les nanoparticules magnétiques doivent répondre à un cahier des charges bien spécifique. Nous nous intéresserons dans ce manuscrit à deux des problématiques évoquées dans la section 3, à savoir la fabrication de nanoparticules monodisperses pour des applications de type imagerie médicale, et l'exploitation des effets de transduction magnéto-mécaniques de microparticules pour la réactivation de l'apoptose de cellule cancéreuses.

Dans un premier temps, nous nous intéresserons donc à la fabrication de nanoparticules magnétiques destinées à être utilisées en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie médicale. Nous nous attacherons ainsi à développer et optimiser un procédé de fabrication de nanoparticules nouveau et original. Comme évoqué précédemment, l'une des problématiques principales à laquelle est confrontée la fabrication de nanoparticules est liée à la distribution en taille finale des nanoparticules, laquelle doit être la plus étroite possible. Or, les techniques chimiques les plus abouties sont pour la plupart soit peu fiables en ce qui concerne ce critère car elles nécessitent souvent des étapes supplémentaires de filtration pour trier la suspension, soit elles sont relativement compliquées à mettre en place. A l'inverse, les techniques top-down telles que la lithographie permettent la fabrication de particules monodisperses mais présentent d'autres inconvénients tels qu'une limite en résolution (diamètre minimal de la particule atteignable) ou alors une longue durée du procédé de fabrication pour une faible quantité de particules produites. Dans ce contexte, le procédé de fabrication proposé dans ces travaux est un procédé relativement simple qui combine une approche « top-down » et « bottom-up » et qui fait partie, comme nous le verrons, d'une des techniques les plus efficaces en ce qui concerne la fabrication de nanoparticules monodisperses. Cette méthode repose sur les propriétés particulières d'auto-organisation d'un copolymère dibloc, capable sous certaines conditions de se séparer en deux phases distinctes dont une s'auto assemble en cylindres verticaux. Ceux-ci seront utilisés pour créer un masque de trous dans la matrice du deuxième polymère. Le matériau est ensuite déposé sur ce masque, étape suivie par la gravure de la matrice de polymère, ce qui aboutit à l'obtention d'un réseau de nanoparticules attachées au substrat. Nous montrerons que ce procédé novateur permet l'obtention de nanoparticules magnétiques éventuellement biocompatibles dont la dispersion en taille est contrôlée et étroite. Par la suite, il s'agira de démontrer que les propriétés magnétiques de ces nanoparticules sont compatibles avec l'idée de les utiliser en tant qu'agents de contrastes, c'est-à-dire qu'elles ont un comportement de type superparamagnétique. A ce titre, ce premier chapitre sera découpé en quatre parties :

- Tout d'abord, une définition des copolymères à blocs sera donnée, ainsi qu'un état de l'art de leurs applications.
- Dans la deuxième partie, le procédé de fabrication développé à SPINTEC en collaboration avec le LTM et le LETI sera détaillé.
- La troisième partie présentera les caractérisations structurales et magnétiques des nanoparticules attachées au substrat. Nous inclurons dans cette partie la caractérisation des dépôts de magnétite faits sur des dépôts pleine couche avant de décrire les caractéristiques des nanoparticules. Les cycles d'hystérésis expérimentaux seront également mis en relation avec un modèle d'un réseau de nanoparticules dont les interactions dipolaires seront prises en compte.

- Enfin, la quatrième partie sera consacrée à la mise en suspension et à la fonctionnalisation des nanoparticules, les rendant exploitables pour la suite pour des mesures de type RMN.

Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons à une autre application médicale, à savoir le traitement du cancer. La technique abordée dans ce manuscrit est encore très peu étudiée au niveau international bien que prometteuse, puisqu'elle a été initiée par l'Argonne National Laboratory en 2010 [96] et poursuivie à SPINTEC lors de la thèse de Selma Leulmi [97] [98], dont ces travaux sont une suite directe. A l'international, une équipe de Cambridge travaille également sur ce sujet, en collaboration avec une équipe de Chicago. Cette méthode consiste à réactiver l'apoptose des cellules cancéreuses par vibrations magnéto-mécaniques de microparticules magnétiques attachées à leur membrane. Plus précisément, l'idée est ici de fonctionnaliser les microparticules magnétiques pour cibler spécifiquement la lignée de cellules cancéreuses choisie, puis d'appliquer un champ magnétique alternatif d'environ 30 mT à 20 Hz, ce qui provoque les vibrations des particules magnétiques, lesquelles engendrent un stress mécanique sur les membranes des cellules. Ce stress déclenche une cascade de signalisation biochimique spécifique qui aboutit au déclenchement de l'apoptose ou mort programmée de la cellule. Comme évoqué précédemment, le principal avantage de cette technique est que le mode de déclenchement de la mort cellulaire est plus doux, plus contrôlé et plus local que ce qu'il n'est lors d'un traitement par hyperthermie, lequel est de plus encore souvent assisté par un traitement par radio ou chimiothérapie.

L'objectif principal de l'étude est la comparaison des effets des microparticules de FeNi utilisées précédemment dans la thèse de Selma Leulmi avec des microparticules de magnétite, matériau biocompatible et de ce fait meilleure candidat à des applications biomédicales *in vivo*. En effet, au vu des bons résultats obtenus avec les particules de permalloy, il nous a semblé nécessaire de démarrer une étude sur un matériau qui est accepté par la communauté médicale comme parfaitement compatible avec un traitement chez l'homme. Les différents états magnétiques, en vortex pour le FeNi, multidomaine pour la magnétite, seront comparés et mis en lien avec les résultats sur l'apoptose de la même lignée de cellules cancéreuses. Le plan suivi sera le suivant :

- La première partie portera sur la fabrication des microparticules de permalloy et de magnétite, dont le procédé sera mis en perspective en fonction du cahier des charges que les particules doivent respecter.
- La seconde partie sera consacrée aux caractérisations magnétiques des particules et permettra la comparaison des deux matériaux.
- Puis, le comportement en suspension de ces particules en champ nul et sous champ sera décrit, et sera mis en lien avec leurs propriétés magnétiques respectives.
- La quatrième partie portera sur la stratégie de fonctionnalisation qui permettra aux particules de se greffer aux membranes des cellules.
- Enfin, les tests *in vitro* destinés à mesurer l'effet des particules sur les cellules cancéreuses seront présentés.

diblocs, composés de deux monomères de nature chimique différente. C'est d'ailleurs un copolymère dibloc qui fait l'objet de l'étude présentée dans ce premier chapitre. Les copolymères triblocs sont soumis aux mêmes types d'interactions, mais les microstructures accessibles sont plus nombreuses et plus complexes par rapport aux copolymères diblocs et ne seront pas détaillées dans ce manuscrit [100] [101].

Micro séparation de phase :

Les chaînes des deux monomères d'un copolymère dibloc ont la particularité d'être immiscibles, ou incompatibles, ce qui signifie que le système tend fortement vers une séparation des phases, mais ceci seulement sous certaines conditions, notamment à condition que l'on donne suffisamment de mobilité aux chaînes du polymère. Ainsi, s'il y a équilibre entre l'enthalpie qui favorise la ségrégation et l'entropie du mélange, il n'y a pas de séparation de phase. Si cet équilibre ne peut pas se faire, on entre donc dans les conditions dans lesquelles il y a séparation de phase, laquelle est gouvernée par la compétition entre les énergies thermodynamiques qui favorisent le mélange et les forces entropiques liées à la ségrégation des chaînes du copolymère venant de la liaison covalente entre les deux monomères. Ces forces traduisent le fait qu'un système thermodynamique tend toujours à minimiser son entropie, et donc à favoriser un état désordonné. Ainsi, pour satisfaire l'incompatibilité des chaînes A et B, le système doit adopter des configurations où ces chaînes sont étirées. Or, l'état initial où les polymères sont désordonnés offre plus de possibilités de configurations qu'un état ordonné, d'où la préférence pour le système de rester dans un état désordonné. On peut également associer cette force à une propriété élastique du système, qui tendrait à le ramener dans son état initial. C'est cette compétition en énergie qui donne lieu à la formation des micro ou nanostructures au sein du copolymère.

Ces deux régions sont visibles sur le diagramme de phase Figure 15, qui montre qu'il y a une valeur seuil du degré de ségrégation en dessous de laquelle le système reste dans un état désordonné. Théoriquement évaluée à 10.5, cette valeur traduit le fait que si les chaînes ne sont pas « suffisamment incompatibles », il n'y a pas de séparation de phases, de même que si les chaînes sont trop courtes (ce qui revient à dire que la masse moléculaire est trop faible). On peut également relier cette valeur seuil à une température seuil : le degré de ségrégation ou incompatibilité des chaînes est souvent associée au terme de Flory-Huggins χ_{AB} , paramètre qui traduit le coût en énergie libre par monomère du contact entre les monomères A et B :

$$\chi_{AB} = \frac{1}{k_B T} [\epsilon_{AB} - \frac{1}{2}(\epsilon_{AA} + \epsilon_{BB})] \quad \text{Equation 1}$$

ϵ_{AB} est l'énergie d'interaction par monomère entre les monomères A et B, interaction de type Van der Waals. Un χ positif traduit une répulsion entre A et B et donc une ségrégation de phase, tandis qu'un χ négatif correspond à une tendance au mélange du système. L'équation 1 montre que χN est proportionnel à $1/T$, ce qui signifie que la séparation de phases ne peut avoir lieu au-dessus d'une certaine température, appelée température critique de transition ordre-désordre, au-dessus de laquelle la configuration des chaînes du polymère est gouvernée par des effets entropiques de mélange. En dessous de cette température, la séparation de phases peut avoir lieu, à condition cette fois que la température soit assez élevée pour donner de la mobilité aux chaînes : elle doit donc être au-dessus de la température de transition vitreuse du polymère, température à partir de laquelle le matériau a une capacité de déformation élevée.

Dans les bonnes conditions, les chaînes du copolymère ont donc la propriété très intéressante de pouvoir s'auto organiser, par exemple sous l'action d'un traitement thermique sous certaines conditions de température et de durée du recuit. La compétition en énergie résulte en la formation de domaines micro ou nanométriques, dont la géométrie est déterminée par les paramètres chimiques et physiques du mélange (fraction volumique, nature chimique, énergie d'interaction...).

Pour des systèmes de copolymères symétriques, c'est-à-dire dans lesquels les deux polymères ont des chaînes qui présentent des caractéristiques similaires en termes de souplesse, un nombre limité de nanostructures est accessible. Leur géométrie dépend principalement de la nature chimique des polymères, de la masse molaire totale ainsi que de la fraction volumique des deux polymères. Ces configurations ont été déterminées à partir de modèles théoriques se basant sur la théorie SCFT (Self Consistent Field Theory), et ont été théoriquement résumées sur le diagramme de phase de la Figure 15 [102-105].

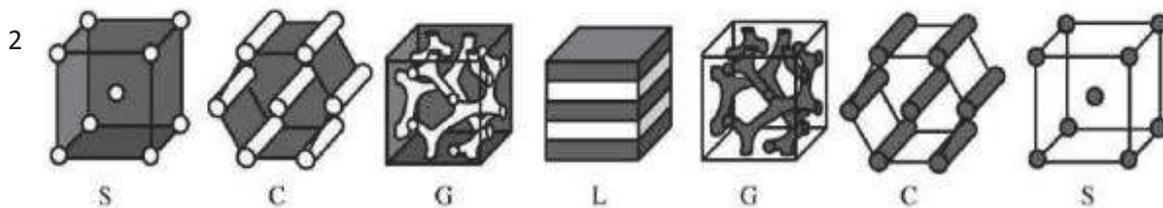
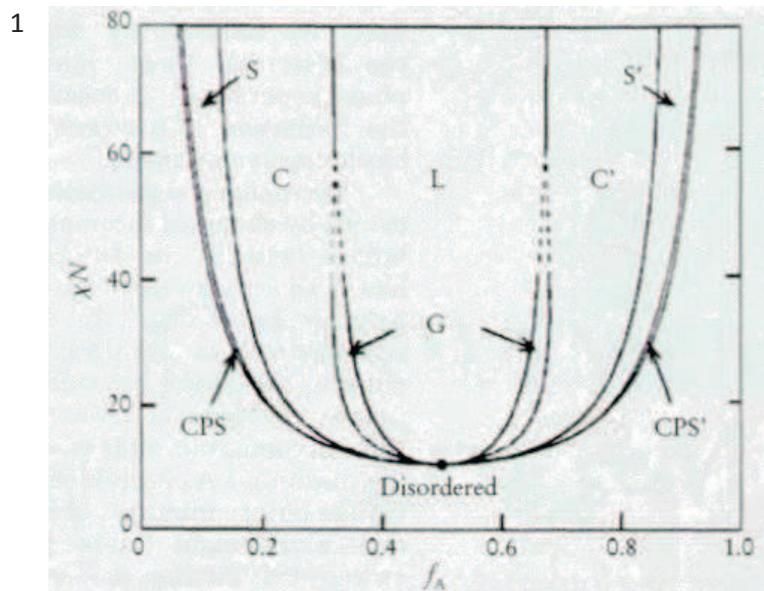


Figure 15. 1/ Diagramme de phase d'un copolymère dibloc : χN est le degré de ségrégation des chaînes avec N le nombre moyen de monomères dans le copolymère ou degré de polymérisation et f_A la fraction volumique du monomère A. 2/ Schémas des différentes géométries possibles lors de l'auto organisation d'un copolymère dibloc en fonction de la fraction volumique des monomères.

Comme schématisé sur la Figure 15, on peut obtenir une configuration en lamelles pour des systèmes équilibrés (c'est-à-dire dont le copolymère est composé des deux monomères en proportions égales), une configuration en gyroïdes pour des systèmes un peu plus asymétriques (80:20 environ), puis une configuration en cylindres et enfin en sphères pour des systèmes de plus en plus asymétriques, dans lesquels l'interface est forcée de se courber de plus en plus pour minimiser l'énergie superficielle entre les deux monomères.

Toutes ces géométries sont intéressantes d'un point de vue applicatif. Cependant, c'est la géométrie cylindrique qui fait l'objet de la plupart des recherches et qui bénéficie du plus grand nombre de publications, en particulier la géométrie en cylindres verticaux. En effet, l'organisation du polymère minoritaire (de plus faible fraction volumique) en cylindres verticaux dans la matrice composée de l'autre polymère et son retrait sélectif consécutif conduit à l'obtention d'une matrice de polymère poreuse. Cette dernière peut trouver de nombreuses applications en nano-lithographie et fournir ainsi une alternative intéressante aux autres techniques de nano-structuration. Cependant, l'orientation des cylindres est en général naturellement une orientation horizontale, dans la mesure où l'un des deux polymères présente souvent une tension superficielle plus élevée que l'autre et va donc avoir une plus grande affinité pour le substrat, tandis que l'autre polymère a en général une plus grande affinité pour les surfaces libres, à savoir l'air. Cela résulte en la formation par le premier d'une couche de mouillage à la surface du substrat et favorise ainsi une organisation du deuxième en cylindres horizontaux dans la matrice du premier. Si l'on désire forcer l'orientation des cylindres perpendiculairement à la surface, plusieurs stratégies sont possibles, dont les trois présentées ci-dessous sont les plus souvent reportées dans la littérature [106] :

- *la neutralisation de surface* : la nature chimique du substrat sur lequel est déposé le copolymère dibloc joue un rôle crucial dans l'orientation des cylindres. S'il a une plus forte affinité pour l'un des polymères, il va favoriser la formation d'une couche de mouillage de celui-ci et donc son orientation en cylindres horizontaux. Une des stratégies les plus répandues pour contrebalancer ces interactions consiste donc à neutraliser la surface sur laquelle va croître le copolymère en y greffant un substrat neutre vis-à-vis des deux polymères, c'est-à-dire qui ne va favoriser la croissance d'aucune des deux phases. Cette neutralisation est très souvent réalisée par un copolymère aléatoire (voir Figure 13) aussi appelé copolymère statistique. Il est composé principalement des deux mêmes monomères que le copolymère dibloc, mais dont les chaînes sont organisées de façon aléatoire, et dont la composition doit être ajustée afin que l'effet de « démouillage » soit efficace [107-109].
- *L'utilisation de champs électriques* : un corps diélectrique soumis à un champ électrique voit sa surface se charger sous l'effet de la différence de polarisation entre ce corps et son environnement. Dans le cas d'un copolymère, les deux polymères ont des constantes diélectriques différentes, l'application d'un champ électrique pendant le recuit du copolymère a donc pour effet d'aligner les cylindres parallèlement à la direction du champ afin de minimiser l'énergie libre du système. L'application d'un champ électrique perpendiculaire à la surface, s'il est assez fort (typiquement 10-100 kV/cm), peut donc contrebalancer l'effet des interactions superficielles des polymères avec le substrat, et ce pour une gamme assez large d'épaisseur du film de copolymère (10-30 μm) [110-114].
- *Le traitement sous vapeur de solvant* : cette technique a pour effet de solubiliser partiellement le film de copolymère et donc de le plastifier, donc d'augmenter la mobilité des chaînes de polymère [115-118].

Parmi ces techniques, la neutralisation de la surface est la plus reportée dans la littérature, au vu de la simplicité de sa mise en œuvre. Dans le cas de cette stratégie, l'orientation perpendiculaire a vraiment lieu seulement si l'épaisseur du film de copolymère n'est pas trop grande par rapport à la longueur caractéristique du réseau L_0 . A défaut, c'est l'orientation parallèle qui est favorisée [119] [120]. On parle de commensurabilité entre L_0 et l'épaisseur du film de copolymère. Dans le cas d'une organisation cylindrique, L_0 correspond à la distance entre les axes de deux cylindres.

Dimensions du réseau :

La taille des domaines auto-organisés, que l'on peut assimiler à la résolution spatiale du système, est également un paramètre très important à contrôler. En effet, comme nous le verrons dans le prochain paragraphe, l'utilisation des copolymères à bloc pourrait concerner des applications très variées, qui nécessitent chacune de pouvoir contrôler la morphologie du copolymère. Plus la gamme de taille des domaines accessible est large, plus les applications sont nombreuses. Cette taille caractéristique dépend principalement de la longueur des chaînes du copolymère, que l'on peut relier au degré de polymérisation N ou encore à la masse moléculaire du copolymère. Plus la masse moléculaire est élevée, plus le degré de ségrégation χN est élevé, plus la séparation de phases est « efficace », plus l'interface est étroite. En revanche, plus N est élevé, plus les chaînes du copolymère sont longues et donc moins mobiles, plus la cinétique de séparation de phases est lente et plus les dimensions du réseau sont grandes.

Mise à part la modification de la masse moléculaire du copolymère, une autre technique peut être employée pour modifier à plus grande échelle les dimensions du système et avoir ainsi accès à de plus grandes plages de longueurs caractéristiques: un homopolymère est ajouté dans le copolymère à blocs. Celui-ci va interagir avec les chaînes du copolymère en fonction des conditions de recuit ainsi qu'en fonction de sa masse moléculaire. De nombreux articles ont été publiés sur l'application de cette technique sur des structures lamellaires. Quelques articles concernent l'application d'une telle stratégie à une organisation cylindrique, dans laquelle l'homopolymère peut former un cylindre de diamètre plus petit que le cylindre formé par le bloc. Le plus petit diamètre reporté dans la littérature est de 6 nm. Ainsi, on peut choisir de n'éliminer sélectivement que cet homopolymère pour avoir accès à des domaines plus petits, ou alors d'enlever également la phase en bloc pour atteindre des diamètres plus larges [121-127].

Enfin, pour modifier la taille des domaines, on peut trouver des systèmes de copolymères à blocs à forte incompatibilité, dits copolymères « high χ ». Un des systèmes à forte incompatibilité le plus étudiés actuellement est le copolymère PS-PDMS (Polystyrène-PolyDiMethylSiloxane), dont le χ est d'environ 0.26, largement supérieur au paramètre χ du système PS-PMMA (Polystyrène-PolyMethylMethacrylate) dont le χ est égal à 0.06 et qui a longtemps été le plus utilisé pour étudier l'auto-organisation des copolymères à blocs. Outre les faibles tailles des domaines accessibles, le système PS-PDMS permet d'atteindre une organisation sur de plus longues distances [128-131].

Applications :

Les copolymères à blocs font l'objet depuis une vingtaine d'années d'une attention particulière, notamment en raison du faible coût de leur procédé d'organisation, de la flexibilité de leurs propriétés ainsi que de la petite taille des domaines accessibles. De nombreux articles de revues décrivent les différents domaines d'application des copolymères à blocs les plus prometteurs et les plus investis, lesquels concernent des domaines aussi variés que la physique, la chimie, la biologie ou encore les sciences médicales. Ils peuvent être classés en fonction de l'état dans lequel les polymères sont utilisés, sous forme de films minces ou en solution:

- *Films minces* : la propriété d'auto assemblage des films minces de copolymères à blocs donne des perspectives très intéressantes dans le domaine de la nano-lithographie, c'est-à-dire la nano-structuration de matériaux. Dans ce domaine, deux approches existent : la première est

la structuration par transfert de motif où le film de copolymère auto-organisé est utilisé comme masque permettant la structuration (généralement par gravure) du substrat sous-jacent. Cette approche peut être utilisée en microélectronique, notamment dans l'élaboration de points mémoires à haute densité [132]. La deuxième approche est la structuration « directe » d'objets nanométriques. Dans ce cas, ils sont utilisés en tant que masques pour la fabrication de nano-objets tels que nanoparticules, nano-fils... En plus de leur potentiel dans l'élaboration de nano-objets ou nanostructures, on peut noter l'utilisation des copolymères à blocs en tant que membranes très performantes, dans la mesure où des techniques de fabrication spéciales (NIPS, « Nonsolvent-Induced Phase Separation ») permettent l'élaboration de membranes poreuses asymétriques, c'est-à-dire plus fines sur la couche supérieure des membranes que dans leur partie inférieure [133] [134]. A noter également des applications envisagées dans l'élaboration de matériaux pour la photonique [135], dans la mesure où les propriétés de tels matériaux dépendent beaucoup de la structuration de leurs domaines, dont la morphologie peut être contrôlée par les copolymères à blocs. Le principal frein à cette application est que la taille des domaines nécessaire doit être de l'ordre de la centaine de nm pour faire de bons matériaux photoniques, ce qui nécessite donc des copolymères à blocs à larges masses moléculaires, avec les inconvénients mentionnés plus haut. Enfin, on peut citer des applications telles que les précurseurs de céramique [133] ou encore la fabrication de cellules solaires hybrides [136].

- *Copolymères en solution* : l'auto assemblage de copolymères à blocs dans un solvant sélectif permet la fabrication de micelles, c'est-à-dire de nanoparticules formées d'un cœur (composé d'un monomère) et d'une couronne (composée du second monomère). La différence de densité et de solubilité des deux monomères fait de la micelle un outil idéal en tant que transporteur de médicaments pour leur délivrance ciblée [137] [138]. Le copolymère à blocs apporte également l'avantage de pouvoir fabriquer des micelles de différentes géométries [139]. De plus, en choisissant bien les monomères, on peut faire de ces micelles des objets « intelligents », capables de répondre à un stimulus extérieur tel qu'un changement de pH ou de température. D'autres applications de copolymères à blocs sont reportées dans la littérature, telles que les nano-réacteurs ou les catalyseurs de réaction chimique [140] [106] [100].

En résumé, la faculté des copolymères à blocs de s'auto-organiser en différentes géométries à l'échelle de la dizaine à la centaine de nanomètres rend ces systèmes très intéressants pour de nombreux domaines d'application. En particulier, il est possible d'auto-organiser un copolymère à blocs en cylindres verticaux et d'éliminer la phase minoritaire afin d'obtenir une matrice de polymère avec des motifs de très faibles dimensions. C'est cette possibilité que nous allons exploiter dans notre étude, où le copolymère à blocs est utilisé comme matrice pour la fabrication de nanoparticules. Ce procédé présente une alternative très intéressante par rapport aux techniques de lithographie, étant donné la possibilité de réaliser un masque de copolymère très uniforme en termes de dimensions de motifs. Ceci permettrait de réaliser des nanoparticules plus monodisperses que les particules classiquement fabriquées par voie chimique. Celles-ci seraient alors de bonnes candidates pour des applications biotechnologiques telles que l'imagerie médicale.

L'idée de fabriquer des nanoparticules par copolymères à blocs a déjà été envisagée et mise en œuvre en utilisant le système PS/PMMA [141]. Dans notre étude, nous proposons d'aller plus loin, notamment jusqu'à la libération des particules en suspension, ce qui n'a pas été fait jusque-là.

2. Procédé de fabrication

Comme nous venons de le voir, c'est la propriété remarquable d'auto-organisation d'un copolymère dibloc en cylindres verticaux que nous allons exploiter pour en faire un masque de lithographie qui permettra de fabriquer des nanoparticules magnétiques. Une telle utilisation est une des alternatives les plus prometteuses aux techniques de lithographie existantes, notamment la lithographie par faisceaux d'électrons. En effet, cette dernière permet d'obtenir une bonne résolution spatiale d'environ 10 nm. Cependant, il s'agit d'une technique de lithographie extrêmement lente si d'importantes surfaces sont en jeu et relativement coûteuse. L'auto-organisation de copolymères dibloc serait en ce sens une très bonne alternative, rapide, peu coûteuse et permettant d'atteindre des résolutions de 20 nm voire moins grâce à des systèmes adéquats de copolymères, puisque dans de bonnes conditions, on peut atteindre de façon collective des tailles de domaines aussi petites que 6 nm.

Nous détaillons donc dans ce chapitre les différentes étapes technologiques menant à l'obtention de nanoparticules organisées en réseau hexagonal compact sur un substrat de germanium. Les caractérisations structurales et magnétiques des nanoparticules obtenues nous permettront de déterminer quelles sont les étapes déterminantes qui font de ce procédé un des procédés les plus prometteurs pour la fabrication de nano-objets monodisperses et superparamagnétiques, et quels sont les points qui doivent encore être améliorés. De plus, nous montrerons qu'il a été possible de mettre ces particules en suspension et de les fonctionnaliser, les rendant exploitables pour des applications biomédicales, ce qui représente la finalité de cette étude.

2.1. Description des différentes étapes techniques

L'idée principale de ce procédé de fabrication de nanoparticules magnétiques est d'utiliser une couche de copolymère à blocs comme matrice ouverte (suite au retrait d'une de deux phases du copolymère). Elle permet, après dépôt d'une couche magnétique, d'obtenir des nano-motifs de matériaux magnétiques sur le substrat sous-jacent. Ces nano-motifs seront ensuite détachés du substrat en faisant la gravure sacrificielle d'une couche intermédiaire entre le dépôt magnétique et le substrat. Il s'agit d'un procédé de « lift-off ». Il est à noter que dans notre cas, le procédé de fabrication de nanoparticules magnétiques repose sur l'utilisation d'un substrat de germanium. Le choix du germanium est lié au fait que la couche d'oxyde natif (naturel) peut servir de couche sacrificielle, ce qui simplifie le procédé en évitant d'avoir recours au dépôt d'une couche sacrificielle qui risque en plus d'être plus difficile à éliminer. La Figure 16 décrit les différentes étapes de réalisation de la matrice de copolymère à blocs auto-organisée en cylindres verticaux. Le copolymère dibloc choisi pour cette étude est le copolymère PS-PMMA, très étudié dans la littérature et choisi pour la flexibilité de ses propriétés, en particulier pour sa relative facilité d'auto-organisation en cylindres verticaux. Il sera nommé par la suite PS-b-PMMA (b pour blocs).

Les étapes d'auto-organisation du copolymère schématisées sur la Figure 16 sont les suivantes :

- La première étape du procédé est l'obtention d'une auto-organisation de type cylindres verticaux (cylindres perpendiculaires à la surface). La stratégie choisie est la neutralisation de la surface par rapport au PS et au PMMA afin de ne favoriser la croissance d'aucune des deux phases l'une par rapport à l'autre en empêchant l'action de l'effet de mouillage. Cette neutralisation est obtenue grâce à une couche de copolymère statistique (que nous appellerons par la suite « couche neutre ») composé principalement de ces mêmes polymères

PS et PMMA en proportions 70:30, dont les chaînes sont cette fois-ci organisées de façon aléatoire (et non plus en blocs). On nommera ce polymère PS-r-PMMA (r pour « random »). Ce dernier, solubilisé dans du Propylène Glycol Methyl Ether Acélate (PGMEA) à une concentration massique de 0,5% wt (weight percent) est couché sur la surface du substrat par étalement sur une tournette. Ces conditions expérimentales conduisent à une couche neutre de 9 nm d'épaisseur. Cette couche neutre doit ensuite être réticulée afin de greffer le polymère à la surface du substrat, ce qui se fait par un recuit à 230°C pendant 10 minutes. Le substrat est ensuite rincé avec du PGMEA pour évacuer les chaînes de copolymères qui n'auraient pas été attachées à la surface du substrat.

- La deuxième étape du procédé consiste à couler le copolymère dibloc PS-b-PMMA au-dessus de la couche neutre : le PS-b-PMMA est composé des deux monomères dans les mêmes proportions 70:30, ce qui va permettre son organisation cylindrique, avec une masse molaire du PS de 46 kg.mol⁻¹, une masse molaire du PMMA de 21 kg.mol⁻¹ et un indice de polydispersité (PDI, polydispersity index) de 1,11. Comme nous l'avons vu dans la section 1, ces masses molaires déterminent la période intrinsèque en épaisseur du copolymère, appelée L₀, dont la valeur est ici de 35 nm, confirmée lors des caractérisations structurales dans la section 3. Avec une concentration massique de 1,5% wt, le copolymère à bloc a une épaisseur de 48 nm après dépôt à la tournette.
- La troisième étape est un recuit à 230°C pendant 10 minutes afin de permettre l'auto-organisation du PMMA en cylindres verticaux dans la matrice de PS.
- La quatrième étape est le retrait sélectif du PMMA. Cette opération est effectuée dans un bain d'acide acétique à 99% pendant 10 minutes suivi d'un rinçage à l'isopropanol (IPA).

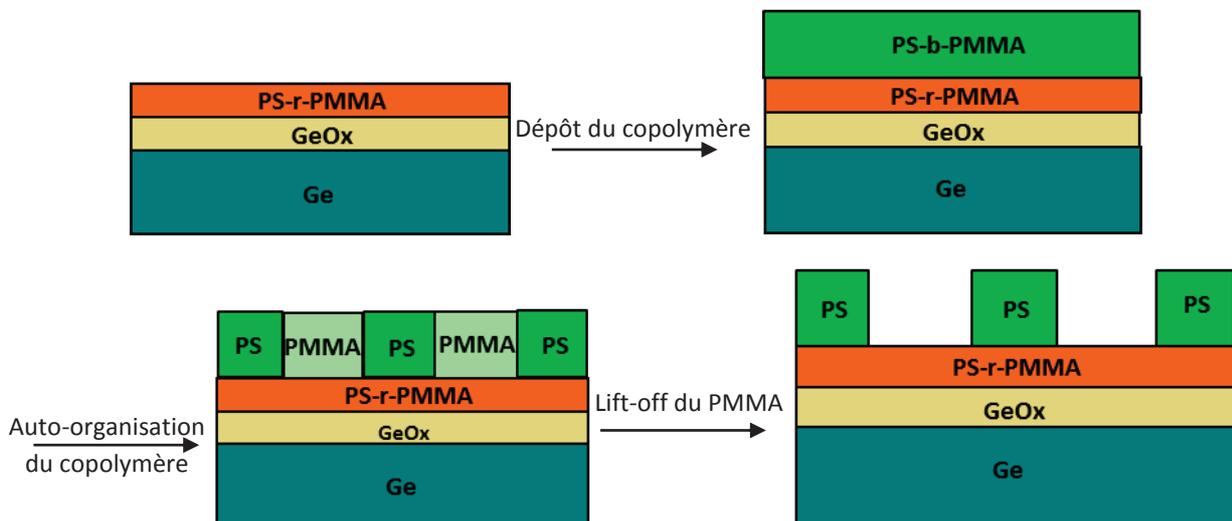


Figure 16. Représentation schématique du procédé d'auto-organisation du copolymère dibloc PS-b-PMMA et du retrait sélectif de la phase PMMA. Une matrice ouverte de PS est ainsi obtenue avec des ouvertures cylindriques.

Le dernier schéma de la Figure 16 présente la forme de la matrice de PS possédant des ouvertures cylindriques formant un réseau hexagonal, sur une structure multicouche composée d'une couche neutre de copolymère, d'une couche d'oxyde de germanium et d'un substrat de germanium. La Figure 17 présente les images MEB correspondant à une vue de dessus de la matrice de PS.

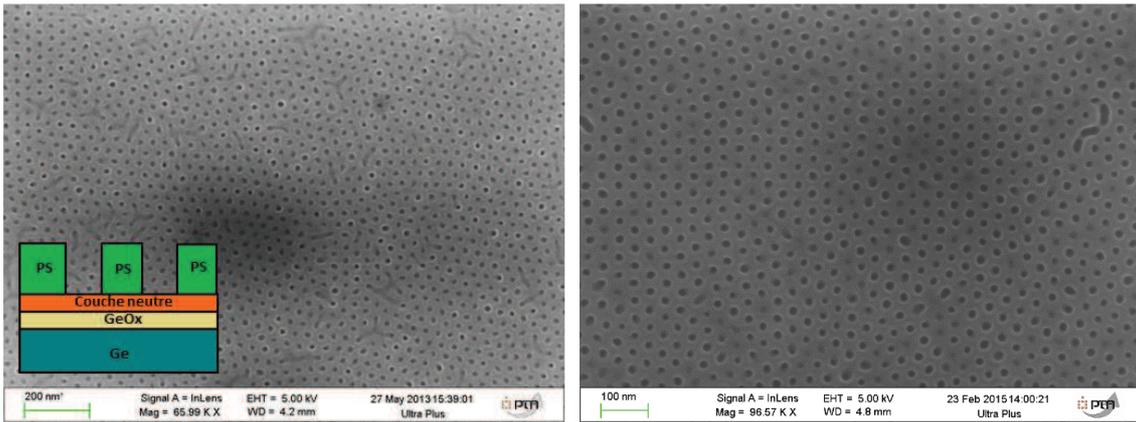
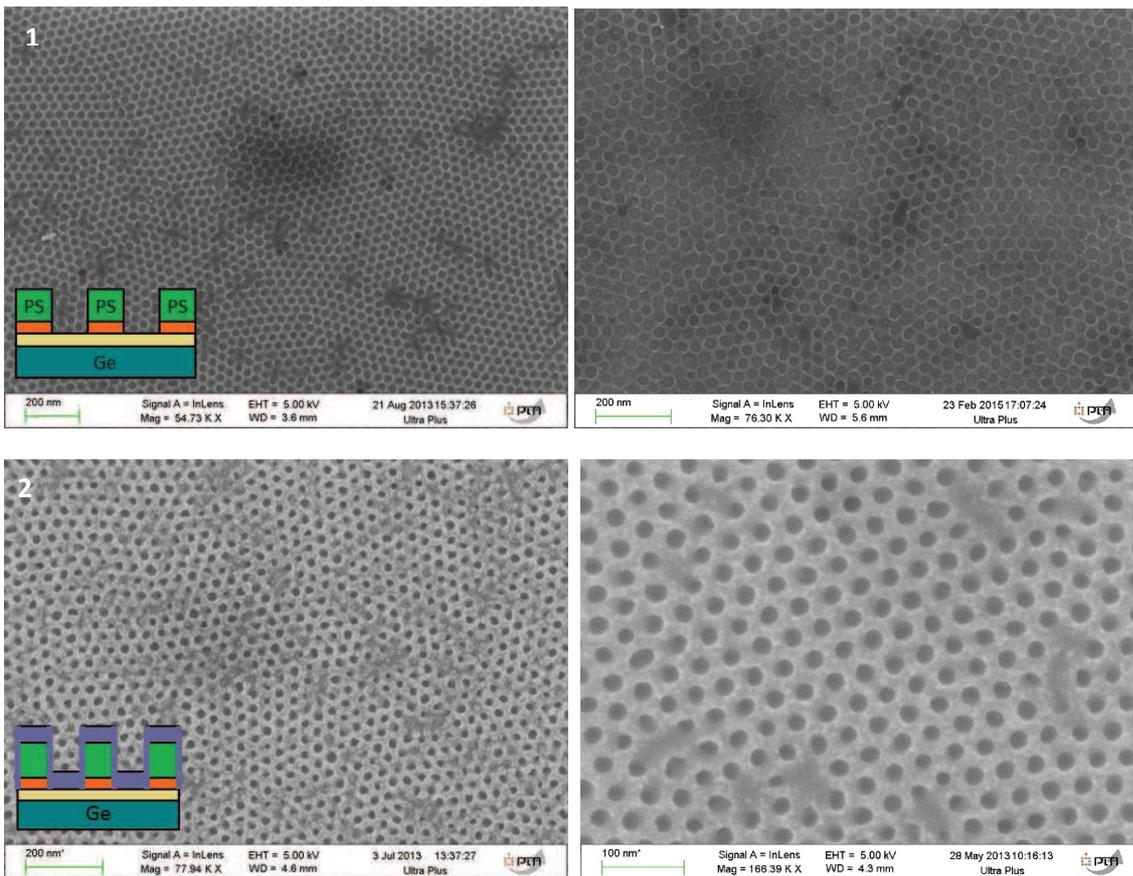


Figure 17. Images par microscopie électronique à balayage (MEB) de la matrice de PS obtenue après retrait des cylindres verticaux de PMMA sur un substrat de germanium oxydé. Un réseau hexagonal de cylindres vide est ainsi obtenu.

Les étapes de gravure supplémentaires de la matrice et de dépôt de matériaux magnétiques ont par la suite été réalisées dans l'objectif d'obtenir des nanoparticules magnétiques de dimensions contrôlées.



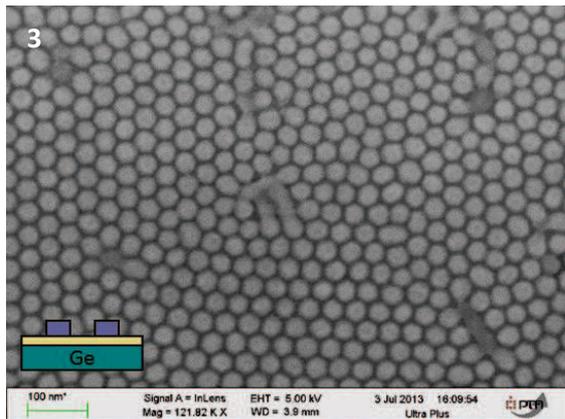


Figure 18. Images MEB correspondant aux différentes étapes du procédé de fabrication de nanoparticules. 1/ Matrice de PS avec cylindres ouverts après un traitement de 20 s sous plasma d'oxygène dans les conditions données par le Tableau 4. Ce traitement permet d'éliminer la couche de PS-r-PMMA au fond des cylindres comme le montre le schéma inséré dans l'image. 2/ Matrice après dépôt d'une couche magnétique. 3/ Nanoparticules magnétiques suite à l'élimination de la matrice PS par gravure dont les conditions sont données dans le Tableau 5.

Le procédé qui conduit à la réalisation de nanoparticules magnétiques se compose de plusieurs étapes, détaillées ci-dessous et imagées sur la Figure 18 :

1 - La première étape est l'élimination de résidus du polymère PMMA. En effet, le retrait effectué jusque-là de la phase PMMA par l'acide acétique ne permet pas la dissolution complète de cette phase, mais a plutôt pour effet de faire remonter les chaînes de ce polymère sur les bords et les sommets de la matrice de PS, comme illustré sur la Figure 19. Ainsi, une gravure supplémentaire à mettre en place devra remplir deux rôles : éliminer ces résidus de PMMA ainsi que graver la couche neutre de PS-r-PMMA restant au fond des trous, dont l'épaisseur est estimée à 9 nm. L'élimination de cette couche est nécessaire afin de révéler la couche d'oxyde de germanium qui servira de couche sacrificielle pour libérer les particules magnétiques qui auront été déposées au fond des cylindres vides.

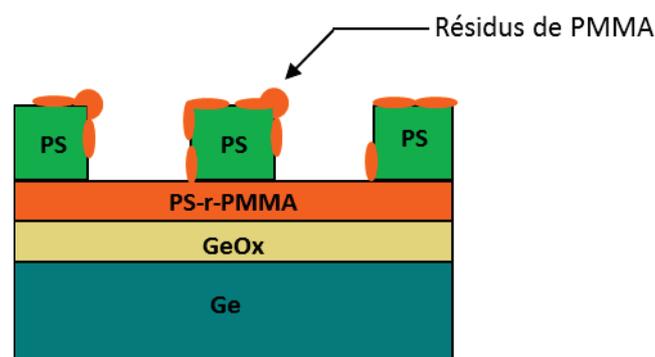


Figure 19. Schéma d'un échantillon après élimination de la phase PMMA par l'acide acétique. Des résidus de chaînes de PMMA restent accrochés au PS. Ces résidus doivent être éliminés, ainsi que la couche du polymère statistique.

La gravure d'un polymère se fait dans la plupart des cas *via* un traitement chimique avec des solvants tels que l'acétone ou l'isopropanol. Cependant, dans notre cas, un tel traitement ne peut pas être utilisé pour éliminer la couche neutre puisque les chaînes du polymère composant cette dernière sont réticulées, c'est-à-dire qu'elles forment un réseau tridimensionnel limitant la mobilité des molécules,

rendant le système plus dur et imperméable au solvant. Nous avons donc décidé de réaliser cette étape par gravure réactive dans une machine de gravure ICP RIE (Inductively Coupled Plasma Reactive Ion Etching). Ce procédé de gravure combine une composante mécanique par bombardement ionique d'un gaz dit neutre vis-à-vis du matériau à graver (en l'occurrence l'argon), et une composante chimique avec l'ajout dans le plasma d'un gaz réactif par rapport au matériau à graver (en l'occurrence l'oxygène). Plusieurs essais de gravure ont été conduits afin de déterminer les paramètres adéquats du procédé. Les paramètres ayant conduits aux meilleurs résultats sont donnés dans le Tableau 4.

Gaz	Débit (sccm)	Puissance de la source RF (W)	Puissance du bias RF (W)	Pression (mTorr)	Temps (s)
Argon	50	220	0	5	20
Oxygène	5				

Tableau 4. Paramètres expérimentaux de traitement par plasma de la matrice de PS avec ouvertures cylindriques.

Les principaux paramètres expérimentaux dans un procédé plasma sont le débit du gaz, la puissance de la source RF, la puissance de la tension d'autopolarisation (« bias »), la pression dans la chambre du réacteur et la durée du procédé. La source RF sert à ioniser le gaz et créer le plasma et permet de contrôler la densité du plasma, tandis que la puissance « bias » correspond à une tension appliquée au substrat qui sert à créer localement des champs électriques autour du substrat et ainsi contrôler la vitesse des ions atteignant la surface du substrat, ce qui permet de régler la composante physique de la gravure. Dans le cas de cette première gravure, seule la réaction chimique de l'oxygène avec le polymère nous intéresse, d'où une puissance bias à 0.

L'image 1 de la Figure 18 montre des images réalisées par MEB (Microscopie Electronique à Balayage) de la couche de polymère vue de dessus à l'issue de cette gravure. On voit qu'outre la gravure de la couche neutre, le traitement par plasma d'oxygène attaque également le polystyrène, puisque le diamètre des cylindres vides dans la matrice de PS est visiblement agrandi par rapport aux échantillons bruts (sans traitement plasma). Cela est dû au fait que la sélectivité de gravure par plasma d'oxygène entre le PMMA et le PS n'est pas très élevée. En effet, dans notre cas, on peut définir la sélectivité comme étant le rapport $\frac{\text{épaisseur gravée de PMMA}}{\text{épaisseur gravée de PS}}$ à conditions constantes. Dans le cas d'une gravure par plasma argon/oxygène, une étude a montré que cette sélectivité est égale à 2, ce qui signifie que le PMMA est gravé seulement 2 fois plus vite que le PS [142]. Cela explique l'impact de cette gravure sur la matrice de PS.

Néanmoins, il s'est avéré par la suite que cet agrandissement du diamètre des trous est nécessaire au bon déroulement de l'étape suivante de dépôt de la couche magnétique dans cette matrice de PS. En effet, le renforcement de cette ouverture permet de s'assurer que le matériau magnétique est bien déposé au fond des cylindres et pas uniquement sur leurs flancs. De plus, tout risque de voir ces cylindres se boucher par le dépôt de métal est ainsi minimisé. L'optimisation de cette étape s'est faite en ajustant la puissance de la source RF ainsi que la durée du traitement par plasma. A titre d'exemple, les images de la Figure 20 montrent l'effet de la durée de traitement sur l'efficacité d'ouverture des

(voir le schéma de l'image 2, Figure 18), ce qui empêche l'accès par l'acétone au polymère. De plus, nous avons constaté la même difficulté lorsque la couche déposée n'a que de 2 nm d'épaisseur, auquel cas la couverture complète de la matrice de PS ne se produit pas. En effet, la matrice de PS est éliminée seulement sur une partie de la surface (Figure 21), ce qui signifie que même lorsque le solvant a accès au polymère, ce dernier n'est pas dissout. Par conséquent, il est fortement probable que le PS soit réticulé suite à l'exposition aux UV générés pendant l'étape de dépôt de la couche métallique, qui utilise un plasma pour pulvériser la cible métallique. Cette exposition aux UV rendrait le polymère insoluble dans l'acétone. Cette réticulation pourrait également avoir lieu pendant la première gravure de la couche neutre, pendant laquelle le plasma d'oxygène génère sûrement des rayonnements UV.

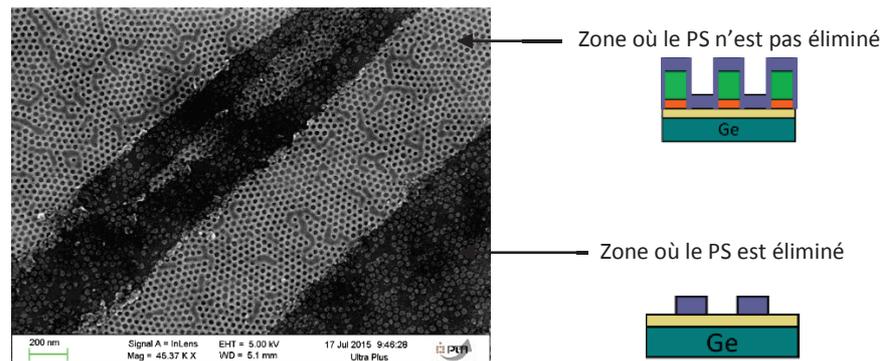


Figure 21. Image MEB d'un échantillon après dépôt soumis aux ultrasons dans un bain d'acétone pendant 20 minutes. Ce traitement n'a pas permis d'éliminer la matrice de PS de façon uniforme sur la surface de l'échantillon.

Pour éliminer cette matrice de PS, une gravure ionique réactive a été utilisée, qui se compose de deux traitements successifs sous plasma : un traitement sous plasma d'argon, destiné à bombarder et fragiliser la couche métallique déposée sur les piliers de PS, suivi par un plasma d'oxygène, pouvant ainsi s'infiltrer par les « fissures » jusqu'au PS et l'éliminer par gravure réactive. Le Tableau 5 récapitule les paramètres expérimentaux qui ont été mis au point après une étude des conditions de traitement par plasma.

Gas	Débit (sccm)	Puissance de la source RF (W)	Puissance du bias (W)	Pression (mTorr)	Temps (s)
Argon	60	350	120	4.2	45
Oxygène	80	200	200	10	900 (=15min)

Tableau 5. Paramètres expérimentaux de traitement par plasma de la matrice de PS recouverte d'une fine couche métallique.

Les paramètres qui ont été optimisés sont la puissance du « bias » du plasma d'argon (dont les ions doivent être suffisamment accélérés au niveau de la surface du substrat pour endommager la couche superficielle et permettre l'infiltration de l'oxygène jusqu'au PS) et la durée du plasma d'oxygène. A titre d'exemple, les images MEB de la Figure 22 montrent l'effet de la puissance plasma sur l'efficacité de gravure de la couche de PS. L'image (a) montre l'effet d'une puissance plasma trop faible où la matrice de PS n'est pas totalement éliminée. L'image (c) montre quant à elle l'effet d'une puissance

plasma trop élevée qui a entraîné l'élimination des nanoparticules en même temps que la matrice de PS. En revanche, les conditions expérimentales correspondant à l'image (b) donnent un résultat satisfaisant.

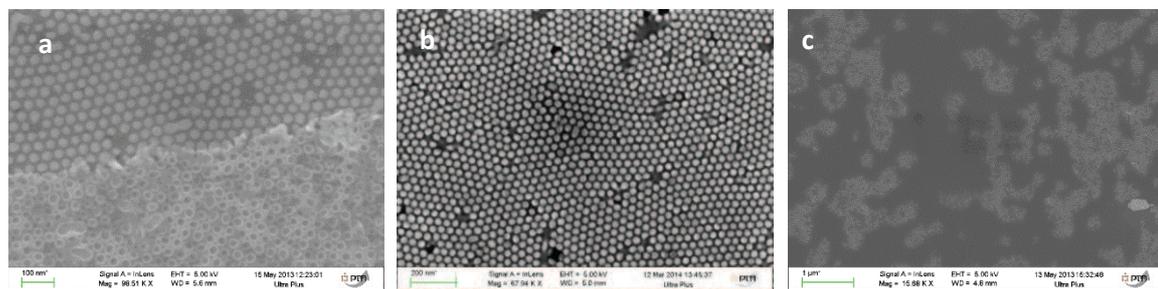


Figure 22. Images MEB montrant l'effet de la puissance plasma (puissance de la source et puissance de bias) d'un plasma d'argon sur le retrait de la matrice de PS sur laquelle une fine couche de métal a été déposée. a/ Puissance insuffisamment élevée, d'où une gravure uniquement partielle. b/ Conditions de puissance adéquates conduisant à la gravure de toute la matrice de PS en conservant les nanoparticules. c/ Conditions de puissance trop élevée conduisant à l'élimination de la matrice de PS et des nanoparticules.

4 - Une étape supplémentaire a été ajoutée, qui consiste à appliquer à la fin du procédé un traitement par plasma d'oxygène dilué dans l'argon plus puissant que le précédent (puissance de la source RF = 900 W, puissance du bias = 300 W) afin de « nettoyer » la surface de tout résidu éventuel de polymère et d'avoir une surface plus nette. La Figure 23 montre l'état de la surface suite à ce traitement.

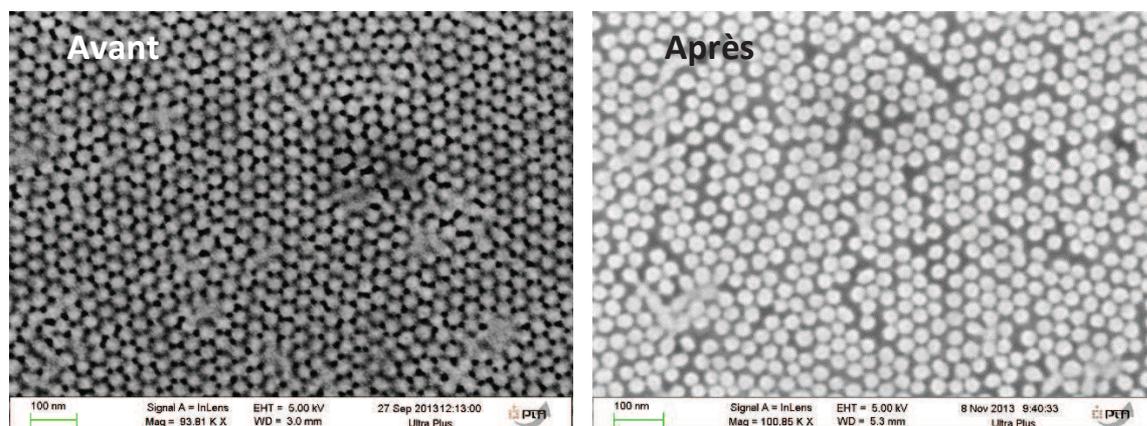


Figure 23. Images MEB avant et après traitement par plasma d'oxygène de nettoyage à la fin du procédé de fabrication.

La succession de ces étapes de gravure et de dépôt aboutit donc à la création de nanoparticules attachées au substrat et organisées de façon très régulière en réseau hexagonal compact.

2.2. Nature des nanoparticules

Le principal avantage de ce procédé de fabrication de nanoparticules magnétiques par rapport aux autres procédés connus est la possibilité unique de contrôler parfaitement la composition et la structure des nanoparticules. En effet, comme nous l'avons vu, les nanoparticules résultent des dépôts de couches minces de matériaux magnétiques réalisés par des procédés de pulvérisation cathodique

ou d'évaporation. Or, ces procédés de dépôt permettent de réaliser des multicouches dont l'épaisseur est contrôlée à l'échelle nanométrique. Afin de démontrer la potentialité du procédé décrit dans le paragraphe précédent pour l'élaboration de nanoparticules magnétiques, plusieurs métaux ont été déposés sur des matrices de PS. Le retrait de cette matrice de PS donne ensuite naissance à un réseau de nanoparticules attachées au substrat. Ces métaux sont le suivant :

- Le Nickel : une étude des conditions de dépôt et de gravure a été réalisée dans le cas du nickel, déposé par évaporation, pour des raisons pratiques de disponibilité. Le nickel est un matériau intéressant car il possède une forte aimantation à saturation : M_s (Ni massif) = 500 kA/m. La Figure 24 montre un réseau de nanoparticules de nickel obtenu sur le substrat de germanium oxydé, une fois la matrice de PS retirée.

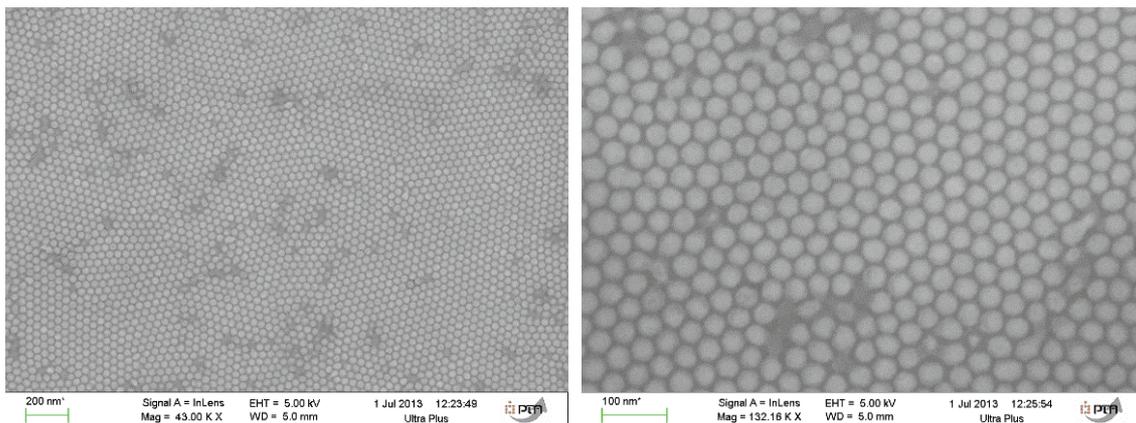


Figure 24. Images MEB d'un réseau de nanoparticules de nickel obtenu par dépôt par évaporation sous vide.

- Un alliage Fer-Nickel, le permalloy ($Fe_{20}Ni_{80}$) : ce composé magnétique est également très intéressant vu ses propriétés magnétiques remarquables en terme d'amplitude d'aimantation à saturation : M_s (FeNi massif) = 800 kA/m. En effet, rappelons que les nanoparticules dont nous étudions l'élaboration sont destinées à être utilisées en tant qu'agent de contraste pour l'imagerie médicale : il est donc nécessaire qu'elles aient une aimantation à saturation la plus forte possible. Cet alliage a été déposé par évaporation sur la matrice de PS selon le procédé que nous avons développé, ce qui a permis d'obtenir un réseau de nanoparticules comme le montre la Figure 25.

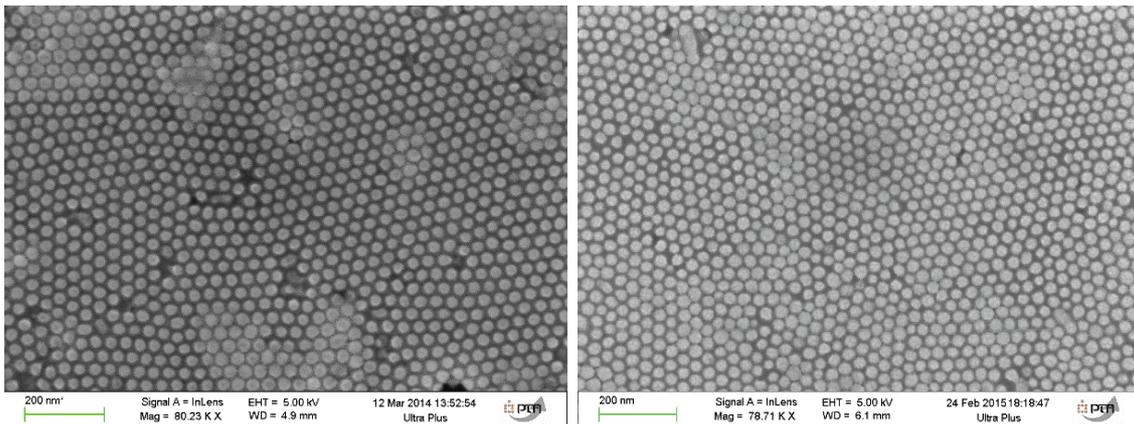


Figure 25. Images MEB d'un réseau de nanoparticules de permalloy obtenu par dépôt par évaporation sous vide.

Ce matériau servira tout au long de ce travail de matériau de référence, puisque sa forte aimantation à saturation permet en quelque sorte de zoomer sur les phénomènes magnétiques. S'il était biocompatible, il serait sans aucun doute le matériau phare pour la composition de nanoparticules magnétiques pour des applications biomédicales.

- La magnétite Fe_3O_4 : il est possible de rendre ces particules biocompatibles en déposant de la magnétite, qui reste le matériau phare en ce qui concerne les nanoparticules magnétiques utilisées à des fins biomédicales. En effet, comme nous le verrons dans la section 3.2.1, il est le matériau biocompatible présentant les meilleures propriétés magnétiques, notamment parmi les oxydes de fer : $M_s (Fe_3O_4 \text{ massive}) = 480 \text{ kA/m}$. La magnétite est déposée par pulvérisation cathodique réactive. La Figure 26 montre l'obtention d'un réseau régulier de nanoparticules de magnétite déposées sur un substrat de germanium oxydé.

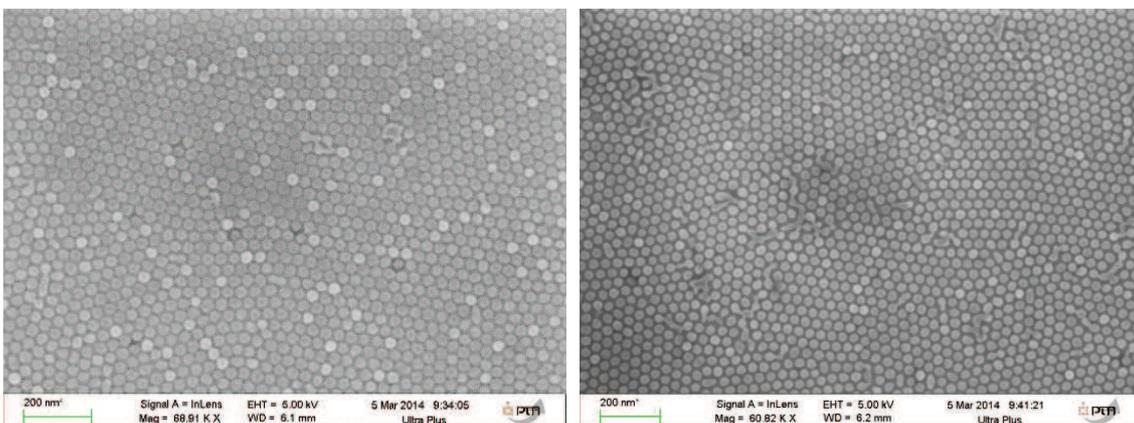


Figure 26. Images MEB d'un réseau de nanoparticules de magnétite obtenu par dépôt par pulvérisation cathodique sous vide.

- Structures en multicouches : enfin, ce procédé de fabrication a été utilisé pour réaliser des empilements composés du matériau magnétique recouvert de deux couches d'or, une couche inférieure et une couche superficielle. Ces couches d'or ont plusieurs objectifs : 1) augmenter la biocompatibilité des particules de FeNi ou de Ni, l'or étant non toxique pour les milieux biologiques. 2) Protéger le matériau de l'oxydation. 3) Permettre sa future fonctionnalisation, puisque comme nous le verrons dans la section 4.2, l'or est connu pour permettre l'ancrage

de groupements thiols dont l'élément de tête, un composé du soufre, possède une forte affinité pour ce métal.

En conclusion, les images MEB obtenues à la fin du procédé de fabrication indiquent que nous avons réussi à obtenir un réseau hexagonal compact de nanoparticules attachées au substrat de germanium oxydé en surface, dont le matériau est au choix de l'opérateur. Elles peuvent ainsi être composées d'un matériau monoatomique, d'un alliage ou de multicouches différentes. Il s'agit à présent de déterminer si ces particules ont la géométrie attendue, et si leurs propriétés magnétiques les rendent exploitables pour des applications biomédicales telles que l'imagerie médicale.

3. Etude des caractéristiques géométriques et magnétiques des nanoparticules attachées au substrat

3.1. Caractérisations géométriques

Avant de décrire les caractéristiques géométriques des nanoparticules, nous allons analyser plus en détail les caractéristiques géométriques du réseau hexagonal de trous dans la matrice de polystyrène (PS), obtenu par retrait de la phase organisée PMMA du copolymère à blocs.

3.1.1. Evolution des caractéristiques géométriques des échantillons avec la première gravure

La réalisation de nanoparticules magnétiques repose sur le dépôt de couches minces sur une matrice de PS comportant des ouvertures cylindriques comme le rappelle le schéma de la Figure 27. Les caractéristiques géométriques des ouvertures cylindriques déterminent celles de nanoparticules obtenues. En particulier, la profondeur des trous dans la matrice de PS va conditionner l'épaisseur possible du dépôt, donc celle des nanoparticules. Initialement, juste après l'élimination de la phase PMMA, la profondeur des trous est estimée à environ 50 nm. Cette valeur, qui correspond à l'épaisseur de la couche du copolymère, est estimée sur la base de la concentration massique du copolymère dans la solution et de la vitesse de rotation de la tournette utilisée pour étaler la couche du copolymère.

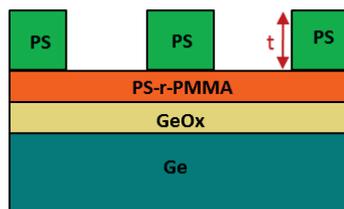


Figure 27. Représentation schématique de la matrice de polystyrène (PS) obtenue par auto-organisation du copolymère à blocs PS-b-PMMA suivi du retrait de la phase PMMA. L'épaisseur t est estimée à environ 50 nm.

Cette valeur n'a pas pu être confirmée par microscopie à force atomique (AFM), dans la mesure où les meilleures pointes AFM disponibles possédaient un rayon de courbure qui s'est révélé supérieur aux dimensions des ouvertures dans la matrice de PS. En effet, les pointes AFM disponibles sont des pointes dites « SSS-NCHR » (Super Sharp Silicon), dont le demi-angle du cône est de 10° maximum, ce qui fait un diamètre d'environ 18 nm à une hauteur de 50 nm (voir Figure 28). Or, à cette étape, le diamètre des trous a été estimé à 15 nm en moyenne d'après les images MEB, ce qui est donc trop étroit pour laisser passer la pointe. L'estimation de ce diamètre a été faite grâce au logiciel ImageJ (National Institutes of Health), qui permet de faire des analyses statistiques de surface à partir des images MEB.

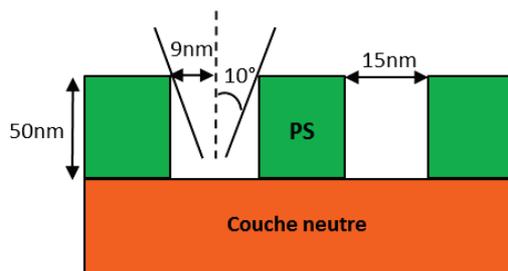


Figure 28. Schéma d'une matrice de PS faisant apparaître les dimensions des ouvertures ainsi que les caractéristiques de la pointe AFM. Ce schéma montre que la pointe AFM ne permet pas d'imager la matrice, la dimension de cette pointe étant supérieure à celle des trous dans la matrice.

Cependant, après la première gravure sous plasma, le diamètre des trous est sensiblement augmenté et devient supérieur à 30 nm, comme on peut l'estimer à partir des images MEB telles que celles de la Figure 18, image 1. Il devient donc possible de faire des mesures AFM de la profondeur des trous avec ces pointes fines dites « SSS ». Un exemple de mesure AFM sur un échantillon après la gravure de la couche neutre est donné Figure 29 :

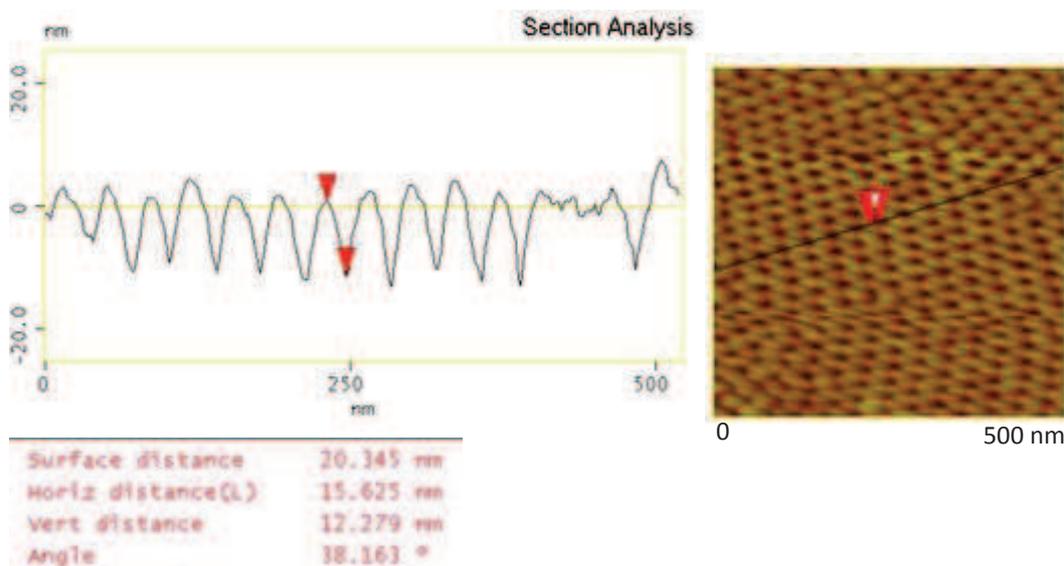


Figure 29. Analyse par imagerie AFM via une pointe SSS-NCHR d'un échantillon comportant une matrice de PS ayant subi un traitement plasma pour retirer la couche neutre (PS-r-PMMA): la distance verticale (« Vert distance ») indique la profondeur des trous dans la matrice de PS.

Plusieurs mesures effectuées par AFM ont permis de déterminer une valeur moyenne de 12 nm pour la profondeur de trous. Le profil de topologie de la Figure 29 laisse penser que la pointe AFM n'atteint pas le fond des trous, puisque l'on n'observe pas de plateau au fond des trous. Cependant, ce genre de profil est classique en AFM et peut s'expliquer par des effets de répulsions de la pointe lorsque celle-ci arrive sur les bords des trous.

La profondeur de trous dans la matrice de PS est un paramètre déterminant pour l'épaisseur maximale de nanoparticules qu'il est possible d'obtenir grâce à cette matrice. En effet, l'obtention des nanoparticules dépend de la possibilité d'éliminer la couche de PS une fois la couche métallique déposée sur la matrice. Par conséquent, l'épaisseur de cette couche doit rester inférieure à celle des trous de la matrice de PS de telle sorte que l'accès latéral à la couche de PS reste possible. Une étude

a été conduite pour déterminer l'épaisseur maximale de la couche métallique, et donc celle des nanoparticules, qu'il est possible d'obtenir avec ce procédé. Pour ce faire, plusieurs couches de nickel ont été déposées sur des matrices de PS ayant toutes la même épaisseur de polymère comme le montre schématiquement la Figure 30. Des couches de 5, 10, 15 et 20 nm ont ainsi été déposées, puis un traitement par plasma d'argon/oxygène avec les paramètres du Tableau 5 a été appliqué afin d'enlever la matrice de PS et de révéler ainsi les nanoparticules en fond de trous. Comme on le voit sur les images MEB de la Figure 31, au-delà de 10 nm d'épaisseur de la couche métallique, il est impossible d'éliminer la couche de PS, ce qui indique que la couche métallique est trop épaisse pour être fragilisée par le plasma d'argon, ce qui empêche par la suite le plasma d'oxygène d'avoir accès au PS.

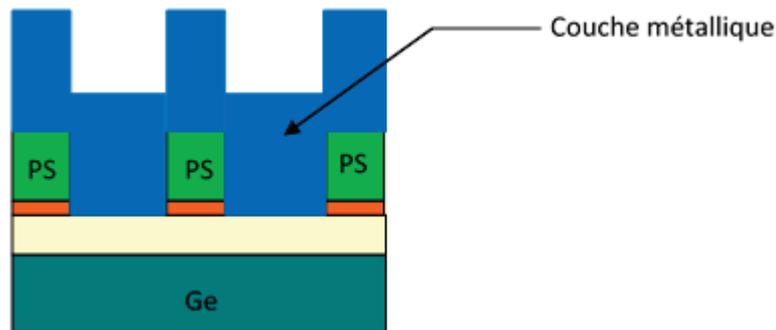


Figure 30. Représentation schématique d'une matrice de PS sur laquelle une couche métallique épaisse a été déposée en vue de former des nanoparticules en fond de trous une fois la matrice de PS éliminée.

En conclusion, ces résultats montrent que ce procédé de fragilisation de la couche métallique qui permet ensuite la gravure réactive de la couche de PS n'est possible que si l'épaisseur de la couche métallique ne dépasse pas la profondeur de trous, qui est ici de 12 nm environ.

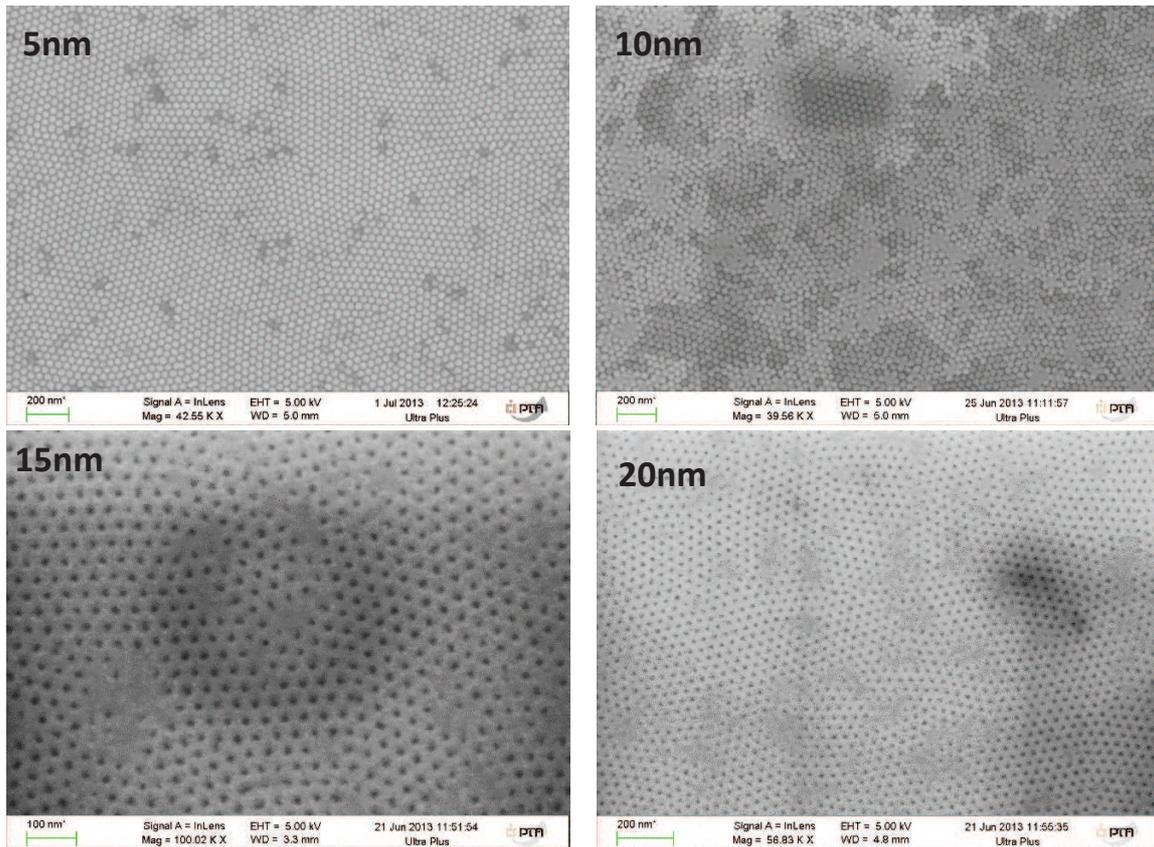


Figure 31. Images MEB des échantillons de différentes épaisseurs à la fin du procédé de fabrication permettant l'obtention de nanoparticules de 5 nm d'épaisseur. Au-delà de 10 nm, la couche métallique est trop épaisse pour permettre sa fragilisation par le plasma d'argon.

A fortiori, on peut vérifier qu'il est plus facile d'éliminer la matrice de PS si des couches métalliques moins épaisses sont déposées. En effet, comme le montre la Figure 32, des nanoparticules de 3 nm d'épaisseur sont obtenues après une gravure oxygène de 10 minutes, contre 15 minutes pour le procédé optimisé.

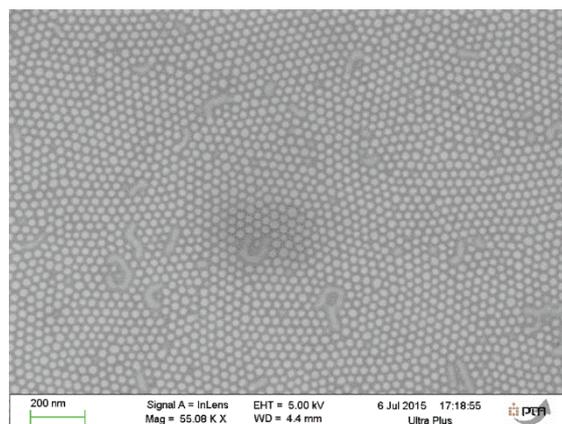


Figure 32. Image MEB de nanoparticules de nickel de 3 nm d'épaisseur, pour lesquelles la matrice de PS est plus « facile » à éliminer.

En conclusion, il apparaît clairement que le plasma Argon / Oxygène destiné à graver les 9 nm de la couche neutre de copolymère a un impact important sur la géométrie du système, puisqu'en

augmentant de 50% le diamètre des trous, il diminue de 80% leur hauteur et impose ainsi une épaisseur maximum de nanoparticules d'environ 10 nm. Plus l'épaisseur de la couche de métal déposée sur la matrice de PS est faible, plus il est facile d'éliminer cette dernière.

3.1.2. Caractérisations géométriques des nanoparticules

Les nanoparticules qui résultent du dépôt des couches métalliques en fond de trous de la matrice de PS sont caractérisées par leur épaisseur, leur diamètre (et sa distribution) et leur distance centre à centre au sein du réseau hexagonal compact formé par ces nanoparticules. Cette dernière distance est directement liée à la période intrinsèque du réseau de copolymère, qui est ici de 40 nm comme le montre la Figure 33.

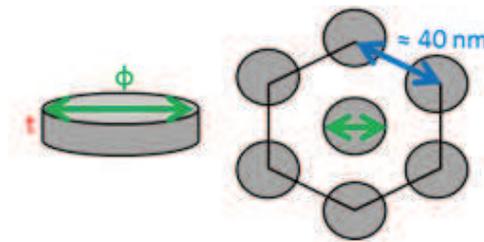


Figure 33. Représentation schématique des caractéristiques géométriques des nanoparticules, qui ont une forme de disque plat et sont espacées d'environ 40 nm centre à centre.

Ainsi, avec cette distance inter-particules, ce procédé de fabrication permet d'obtenir une densité de $7,2 \cdot 10^{10}$ particules /cm² à la surface du substrat.

a - Epaisseur

Comme nous l'avons vu au cours du paragraphe précédent, la profondeur des trous limite l'épaisseur des nanoparticules métalliques à 10 nm environ. C'est pourquoi les nanoparticules recouvertes d'or, qui sont celles qui présentent le plus grand intérêt pour l'application biomédicale visée, sont composées d'une multicouche métallique d'épaisseur totale de 9 nm, dont l'empilement est le suivant : Au (2nm) / couche magnétique (5 nm) / Au (2 nm). Les couches d'or permettent d'une part de protéger le matériau de l'oxydation, et serviront d'autre part pour la fonctionnalisation des nanoparticules.

Cependant, des mesures EDX (Energy Dispersive X-ray spectrometry) effectuées sur un dépôt d'une multicouche de Ni (7 nm) / Au (2 nm) une fois la matrice de PS éliminée ont révélé l'absence d'or, comme le montre la Figure 34. Ceci montre que le plasma d'argon destiné à faciliter l'élimination de la couche de PS en fragilisant la couche métallique déposée sur le PS entraîne la gravure de la couche d'or superficielle.

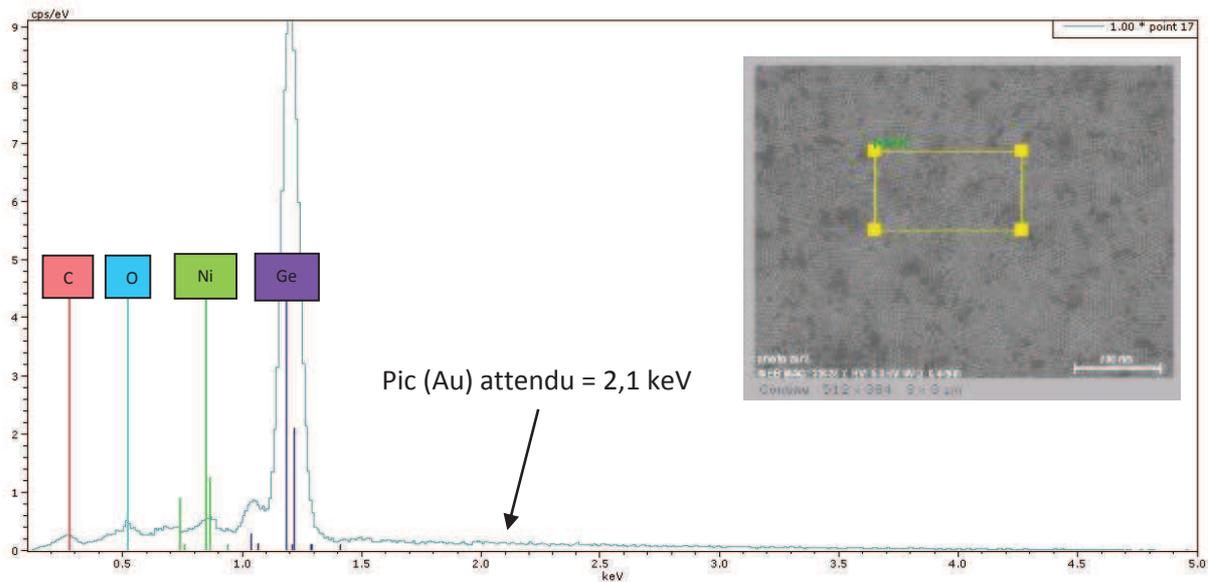


Figure 34. Spectre EDX réalisé dans la zone encadrée en jaune sur l'image MEB correspondant aux nanoparticules provenant du dépôt d'une multicouche de Ni (7 nm) / Au (2 nm) : le pic de nickel est clairement observé alors que le pic d'or, attendu à 2,1 keV, est absent.

La gravure de la couche d'or par le plasma d'argon est confirmée par une analyse par EDX du même type d'échantillon avec empilement Ni/Au mais juste avant le traitement plasma. En effet, la Figure 35 montre la présence d'un pic correspondant à la couche d'or.

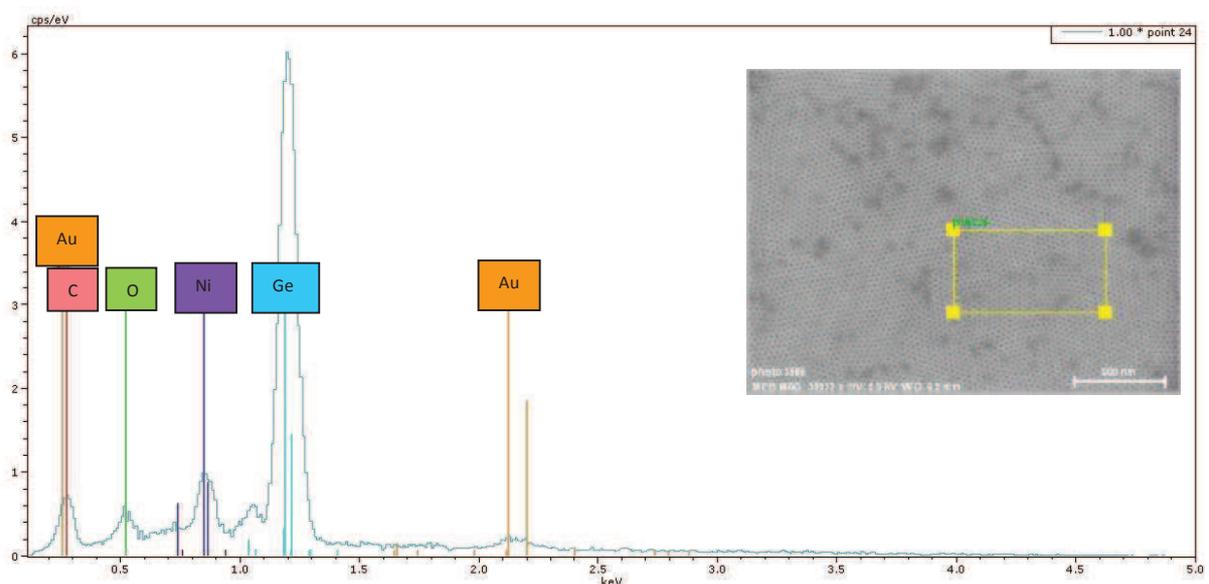


Figure 35. Spectre EDX réalisé dans la zone encadrée en jaune sur l'image MEB correspondant à une multicouche de Ni (7 nm) / Au (2 nm) déposée sur matrice de PS **avant** l'élimination de cette dernière.

La disparition de la couche d'or a été confirmée par spectrométrie à photoélectron XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy), qui est une technique d'analyse plus précise que l'EDX. De plus, une analyse plus directe de cet effet a été réalisée en utilisant une couche d'or déposée en pleine plaque puis soumise à l'action du plasma Argon / Oxygène. La disparition totale de cette couche d'or a ainsi été confirmée.

A partir de ces observations, il est probable que le traitement plasma entraîne également la gravure de la couche magnétique sous-jacente à la couche d'or superficielle. Ceci a été vérifié en effectuant des mesures AFM sur des échantillons composés d'empilements Au (2 nm) / Ni (5 nm) / Au (2 nm), obtenus suite à l'élimination de la couche de PS par plasma d'argon / oxygène. Ces mesures présentées par la Figure 36 montrent une épaisseur résiduelle moyenne de l'ordre de 3 à 4 nm alors que l'empilement initial a une épaisseur de 9 nm au total.

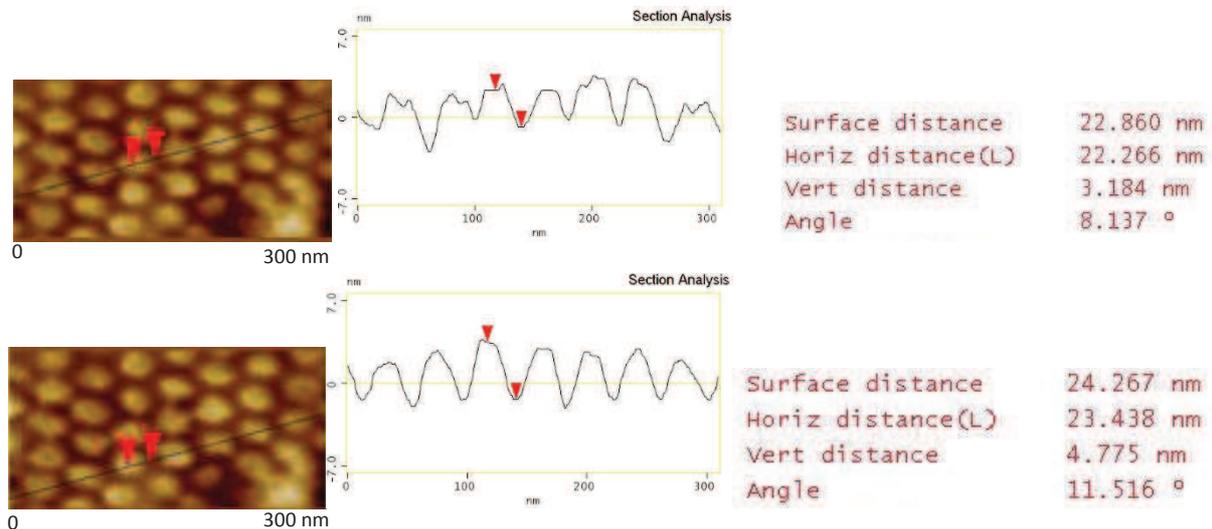


Figure 36. Cartographie par AFM en mode topographie via une pointe SSS-NCHR de nanoparticules composées d'un empilement Au (2 nm) / Ni (5 nm) / Au (2 nm) et profil en coupe réalisé selon la ligne en noir de l'image. L'épaisseur de ces particules identifiée par la donnée « Vert distance » est entre 3 et 4 nm.

Ce résultat signifierait qu'il ne reste à la fin du procédé qu'une épaisseur de 1 ou 2 nm du matériau magnétique. Ces mesures ayant été faites avec des pointes AFM de haute résolution (pointes SSS), il n'y a *a priori* aucun doute sur leur validité, puisque même si les particules sont proches les unes des autres (distance bord à bord de 5 nm), ces pointes sont suffisamment fines pour s'introduire complètement dans l'espace inter particules.

Par ailleurs, ce résultat a été confirmé par des mesures magnétiques qui ont montré une diminution importante de l'aimantation à saturation suite à l'élimination de la couche de PS par plasma d'argon, ce qui a été interprété comme une diminution du volume du matériau magnétique. Pour ce faire, des mesures d'aimantation par SQUID (Superconductiong QUantum Interference Device) d'une couche de Au (2 nm) / Ni (5 nm) / Au (2 nm) déposée sur une matrice de PS ont été réalisées sur le même échantillon avant et après la gravure de la matrice de PS. Le résultat est représenté par la Figure 37, qui montre deux cycles d'hystérésis décrivant l'aimantation de l'échantillon avant et après élimination de la couche de PS. Ces deux cycles d'aimantation devraient *a priori* présenter la même aimantation à saturation, puisque celle-ci est intrinsèque au matériau. Or, on observe une diminution d'un facteur 8 de l'aimantation à saturation après retrait de la couche de PS.

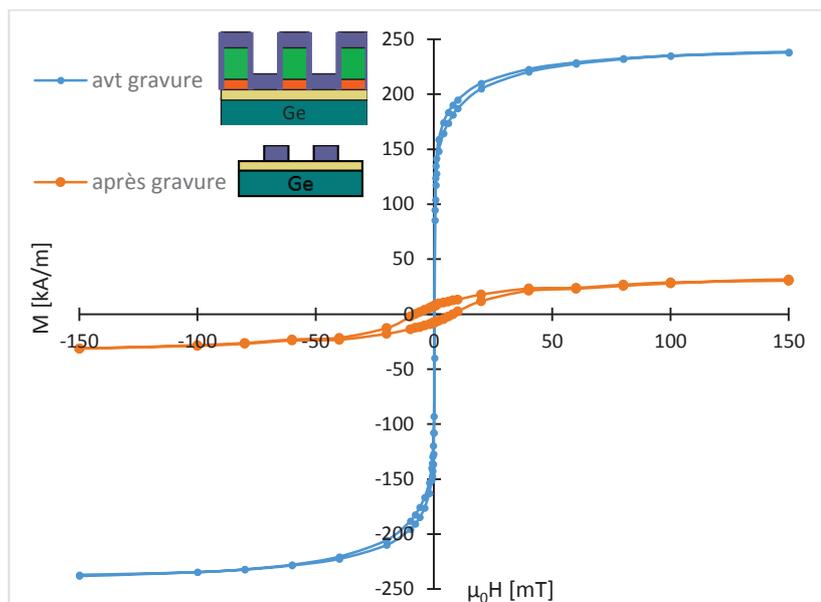


Figure 37. Cycles d'hystérésis mesurés au SQUID d'un échantillon composé d'une couche de Au (2 nm) / Ni (5 nm) / Au (2 nm) avant et après la gravure de la matrice de PS. Une diminution d'un facteur 8 de l'aimantation à saturation est constatée après gravure.

Ce facteur 8 de la diminution de l'aimantation à saturation vient de l'hypothèse que l'épaisseur magnétique est la même avant et après gravure. En d'autres termes, si l'on considère que l'aimantation à saturation du matériau est celle mesurée avant la gravure de 238 emu/cm^3 , et avec un moment mesuré après gravure de $3,8 \cdot 10^{-6} \text{ emu}$, cela donne un volume magnétique de $1,6 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^3$, alors que le volume estimé par la pesée de l'échantillon et calculé avec les dimensions « nominales » des nanoparticules (épaisseur de 5 nm) est de $16 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^3$, soit 10 fois plus élevé.

La diminution de l'aimantation à saturation peut être un effet combiné de la gravure du matériau magnétique et de l'oxydation du matériau restant. Cette oxydation est très probable étant donné que la couche d'or censée protéger le matériau de l'oxydation est rapidement gravée sous l'action du plasma, laissant le matériau exposé au plasma d'oxygène employé pour éliminer la couche de PS pendant une durée non négligeable.

Ainsi, nous sommes confrontés ici au problème principal de ce procédé de fabrication, qui cherche à combiner une approche « bottom-up » avec une approche « top-down » classique (gravure), sans pour autant respecter parfaitement les conditions optimales de ces deux approches. D'après les caractérisations effectuées, il semblerait que l'origine de la gravure du matériau magnétique soit à chercher au tout début du procédé de fabrication. En effet, la sélectivité entre le PS et le PMMA étant très faible, l'élimination de la couche neutre et des résidus de PMMA par gravure a un fort impact sur les dimensions de la matrice de PS. La hauteur des piliers en est particulièrement diminuée, ce qui laisse peu de choix pour l'épaisseur du matériau déposée. Celle-ci est donc très proche de la hauteur maximum des trous, et est donc fortement impactée par la dernière gravure.

Cependant, ces problèmes ne se sont pas révélés rédhibitoires pour la suite de notre étude. Pour pallier à la gravure de la couche l'or qui recouvre le matériau magnétique, une alternative a été trouvée et qui consiste à déposer cette couche de 2 nm à la fin du procédé, c'est-à-dire, après la gravure de la matrice de PS. Comme nous le verrons dans la section 4, cela n'altère pas la libération des

nanoparticules du substrat et leur mise en suspension. En effet, la couche d'or étant relativement mince, elle ne constitue pas une barrière suffisamment étanche qui empêcherait la pénétration du solvant sous les nanoparticules qui, en éliminant la couche sacrificielle, libérerait ces nanoparticules. On rappelle que cette couche d'or, en plus de son rôle antioxydant, aura pour but premier de faciliter la fonctionnalisation des particules, qui pourra ainsi être faite *via* des molécules thiols.

b - Caractérisation du diamètre et de la distribution en taille des nanoparticules magnétiques

Comme évoqué précédemment, le principal objectif de cette étude est de réaliser des nanoparticules magnétiques de compositions contrôlées, « fonctionnalisables » et possédant une plus faible dispersion en taille que les particules commerciales obtenues par voie chimique. On rappelle que ce critère de monodispersion est très important d'une manière générale pour des particules destinées à des applications biomédicales, et d'autant plus lorsqu'il s'agit d'applications dans lesquelles on utilise leurs propriétés magnétiques, tels que pour les agents de contraste en imagerie médicale. En effet, plus leur dispersion en taille est importante, plus les taux de relaxation des protons situés dans leur environnement proche vont être distribués par ces effets de taille au lieu d'être seulement distribués par la nature du milieu entourant les particules. Ceci a donc pour effet d'amoinrir la qualité de l'image [143].

Le fait que l'on puisse en effet s'attendre à atteindre cet objectif se justifie par la composante « top-down » du procédé de fabrication, c'est-à-dire l'utilisation d'un masque de trous pour le dépôt du matériau, laquelle se rapproche des procédés de lithographie optique qui permettent la fabrication de nanoparticules très monodisperses. En revanche, la composante « bottom-up » correspondant à l'étape d'auto-organisation du copolymère tendrait à augmenter la distribution en taille des nanoparticules.

Dans le cas de nanoparticules fabriquées par voie chimique, et qui sont donc en suspension à la fin du procédé de fabrication, l'analyse du diamètre et de la distribution en taille se fait usuellement par mesures DLS (Dynamic Light Scattering) [144]. Cette technique a pour principe la mesure de l'intensité d'un faisceau laser ayant traversé une suspension contenant les particules. Ces particules étant soumises au mouvement Brownien, l'intensité recueillie sous un certain angle, fruit d'interférences constructives et destructives, varie en fonction de leur mobilité, et donc de leur taille. Cependant, cette technique nécessite une suspension parfaitement propre de tout résidu et contenant une concentration en particules relativement importante. Or, comme nous le verrons plus en détail dans les chapitres suivants, ces deux critères de pureté et concentration ne peuvent pas être assurés avec le procédé de fabrication développé au cours de la présente étude. En effet, d'une part, un degré de pureté suffisant ne peut pas être atteint car la suspension obtenue après dissolution de la couche sacrificielle de germanium est « polluée » par ce qui semble être des résidus de polymère (voir section 4). D'autre part, ce procédé 2D a été optimisé sur de petits échantillons de 5 mm de côté pour des raisons pratiques d'approvisionnement en plaques, ce qui limite son rendement.

Cependant, le procédé de fabrication présenté dans ces travaux présente l'avantage indéniable que l'on peut observer les particules sur un substrat avant leur mise en suspension. Les images MEB étant particulièrement adaptées pour une analyse de surface, le logiciel ImageJ (National Institutes of Health) a été choisi pour la mesure du diamètre et l'analyse de la distribution en taille des nanoparticules. Le principe de base du procédé d'analyse d'image de ce logiciel est de déterminer, à partir d'une image numérisée en noir et blanc, la limite particule/substrat en détectant la frontière

entre pixels blancs et pixels noirs. Ensuite, le logiciel calcule le diamètre de Feret des particules (plus grande longueur entre deux points de l'objet) en tenant éventuellement compte d'un intervalle imposé. Une contrainte peut également être ajoutée sur la « circularité » de l'objet mesuré, allant de 0 pour une barre à 1 pour un cercle parfait. Ces intervalles permettent de supprimer les défauts de l'image et les éléments de la surface qui ne doivent pas être comptabilisés comme des particules (poussières...). Dans l'analyse menée, les intervalles à imposer ont été déterminés en essayant plusieurs intervalles « cohérents » par rapport à la dimension attendue des particules et en regardant sur les images après traitement que la majorité des résidus sont bien éliminés du calcul. Les intervalles retenus sont une surface de particule comprise entre 300 et 1300 nm² (ce qui correspond à des particules circulaires de diamètre compris entre 20 et 40 nm), et une circularité comprise entre 0,5 et 1, ce qui élimine les résidus trop allongés.

Cette méthode très simple permet l'analyse statistique de surfaces et la prise en compte d'un très grand nombre de particules, ce qui rend l'étude plus fiable en réduisant l'erreur statistique. Dans le cas des particules fabriquées par voie chimique, selon la méthode de fabrication, on rencontre régulièrement dans la littérature des analyses de taille qui ont été faites en analysant « à la main » une centaine de particules tout au plus, ce qui est donc beaucoup plus contraignant et moins précis que dans notre cas [60] [145] [146]. Les analyses ont été effectuées sur plusieurs images à différents grossissements, pour les différents empilements et matériaux déposés. La Figure 38 présente un exemple de traitement d'image avec l'image MEB brute, l'image reconstituée après traitement, les deux images précédentes superposées ainsi que l'histogramme correspondant à la distribution en taille.

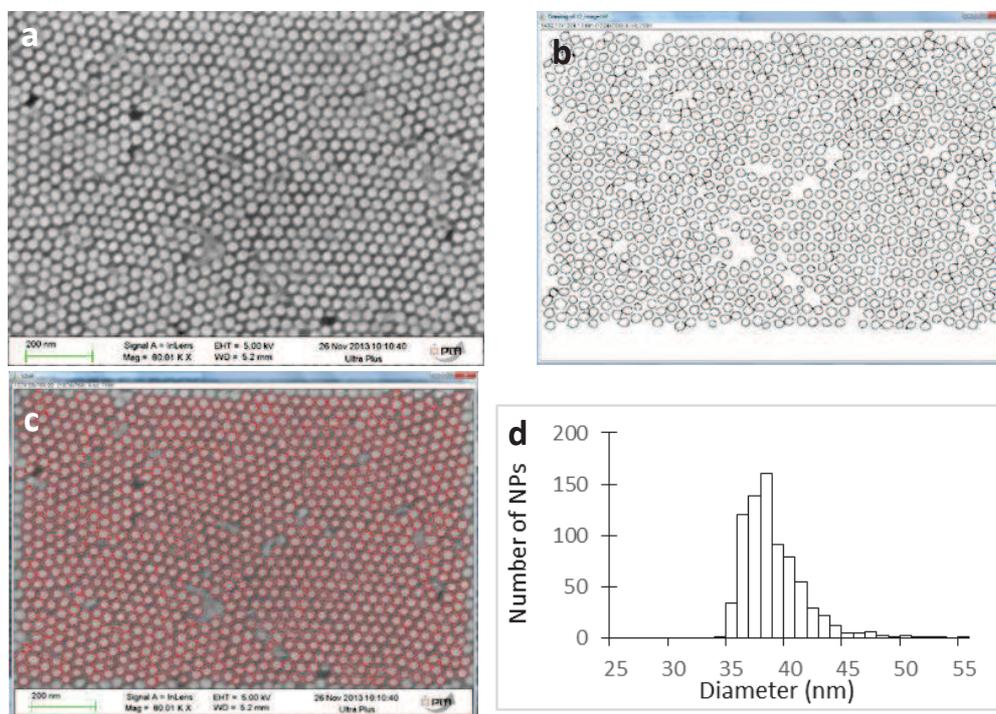


Figure 38. Exemple d'une image traitée par le logiciel ImageJ destinée à déterminer la distribution en taille des nanoparticules. a/ Image MEB brute. b/ Image reconstituée par le logiciel où apparaît le

contour des nanoparticules. c/ Superposition des images a et b. d/ Histogramme de taille des nanoparticules tirées de l'image b.

La distribution en taille des particules tirée de l'analyse des images MEB par le logiciel ImageJ est classiquement ajustée par une loi de type lognormal, comme montré sur deux exemples Figure 39.

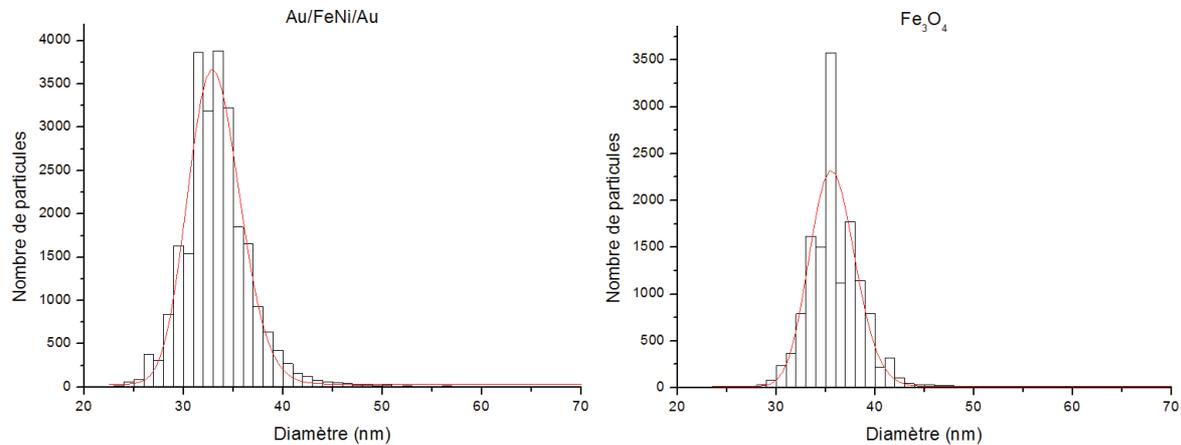


Figure 39. Histogrammes de diamètres des nanoparticules tirées des images MEB traitées par le logiciel ImageJ, modélisés par une loi lognormal. Les deux exemples concernent des nanoparticules Au/FeNi/Au et Fe₃O₄. Des résultats similaires ont été obtenus sur des nanoparticules FeNi et Au/Fe₃O₄/Au.

Ce type de dispersion lognormal est en effet très souvent retrouvé dans la littérature pour les nanoparticules fabriquées par voies chimiques, dans lesquelles le procédé de croissance des grains se fait à partir de phénomènes de nucléation, diffusion, cristallisation, lesquels sont des phénomènes non homogènes en fonction du temps. Plusieurs modèles théoriques ont été élaborés pour essayer d'expliquer l'origine de cette dispersion en tailles de nanoparticules, qui ne seront pas détaillés ici [147-153]. Dans notre cas, on peut comprendre cette distribution en se rappelant que la distribution en taille des particules est initialement fixée par la dispersion en taille des cylindres de PMMA qui se forment dans la matrice de PS, et dont l'organisation est gouvernée par la cinétique de diffusion des chaînes de polymère au cours du processus d'auto-organisation. Cette cinétique, qui peut être décrite par plusieurs étapes, passe par la nucléation de grains de cylindres verticaux, puis leur croissance, et peut donc se rapprocher des phénomènes ayant lieu lors de la cristallisation de nanoparticules fabriquées par des techniques « bottom-up » comme c'est le cas dans les approches par voie chimique. Tableau 6 donne une synthèse des analyses des caractéristiques géométriques des nanoparticules en termes de leur diamètre moyen et de l'écart-type de la distribution du diamètre. Ce tableau donne également le nombre de nanoparticules (NPs) prises en compte dans le calcul pour les différents matériaux.

Nature des particules	FeNi	Au/FeNi/Au	Fe ₃ O ₄	Au/Fe ₃ O ₄ /Au
Diamètre moyen (nm)	33	33	35	35
Ecart-type σ (%)	7	7,8	6,4	7
Nombre de NPs prises en compte	69 527	25 496	13 200	15 237

Tableau 6. Synthèse des analyses des caractéristiques géométriques des nanoparticules, calculées statistiquement à partir des analyses ImageJ sur plusieurs images MEB.

Le Tableau 6 montre que l'on obtient des nanoparticules avec un diamètre moyen de 33 et 35 nm, ce qui correspond parfaitement à la longueur caractéristique du copolymère dibloc utilisé. De plus, le résultat le plus marquant de cette étude est l'obtention d'une faible dispersion du diamètre des nanoparticules. En effet, l'écart-type de la distribution de ce diamètre n'excède pas 7-8% ce qui place ce procédé d'élaboration parmi l'un des plus efficaces en ce qui concerne l'obtention de nanoparticules monodisperses, par comparaison aux particules commerciales obtenues par voie chimique, dont la dispersion en taille est comprise entre 10% et 20% dans les meilleurs des cas (voir chapitre 1, section 2). De plus, ces techniques chimiques nécessitent souvent des étapes supplémentaires de filtration pour trier la solution, ce qui ajoute un élément de complexité.

Nous sommes donc en mesure de confirmer que le procédé d'élaboration de nanoparticules par copolymère dibloc permet l'obtention de nanoparticules en forme de disque plat de 35 nm de diamètre faiblement dispersées. Ces caractéristiques remarquables rendent ces nanoparticules particulièrement bien adaptées aux applications biomédicales.

En ce qui concerne les agents de contraste pour l'imagerie médicale, comme décrit dans le chapitre 1, section 3.1, ceux-ci sont classés en plusieurs catégories en fonction de leur diamètre hydrodynamique, c'est-à-dire en prenant en compte la couche fonctionnelle dont le rôle premier est d'améliorer la stabilité colloïdale des particules en suspension. Avec un cœur magnétique de diamètre 35 nm, on peut estimer que le diamètre hydrodynamique de ces nanoparticules pourra être compris entre 50 et 100 nm en fonction de la longueur des molécules utilisées pour les fonctionnaliser (PEGs courts ou longs, SAMs de thiols courts ou longs...), ce qui les classerait parmi les SPIO (SuperParamagnetic Iron Oxide), dont le diamètre hydrodynamique est supérieur à 50 nm. Avec ce système de copolymère dibloc particulier PS-PMMA, il est possible de réduire le diamètre des particules en réduisant le diamètre des cylindres de PMMA dans la phase organisée, sans que l'on puisse pour autant atteindre des résolutions bien meilleures que les meilleures techniques de lithographie. Ce point est abordé brièvement dans le paragraphe suivant.

c - Résolution en taille

Comme expliqué dans la section 1, la taille des domaines formés lors de l'auto-organisation d'un copolymère dibloc est principalement fonction de l'incompatibilité des deux monomères ainsi que de la masse molaire du copolymère. Plus l'incompatibilité est importante, plus la période intrinsèque du copolymère est courte, alors que plus la masse molaire est importante, plus cette longueur caractéristique est grande. Le copolymère à blocs PS-PMMA utilisé dans cette étude n'est pas un système hautement incompatible, l'incompatibilité restant relativement faible ($\chi \approx 0.06$). Ainsi, en

jouant sur les masses molaires, le diamètre minimal des particules que l'on peut atteindre avec ce système est d'environ 23 nm. Ceci est confirmé par les résultats préliminaires montrés Figure 40 et obtenus avec un copolymère PS-*b*-PMMA toujours en proportions 70:30, de masses molaires 23,8 kg.mol⁻¹ et 12,5 kg.mol⁻¹ respectivement (soit environ 2 fois plus faibles que dans le copolymère utilisé jusque-là, de longueur caractéristique 35 nm) et d'indice de polydispersité de 1,05. Cette image MEB a été obtenue dans les mêmes conditions de gravure et de dépôt développées sur le copolymère utilisé jusque-là. Le résultat important mis en évidence sur la Figure 40 montre la possibilité de diminuer davantage le diamètre des nanoparticules que nous pouvons obtenir avec le procédé développé.

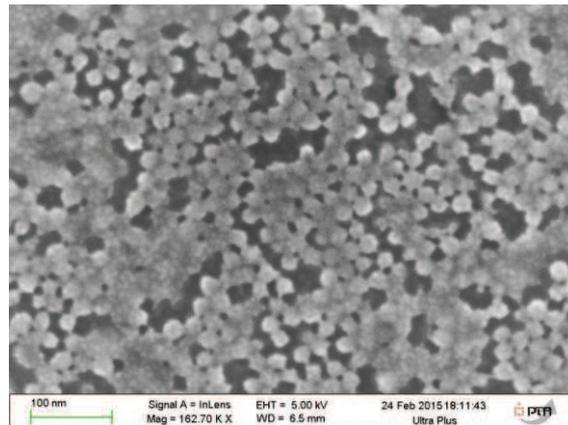


Figure 40. Image MEB de nanoparticules obtenues à partir d'un système PS-*b*-PMMA de plus faibles masses molaires. Le diamètre des nanoparticules est d'environ 23 nm.

En conclusion, nous avons donc démontré que le procédé de fabrication de nanoparticules magnétiques par copolymère dibloc permet d'obtenir des nanoparticules de 35 nm de diamètre en moyenne, très monodisperses et de composition versatile. Elles se distinguent de façon intéressante des particules conventionnelles en se présentant sous forme de cylindres ou disques plats dont l'épaisseur est beaucoup plus mince que le diamètre, conférant aux particules une anisotropie magnétique de forme. Il est cependant important de noter que le matériau est en partie gravé lors de l'élimination de la matrice de PS. Avec une épaisseur initiale de 5 nm de matériau magnétique, on obtient des nanoparticules d'environ 2 nm d'épaisseur en fin de procédé. Nous utiliserons désormais l'appellation V_{nominal} pour faire référence à une nanoparticule dont le matériau magnétique a 5 nm d'épaisseur, et $V_{\text{réel}}$ pour faire référence au volume d'une nanoparticule dont le matériau magnétique a 2 nm d'épaisseur. La prochaine partie détaille l'impact de cette réduction de matériau sur les caractéristiques magnétiques des nanoparticules.

3.2. Caractérisations magnétiques

Au vu de leur faible dispersion en taille, les particules pourraient éventuellement être utilisées en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie médicale, à condition que leurs propriétés magnétiques respectent les conditions requises, à savoir une aimantation à saturation « raisonnable » et une aimantation moyenne nulle en champ nul pour éviter toute agglomération spontanée (imitation du superparamagnétisme). Ces caractéristiques seront mesurées sur les nanoparticules de permalloy et de magnétite attachées au substrat à la fin du procédé de fabrication. Nous présentons tout d'abord la technique de dépôt ainsi que la caractérisation magnétique de la magnétite sur des dépôts pleine

couche, afin de s'assurer que l'on dépose bien la bonne phase d'oxyde de fer. Puis, les caractéristiques magnétiques des nanoparticules seront discutées : nous verrons que le procédé de fabrication entraîne un amoindrissement de leur moment magnétique, bien qu'elles présentent un caractère superparamagnétique très intéressant pour les applications visées.

3.2.1. Caractérisations de la magnétite pleine couche

Comme mentionné précédemment, un des volets de ce travail a été d'introduire la magnétite dans la composition des particules. Cet oxyde de fer est en effet le matériau magnétique phare en ce qui concerne la composition de particules utilisées pour des applications biomédicales, puisqu'il est d'une part biocompatible, ce qui est un réel avantage par rapport au permalloy puisque le nickel est toxique, et d'autre part il est l'oxyde de fer qui présente l'aimantation à saturation la plus élevée parmi les matériaux biocompatibles (92 emu/g correspondant à 480 kA/m), en particulier parmi les oxydes de fer tels que la wüstite FeO, l'hématite α -Fe₂O₃ ou encore la maghémite γ -Fe₂O₃ (aimantation à saturation de 74 emu/g). Nous décrirons brièvement les principales caractéristiques structurales et magnétiques de la magnétite massive avant de décrire le procédé de dépôt utilisé dans ces travaux et les résultats de la caractérisation faite sur des matériaux pleine couche.

a - Caractéristiques

La magnétite a une structure spinelle inverse, dans laquelle les atomes d'oxygène forment un réseau cubique compact, les ions Fe³⁺ occupant $\frac{1}{8}$ des sites tétraédriques ainsi que la moitié des sites octaédriques en proportions égales avec les ions Fe²⁺ (Figure 41). Le saut d'électrons possible entre les ions Fe²⁺ et Fe³⁺ rend ce matériau très bon conducteur à température ambiante [154].

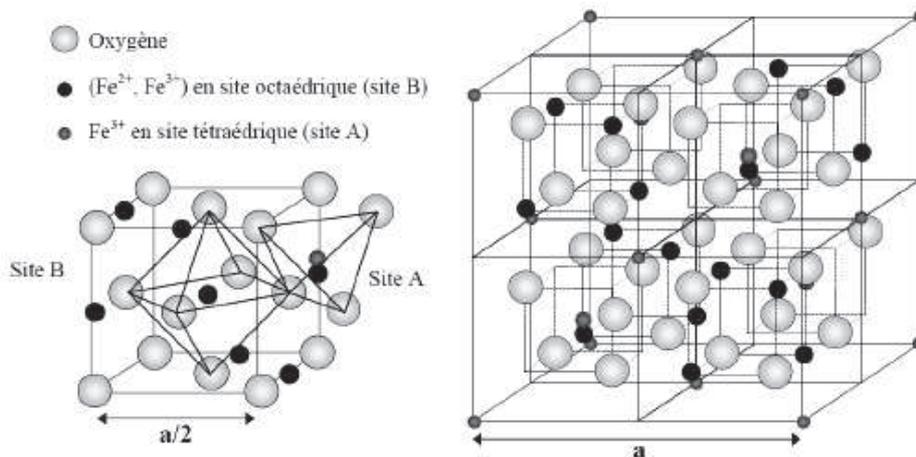


Figure 41. Maille élémentaire de la magnétite, qui présente une structure spinelle inverse. Figure extraite de la référence [155].

La magnétite a un paramètre de maille de $0,8396 \pm 0,0001$ nm (fiche JCPDS 00-019-0629), très proche de celui de la maghémite, $0,8338 \pm 0,0001$ nm (fiche JCPDS 00-013-0458). Il est donc très délicat de distinguer aux rayons X ces deux oxydes de fer. La meilleure technique pour distinguer leur structure cristallographique est la spectroscopie Mössbauer, très sensible au degré d'oxydation et au rapport des concentrations $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, ainsi qu'à leur environnement. Cependant, la signature que nous utiliserons pour caractériser la magnétite est sa transition de phase à une température appelée la température de Verwey, qui est de 120 K dans la magnétite pure. Au-dessus de cette température, la

magnétite présente une anisotropie magnétique cubique de constante d'anisotropie négative $K_1 = -1,35 \cdot 10^5 \text{ J/m}^3$, ce qui signifie que l'axe (111) est un axe de facile aimantation et l'axe (100) un axe de difficile aimantation. A la température de Verwey, la magnétite subit une transition de phase du premier ordre qui se traduit par plusieurs changements radicaux dans ses propriétés électriques et magnétiques, dont une chute de sa conductivité électrique de deux ordres de grandeurs et une chute de son aimantation. Plusieurs hypothèses sont émises quant à l'origine de ces changements, tel qu'un changement de la structure cristalline d'un réseau cubique à un réseau mono ou triclinique ou alors la localisation des charges dans les sites octaédriques et donc la perte du saut d'électrons entre Fe^{2+} et Fe^{3+} [156-158]. On peut noter que cette transition est sensible à la déviation de stœchiométrie du matériau, ce qui se traduit par une diminution voire une disparition de cet effet au fur et à mesure que l'on réduit la taille des particules étudiées, puisqu'alors l'oxydation de surface augmente, ce qui modifie la stœchiométrie [159] [160].

Une importante caractéristique de la magnétite est la possibilité de la présence de parois antiphases dans les films minces, qui sont des défauts de structure souvent liés au mode de croissance de la magnétite lors de son dépôt [161-163]. Par exemple, s'il y a un décalage entre le paramètre de maille du substrat et celui de la magnétite, cela peut induire des décalages d'une maille à l'autre à certains endroits, qui peuvent se faire perpendiculairement ou parallèlement au substrat. Le sous-réseau cristallin formé par les atomes d'oxygène demeure inchangé, tandis que les sous-réseaux d'ions cationiques de fer sont décalés. Plusieurs types de parois antiphases existent selon la nature de ce décalage (shift ou rotation) [164]. Ces défauts sont importants dans la mesure où ils influencent les propriétés magnétiques du film, qui dévient parfois de manière importante par rapport à celles du matériau massif. En effet, des couplages ferromagnétiques ou antiferromagnétiques ont lieu à travers ces parois antiphases, dont la nature est due au super-échange entre deux cations par l'intermédiaire d'un atome d'oxygène, et qui dépend principalement de l'angle que forme la liaison Fe-O-Fe (Figure 42) : un angle de 125° donne lieu à un fort couplage antiferromagnétique, tandis qu'un angle de 90° donne lieu à un couplage ferromagnétique, lequel est bien plus faible que le précédent couplage antiferromagnétique. Un angle de 180° maximise le couplage antiferromagnétique [161] [165] [166].

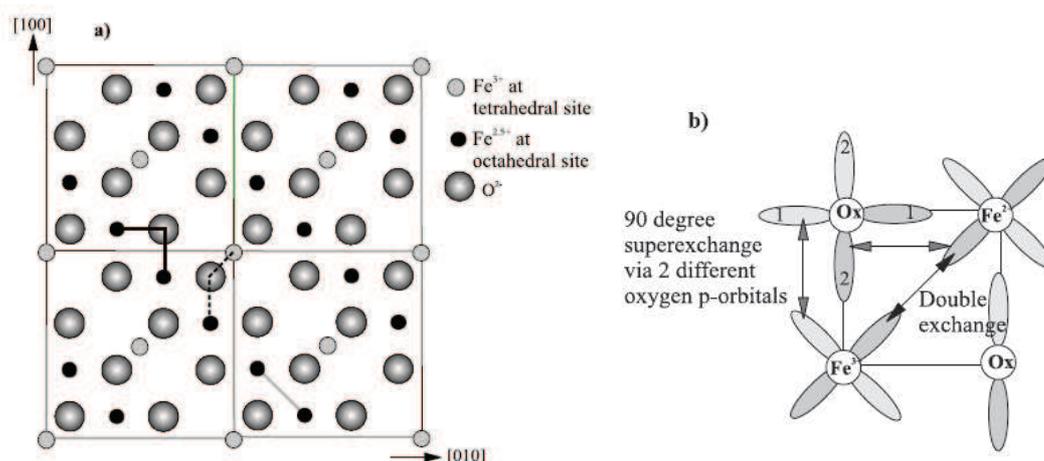


Figure 42. a) Schéma de principe des couplages cations-oxygène-cations (ferromagnétique ou antiferromagnétique) via le super-échange et cations-cations via le double échange (couplage ferromagnétique). b) Relation de ces couplages avec les recouvrements d'orbitales. Figure extraite de la référence [154].

Ces parois antiphases sont à l'origine par exemple des forts champs de saturation souvent observés dans les films minces. L'impact de ces parois est fonction de leur densité, qui diminue quand l'épaisseur du film augmente [161] [167] [166]. Les très forts champs de saturation des couches minces (parfois > 7 T), sont ainsi fortement réduits dans la magnétite massive.

b - Technique de dépôt

Le procédé de dépôt de la magnétite a été optimisé sur des échantillons pleine couche. On cherchera lors de cette optimisation à obtenir une magnétite la plus pure possible afin de se rapprocher des propriétés magnétiques de la magnétite en volume, bien que cela paraisse délicat, comme évoqué plus haut.

Les dépôts ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire NM (SP2M, INAC) dans un bâti de dépôt par pulvérisation cathodique réactive DC d'une cible de Fer sur magnétron par un plasma d'Argon sous pression partielle d'oxygène. Pour contrôler la stœchiométrie de l'oxyde de fer déposé, c'est principalement la pression partielle d'oxygène qu'il faut faire varier. Toute la difficulté de cette technique est de ne pas oxygéner la cible de fer pendant le dépôt. Cette oxygénation a lieu au-dessus d'une valeur seuil de pression partielle en oxygène, puisqu'au-delà de cette valeur, les sites d'adsorption des parois de l'enceinte sont saturés. Même si elle est réversible, cette oxygénation a pour conséquence de réduire drastiquement le rendement et la vitesse de dépôt, comme le montre la Figure 43.

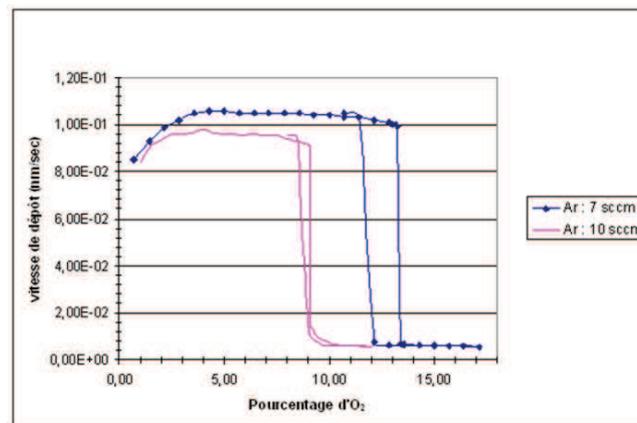


Figure 43. Evolution de la vitesse de dépôt en fonction de la pression partielle d'oxygène, pour deux valeurs de débit d'argon.

La transition métal / oxyde est très abrupte, ce qui est sans doute dû au fait que le fer a un grand pouvoir oxydant. Il est donc nécessaire d'effectuer le dépôt en-dessous de cette valeur seuil, qui est de 9% pour un débit d'argon de 10 sccm. Plusieurs dépôts de 200 nm d'épais ont donc été faits en faisant varier la pression partielle d'oxygène jusqu'à environ 9%. Dans ces conditions, la vitesse de dépôt est d'environ $1 \pm 0.1 \text{ \AA.s}^{-1}$. Tous les dépôts ont été faits sur des substrats MgO (100).

c - Résultats sur des échantillons pleine couche

Mesures structurales :

Des mesures par diffraction de rayons X en incidence rasante avec un rayonnement de longueur d'onde de 0,17903 nm (Co) ont permis de suivre l'évolution de la stœchiométrie de la phase déposée en

fonction de la variation de la pression partielle d'oxygène. Les pics de diffraction obtenus sont comparés avec des spectres de référence issus de la base de données « Powder Diffraction File (PDF-4+), International Centre for Diffraction Data ».

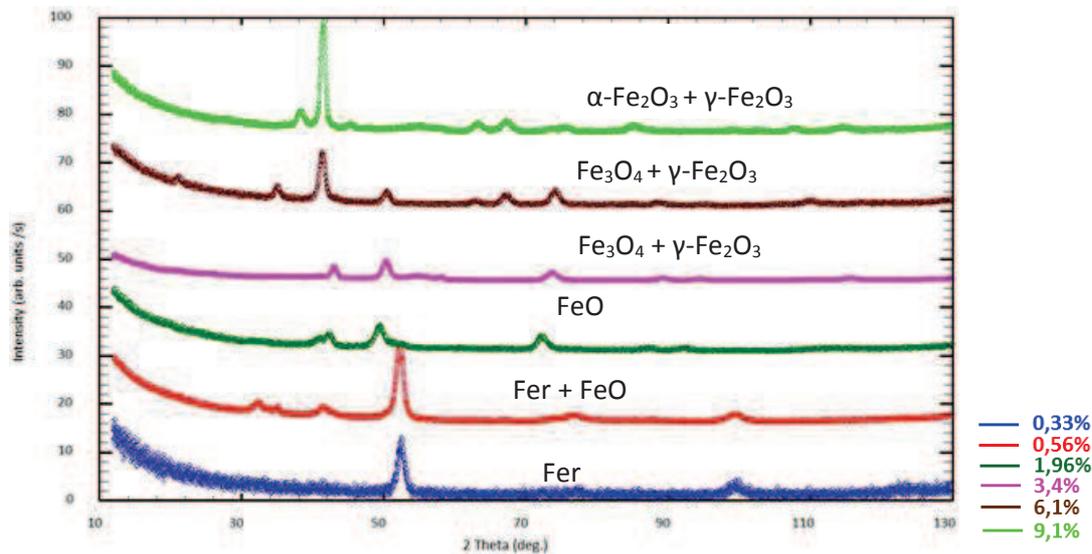


Figure 44. Evolution des pics de diffraction des dépôts d'oxyde de fer de 200 nm d'épais en fonction de la pression partielle d'oxygène.

La Figure 44 montre l'évolution de la stœchiométrie de 6 échantillons en fonction de la pression partielle d'oxygène. Les phases repérées sur la figure ont pu être déterminées grâce aux spectres de référence suivants : PDF 00-006-0696 (fer métallique), PDF 01-089-0687 (FeO), PDF 00-019-0629 (magnétite Fe_3O_4). On rappelle qu'il est important d'être prudent lors de la détermination des pics de diffraction de la magnétite, qu'il est difficile de distinguer des pics de diffraction correspondant à la maghémite, comme l'illustre la

Figure 45, qui compare les spectres de référence de ces deux oxydes de fer.

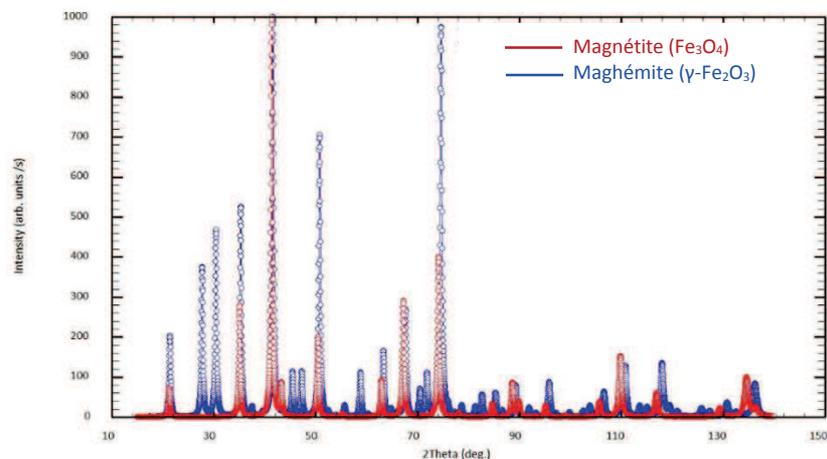


Figure 45. Comparaison des spectres de diffraction de référence de la magnétite (Fe_3O_4) et de la maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Les pics de diffraction des deux matériaux sont très proches.

Il est donc possible qu'à des pressions partielles comprises entre 3,4% et 6,1%, l'oxyde déposé soit un mélange de magnétite et de maghémite. Cette incertitude est d'autant plus grande que l'élargissement des pics est grand, lequel est directement lié à la taille des cristallites. Or, le dépôt étant réalisé à température ambiante, les atomes n'ont pas assez de mobilité pour s'organiser de façon monocristalline, le dépôt est donc polycristallin.

En conclusion, nous avons choisi de faire le dépôt sous une pression partielle d'oxygène de 3,4% :

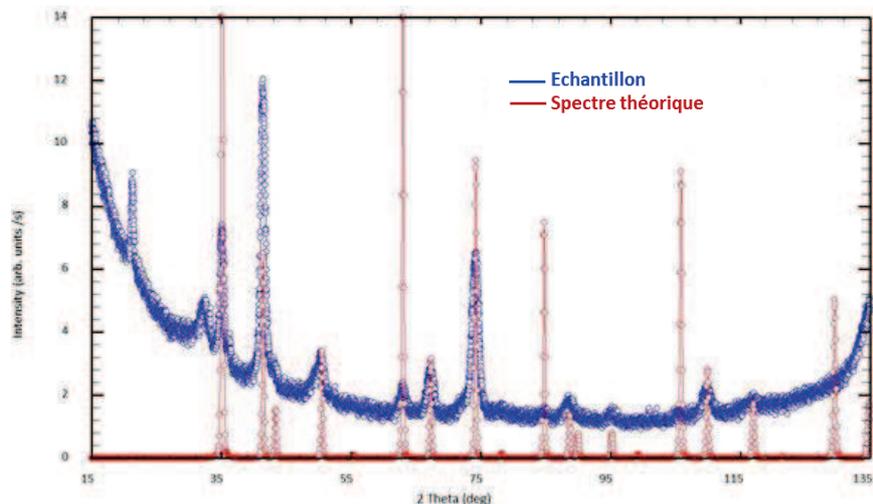


Figure 46. Comparaison des pics de diffraction de l'échantillon déposé par pulvérisation cathodique sous une pression partielle d'oxygène de 3,4% avec le spectre de référence de la magnétite.

Le paramètre de maille, calculé à partir de plusieurs spectres de diffraction de rayons X, est en moyenne de $0,8434 \pm 0,001$ nm. C'est un peu plus élevé que le paramètre de maille de la magnétite pure de 0.8396 nm, ce qui indique que le matériau déposé n'est pas de la magnétite pure.

Les paramètres retenus pour le dépôt sont les suivants :

- débit Argon / O₂ = 100 / 3,4 ;
- distance cible-substrat = 80 nm ;
- pression dans la chambre de dépôt en présence d'O₂ = $6,72 \cdot 10^{-3}$ Pa.

Mesures magnétiques :

Afin de juger de la qualité de la magnétite déposée, il est nécessaire d'effectuer des caractérisations magnétiques sur l'échantillon pleine couche. Dans un premier temps, on il est nécessaire de vérifier que l'on mesure bien la transition de Verwey autour de 120 K, caractéristique de la magnétite. Cette transition est visible sur les courbes ZFC / FC (Zero Field Cooling / Field Cooling), sur lesquelles elle se traduit par une rupture de pente de la baisse de l'aimantation entre 100 et 130 K, comme illustré sur la Figure 47. La transition non abrupte ainsi que l'augmentation continue de l'aimantation en température semble indiquer la présence de parois antiphases, dont on rappelle qu'elles sont une conséquence de défauts structuraux pouvant avoir lieu lors de la croissance d'un matériau à structure spinelle [166].

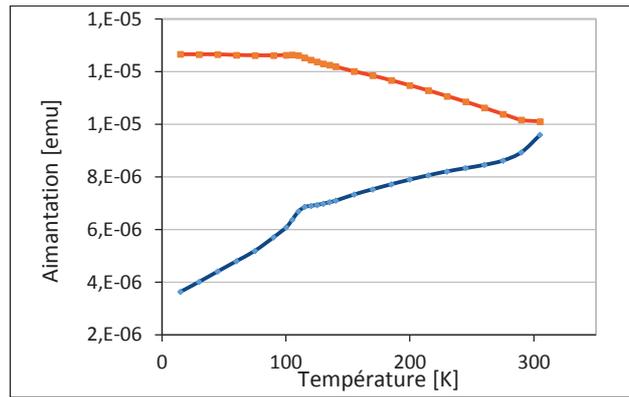


Figure 47. Courbes ZFC/FC mesurées sur un échantillon de 80 nm d'épaisseur sous un champ de 10 mT. La transition de Verwey est présente aux alentours de 115-120 K.

L'aimantation à saturation peut également nous renseigner sur la qualité du dépôt, que l'on doit comparer à l'aimantation à saturation de la magnétite massive (480 kA/m). Le cycle d'hystérésis d'un échantillon pleine couche de 100 nm d'épaisseur mesuré à 300 K est donné Figure 48 :

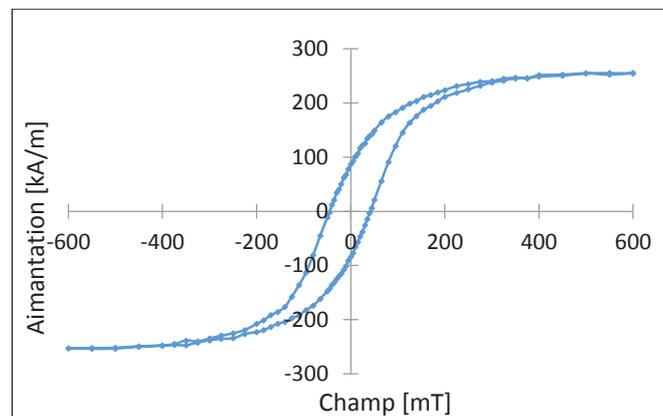


Figure 48. Cycle d'hystérésis mesuré à 300 K d'un échantillon de 100 nm d'épaisseur.

L'aimantation à saturation mesurée est d'environ 250 kA/m, soit environ 50% de l'aimantation à saturation théorique. Parmi les hypothèses qui peuvent expliquer cette valeur relativement faible par rapport à la valeur attendue, nous pouvons maintenant dire que d'autres phases d'oxydes de fer sont présentes, en quantité négligeable car difficilement détectable sur les spectres de diffractions de rayons X mais réduisant néanmoins l'aimantation à saturation du dépôt. On rappelle en effet que la magnétite est l'oxyde de fer présentant l'aimantation à saturation la plus élevée. De plus, il est fortement probable que la composante diamagnétique du substrat n'ait pas été correctement soustraite, ce qui peut mener à une incertitude sur la valeur de l'aimantation à saturation dans la mesure où l'on sous-estimerait alors le champ de saturation. Celui-ci peut en effet être plus élevé à cause de la présence des parois antiphases, et la valeur de l'aimantation à saturation peut donc également être sous-estimée. Nous poursuivrons donc avec les dépôts effectués dans ces conditions.

Il est intéressant d'effectuer le même type d'analyse sur un échantillon recuit, afin de voir si la transition non abrupte à la température de Verwey peut effectivement s'expliquer par la présence de parois antiphases. En effet, la présence de parois antiphases a pour conséquence d'une part le couchage des cycles (fort champ de saturation) dû aux couplages antiferromagnétiques à travers la paroi, et d'autre part un élargissement de la transition de Verwey [166]. En recuisant l'échantillon, on

donne de la mobilité aux atomes, qui peuvent alors se réarranger dans une configuration plus stable, ce qui réduit la densité des parois antiphases [154]. La Figure 49 illustre parfaitement ce phénomène sur un échantillon recuit à 673 K sous une pression partielle d'oxygène de quelques mPa pendant 1h : la transition de Verwey autour de 125-130 K est effectivement plus abrupte, et le champ de saturation a diminué de moitié environ.

De plus, il est important de noter que l'aimantation à saturation est plus élevée pour l'échantillon recuit, ce qui confirme que l'on n'ait en réalité pas atteint la saturation à 600 mT pour l'échantillon non recuit à cause de la présence des parois antiphases.

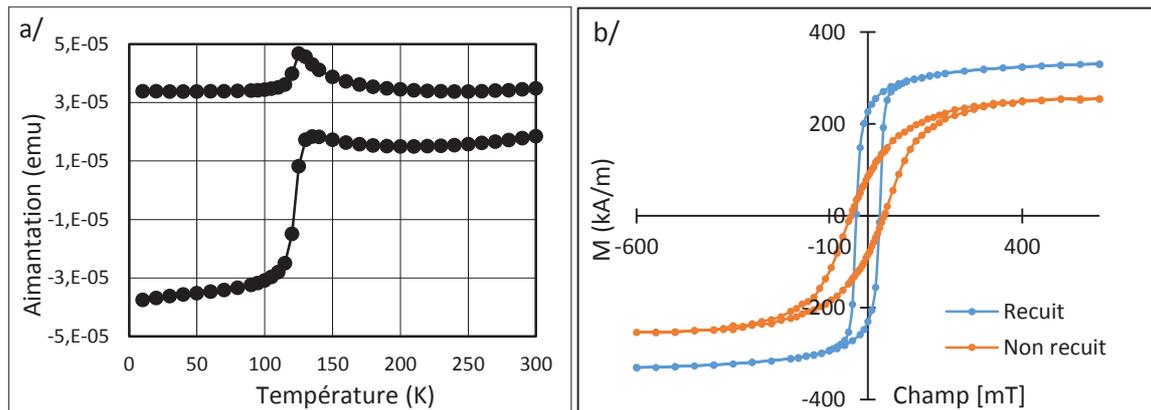


Figure 49. a/ Courbes ZFC / FC mesurées sur un échantillon recuit sous un champ de 10 mT, montrant une transition de Verwey très abrupte. b/ Comparaison des cycles d'hystérésis mesurés à 300 K des échantillons recuit et non recuit.

En résumé, le matériau déposé par pulvérisation cathodique est vraisemblablement composé majoritairement de magnétite avec une faible proportion de maghémite. Ce matériau possède des parois antiphases qui expliquent son champ de saturation relativement fort supérieur à 600 mT.

3.2.2. Caractérisations des nanoparticules

De nombreux articles se sont penchés sur le calcul de diagrammes de phase par simulations micromagnétiques pour plusieurs types de nanoparticules (disques, anneaux, particules carrées...) en fonction de leurs dimensions géométriques, du matériau, des constantes d'anisotropies, etc [168-176]. D'une manière générale, on retrouve régulièrement les trois types de configurations magnétiques possibles suivants pour des disques de dimensions submicroniques : configuration en vortex, en oignon ou en monodomaine, et ce en fonction du rapport de forme des disques. Les dimensions des nanoparticules jouent en effet un rôle important dans la minimisation de l'énergie magnétique totale, qui résulte en général de la compétition entre l'énergie d'échange et les énergies d'anisotropie magnétocristalline et de forme. Par exemple, la configuration en vortex s'explique par la dominance des effets de l'énergie magnétostatique qui favorise un état de fermeture de flux, tandis que la configuration en monodomaine est favorisée par la dominance des interactions d'échange. Plus on réduit les dimensions de la nanoparticule, plus les effets dominants proviennent de l'énergie d'échange, plus on tend vers un état monodomaine.

Si l'on réduit encore les dimensions, l'agitation thermique devient alors prépondérante devant l'énergie d'anisotropie, la nanoparticule devient superparamagnétique. Dans le cas de particules sphériques, on trouve dans la littérature des modèles sur le calcul d'un diamètre limite au-dessous

duquel une nanoparticule est superparamagnétique [177] [178]. Ainsi, des particules sphériques de magnétite sont supposées être superparamagnétiques pour des diamètres inférieurs à 55 nm. Pour des particules de forme anisotrope, il faut alors rajouter l'anisotropie de forme à l'anisotropie magnétocristalline pour estimer la limite superparamagnétique [177].

Ce qui est important pour les applications biomédicales est que les nanoparticules présentent une aimantation moyenne nulle en champ nul afin d'éviter leur agglomération spontanée une fois dispersées en solution (et donc qu'elles imitent en ce sens le superparamagnétisme), ainsi qu'une aimantation à saturation la plus forte possible afin d'avoir plus d'efficacité et un champ de saturation le plus faible possible afin d'être manipulées avec des champs magnétiques faibles ou modérés. Afin de déterminer la configuration magnétique de nos nanoparticules fabriquées par copolymère dibloc, des mesures ZFC/FC et des cycles d'hystérésis à différentes températures ont été mesurés au SQUID, sur des nanoparticules (NPs) composées des empilements Au/FeNi/Au et Au/Fe₃O₄/Au et attachées au substrat. Les résultats de ces mesures sont présentés Figure 50.

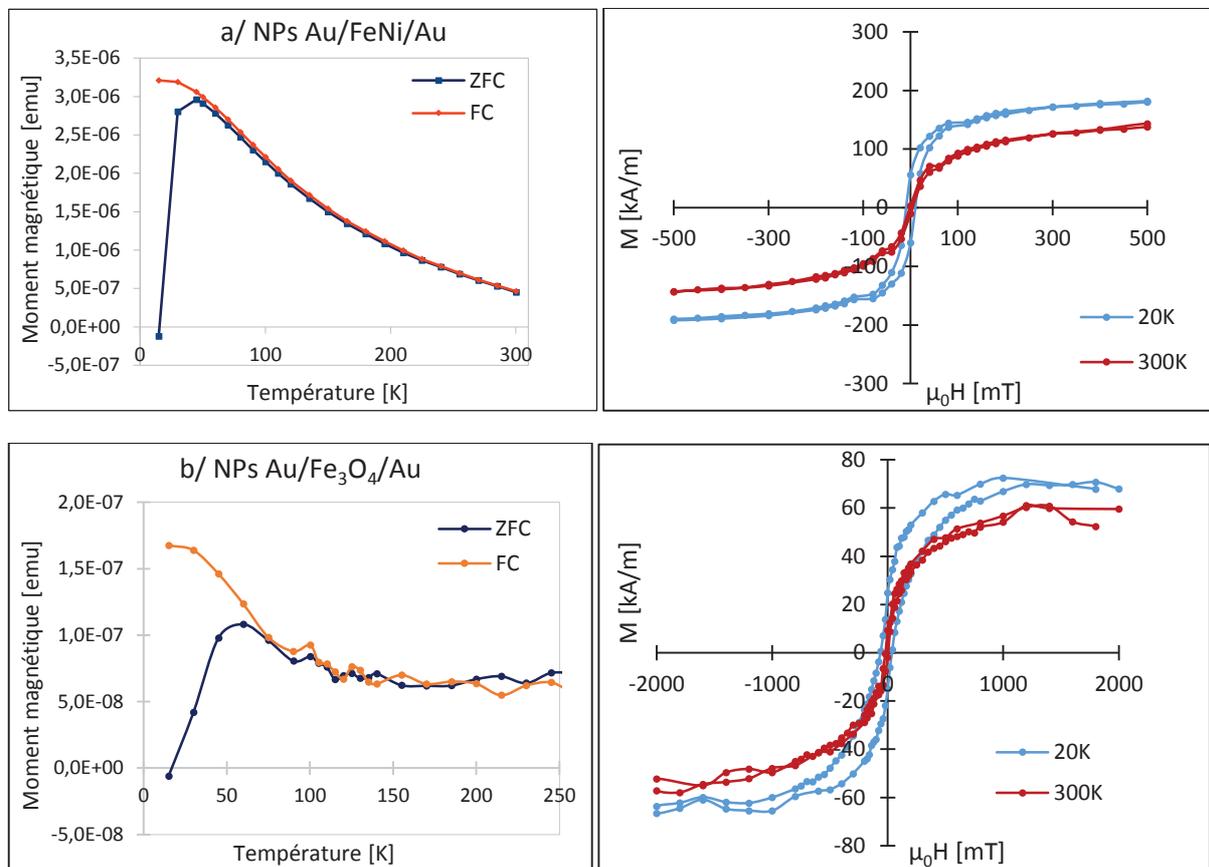


Figure 50. Mesures ZFC/FC effectuées sous un champ extérieur de 10 mT sur un montage parallèle et cycles d'hystérésis à 20 K et 300 K des nanoparticules a/ Au/FeNi/Au et b/ Au/Fe₃O₄/Au attachées au substrat.

La nette transition sur les courbes ZFC/FC est significative d'un comportement superparamagnétique, de même que la réduction de l'aimantation rémanente en fonction de la température comme on peut le voir sur les cycles d'hystérésis mesurés à 20 K et 300 K. En effet, dans un matériau superparamagnétique, l'énergie thermique à température ambiante est supérieure à l'énergie d'anisotropie magnétique, permettant aux moments magnétiques de se retourner d'un sens à l'autre en un temps beaucoup plus court que le temps de mesure, ce qui explique que l'aimantation mesurée

en champ nul soit quasi nulle en moyenne sur la durée de la mesure. Ce temps entre deux retournements est appelé le temps de relaxation de Néel-Brown, que nous exploiterons dans le paragraphe suivant :

$$\tau_N = \tau_0 \cdot \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right) \quad \text{Equation 2}$$

Où τ_0 est caractéristique du matériau, $1/\tau_0$ étant considérée comme « la fréquence de précession du spin » ou « attempt frequency », de l'ordre de 1 GHz pour la plupart des matériaux doux et généralement comprise entre 10^{-9} et 10^{-11} s [179], K la constante d'anisotropie, V le volume d'une nanoparticule et $k_B T$ l'énergie thermique.

La courbe ZFC s'explique donc comme suit : la température a tout d'abord été baissée en champ nul, les moments magnétiques sont donc « figés » dans des directions aléatoires. Puis on applique un champ faible (10 mT en l'occurrence) et on mesure l'aimantation en augmentant progressivement la température : la première phase d'augmentation de l'aimantation observée correspond au déblocage progressif des moments magnétiques au fur et à mesure que leur énergie thermique augmente, lesquels tendent alors à s'aligner avec le champ extérieur. Puis, lorsque l'on atteint la température dite de blocage T_B , l'énergie thermique devient prépondérante devant KV , les moments deviennent à nouveau libres de se retourner spontanément en un temps $\tau_N \ll \tau_{\text{mesure}}$, d'où la diminution de l'aimantation. La courbe FC se mesure en partant d'un état où la température a été diminuée sous le même champ extérieur et où les moments sont donc figés préférentiellement dans une direction parallèle au champ. Puis la mesure se fait en augmentant la température, donc en débloquant petit à petit les moments, qui deviennent libres de se retourner, de même que lors de la mesure de la courbe ZFC. Ainsi, à partir de la température de blocage, elle suit une évolution indépendante de l'histoire magnétique du matériau selon la loi de relaxation de Néel. Les courbes FC et ZFC sont donc superposées pour $T > T_B$.

On confirme l'effet de la température sur un matériau superparamagnétique en comparant son cycle d'hystérésis à basse température et à température ambiante : à basse température, il n'y a plus cet effet de retournement spontané, c'est donc l'anisotropie magnétique qui domine dans le comportement du matériau, l'aimantation moyenne mesurée en champ nul n'est plus égale à zéro, d'où la valeur non nulle de la rémanence mesurée.

Les petites dimensions des nanoparticules de permalloy et de magnétite leur confèrent donc un comportement superparamagnétique.

Si l'on s'intéresse à présent aux valeurs des aimantations à saturation, que l'on calcule désormais à partir du volume réel des nanoparticules (épaisseur de 2 nm) et non plus à partir de leur volume nominal (épaisseur de 5 nm, voir section 3.1.2), elles sont respectivement 5 et 4 fois plus faibles que les valeurs du matériau massif pour les particules de permalloy et de magnétite :

$$M_s(\text{FeNi, NPs}) = 150 \text{ kA/m} ; M_s(\text{FeNi, massif}) = 800 \text{ kA/m}$$

$$M_s(\text{Fe}_3\text{O}_4, \text{NPs}) = 60 \text{ kA/m} ; M_s(\text{Fe}_3\text{O}_4, \text{massif}) = 250 \text{ kA/m} \quad (\text{extrait des caractérisations pleine couche})$$

Le fait que les nanoparticules présentent une aimantation à saturation plus faible que celle du matériau massif n'est en soi pas étonnant, et est un fait souvent relaté dans la littérature. La raison avancée dans la plupart des cas est l'augmentation des effets de surface due à l'augmentation du ratio

surface / volume lorsque l'on réduit la taille des particules, ce qui induirait un effet de « spin canting » ou effet de couche magnétique morte à la surface des particules. Les spins localisés à la surface ne contribueraient donc pas de la même façon à l'aimantation de la nanoparticule que les spins localisés dans son volume. En lien avec ces considérations sont également évoqués des effets de brisure de symétrie à la surface [180-185]. De plus, dans le cas de la fabrication de particules d'oxydes de fer *via* des techniques chimiques, les effets d'oxydation de surface combinés à la composition non homogène des particules (qui sont très souvent composées d'un mélange de magnétite et de maghémite - voir chapitre 1, section 2.1) aboutissent constamment à des valeurs d'aimantation à saturation plus faibles que celle du matériau massif : entre 300 et 400 kA/m pour des particules fabriquées par coprécipitation [186-188] [146], décomposition thermique [189] ou voie hydrothermale [190], contre 480 kA/m pour la magnétite pure.

Cependant, cet effet est rarement le seul effet en jeu dans le comportement magnétique de nanoparticules, il ne peut expliquer à lui seul l'amplitude de la réduction de l'aimantation à saturation mesurée dans nos expériences. Plusieurs autres hypothèses peuvent être soulevées :

1/ Tout d'abord, il est à noter qu'une source d'erreur non négligeable provient du calcul du volume magnétique d'un échantillon, lequel est ensuite utilisé pour diviser les valeurs brutes en emu données par le SQUID. Ce volume est calculé sur la base de plusieurs données géométriques mesurées avec une certaine précision. L'accumulation d'incertitude sur toutes ces données conduit à une erreur non négligeable sur le volume. Celui-ci est calculé à partir de la mesure de la surface magnétique d'un échantillon, qui sera multipliée par l'épaisseur de matériau magnétique déposée :

- L'échantillon à mesurer est pesé, on obtient sa masse m avec une précision de 10^{-2} mg, précision intrinsèque à la balance.
- Connaissant l'épaisseur du substrat e_s , que l'on réduit au silicium sans trop d'incertitude (la présence d'une fine couche de germanium ne changera pas l'incertitude de mesure), et la masse volumique du silicium d_s , on en déduit la surface de l'échantillon : $S_{ech} = \frac{m}{d_s e_s}$.
- Connaissant le nombre de particules par unité de surface d_p et la surface d'une particule S_p , on en déduit la surface totale magnétique sur l'échantillon : $S_{magn} = S_p \times d_p \times S_{ech}$.
- Alors le volume magnétique se déduit de l'épaisseur déposée e : $V_{magn} = S_{magn} \times e$.

L'erreur relative faite sur le volume est la somme des erreurs relatives de chaque terme. On considère les incertitudes suivantes :

- Sur le diamètre des particules $\phi = \phi \pm 7\%$ (voir l'analyse faite sur ImageJ, section 3.1.2), soit 2,45 nm sur un diamètre de 35 nm.
- Sur la distance inter particules $a = 40 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$, estimé à partir des images MEB.
- Sur la masse de l'échantillon, $m = m \pm 10^{-2}$ mg, erreur due à la balance.
- Sur l'épaisseur de l'échantillon $e = 2 \text{ nm} \pm 0,2 \text{ nm}$, erreur due au bâti de dépôt.

Ainsi,

$$\frac{\Delta V_{\text{magn}}}{V_{\text{magn}}} = 2 \frac{\Delta \phi}{\phi} + 2 \frac{\Delta a}{a} + \frac{\Delta m}{m} + \frac{\Delta e}{e}$$

Sur les nanoparticules de permalloy, cette erreur représente 30% du volume calculé, ce qui est directement reporté sur la valeur de l'aimantation en emu.cm^{-3} ou kA.m^{-1} :

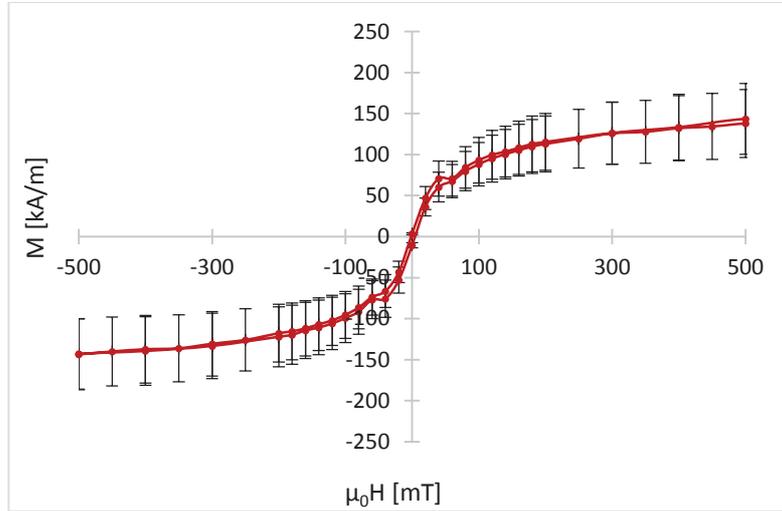


Figure 51. Cycle d'hystérésis de nanoparticules de permalloy et incertitude sur la valeur de l'aimantation, due à l'incertitude sur le volume magnétique mesuré.

L'impact de cette incertitude est donc non négligeable, c'est pourquoi la valeur de l'aimantation à saturation mesurée est sujette à discussion et ne nous permet pas de juger avec précision de la qualité magnétique des nanoparticules. Il sera par la suite préférable de se baser sur les cycles normalisés par l'aimantation à saturation pour s'affranchir de cette erreur. Cependant, cette incertitude ne suffit pas pour rendre compte du facteur 5 entre M_s (NPs) et M_s (massif).

2/ La seconde hypothèse pour expliquer cet écart entre M_s (NPs) et M_s (massif) serait qu'il y a un effet de surface autre que le spin canting, provenant directement du procédé de fabrication. En effet, comme nous l'avons déjà mentionné, il y a sans aucun doute une oxydation en surface du matériau magnétique lors du procédé de fabrication, puisque l'on a montré que la couche d'or superficielle censée protéger le matériau de l'oxydation est totalement gravée au cours du procédé (voir section 3.1.2), ce qui laisse le matériau magnétique exposé au plasma d'oxygène pendant une durée non négligeable. Le volume magnétique qui contribue effectivement à l'aimantation à saturation est donc vraisemblablement plus faible que le volume calculé à partir des dimensions de la particule. On rappelle que l'on a déjà tenu compte ici de la gravure partielle du matériau magnétique, et que l'on a donc considéré des nanoparticules de 2 nm d'épaisseur. Le phénomène d'oxydation est un effet supplémentaire, vraisemblablement dominant par rapport à l'effet de spin canting.

Pour avoir une idée plus précise sur le volume magnétique qui contribue effectivement au comportement magnétique de la nanoparticule (que l'on appellera V_{effectif}), on peut travailler à partir de la modélisation du cycle d'hystérésis à 300 K par une fonction de Langevin, classiquement utilisée pour modéliser la réponse en champ de systèmes superparamagnétiques :

$$M = M_s L\left(\frac{\mu B_{\text{appl}}}{k_B T}\right) \quad \text{Équation 3}$$

$\mu = M_s \cdot V_{\text{effectif}}$ est le moment magnétique effectif d'une nanoparticule et B_{appl} le champ appliqué en tesla. Si l'on se place à faible champ, ce qui revient à s'intéresser uniquement à la partie linéaire de la courbe, le développement limité de la fonction de Langevin donne :

$$\frac{M}{M_s} = \frac{\mu B_{\text{appl}}}{3k_B T} = \frac{M_s V_{\text{effectif}} B_{\text{appl}}}{3k_B T}, \text{ soit}$$

$$\frac{M}{M_s} \cdot \frac{1}{B_{\text{appl}}} = \frac{M_s V_{\text{effectif}}}{3k_B T}$$

Le premier terme de l'égalité correspond à la pente du cycle d'hystérésis normalisé. Si l'on prend l'exemple des nanoparticules de permalloy (Figure 50a), alors, avec $M_s = M_s(\text{FeNi}) = 800 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$ et $T = 300 \text{ K}$, on obtient :

$$V_{\text{effectif}} = 1,55 \cdot 10^{-25} \text{ m}^3$$

On compare ce volume effectif au volume réel d'une nanoparticule calculé à partir de ses dimensions réelles:

$$V_{\text{réel}} = \pi r^2 e \text{ avec } r \approx 17 \text{ nm et } e \approx 2 \text{ nm, soit } V_{\text{réel}} \approx 1,81 \cdot 10^{-24} \text{ m}^3$$

D'où :

$$V_{\text{réel}} \approx 12 \cdot V_{\text{effectif}}$$

Ainsi, il semblerait que le volume qui contribue effectivement à la réponse en champ d'une nanoparticule de permalloy soit environ 12 fois plus petit que le volume réel calculé à partir des dimensions de la particule, ce qui correspondrait à une particule de 5 nm de rayon pour une épaisseur équivalente de 2 nm. On retrouve ici l'estimation qui avait été faite dans la section 3.1.2 lors de la mesure des cycles d'hystérésis avant et après la gravure de la matrice de PS, qui avait montré une nette chute de l'aimantation à saturation. On confirme donc qu'il y a bien une influence réelle des effets de surface combinés à des effets d'oxydation de la particule pendant le procédé de fabrication. Nous nous baserons pour la suite sur la valeur de ce volume effectif.

Si l'on s'affranchit pour l'instant de l'incertitude dans le calcul du volume magnétique d'une nanoparticule, et que l'on considère donc que celui-ci est égal au volume « effectif » d'une particule à la fin du procédé de fabrication, il est possible d'extraire d'autres informations de ces mesures en température, notamment la constante d'anisotropie des particules à partir de la température de blocage selon la formule :

$$K_{\text{eff}} = \frac{k_B T_B \cdot \ln\left(\frac{\tau_m}{\tau_0}\right)}{V_{\text{part}}}$$

où $k_B T_B$ est l'énergie thermique à la température de blocage, V_{part} le volume d'une particule, τ_m le temps moyen entre deux points de mesure (environ 1s pour un SQUID) et τ_0 une constante de temps estimée à 10^{-9} s. Cette formule vient de la formule de Néel-Brown (équation 2), qui traduit la dynamique de retournement de l'aimantation dans des nanoparticules d'anisotropie uniaxiale sans interactions. A la température de blocage, le temps de relaxation est approximativement égal au temps de mesure.

Ainsi, on a

$$K_{\text{eff}} (\text{FeNi, NPs}) = 92,2 \text{ kJ.m}^{-3} \text{ et } K (\text{FeNi, massif}) \approx 200 \text{ J.m}^{-3} \text{ [191] [192] [193]}$$

$$K_{\text{eff}} (\text{Fe}_3\text{O}_4, \text{NPs}) = 331,6 \text{ kJ.m}^{-3} \text{ et } K (\text{Fe}_3\text{O}_4, \text{massif}) = 13,5 \text{ kJ.m}^{-3}$$

Pour le matériau sous forme de nanoparticules, cette constante d'anisotropie est notée K_{eff} pour dénoter son caractère « effectif » et dépendant de nombreux paramètres tels que la forme des particules, leur taille, leur état d'agrégation et donc les interactions dipolaires entre les particules... toutes ces interactions pouvant contribuer à augmenter l'anisotropie. On s'attend donc à ce que cette constante d'anisotropie soit plus élevée pour les nanoparticules que pour le matériau massif, dans lequel il y a moins de sources d'anisotropie [146] [194]. Ici, on obtient des constantes d'anisotropie qui sont entre 200 et 500 fois plus élevées que celles du matériau massif. Cependant, il est encore une fois difficile d'être précis sur la valeur en elle-même, puisqu'en plus des incertitudes sur le volume, il y a des incertitudes sur les valeurs de τ et τ_0 . La démarche adéquate pour diminuer ces erreurs serait de faire des mesures en dynamique afin de reproduire la courbe $\ln(\tau/\tau_0) = f(T)$.

Cette valeur élevée de l'anisotropie est à relier aux champs de saturation extraits des cycles d'hystérésis, qui sont eux aussi plus élevés dans le cas des nanoparticules que dans le matériau massif, ce qui signifie bien qu'il y a une ou plusieurs sources d'anisotropie supplémentaires dans les nanoparticules, en particulier des effets magnétostatiques. En effet, d'après la Figure 52, on a :

$$\mu_0 H_{\text{sat}} (\text{FeNi, NPs}) \approx 500 \text{ mT et } \mu_0 H_{\text{sat}} (\text{FeNi, massif}) \approx 100 \text{ mT}$$

$$\mu_0 H_{\text{sat}} (\text{Fe}_3\text{O}_4, \text{NPs}) > 1 \text{ T et } \mu_0 H_{\text{sat}} (\text{Fe}_3\text{O}_4, \text{massif}) \approx 400 \text{ mT}$$

Ici, matériau « massif » est à comprendre en tant que pleine couche de 100 nm d'épaisseur.

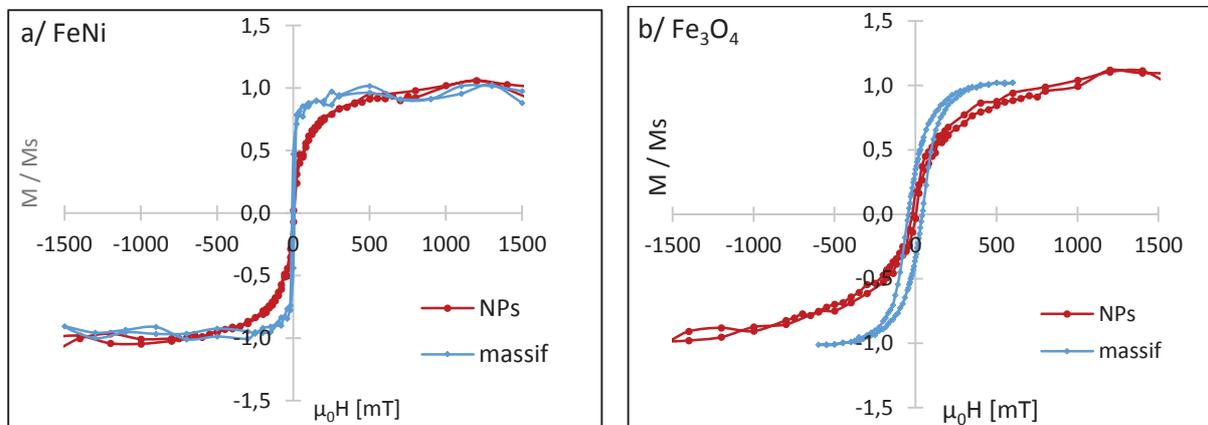


Figure 52. Comparaison des cycles d'hystérésis de nanoparticules et d'une pleine couche de 100 nm d'épaisseur de a/ permalloy et b/ magnétite allant jusqu'à la saturation et permettant de comparer les champs de saturation.

On peut noter que le cycle correspondant aux nanoparticules de magnétite (Figure 52.b) que la saturation ne semble pas atteinte, ce qui traduit la présence des parois antiphases discutée dans le chapitre 3.2.1.

Si l'on regarde de plus près quelles sont les principales contributions que l'on doit prendre en compte dans notre système parmi tous les critères influençant l'anisotropie pour expliquer cet écart entre nanoparticules et matériau massif, l'approche la plus intuitive est de regarder la forme des particules,

lesquelles ne sont en réalité pas parfaitement circulaires mais plutôt hexagonale, comme le montrent les images MEB de la Figure 53, ce qui rajoute sans aucun doute une composante d'anisotropie de forme :

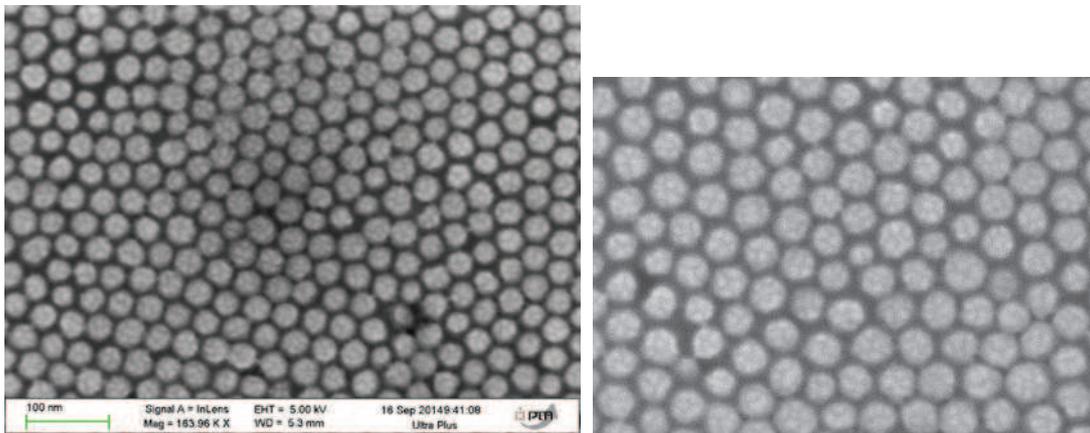


Figure 53. Images MEB de nanoparticules de permalloy, montrant la forme quasi hexagonale des particules.

On s'attend également à ce qu'il y ait une composante d'anisotropie de forme venant de la forme très plate des particules, dont le rapport de forme est $\frac{\text{épaisseur}}{\text{rayon}} = \frac{2}{17} \approx 0,12$. On s'attendrait donc à ce que l'aimantation soit préférentiellement confinée dans le plan de la particule. Cependant, les cycles mesurés parallèlement et perpendiculairement au plan de la particule ont une susceptibilité initiale très proche. Ce phénomène est illustré Figure 54, dont les cycles ont été mesurés sur des nanoparticules de nickel: $\chi(\text{perpendiculaire}) = 90\% \chi(\text{parallèle})$.

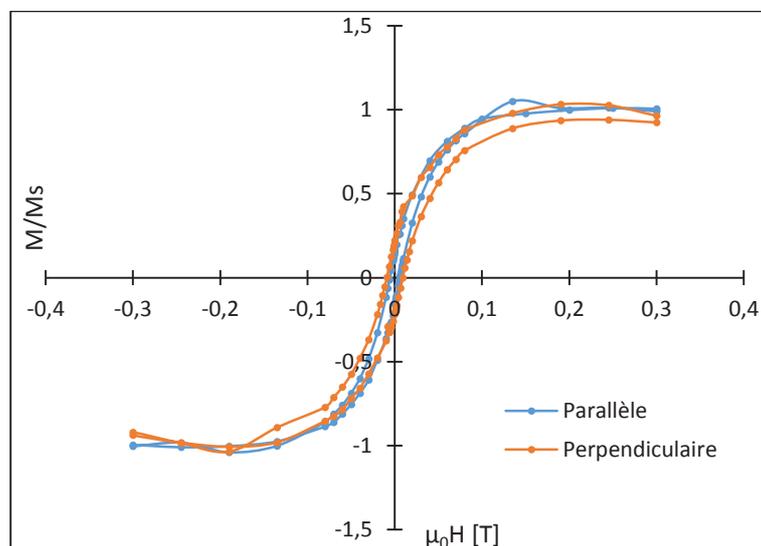


Figure 54. Comparaison des cycles d'hystérésis de nanoparticules de nickel attachées au substrat, mesurés parallèlement et perpendiculairement au plan des particules.

On retrouve ici encore une fois l'effet du moment magnétique des particules, qui est très faible en raison de leur très faible volume magnétique effectif. L'énergie démagnétisante, que l'on attendait plus élevée dans le cas d'un champ appliqué perpendiculaire au plan de la particule, est en réalité

proportionnelle au carré de l'aimantation à saturation, et se trouve donc d'autant plus diminuée que le moment magnétique des particules est faible.

Parmi les autres critères pouvant contribuer à la variation des propriétés magnétiques du système et notamment de la constante d'anisotropie, les interactions entre particules sont souvent reportées dans la littérature comme ayant un impact non négligeable, autant sur des systèmes de particules en suspension dans un liquide et plus ou moins agrégées que sur des systèmes de nanoparticules organisées sur un substrat. En effet, dans des systèmes où les particules sont proches les unes des autres (« proches » restant à définir : 2,4 nm dans la référence [195], de 1 à 2,4 nm dans la référence [196] de 1,2 à 2,5 nm dans la référence [197]), il semble raisonnable d'imaginer qu'il puisse y avoir des effets de polarisation des particules entre elles, qui pourraient influencer directement les mesures des propriétés magnétiques (susceptibilité magnétique, champ coercitif, champ de saturation...). En particulier, la loi de Néel-Brown (équation 2) est uniquement valable pour des particules qui n'interagissent pas entre elles. Elle a été empiriquement modifiée dans le cas où les interactions dipolaires sont à prendre en compte, en incluant une température effective T_0 qui traduit le fait que les interactions dipolaires introduisent une barrière d'énergie supplémentaire pour le retournement de l'aimantation, ce qui a pour effet d'augmenter la température de blocage [198]. Cette formule est appelée la loi de Volger-Fulcher [155] [199-204]:

$$\tau = \tau_0 \cdot \exp\left(\frac{KV}{k_B(T_B - T_0)}\right)$$

Dans notre cas, on rappelle que les particules sont organisées en réseau hexagonal compact dont les dimensions sont rapportées sur la Figure 55:

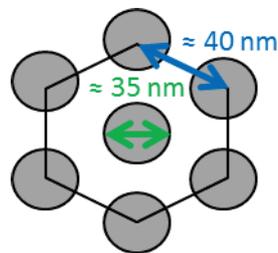


Figure 55. Schéma des dimensions du réseau hexagonal compact des nanoparticules.

Ainsi, la distance bord à bord entre deux particules voisines étant de 5 nm, on peut émettre l'hypothèse qu'il y a des effets de polarisation des particules et donc d'interactions dipolaires entre elles, qui auraient donc des conséquences sur les caractéristiques magnétiques mesurées.

Ainsi, on cherchera dans le prochain paragraphe à modéliser ces interactions dipolaires sur un réseau hexagonal compact de nanoparticules afin d'estimer s'il y a un effet non négligeable, notamment sur le cycle d'hystérésis.

3.2.3. Estimation de l'effet des interactions dipolaires sur les caractéristiques magnétiques des nanoparticules

On se place pour cette estimation dans l'approximation dipolaire : chaque particule est représentée par un dipôle localisé au centre de la particule. Le champ dipolaire exercé par un dipôle de moment magnétique \vec{m} sur un autre dipôle à la distance r_{ij} peut s'écrire :

$$\vec{B}_{\text{dip } ij} = \frac{\mu_0}{4\pi|\vec{r}_{ij}|^3} \left[\frac{3(\vec{m} \cdot \vec{r}_{ij})\vec{r}_{ij}}{|\vec{r}_{ij}|^2} - \vec{m} \right]$$

Les coordonnées \vec{r}_{ij} seront ici exprimées en fonction des vecteurs du réseau hexagonal, et on considèrera les particules à saturation en imposant la direction de leur aimantation alignée avec le champ appliqué selon e_x (Figure 56).

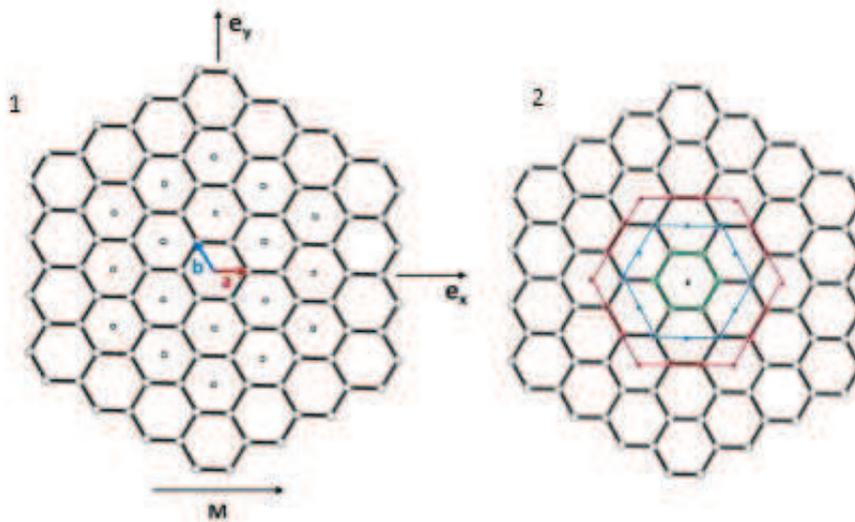


Figure 56. 1/ Schéma du repère utilisé pour modéliser le réseau hexagonal compact. Chaque nœud représente la position du centre d'une nanoparticule. a et b sont les vecteurs directeurs du réseau hexagonal, l'aimantation des particules est fixée selon la direction e_x . 2/ Notion de « couche de particules ».

Le moment magnétique des particules à saturation est :

$$m = M_s \times V_{\text{effectif}}$$

On rappelle que V_{effectif} correspond au volume magnétique effectivement contributif au comportement magnétique de la particule.

$a = \begin{bmatrix} d \\ 0 \end{bmatrix}$ et $b = \begin{bmatrix} -d \sin(\frac{\pi}{6}) \\ d \cos(\frac{\pi}{6}) \end{bmatrix}$ sont les vecteurs directeurs du réseau hexagonal compact, où $d = 40$ nm est la distance centre à centre entre deux particules.

On somme ensuite l'expression du champ dipolaire en fonction du nombre de « couches de particules » voisines par rapport à la particule centrale. Le résultat de cette somme est donné Figure 57.

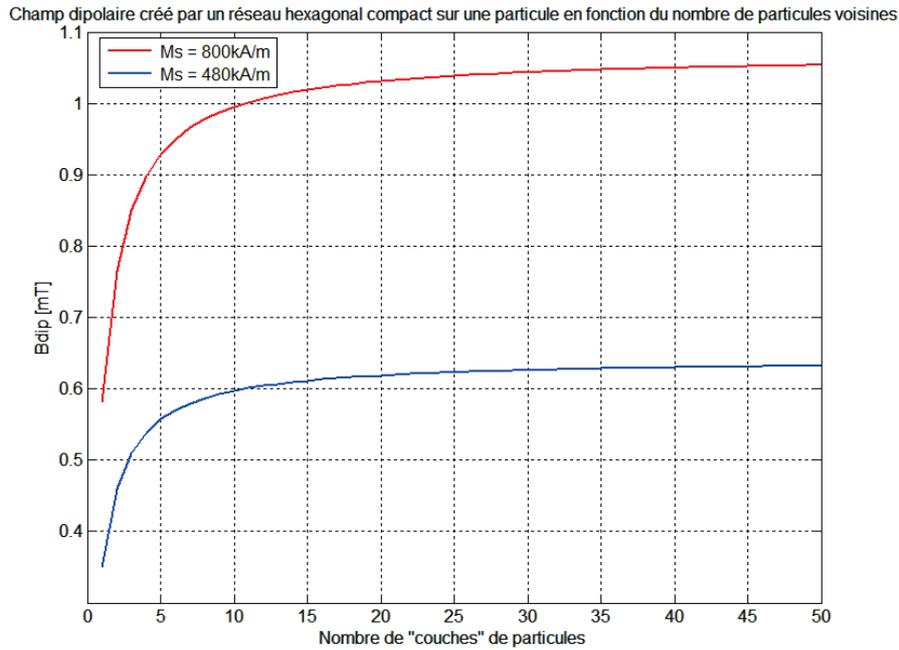


Figure 57. Evolution du champ dipolaire exercé par N dipôles situés sur les « couches voisines » de la particule centrale sur celle-ci. La courbe rouge correspond à des particules dont l'aimantation à saturation est celle du permalloy massif, la courbe bleue correspond à des particules dont l'aimantation à saturation est celle de la magnétite massive.

Comme présenté sur la Figure 57, la valeur du maximum du champ dipolaire est fonction de la valeur de l'aimantation à saturation, que l'on a choisie ici égale à 800 kA/m pour représenter le FeNi ou égale à 480 kA/m pour représenter Fe_3O_4 . Comme on peut s'y attendre, plus l'aimantation à saturation est forte, plus l'effet d'autopolarisation est fort, plus la valeur du champ dipolaire exercé par les particules est élevée. De plus, en raison de la dépendance en $\frac{1}{r^3}$ du champ dipolaire, celui-ci sature rapidement au bout d'une dizaine de couches, ce qui signifie que les particules situées au-delà d'une distance d'environ $10 \cdot d = 400 \text{ nm}$ n'ont presque plus d'influence sur l'autopolarisation de la particule centrale. Quant à la valeur en elle-même du champ dipolaire maximum, on a :

$$B_{\text{dip max}} \approx 0,1\% \mu_0 M_s,$$

$$\text{avec } B_{\text{dip max}} (M_s = 800 \text{ kA/m}) \approx 1 \text{ mT} \text{ et } B_{\text{dip max}} (M_s = 480 \text{ kA/m}) \approx 0,63 \text{ mT}.$$

Pour être plus exact en ce qui concerne cette valeur maximale, on peut ajuster la courbe $B_{\text{dip}}(N)$ par une fonction en $\frac{1}{N}$, ce dont on peut se convaincre par un raisonnement rapide en transformant le problème discret en un problème continu: le champ dipolaire B_{dip} est proportionnel à $\frac{1}{r^3}$, le nombre de particules à prendre en compte dans la contribution à B_{dip} est proportionnel à la surface de la couronne $2\pi r dr$, d'où :

$$B_{\text{dip}} \propto \int \frac{2\pi r}{r^3} dr \propto \frac{1}{r}$$

La fonction qui s'ajuste le mieux au modèle est la suivante :

$f_{\min}(N) = A \left(1 - \frac{1}{N+B}\right) + C$ avec A, B et C trois constantes à optimiser et N le nombre de « couches de particules ».

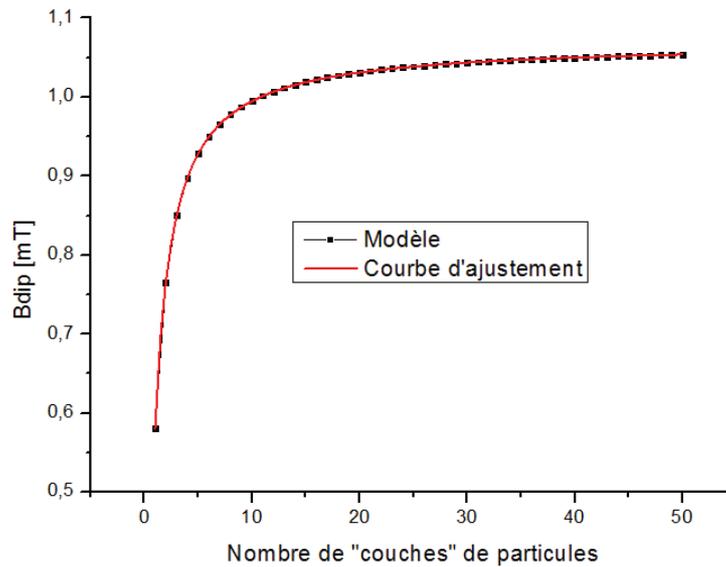


Figure 58. Comparaison du calcul du champ dipolaire à partir de la somme sur le nombre de particules voisines avec une fonction d'ajustement en $1 - \frac{1}{N}$. Cette courbe présente le cas $M_s = 480$ kA/m.

Ainsi pour $M_s = 480$ kA/m, comme le montre la Figure 58, la fonction est parfaitement reproduite avec $A = 0,47564$ mT ; $B = 0,62199$; $C = 0,16604$ mT, soit :

$$\lim_{N \rightarrow \infty} (f_{\min}) = A + C = 0.64168 \text{ mT contre } B_{\text{dip max}} (N = 50) = 0,6322 \text{ mT.}$$

De même pour $M_s = 800$ kA/m, on trouve :

$$\lim_{N \rightarrow \infty} (f_{\min}) = 1,06947 \text{ mT contre } B_{\text{dip max}} (N = 50) = 1,0536 \text{ mT.}$$

On peut donc se fier à la valeur obtenue par le modèle, puisque l'erreur commise par le modèle par rapport à la courbe d'ajustement est d'environ 1,5%, donc négligeable.

Ainsi, avec une contribution d'environ 0,1% par rapport à l'aimantation à saturation, il semblerait que les interactions dipolaires soient complètement négligeables dans ce système de nanoparticules, ce qui est sans aucun doute à relier au faible volume magnétique contribuant au comportement magnétique des nanoparticules. En effet, le champ dipolaire étant proportionnel au volume magnétique, plus celui-ci est petit, plus les effets de polarisation des particules sont faibles.

Nous avons ensuite cherché à modéliser le cycle expérimental par une fonction de Langevin « classique » (voir l'équation 3), dans laquelle nous incluons les interactions dipolaires en ajoutant au champ appliqué une contribution dipolaire linéaire à l'aimantation (en sachant dorénavant qu'elle est faible), par analogie avec la théorie du champ moléculaire modélisant les interactions d'échange entre les moments d'un matériau ferromagnétique [205]. Dans les deux cas, il s'agit d'un phénomène coopératif, que l'on traduit donc par une formule du type :

$$H_{\text{dip}} = \lambda M$$

où λ est appelée constante de champ moyen et ne dépend que de la géométrie du système.

Alors, la fonction de Langevin devient :

$$M = M_s L\left(\frac{\mu (B_{\text{appl}} + \mu_0 \lambda M)}{k_B T}\right)$$

qui est une équation auto consistante et doit être traitée avec une boucle de convergence. La Figure 59 compare cette fonction avec le cycle expérimental des nanoparticules de permalloy avec

$$\mu = M_s \cdot V_{\text{effectif}} = M_s(\text{FeNi}) \times V_{\text{effectif}}.$$

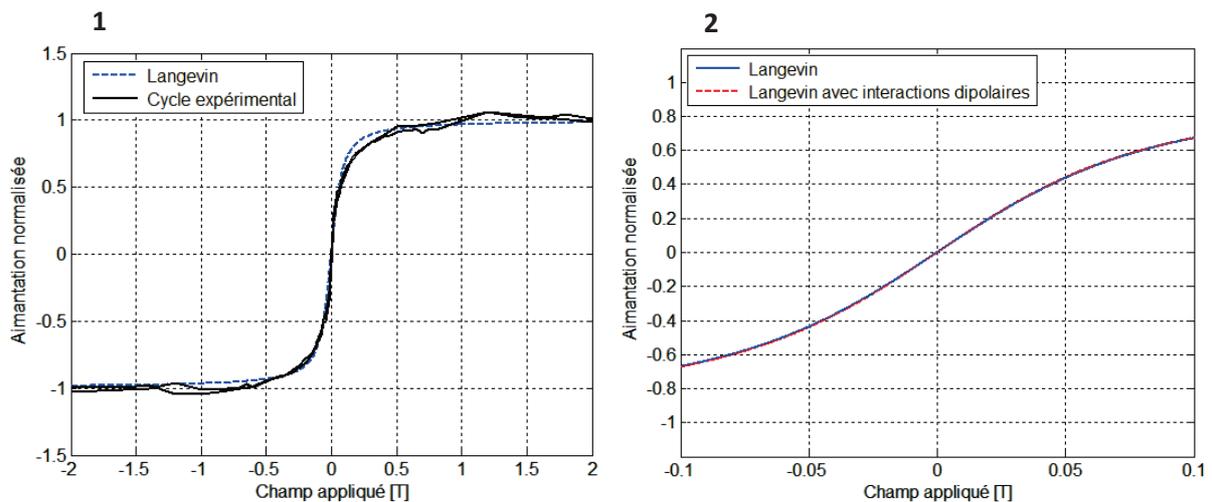


Figure 59. 1/ Comparaison d'une fonction de Langevin « classique » qui ne prend pas en compte les interactions dipolaires avec le cycle d'hystérésis expérimental. Le volume d'une particule pris en compte est ici le volume « effectif ». 2/ Zoom en champ et comparaison avec la Langevin « classique » d'une Langevin qui prend en compte une composante dipolaire.

La Figure 59 illustre d'une part le fait qu'une fonction de Langevin classique reproduit très bien l'approche à la saturation des nanoparticules de permalloy (Figure 59.1), et d'autre part que la prise en compte de la très faible composante dipolaire n'a aucun impact sur la courbe, puisque les fonctions de Langevin sont indifférenciables (Figure 59.2). Pour conclure sur les effets de ces interactions dipolaires entre particules, on peut s'intéresser à l'impact qu'elles auraient si le volume magnétique d'une particule était le volume réel, à savoir celui d'une particule de 2 nm d'épaisseur et 35 nm de diamètre, et faire la même comparaison que précédemment.

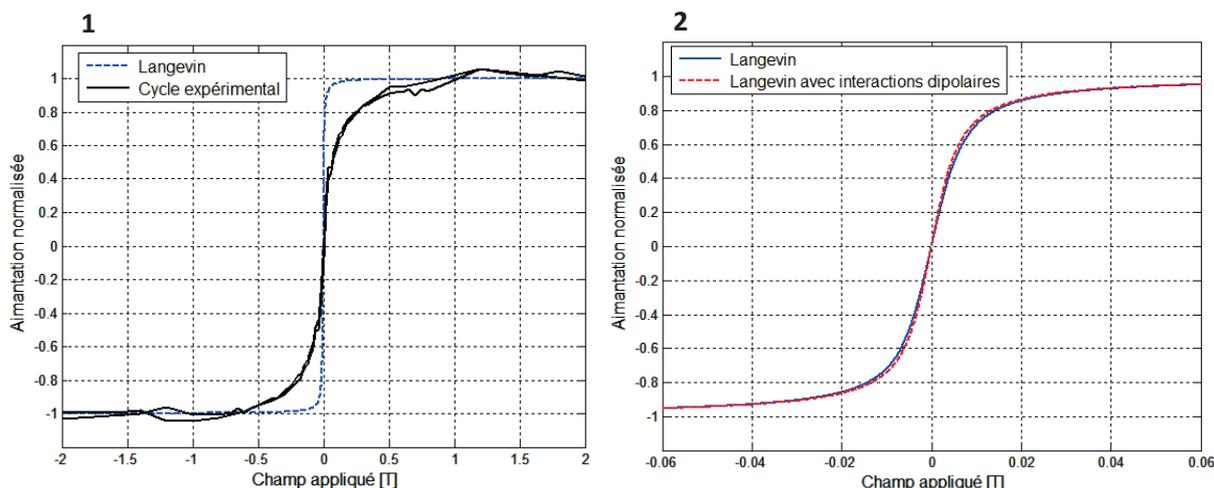


Figure 60. 1/ Comparaison du cycle d’hystérésis expérimental des nanoparticules de permalloy avec une fonction de Langevin qui ne prend pas en compte les interactions dipolaires. Le volume d’une particule pris en compte est ici le volume « réel », à savoir une épaisseur de 2 nm. 2/ Zoom en champ et comparaison de la Langevin « classique » avec une Langevin qui prend en compte les interactions dipolaires.

La Figure 60.1 confirme donc que la fonction de Langevin « classique » ne reproduit pas du tout le cycle expérimental, puisque l’on a vu que le volume de la particule pris en compte pour ces calculs ne correspond pas au volume magnétique effectivement contributif. De plus, la Figure 60.2 montre que l’ajout d’une contribution dipolaire dans la fonction de Langevin a bien un effet amplificateur sur la susceptibilité, s’expliquant par le fait que chaque moment magnétique d’une particule voisine apporte une contribution positive au moment magnétique de la particule centrale. Cependant, cet effet n’est seulement que de 8%. Le volume réel d’une nanoparticule est donc encore trop faible pour qu’il y ait un réel impact des interactions inter particules sur le comportement magnétique du système.

Remarque complémentaire : même si une fonction de Langevin « classique » semble s’ajuster à la forme globale du cycle expérimental des nanoparticules de permalloy, elle ne s’ajuste pas à la pente initiale du cycle, comme l’illustre la Figure 61 :

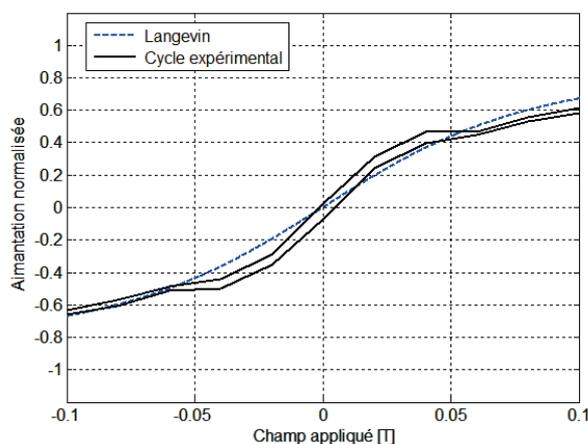


Figure 61. Comparaison d’une fonction de Langevin qui ne prend pas en compte les interactions dipolaires avec le cycle d’hystérésis expérimental des nanoparticules de permalloy. Le volume d’une particule pris en compte est ici le volume « effectif ». Cette figure correspond à un zoom en champ de la Figure 59.1.

Il est important de remarquer à cette occasion que le cycle expérimental des nanoparticules de permalloy présente une rupture de pente à environ 50 mT dont la différence avec la pente de la fonction de Langevin est d'environ 15%, et qui n'est donc pas expliqué par des phénomènes de polarisation entre particules. L'explication de cette rupture de pente nécessiterait des considérations plus poussées en micromagnétisme afin de tenir compte des éventuels effets coopératifs du réseau hexagonal.

En conclusion, il semblerait que l'effet des interactions dipolaires soit négligeable dans notre système de nanoparticules organisées en réseau hexagonal, même si celles-ci sont très proches les unes des autres, et ce à cause du faible volume magnétique contribuant à leur réponse en champ. L'oxydation des nanoparticules pendant le procédé de fabrication entraîne la réduction de leur volume magnétique et donc de leur moment magnétique. Néanmoins, la taille des particules leur confère un comportement superparamagnétique, très intéressant pour des applications biomédicales, puisque l'aimantation moyenne nulle en champ nul permet d'éviter tout phénomène d'agglomération spontanée.

3.3. Conclusion des caractérisations

Ces caractérisations géométriques et magnétiques permettent de s'apercevoir que ce procédé de fabrication est très prometteur en ce qui concerne la fabrication de nanoparticules magnétiques. En effet, il présente les avantages non négligeables d'être parfaitement reproductible, versatile en ce qui concerne la nature du matériau et de permettre l'obtention de nanoparticules parfaitement organisées sur le substrat en réseau hexagonal compact et également très monodisperses. Il s'inscrit dans l'optique de pallier aux inconvénients inhérents aux procédés de fabrication de nanoparticules classiques tels que les procédés chimiques ou la lithographie, dans l'idée d'aller vers des résolutions encore plus petites tout en conservant des distributions en taille étroites.

Cependant, dans l'état actuel des choses, il présente une marge d'amélioration sur certains points, notamment si l'on souhaite avoir une plus grande liberté de manœuvre sur l'épaisseur finale des nanoparticules. En effet, le rapport « hauteur des piliers/épaisseur déposée » n'est pas idéal dans le contexte d'une gravure par plasma. Dans un procédé de lithographie classique, on préconise un rapport 3 entre la hauteur des trous et l'épaisseur déposée afin que le lift-off se passe dans de bonnes conditions. Ici, ce rapport n'est pas respecté puisque l'on « remplit » totalement les trous, d'où l'impossibilité de faire un lift-off chimique et la difficulté de graver le polymère sans graver le matériau constituant les nanoparticules. Les caractérisations géométriques et magnétiques ainsi que les modélisations confirment que le moment magnétique des nanoparticules en est impacté. En revanche, les nanoparticules présentent un caractère superparamagnétique très intéressant pour des applications biomédicales telles que l'imagerie médicale.

Nous pouvons mentionner plusieurs pistes qu'il serait intéressant de suivre pour pallier à ce problème de gravure, lequel vient principalement, comme nous l'avons dit, du fait que le rapport hauteur des trous / épaisseur déposée n'est pas assez grand.

- La première idée à exploiter serait de s'affranchir de la couche neutre en faisant l'auto-organisation du copolymère dibloc directement sur une couche sacrificielle, ce qui permettrait de se passer de la première gravure. Comme évoqué dans la section 1, cela serait possible par d'autres techniques d'auto-organisation du copolymère à blocs que la

neutralisation de surface telles que l'application de champs électriques ou le recuit par vapeur de solvant.

- On pourrait également jouer sur la chimie du plasma afin d'augmenter la sélectivité entre le PS et le PMMA. L'étude de la référence [142] a permis de déterminer qu'une association judicieuse de différents gaz dans le plasma peut améliorer cette sélectivité pour le système PS-b-PMMA.
- Plus loin dans le procédé de fabrication, nous nous sommes rendus compte que la gravure par plasma argon/oxygène a pour effet de graver en partie la couche magnétique. Il est donc naturel de réfléchir à remplacer cette gravure par un lift-off chimique, en utilisant un solvant capable de dissoudre un polymère réticulé. Dans la littérature, on rencontre régulièrement l'utilisation d'une solution appelée Piranha composée entre autres d'acide sulfurique et d'eau oxygénée et employée au lavage de substrats avant toute utilisation dans le but d'éliminer les résidus organiques. Un article mentionne son utilisation en tant que solvant de la matrice poreuse de PS réticulé recouverte d'un dépôt de Si [107], montrant la capacité de cette solution à dissoudre un polymère réticulé. Cependant, le pouvoir fortement oxydant de cette solution devra être pris en compte afin de s'assurer que cela n'altère pas la qualité du matériau constitutif des particules.

Ces pistes n'ont malheureusement pas pu être étudiées dans le cadre de ce travail.

Nous pouvons néanmoins poursuivre l'étude et aller jusqu'au bout du procédé en libérant les particules en suspension.

4. Mise en suspension et fonctionnalisation

Les nanoparticules fabriquées par voie chimique sont fabriquées directement en suspension, et peuvent également être fonctionnalisées au cours de leur procédé de fabrication, ce qui évite d'ajouter des étapes supplémentaires. Par fonctionnalisation, on entend l'ajout d'une couche fonctionnelle enveloppant la particule, dont le premier rôle est d'augmenter leur stabilité colloïdale en suspension. Des groupes actifs peuvent ensuite être greffés sur cette couche fonctionnelle selon l'application visée. Dans le cas de particules fabriquées sur un substrat (lithographie, nano-impression...), ces étapes de libération en suspension et fonctionnalisation sont des étapes supplémentaires, qui doivent être rendues possible par l'ajout d'une couche sacrificielle sur le substrat, soluble dans un solvant. On peut donc penser que cela alourdit le procédé. Cependant, l'avantage de ces méthodes de fabrication par rapport à des méthodes en voie humide en ce qui concerne la fonctionnalisation est que celle-ci peut être faite de plusieurs façons : soit on fonctionnalise la totalité de la surface des particules avec la même molécule une fois celles-ci mises en suspension, soit on fonctionnalise un côté des particules lorsqu'elles sont encore attachées au substrat, on les libère en suspension, puis on fonctionnalise l'autre côté avec une autre molécule. Cela permet de créer des particules hybrides, pouvant remplir simultanément plusieurs fonctions, et étant donc très prisées pour des applications en théranostique. On peut citer à ce propos le travail effectué par le SPrAM, laboratoire collaborateur de ces travaux de thèse, qui a montré qu'il est possible de réaliser une fonctionnalisation double sur des particules carrées de 1 μm ou 10 μm de côté fabriquées par lithographie optique [206].

On cherchera donc dans cette partie à démontrer qu'il est possible de libérer les particules fabriquées par copolymère dibloc en suspension, bien que des problèmes inhérents au procédé de fabrication entraînent la pollution encore non résolue de la suspension. Une première preuve de concept sera également apportée sur un procédé de modification de la surface des nanoparticules. Elles seront ainsi rendues exploitables pour des applications biomédicales.

4.1. Mise en suspension

En lithographie classique, la mise en suspension de particules se fait par la dissolution chimique d'une couche sacrificielle de résine dont le solvant est la plupart du temps l'acétone ou l'isopropanol. Dans notre procédé, la couche sacrificielle est une couche de germanium recouverte d'une fine couche d'oxyde de germanium native, dont le solvant est l'eau oxygénée H_2O_2 . L'eau oxygénée a pour effet de dissoudre la couche d'oxyde tout en oxydant la couche de germanium sous-jacente, ce qui mène à la libération des particules en suspension. L'idée est ensuite de pouvoir récupérer les particules dans n'importe quel solvant, par exemple de l'eau.

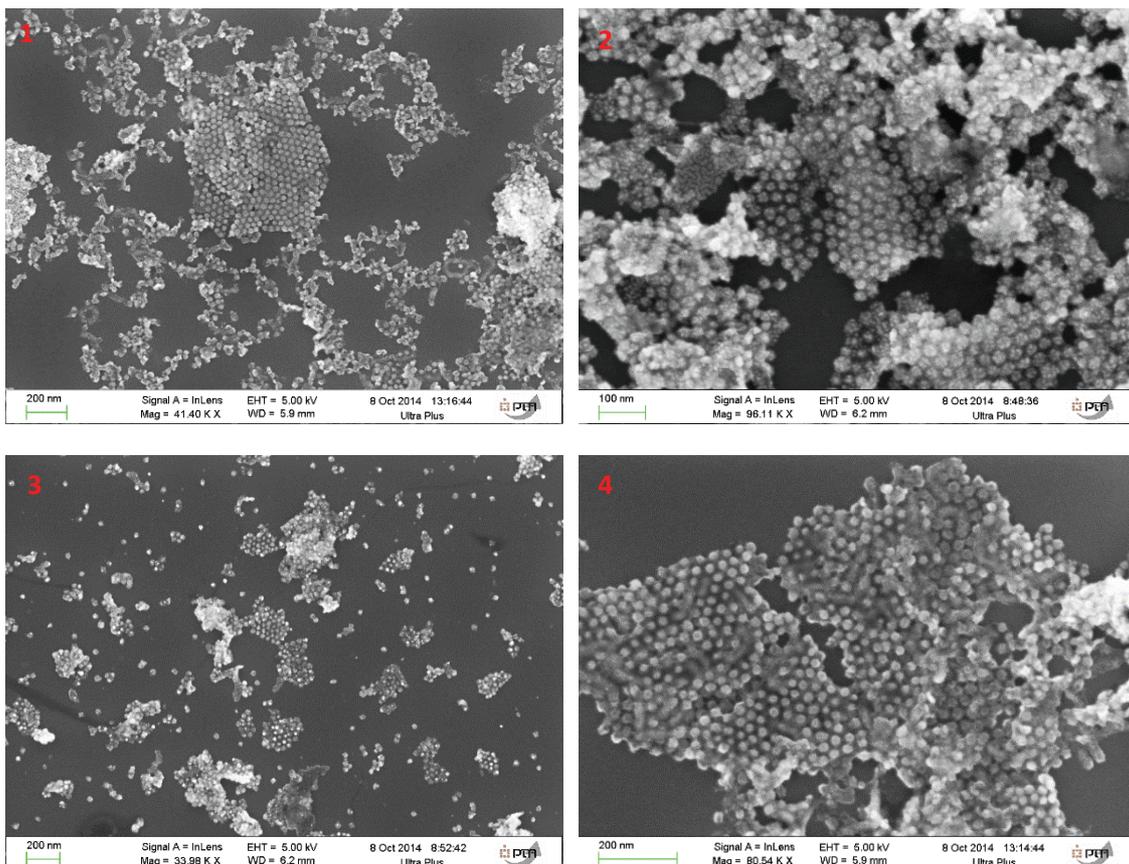
Protocole expérimental :

Une des 1ères idées mises en place a été d'utiliser les techniques de tri ou séparation magnétique afin de concentrer les particules et les maintenir bloquées pendant les remplacements successifs de la solution, à l'aide des forces magnétiques générées par le gradient de champ d'un aimant. L'échantillon est placé dans une petite éprouvette dans l'eau oxygénée à 30%, et le tout soumis aux ultrasons pendant le temps nécessaire à la mise en suspension des nanoparticules, dont nous verrons qu'il dépend de l'épaisseur de la couche sacrificielle. Une fois les particules détachées du substrat, ce qui se note par un léger changement de couleur de la surface de l'échantillon, un aimant de NdFeB (Néodyme Fer Bore) est collé d'un côté de la paroi de l'éprouvette afin d'attirer les nanoparticules, et

l'échantillon est retiré. L'aimant produit un champ magnétique d'environ 400 mT à sa surface, lequel est réduit à environ 100 mT à 1 cm de distance. Une fois les particules attirées par l'aimant sur la paroi intérieure de l'éprouvette, la solution est rincée plusieurs fois afin d'éliminer tout résidu et remplacée par de l'eau. L'aimant est ensuite retiré, et les particules redispersées dans la nouvelle solution par ultrasons.

Pour observer si le protocole a réussi, une μ -goutte de la solution est redéposée sur un substrat de silicium, lequel est observé au MEB après évaporation de la goutte. On s'attend à observer les nanoparticules sur les bords de la goutte, là où elles auront été attirées par force capillaire. Cependant, il s'est avéré que la faible valeur du gradient de champ combinée à la faible valeur du moment magnétique des particules et aux volumes trop importants de solution utilisés pour la dissolution du germanium (environ 2 mL par lavage) ne permet pas de récupérer les nanoparticules.

Le 2^{ème} protocole expérimenté a montré plus de réussite : le tri a été fait mécaniquement par centrifugeuse, et la solution rincée entre chaque cycle de centrifugation, sans l'aide d'un aimant puisque les particules sont alors concentrées au fond du tube. Afin d'optimiser le nettoyage de tout résidu de polymère, 2 nettoyages à l'acétone ont été ajoutés, après 2 nettoyages à H_2O_2 et avant 2 nettoyages à H_2O . Les images MEB de la Figure 62 correspondent à des échantillons où une μ -goutte de la suspension a été redéposée sur un substrat de silicium et laissée évaporée. On retrouve bien les particules sur les bords de la goutte évaporée.



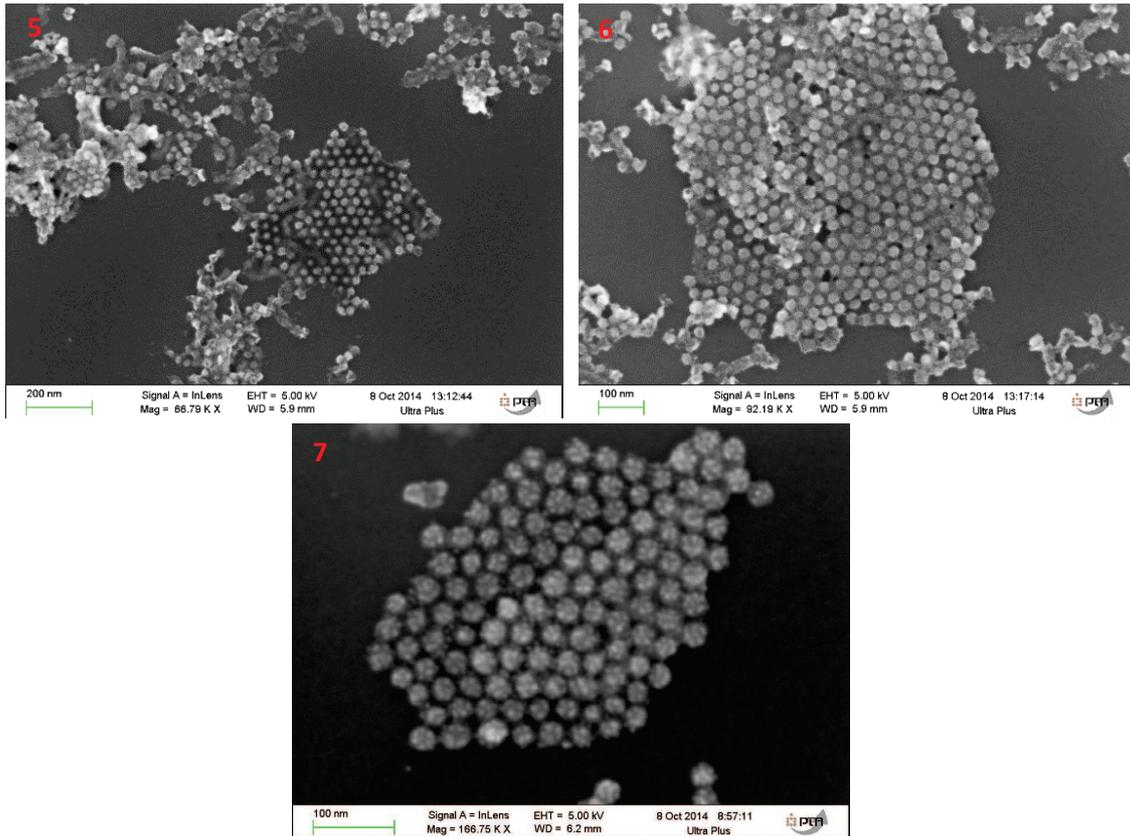


Figure 62. Nanoparticules mises en suspension et redéposées sur un substrat de silicium. 1-4/ Les différents cycles de nettoyage semblent avoir été insuffisants pour permettre de nettoyer la solution de tous les résidus. 4-6/ Les particules semblent avoir été décollées ensemble, restant liées par une couche subsistante. 7/ Les particules sont bien séparées après libération, se réorganisant spontanément en réseau hexagonal.

Plusieurs observations peuvent être faites à partir de ces images : tout d'abord, il semble que les différents cycles de nettoyage ne soient pas suffisants pour permettre de nettoyer la solution de tous les résidus (images 1-4). La nature de ces résidus n'a pas pu être déterminée avec certitude, les spectres EDX détectant principalement du carbone en plus des matériaux métalliques composant les nanoparticules. Il est possible que la 1^{ère} gravure destinée à enlever les restes de la couche neutre ne soit pas assez efficace, auquel cas cette couche de polymère réticulé, résistante à l'acétone, serait décollée en même temps que les nanoparticules et viendrait polluer la solution (voir Figure 63).

De façon liée à cette observation, on peut également remarquer que les particules semblent se redéposer selon différentes configurations : elles ont parfois l'air d'être liées par une couche quelconque, comme si elles avaient été décollées ensemble (images 4-6). On sait que cette couche liante n'est pas l'or superficiel (que l'on dépose à la fin du procédé de fabrication) puisque l'on fait les mêmes observations sur des particules non recouvertes d'or. Il pourrait en revanche s'agir de la couche neutre mal gravée.

D'autres images MEB montrent une libération et mise en suspension des particules réussies. De manière remarquable, les nanoparticules semblent s'être reformées en réseau hexagonal compact sans qu'elles soient liées entre elles (image 7). Cette observation est souvent reportée dans la littérature lors du dépôt d'une suspension de particules, lesquelles s'organisent lors de l'évaporation du solvant en différents motifs selon leur concentration [207-212] [57]. Enfin, elles peuvent se

redéposer indépendamment les unes des autres, en particulier si elles sont peu nombreuses dans une même zone (image 3).

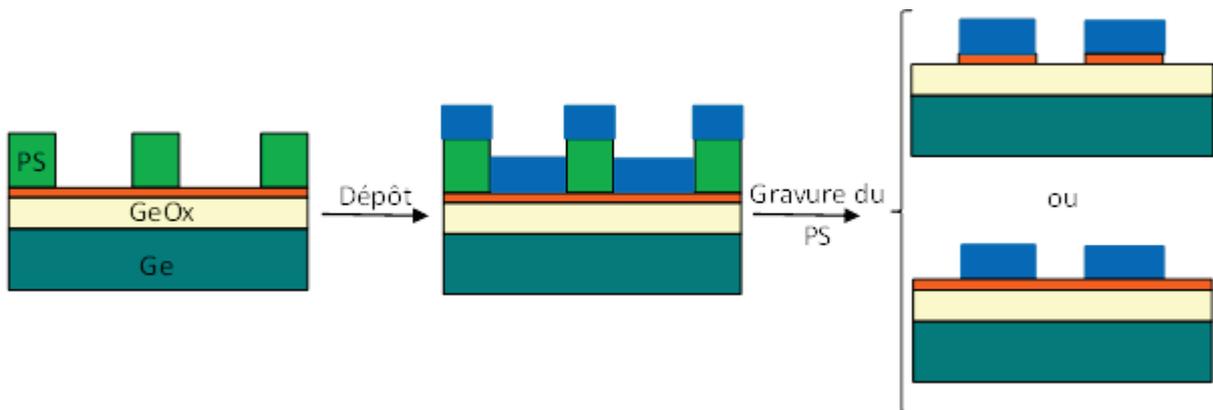


Figure 63. Schéma du procédé de fabrication au cours duquel la couche neutre ne serait pas totalement gravée et viendrait former un film sous les nanoparticules ou éventuellement sur tout le substrat, polluant la solution lors de la mise en suspension des particules.

La présence de résidus, associée avec de fortes présomptions à la couche neutre, est *a priori* un problème en ce qui concerne la pureté de la suspension obtenue, laquelle doit être la plus parfaite possible pour pouvoir faire des mesures en suspension telles que la DLS, qui n'a donc pas été possible (pour des mesures du diamètre des particules, voir section 3.1.2). Il sera donc nécessaire par la suite de travailler sur l'épaisseur de la couche neutre et d'étudier s'il est possible de la réduire sans affecter l'auto-organisation du copolymère à bloc.

Remarque complémentaire :

L'épaisseur de la couche sacrificielle de germanium influence la rapidité de la réaction de dissolution. Les 1ers échantillons fournis avaient une épaisseur de germanium d'environ 1.6 μm , dont la dissolution durait entre 20 et 30 minutes. Par la suite, des échantillons avec une épaisseur de germanium d'environ 50 nm ont été fournis, sans que cela n'ait d'impact sur l'organisation des copolymères. Cela a effectivement permis de diminuer le temps de dissolution à environ 3 minutes. Cependant, la qualification de la vitesse de dissolution du germanium faite en parallèle permet de penser qu'il y a bel et bien une couche qui freine cette dissolution et donc la libération des particules : en effet, des échantillons pleine couche de germanium ont été dissous dans l'eau oxygénée à 30% pendant différentes durées, et leur épaisseur mesurée au MEB. Il en ressort que la vitesse de dissolution du germanium est de l'ordre de 5 nm/s, ce qui voudrait dire que les couches de 50 nm devraient se dissoudre en quelques secondes, et les couches de 1.6 μm en 5 minutes. Cela va dans le même sens que l'hypothèse mentionnée plus haut qui suppose que la couche neutre ne serait pas gravée en entier au début du procédé et limiterait donc l'accès du solvant au germanium, ralentissant donc le procédé de dissolution.

De façon moins efficace mais tout de même remarquable, il est possible de faire le lift-off des particules en remplaçant l'eau oxygénée par de l'eau pure, auquel cas la mise en suspension est d'avantage due à la contribution mécanique des ultrasons qu'à une réaction chimique. Les images MEB de la Figure 64 montrent ces particules redéposées sur un substrat de silicium, de la même façon que précédemment. Cette méthode est donc possible bien que moins efficace, le nombre de particules restant accrochées

sur l'échantillon étant bien plus grand par rapport à une dissolution dans l'eau oxygénée pour une même durée d'application des ultrasons.

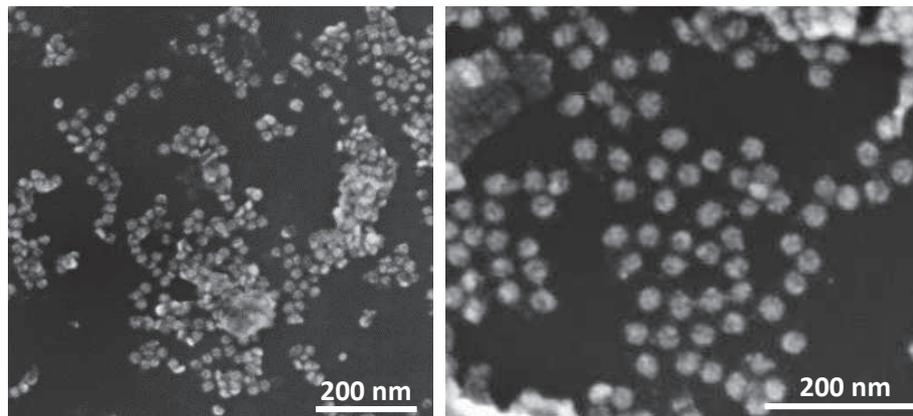


Figure 64. Nanoparticules libérées en suspension dans de l'eau pure et redéposées sur un substrat de silicium.

Ce test dans l'eau pure se justifie par la réflexion suivante : le principal inconvénient que l'on pourrait trouver à ce procédé est que l'eau oxygénée est un solvant très oxydant. Les particules étant protégées par des couches d'or uniquement au-dessus et en dessous, il se pourrait donc qu'il y ait une altération par oxydation du matériau magnétique par les côtés de la particule. Il serait donc préférable de trouver un solvant plus doux et plus neutre envers les matériaux constitutifs des particules.

4.2. Fonctionnalisation

Une fois mises en suspension, l'idée principale est avant tout de fonctionnaliser les nanoparticules avec des ligands qui augmenteraient la stabilité colloïdale de la suspension par répulsions stériques, afin de limiter leur agrégation. De plus, dans l'idée d'utiliser ces particules en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie médicale, il est important de viser à les rendre les plus furtives possible vis-à-vis du système immunitaire afin de retarder leur reconnaissance et leur évacuation par les macrophages. Les ligands les plus efficaces en ce qui concerne ce critère de furtivité sont sans doute les chaînes carbonées de PEG (PolyEthylène Glycol), qui présentent la particularité de limiter l'adsorption des protéines et donc leur reconnaissance par les éléments du système immunitaire [213-215].

Le réel avantage des nanoparticules telles que fabriquées avec le procédé présenté dans ces travaux est la possibilité d'ajouter des couches d'or en-dessous et au-dessus du matériau magnétique. En effet, de nombreuses molécules chimiques présentent une forte affinité pour ce métal, il est donc relativement facile de le fonctionnaliser. C'est notamment le cas des thiols, composés de sulfhydryle en groupement de tête et de groupements carboxyles ou amines en groupements actifs. Des biomolécules telles que des protéines peuvent ensuite être greffées à ces groupements actifs selon l'application visée. Il existe également des PEG thiolés, combinant ainsi les avantages des thiols et des PEGs. L'or est donc une surface de fonctionnalisation très versatile et très étudiée dans la littérature [216-219].

Des premiers tests préliminaires ont donc été réalisés en modifiant la surface des nanoparticules avec des monocouches de thiols afin d'apporter une preuve de concept de leur fonctionnalisation. Cette

stratégie de modification de surface est parfaitement maîtrisée au SPrAM, laboratoire collaborateur où ont été réalisés ces tests. De plus, nous avons choisi de procéder à la même modification de surface que celle utilisée dans la référence [97] et reprise dans la deuxième partie de ces travaux, dont nous maîtrisons donc déjà l'efficacité sur des microparticules de 1.3 μm de diamètre recouvertes d'or. Le protocole, décrit plus en détail dans le chapitre 3, section 5, consiste à greffer sur la surface une monocouche de thiols mixtes, composés au ratio 1/5 d'un thiol « long » ayant un groupement actif carboxyle, et d'un thiol « court » ayant un groupement actif hydroxyle et destiné à limiter l'encombrement stérique. Les groupements actifs sont ensuite activés par les molécules EDC/NHS (voir chapitre 3, section pour plus de détails).

Il a été décidé de procéder à une étape de vérification de l'efficacité de la modification de surface par une technique d'immunofluorescence, qui consiste à ancrer sur les groupements activés un marqueur fluorescent. Une μ -goutte de la suspension est ensuite redéposée sur un substrat et laissée évaporée avant d'être observée au microscope optique à fluorescence. En chimie, les étapes de modification de surface sont usuellement vérifiées par spectroscopie RMN, sensible à l'environnement des protons et donc à un changement d'environnement. Cependant, cette technique requiert une concentration en nanoparticules qui ne peut être raisonnablement atteinte avec le procédé de fabrication tel que mis en place. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers la technique de fluorescence. Encore une fois, nous avons repris ici les mêmes marqueurs que ceux qui sont exploités dans le chapitre 3, à savoir la streptavidine couplée au fluorochrome PhycoErythrine (PE) (voir chapitre 3, section 5 pour plus de détails). Cependant, cette technique de vérification s'est révélée beaucoup moins concluante dans le cas des nanoparticules que dans le cas des microparticules, malgré la similitude de la nature de leur surface :

- D'une part, la résolution du microscope à fluorescence est de l'ordre de 500 nm, il est donc délicat de l'utiliser pour faire des observations sur des nanoparticules de 35 nm de diamètre.
- D'autre part, comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, la suspension de nanoparticules n'est pas nettoyée de tous les résidus de polymère malgré les différents lavages. Cela a posé problème lors de ce test dans la mesure où la streptavidine peut se lier par simple adsorption. Nous n'avons donc pas pu faire de différence entre l'échantillon fonctionnalisé et l'échantillon de contrôle - lequel a seulement été mis en présence de streptavidine - puisqu'ils émettent tous deux une fluorescence de même intensité.

La Figure 65 illustre la fluorescence des nanoparticules fonctionnalisées, clairement redéposées sur le bord de la goutte. Il est cependant difficile de distinguer les nanoparticules des agrégats de polymère.

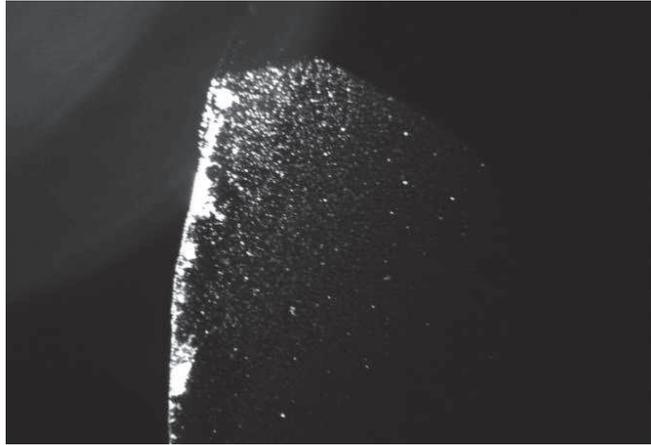


Figure 65. Image en fluorescence au grossissement x10 d'un redépôt de nanoparticules fonctionnalisées.

En conclusion, la couche d'or recouvrant la surface des nanoparticules est un réel avantage en ce qui concerne la modification de leur surface. Cependant, comme nous l'avons déjà évoqué, il est indispensable de définir l'origine exacte des résidus polluant la solution afin de les éliminer et d'augmenter la pureté de la solution avant de pouvoir franchir réellement cette étape de fonctionnalisation.

5. Conclusion générale du chapitre 2

Nous nous sommes attachés dans ce chapitre à démontrer l'efficacité du procédé d'auto-organisation du copolymère dibloc PS-b-PMMA pour engendrer un film nanostructuré poreux exploitable pour la fabrication de nanoparticules. L'obtention de nanoparticules magnétiques organisées sur le substrat en réseau hexagonal compact passe par le dépôt du matériau magnétique et la gravure successive du PS. Ces nanoparticules peuvent consécutivement être mises en suspension grâce à la présence de la couche de germanium en tant que couche sacrificielle.

Le premier point important à noter est que ce procédé de fabrication est un procédé versatile quant à la nature des nanoparticules, qui peuvent en particulier être composées de multicouches. Ce point est un avantage indéniable, dans la mesure où l'on peut donc fabriquer des nanoparticules recouvertes d'or, métal non toxique et largement exploité en tant que surface de fonctionnalisation. De plus, les particules sont, de façon remarquable, plus monodisperses que les particules commerciales classiquement obtenues par voie chimique ($\sigma < 8\%$ contre $\sigma > 10\%$ respectivement) et superparamagnétiques.

Nous avons vu que ce procédé doit cependant être amélioré afin d'éviter la gravure de la couche magnétique au cours de la gravure de la matrice de PS, ainsi que pour améliorer la propreté de la solution une fois les particules mises en suspension.

En ce qui concerne le rendement de ce procédé, plusieurs points sont à noter : dans le cadre de la thèse, les étapes de gravure ont été optimisées sur des échantillons de $5 \times 5 \text{ mm}^2$ pour des raisons pratiques d'approvisionnement en plaques. Ainsi, avec un diamètre moyen de 35 nm et une distance inter particules d'environ 40 nm, on obtient environ $2 \cdot 10^{10}$ particules par échantillon, soit environ 800 ng de particules pour des particules de permalloy, et ce en approximativement 2h. De ce point de vue-là, le rendement est faible. Cela a d'ailleurs été un point bloquant lorsque nous avons tenté de mesurer les temps de relaxation des ces nanoparticules en suspension afin de tester leurs performances en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie médicale. En effet, la trop faible quantité de nanoparticules obtenues ne nous a pas permis d'acquérir un signal exploitable. Cependant, l'organisation des copolymères à blocs est maîtrisée sur des plaques de 300 mm. Les paramètres de gravure (puissance des sources bias ou RF ainsi que durée d'exposition aux plasmas) seraient à revoir sur des plaques de ces dimensions pour augmenter drastiquement le rendement, puisqu'une plaque de 300 mm pourrait produire environ 2 mg, ce qui reste relativement faible mais raisonnable. Il n'y a donc pas d'obstacle majeur à une production industrielle par les techniques des micro- et nanotechnologies.

Chapitre 3 : Microparticules pour la destruction de cellules cancéreuses par réactivation de l'apoptose déclenchée par vibrations magnéto-mécaniques

1. Introduction : rappel des objectifs

L'étude détaillée dans cette partie vise à utiliser un autre type de particules magnétiques, non plus pour l'imagerie médicale, qui permet la visualisation et le diagnostic des tumeurs, mais pour combattre directement la maladie du cancer. L'étude repose pour cela sur un concept récent visant à terme au développement d'un traitement ciblé du cancer. Dans ce domaine de recherche, comme expliqué dans le chapitre 1, section 3.2, plusieurs voies de recherche sont en cours de développement. Parmi elles, l'hyperthermie magnétique fait partie d'une des méthodes les plus investies, bien que présentant comme inconvénients majeurs l'affectation des cellules saines environnant les cellules malades traitées, ainsi que la difficulté de réalisation des équipements lourds nécessaires pour appliquer les fréquences de l'ordre de 100 kHz requises aux amplitudes de quelques 10 mT sur les volumes d'un corps humain. La méthode présentée ici propose un moyen de détruire les cellules cancéreuses d'une manière alternative à l'hyperthermie, sans production de chaleur. Le procédé par lequel la mort de la cellule cancéreuse est induite est plus doux et plus contrôlé et permettrait *in fine* de ne cibler que les cellules malades sans affecter les cellules saines avoisinantes. En effet, cette méthode vise à réactiver l'apoptose ou mort cellulaire programmée des cellules cancéreuses, lesquelles ont perdu cette capacité de s'auto détruire et prolifèrent donc de façon non contrôlée. Or, le phénomène d'apoptose aboutit à la formation de corps apoptotiques qui sont par la suite phagocytés sans qu'il y ait de rupture membranaire. Il permet donc d'éviter les inflammations dues au relargage du milieu intracellulaire lors d'une mort cellulaire par nécrose, qui a lieu lorsque les cellules sont soumises à un traitement trop agressif et qui aboutit au déchirement de la membrane cellulaire. Ce phénomène d'apoptose peut être induit de différentes façons (voir chapitre 1, section 3.2.3). La méthode proposée ici et décrite en premier dans les travaux de Kim *et al.* [96] déclenche l'apoptose par transduction, c'est-à-dire *via* des contraintes mécaniques appliquées sur la membrane des cellules, lesquelles sont à l'origine d'une signalisation intracellulaire biochimique spécifique qui s'achève par la décomposition du cytosquelette. Il est admis que la cascade de signalisation implique une modification du transport ionique à travers la membrane, jusqu'à l'activation des caspases exécutrices qui sont responsables du clivage du cytosquelette et donc de la mort cellulaire. Néanmoins, les différentes étapes menant à l'activation des caspases (effet en cascade de la libération du cytochrome C de la mitochondrie et des ions calcium du réticulum endoplasmique) et donc à la mort cellulaire n'ont pas été étudiées expérimentalement lors de notre étude. Dans notre cas, les contraintes imposées à la membrane correspondent à des vibrations provoquées par des microparticules : celles-ci, magnétiques et présentant une anisotropie de forme, sont fonctionnalisées et greffées à la surface des cellules cancéreuses *via* un anticorps spécifique. L'application d'un champ alternatif à basse fréquence les fait osciller, provoquant ainsi les vibrations. Le principe général de cette idée est schématisé Figure 66.

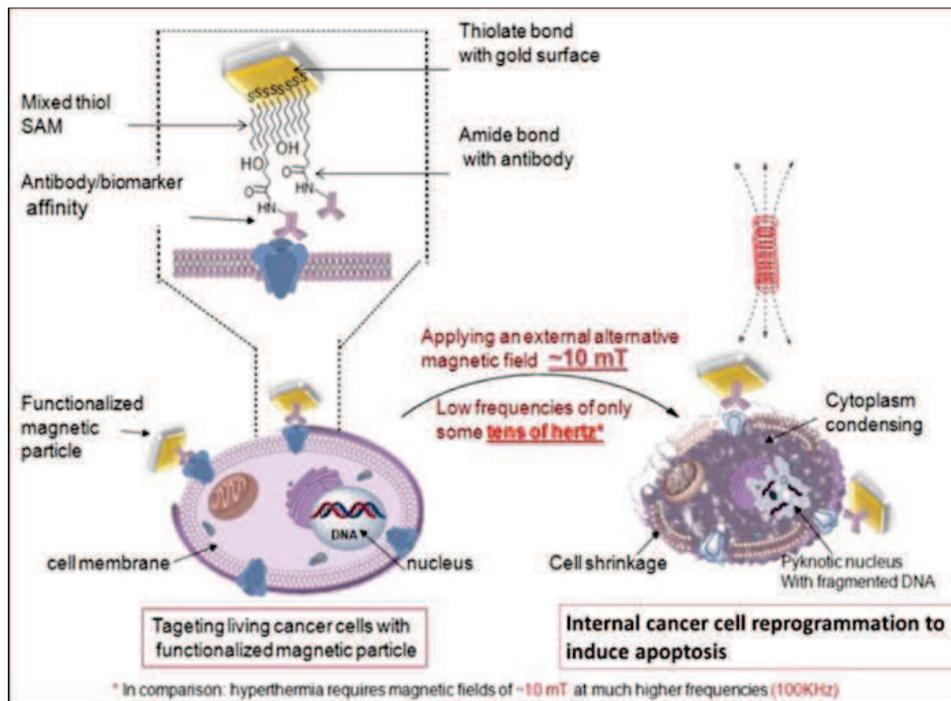


Figure 66. Schéma de principe de l'expérience de déclenchement de l'apoptose de cellules cancéreuses via des vibrations magnéto-mécaniques provoquées par des particules magnétiques anisotropes attachées à leur membrane. Le champ alternatif appliqué est de l'ordre de 10 à 40 mT aux fréquences de 10 à 20 Hz.

Les premiers résultats ont été obtenus à l'origine par l'Argonne National Laboratory [96] ainsi que par SPINTEC [97] à l'aide de particules de permalloy, sur des lignées de cellules cancéreuses différentes, avec l'application d'un champ magnétique alternatif d'amplitude 30 mT et de fréquence 20 Hz. Cela rend cette méthode particulièrement intéressante par rapport à l'hyperthermie, pour laquelle les fréquences employées sont de l'ordre de 100 kHz et nécessitent donc de lourdes installations.

L'étude présentée ici propose de remplacer le permalloy par la magnétite Fe_3O_4 afin de tendre vers un critère de biocompatibilité indispensable à de futures applications *in vivo*. Effectivement, même si les travaux de S.Leulmi ont permis de montrer qu'il n'y a *a priori* pas de cytotoxicité des particules de permalloy lorsqu'elles sont recouvertes d'or, auquel cas elles pourraient donc être utilisées dans des expériences *in vivo* sur les souris de laboratoire, les normes pour les tests *in vivo* chez l'homme sont beaucoup plus restrictives et sévères. Puisque nous pensons que cette méthode est très prometteuse et dans l'idée de se projeter vers de telles applications, nous avons décidé de nous tourner dès maintenant vers des matériaux connus pour être biocompatibles. Ici, il est nécessaire d'ouvrir une parenthèse afin de préciser cette notion de biocompatibilité, qui est à nuancer et à ne pas confondre avec tolérance ou biodégradabilité.

Le sens du terme « biocompatibilité » a évolué au fur et à mesure de l'élargissement des connaissances sur les interactions entre un matériau (plus précisément un biomatériau) et un environnement biologique. La première définition de la biocompatibilité a été proposée en 1982 lors d'une conférence de consensus sur les biomatériaux : « Une substance biocompatible désigne toute substance (autre qu'un principe actif) ou combinaison de substances d'origine naturelle ou synthétique, pouvant être utilisée en tout temps, comme système à part entière ou partie de système qui traite, accroît ou remplace un tissu, un organe ou une fonction du corps ». Puis, cette définition a évolué pour

finalement inclure la notion de « réponse spécifique de l'hôte » et « d'accomplissement de la fonction désirée », c'est-à-dire que l'on ne la réduit plus seulement à l'inertie ou tolérance de l'hôte ni à l'absence totale de réaction mais bien à une réaction appropriée en fonction de l'activité du matériau biocompatible. Ainsi, cela englobe l'absence de toxicité du matériau envers son hôte mais également une biodégradabilité (c'est-à-dire sa destruction en plusieurs éléments qui vont être par la suite assimilés par l'organisme) adaptée à l'application. Selon les cas, cette biodégradabilité peut être souhaitée dès l'injection du matériau dans le corps, seulement à la fin de son action ou alors non désirée. Cela implique que la biocompatibilité d'un matériau doit être évaluée par une série de tests, donnés par la norme ISO 10993 (International Organization for Standardization), comprenant des études physico-chimiques du matériau, des études de cytotoxicité, du potentiel de mutagenèse et du potentiel de carcinogenèse. Selon la norme, ces tests varient principalement en fonction du matériau (taille, composition, encapsulation, fonctionnalisation...), du site d'implantation et de la durée de contact prévue avec l'organisme.

En ce qui concerne les matériaux utilisés au cours de cette étude, leur biocompatibilité ne serait donc avérée qu'après la série de tests mentionnée plus haut. Cependant, on peut dire que la magnétite est biocompatible dans son sens le plus global, puisqu'elle est connue pour n'induire aucun effet de toxicité sur son environnement biologique (ce qui sera vérifié au cours d'un prochain chapitre), et qu'elle est en plus biodégradée au bout d'un certain temps passé dans l'organisme en éléments qui ne sont eux-mêmes pas toxiques. L'or est biocompatible dans le sens où il ne présente pas de toxicité, mais non biocompatible dans le sens où il n'est pas biodégradé. Le permalloy, alliage de fer-nickel, est « encore moins » biocompatible, puisque le nickel seul est toxique pour un environnement biologique. Le seul paramètre que nous testerons en réalité dans le cas de tests *in vitro* est la toxicité intrinsèque de ces matériaux envers les cellules, mais nous ne pourrions conclure sur leur biocompatibilité [220] [221].

Ce chapitre est découpé en 5 parties: nous présenterons d'abord le procédé de fabrication des microparticules de magnétite ainsi que leurs caractéristiques magnétiques lorsqu'elles sont attachées au substrat puis en suspension. Elles seront comparées aux microvortex de permalloy. Les différentes stratégies de fonctionnalisation sont ensuite décrites, avant de détailler les tests biologiques *in vitro* destinés à déclencher l'apoptose des cellules cancéreuses.

2. Procédé de fabrication des particules par lithographie optique

La première étape de cette étude est la fabrication de particules magnétiques, lesquelles doivent respecter un certain nombre de contraintes : elles doivent tout d'abord posséder une anisotropie magnétique suffisante pour être actionnées par un champ magnétique. Dans notre cas, l'anisotropie sera une anisotropie de forme. En effet, si la particule est sphérique, d'aimantation homogène et de faible anisotropie, le moment magnétique global est libre de tourner dans la particule et donc de s'aligner avec le champ sans que cela ne coûte de l'énergie. Le couple magnétique, produit vectoriel du « vecteur moment » et du « vecteur champ appliqué », est donc nul. En revanche, si la particule présente une anisotropie de forme capable de contraindre l'aimantation dans une direction ou dans un plan, le couple créé par un champ appliqué dans un plan perpendiculaire à cette orientation préférentielle est non nul, ce qui crée *a fortiori* un couple magnétique. Celui-ci va être transféré en couple mécanique et va tendre à faire tourner la particule autour de la direction de ce « vecteur couple » afin d'aligner le moment de la particule sur la direction du champ. Parmi les particules de forme anisotrope, plusieurs choix sont possibles, dont les plus évidents sont le disque ou le bâtonnet. Le choix s'est porté sur les disques, qui permettent d'éviter les phénomènes d'autopolarisation et donc d'agglomération en champ nul, grâce à leur configuration magnétique [222] [223]. De plus, ils offrent une plus grande surface et donc un potentiel d'accroche sur la membrane des cellules plus élevé que des bâtonnets. D'autre part, les particules doivent avoir un volume assez important pour exercer une force suffisamment conséquente sur des cellules d'environ 10 à 20 μm de diamètre pour induire leur apoptose. Nous verrons en effet dans la section 4 que le couple magnéto-mécanique exercé par un champ magnétique extérieur sur la particule est proportionnel à son volume, et nous reviendrons à cette occasion sur la valeur de ces forces.

Ainsi, le procédé de fabrication des microparticules de magnétite retenu pour respecter ces contraintes est un procédé de lithographie optique issu des techniques de microélectronique, et est identique à celui utilisé dans la référence [97] pour la fabrication de microparticules de permalloy, excepté en ce qui concerne la technique de dépôt du matériau magnétique. Il s'agit d'un procédé par bicouche de résines, au cours duquel un motif de trous est gravé par lithographie optique sur la résine superficielle, dont le solvant est différent de la résine sacrificielle. Le matériau magnétique est ensuite déposé, puis la résine superficielle est dissoute. La mise en suspension des particules est alors possible par lift-off avec le retrait de la résine sacrificielle. Ce procédé est schématisé Figure 67. Dans notre cas, la résine superficielle est la MAN2403, résine négative (les parties insolées de la résine sont réticulées et ne sont plus solubles au développeur) dont le solvant est l'isopropanol, et la résine sacrificielle est le PMMA 2%, dont le solvant est l'acétone. Les premiers essais ont été faits sur un masque de densité $2,5 \cdot 10^5$ particules/cm². Par la suite, un nouveau masque a été fabriqué, de densité $2,4 \cdot 10^8$ particules/cm², et permettant d'obtenir des particules de diamètre 1,3 μm espacées de 5 μm bord à bord. Quant à la nature du matériau, on comparera dans cette partie deux matériaux différents : le permalloy Fe₂₀Ni₈₀, déposé par évaporation, et la magnétite Fe₃O₄, déposée par pulvérisation cathodique, dont la technique de dépôt et la caractérisation pleine couche a été précédemment décrite dans le chapitre 2, section 3.2.1.

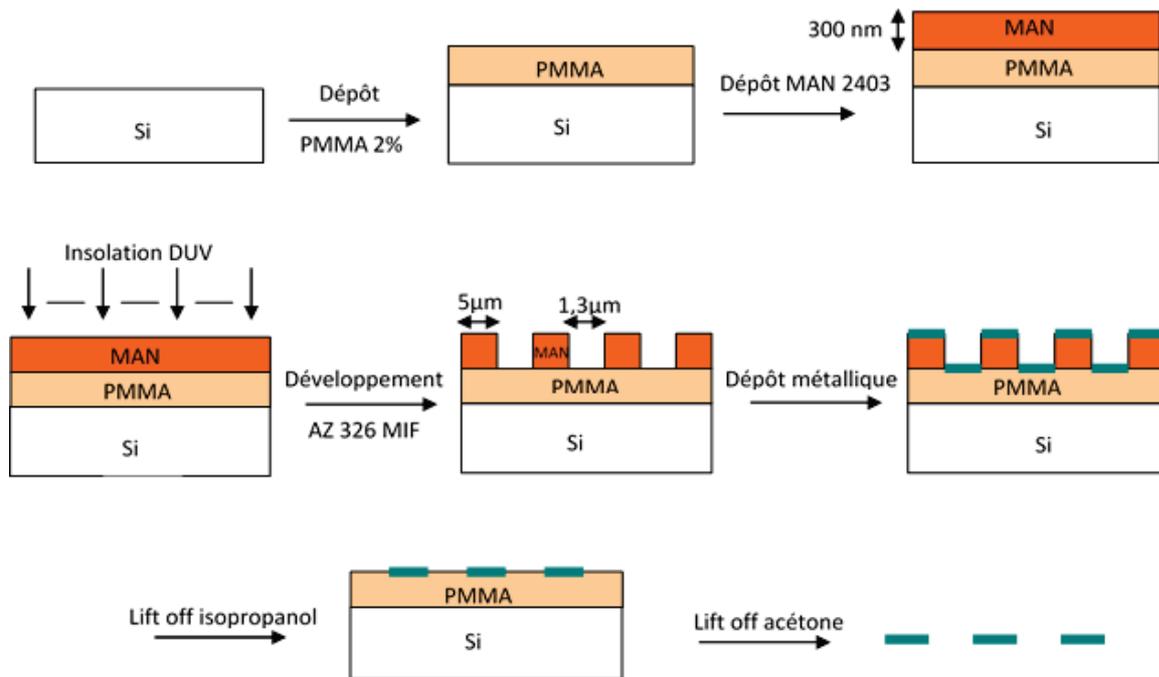


Figure 67. Schéma du procédé de fabrication de microparticules par lithographie optique via un procédé par bicouches de résines.

La Figure 68 montre des images MEB des particules de permalloy (A) et de magnétite (B) obtenues avec ce procédé de fabrication, attachées au substrat ou alors mises en suspension et collectées à nouveau sur un substrat de silicium.

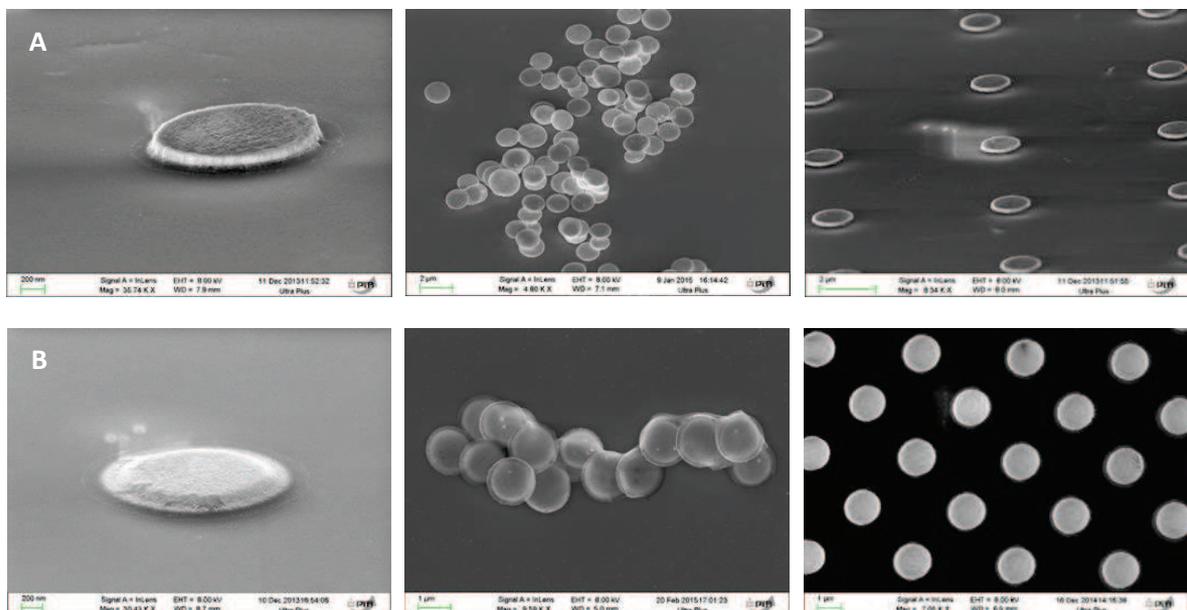


Figure 68. Micro particules magnétiques de A/ FeNi et B/ Fe_3O_4 fabriquées par un procédé de lithographie optique par bicouches de résines.

Un des avantages de cette méthode est qu'elle permet de contrôler avec précision la nature et l'épaisseur du matériau déposé. Les particules de permalloy ont une épaisseur de 60 nm, afin de respecter le rapport de forme permettant une configuration magnétique en vortex (voir chapitre suivant). Quant aux particules de magnétite, elles ont une épaisseur arbitraire de 80 nm, afin de ne

pas dépasser un rapport 3 entre l'épaisseur des trous (donnée par l'épaisseur de la MAN, qui est de 300 nm) et l'épaisseur déposée. Ce rapport 3 est un paramètre conseillé dans les techniques de lithographie, afin que le lift-off se fasse dans de bonnes conditions.

De plus, cette méthode permet de déposer des empilements. Ainsi, la suite de l'étude a été réalisée sur des particules composées du matériau magnétique compris entre deux couches d'or de 10 nm d'épaisseur. Les dimensions des particules obtenues sont schématisées sur la Figure 69.

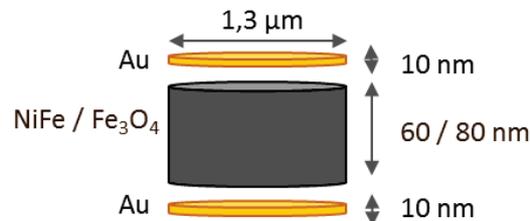


Figure 69. Schéma des dimensions des particules de FeNi et Fe₃O₄ recouvertes d'or obtenues par lithographie optique.

Ces couches d'or ont pour rôle d'empêcher l'oxydation du matériau, ainsi que de faciliter la future fonctionnalisation de surface des particules *via* des molécules thiols, dont l'élément de tête, le sulfhydryle SH, présente une forte affinité avec l'or. Cette fonctionnalisation aura pour but de greffer des anticorps à la surface des particules afin de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses, étape qui sera détaillée dans la section 5. De plus, dans le cas des particules de permalloy, ces couches d'or servent également à améliorer la biocompatibilité des particules.

En revanche, cette technique de fabrication présente plusieurs inconvénients qu'il sera nécessaire d'améliorer par la suite dans l'optique de poursuivre vers des applications *in vivo* : tout d'abord, le rendement de cette technique n'est pas comparable aux rendements que l'on obtient *via* des techniques de fabrication chimiques (coprécipitation, décomposition thermique...) en termes de nombres de particules obtenues par temps de fabrication, puisqu'il s'agit ici d'une méthode 2D où les particules sont obtenues sur une surface. On rappelle que le choix de cette technique se justifie dans le besoin de fabriquer des particules avec une forte anisotropie de forme, ce que ne permettent pas la plupart des techniques chimiques qui aboutissent à la fabrication de particules sphériques. Il est possible de fabriquer des particules de forme anisotrope par voie chimique, mais ces méthodes sont compliquées et les particules présentent une forte dispersion en taille [172] [224]. Elles sont de plus trop petites pour exercer des forces ou couples suffisants sur les membranes des cellules. D'autre part, on pourrait objecter que pour des particules destinées à long terme à être utilisées *in vivo*, celles-ci sont particulièrement grosses (diamètre de 1,3 µm, épaisseur de 80-100 nm). Le choix de ces dimensions a été guidé par plusieurs facteurs : outre la nécessité d'exercer des forces significatives sur les cellules comme discuté plus haut, la deuxième contrainte est directement liée à la technique de fabrication, puisque la résolution facilement accessible en lithographie optique est d'environ 1 µm. Il a été décidé de se placer juste au-dessus de cette limite (1,3 µm). Si par la suite on souhaite réduire leur taille tout en augmentant le rendement, on pourra se tourner vers des techniques telles que le ball milling [225-228] ou la nanoimpression [229-233]. Ainsi, *a fortiori*, à moins de cibler une tumeur présente dans les reins, elles ne sont donc pour l'instant pas destinées à être injectées de façon intraveineuse, puisque dans ce cas elles seraient trop rapidement reconnues par les cellules du système immunitaire et éliminées avant d'avoir pu être guidées vers la tumeur ciblée, et ce même si

elles étaient fonctionnalisées. Elles sont pour l'instant destinées à être injectées directement dans la tumeur à traiter, ce qui pourra éventuellement entraîner un problème de dispersion inhomogène au sein de la tumeur, mais qui permettra néanmoins d'étudier leur effet localisé.

3. Comparaison des caractéristiques magnétiques des microparticules de permalloy et de magnétite attachées au substrat

Cette partie est consacrée à la comparaison des propriétés magnétiques des microparticules de permalloy, déjà connues par de précédents travaux [223] [97] [96], avec celles des microparticules de magnétite, qui nous intéresseront davantage dans cette étude. Les particules étant destinées à être utilisées en suspension, il sera important de vérifier qu'elles ont une aimantation suffisamment faible en champ nul pour éviter des phénomènes d'agglomération, et qu'elles imitent en ce sens le superparamagnétisme. Nous verrons que les deux types de particules diffèrent radicalement en termes de configuration magnétique, ce qui rendra leur comparaison d'autant plus intéressante. Ces caractéristiques sont déterminées *via* des mesures VSM (Vibrating Sample Magnetometer), SQUID (Superconducting QUantum Interference Device), AFM / MFM (Atomic Force Microscopy / Magnetic Force Microscopy) et des mesures en holographie magnétique.

3.1. Particules de permalloy ($\text{Fe}_{20}\text{Ni}_{80}$)

Les particules de permalloy utilisées dans ces travaux sont les mêmes que celles qui ont été étudiées dans les travaux de S.Leulmi [97], dans lesquels leurs dimensions ont été optimisées pour obtenir une configuration magnétique en vortex. Cette configuration décrit un état dans lequel les spins sont dans le plan et « enroulés » autour du cœur de vortex situé au centre de la particule et dont l'aimantation pointe hors du plan. Cet état de fermeture du flux magnétique est le fruit de la minimisation de l'énergie magnétique totale du système, et est favorisée dans les particules de forme anisotrope telles que les disques. De plus, cette configuration n'est possible que pour une certaine gamme de dimensions et de rapport de forme, et ne peut donc se former pour des trop petites particules pour lesquelles la configuration la plus favorable est la configuration en monodomaine, ni pour de trop grosses particules dans lesquelles des parois peuvent se former [234] [169]. Cette configuration magnétique avait été choisie car elle confère aux particules une rémanence nulle, critère essentiel pour des particules destinées à être utilisées dans le domaine du biomédical dans la mesure où cela limite leur agrégation spontanée en champ nul.

Avec un rapport de forme (épaisseur/rayon) de 0.09, les particules de FeNi fabriquées ont bien une configuration magnétique en vortex, comme le prouve l'image MFM de la Figure 70 sur laquelle le cœur du vortex est contrasté et clairement visible au centre de la particule. Cette configuration est confirmée par le cycle d'hystérésis mesuré à 300 K au VSM présenté sur la même figure, qui montre les hystérésis dus à la nucléation et l'annihilation du cœur de vortex.

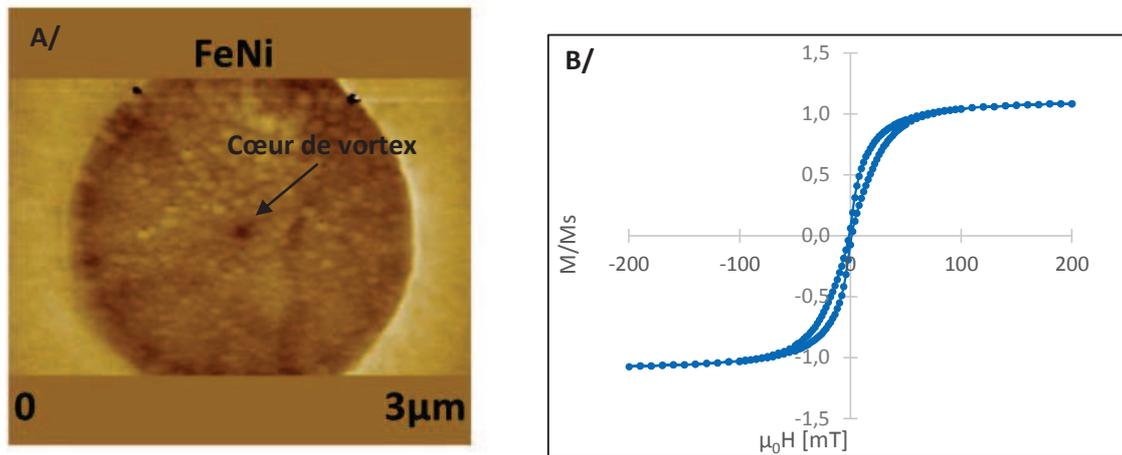


Figure 70. Configuration magnétique des microparticules de FeNi : A/ image mesurée en MFM via une pointe PPP-LM-MFMR (« low moment »), où l'on voit le cœur du vortex au centre de la particule. B/ cycle d'hystérésis de microparticules attachées sur un substrat mesuré au VSM à 300 K, montrant les ouvertures de cycle caractéristiques d'un vortex.

On peut à présent s'intéresser à un autre outil très puissant permettant de remonter à la configuration magnétique d'un matériau et permettant d'obtenir des images très précises des lignes de flux : l'holographie électronique. Parmi les techniques d'imagerie magnétique (MFM, MOKE...), elle est la plus performante en termes de résolution. Elle est basée sur la déflexion d'un faisceau d'électrons de charge q par un champ électromagnétique selon l'équation de Lorentz :

$$\vec{F} = q(\vec{E} + \vec{v} \wedge \vec{B})$$

Lorsqu'un électron rencontre un matériau magnétique, il subit un déphasage lié d'une part à l'induction magnétique de l'échantillon, et d'autre part au champ électrique produit par les nuages électroniques du réseau cristallin. Toute la difficulté de l'imagerie est de conserver cette information de phase, qui est d'habitude perdue dès la projection de l'onde électronique sur un écran. En holographie, on fait interférer deux ondes électroniques, une onde traversant l'échantillon et contenant donc les informations importantes et une onde de référence n'ayant pas traversé l'échantillon (Figure 71).

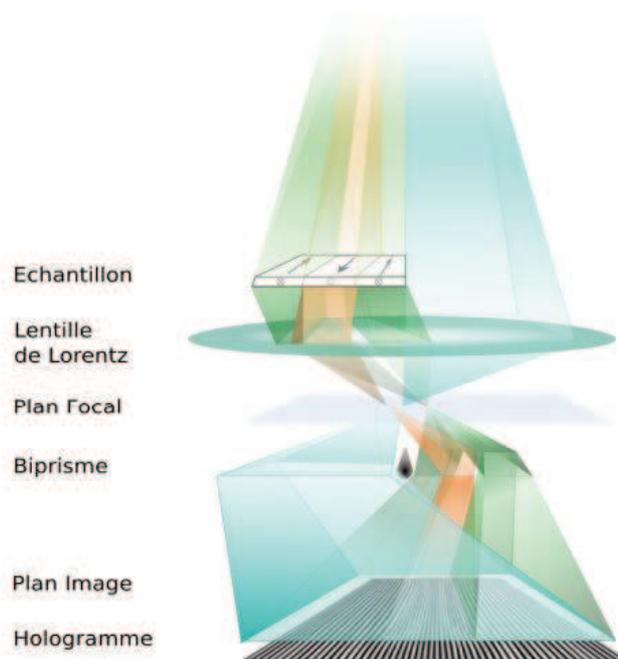


Figure 71. Schéma de principe de l'holographie électronique : la rencontre de deux ondes électroniques mène à une figure d'interférence. Figure extraite de la référence [235].

A partir de la figure d'interférence, il s'agit de reconstruire l'image en passant par une décomposition de Fourier de la figure d'intensité obtenue sur l'hologramme. Pour séparer l'information liée au déphasage électrostatique de celle liée au déphasage magnétique, on peut faire ce qui est appelé le « time reversal analysis », qui consiste à mesurer deux fois l'hologramme en ayant retourné l'échantillon entre les deux : la composante magnétique s'en trouve inversée tandis que la composante électrostatique n'aura pas changé. En additionnant ou soustrayant ces deux hologrammes, on ne garde que l'une ou l'autre des composantes.

Cette mesure a été effectuée par Aurélien Masseboeuf (CEMES Toulouse) sur les disques de permalloy. La Figure 72 présente l'hologramme obtenu sur un microdisque, pour lequel le faisceau d'électrons est envoyé perpendiculairement au plan de la particule. Il est représenté de deux manières différentes : l'image b présente les isophases représentées en échelle de couleur « température » (plutôt qu'en noir et blanc) et l'image c reprend l'image b en calculant le cosinus de la phase afin de voir les lignes de flux plus clairement.

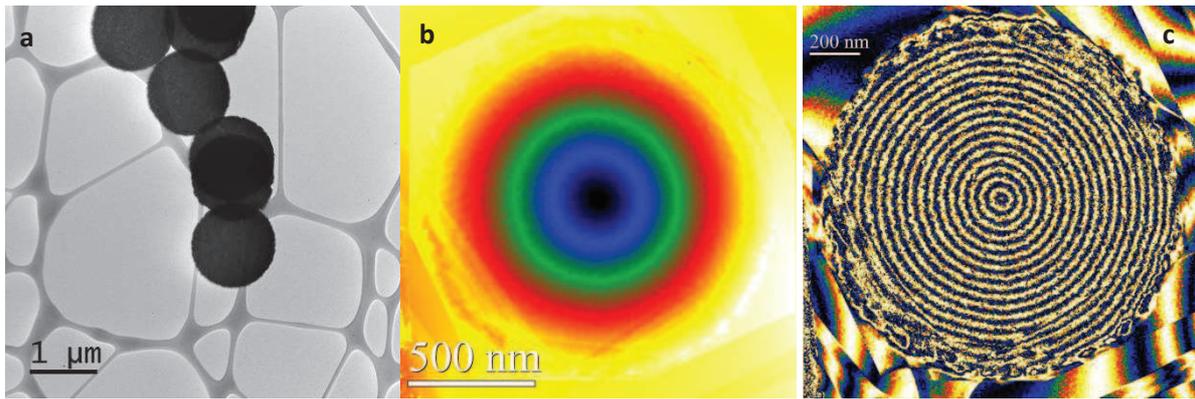


Figure 72. a/ Image TEM de plusieurs microdisques de permalloy. b/ Hologramme ne contenant que l'information du déphasage magnétique. L'échelle d'intensité est représentée en « couleur température ». c/ Autre façon de représenter les lignes de flux, en calculant le cosinus de l'image b.

La Figure 72 montre clairement que les lignes d'isophases, donc les lignes de champ, sont concentriques autour du centre de la particule, où le déphasage devient nul, ce qui est caractéristique d'un cœur de vortex présentant une composante magnétique perpendiculaire au plan de la particule. Il est également possible de quantifier l'induction magnétique connaissant l'épaisseur du matériau traversé par les électrons, puisque le gradient du déphasage magnétique est proportionnel à l'induction, au quantum de flux Φ_0/π ainsi qu'à l'épaisseur. Pour l'hologramme présenté Figure 72, on obtient un $\mu_0 M_s$ de 0.85 T, très proche de la valeur théorique de 1 T pour le permalloy.

Il est intéressant d'observer que sur des microdisques présentant des défauts de structure tels qu'un trou au centre de la particule, celle-ci peut garder la configuration magnétique en vortex ou alors la perdre si le défaut est trop décentré, comme l'illustre la Figure 73.

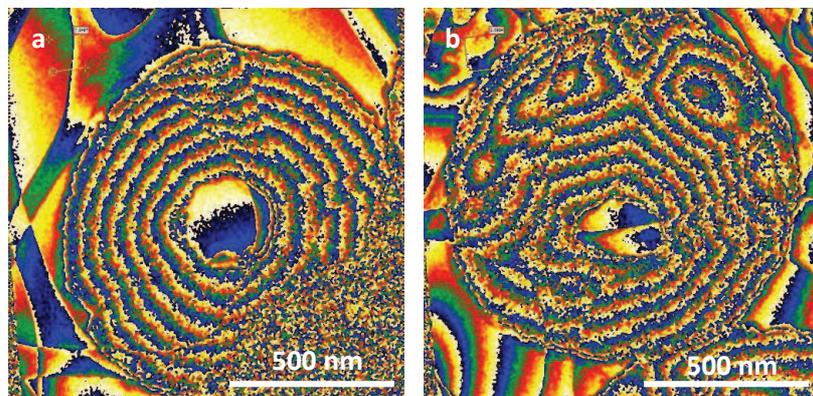


Figure 73. Hologrammes sur des microdisques de permalloy présentant des défauts de structure. a/ La configuration magnétique en vortex est conservée. b/ Le défaut est trop décentré, la configuration magnétique en vortex est perdue.

Ces défauts sont marginaux à l'échelle du procédé de fabrication, et peuvent être dus à une inhomogénéité du développement de la MAN après son insolation (voir section 2) : sur les zones sous-développées, il peut rester de la résine au centre des zones où le matériau va être déposé.

Nous avons donc confirmé la configuration en vortex des microdisques de permalloy de 1,3 μm de diamètre et de 60 nm d'épaisseur.

Comme nous l'avons déjà mentionné, en plus d'une rémanence quasi nulle, l'autre avantage de ce type de particules est leur anisotropie de forme, puisqu'elles ont une forme de disque plat. Cette propriété sera cruciale lorsqu'il s'agira d'actionner les particules avec un champ magnétique extérieur, puisqu'elle permet de confiner l'aimantation dans le plan de la particule et est donc à l'origine de l'effet mécanique du couple magnétique. On confirme ce confinement magnétique en mesurant le cycle d'hystérésis dans le plan perpendiculaire au plan de la particule, lequel présente une susceptibilité χ à l'origine beaucoup plus faible que le cycle mesuré en parallèle, comme montré sur la Figure 74 :

$$\chi_{\perp} = 6\% \chi_{//}$$

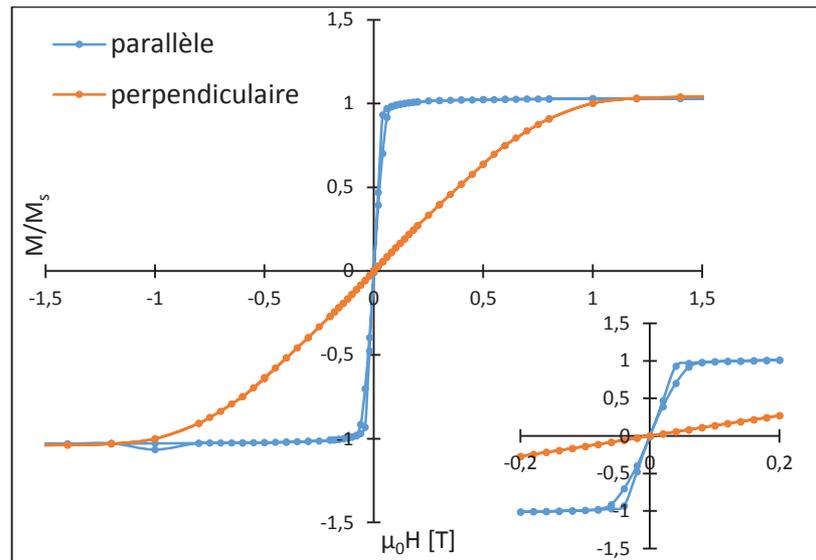


Figure 74. Cycles d'hystérésis de vortex de permalloy mesurés au SQUID dans le plan et perpendiculairement au plan des particules, montrant que l'aimantation est préférentiellement confinée dans le plan à cause de l'anisotropie de forme de la particule : χ (parallèle) \gg χ (perpendiculaire). L'insert est un zoom en champ du cycle complet.

3.2. Particules de magnétite (Fe_3O_4)

De la même façon, des mesures MFM ont été effectuées sur des particules de magnétite de $1.3 \mu\text{m}$ de diamètre et 80 nm d'épaisseur attachées au substrat juste après la dissolution de la résine superficielle, sans que celles-ci n'aient été soumises à un champ magnétique.

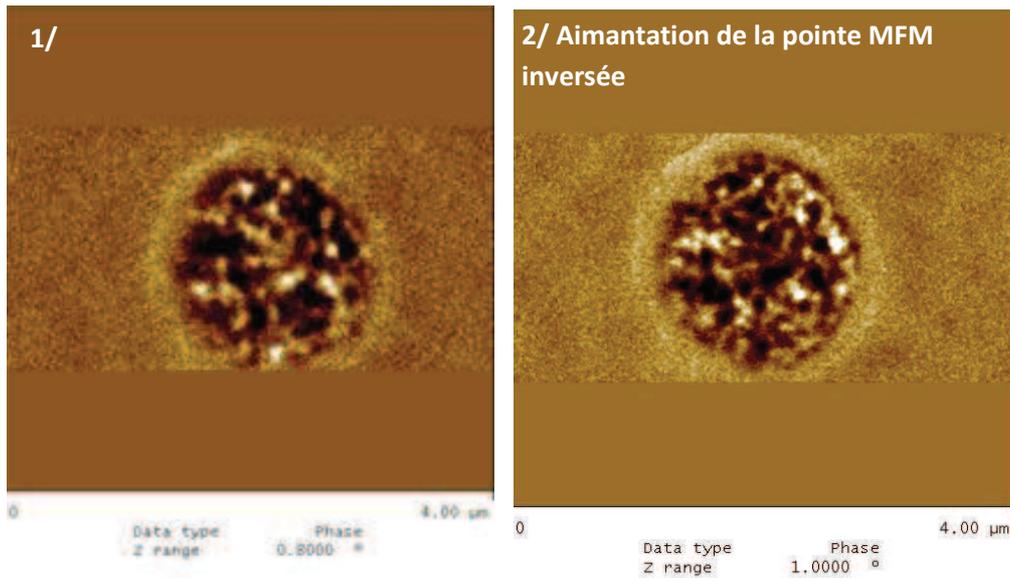


Figure 75. Images MFM d'une microparticule de magnétite mesurées avec une pointe PPP-LM-MFMR. Les deux images correspondent à la même particule, mais l'aimantation de la pointe a été inversée d'une image à l'autre. Le contraste des domaines étant parfaitement inversé, cela prouve leur origine magnétique.

L'image 1 de la Figure 75 a été mesurée avec une pointe PPP-LM-MFMR, et montre que la particule de magnétite est composée de domaines magnétiques de longueur caractéristique 150 nm. Pour s'assurer de l'origine magnétique de ces domaines, l'aimantation de la pointe a été inversée et la même particule scannée. L'image 2 montre que le contraste des domaines est parfaitement inversé par rapport à l'image 1, ce qui prouve leur origine magnétique.

La Figure 76 présente le cycle d'hystérésis de particules de magnétite attachées au substrat mesuré au SQUID: l'aimantation à rémanence et le champ coercitif mesurés sont relativement faibles ($M_r \approx 25\%.M_s$ et $H_c \approx 30$ mT) mais non nuls puisque chaque grain a un comportement ferrimagnétique (et donc une énergie d'échange non nulle au sein de chaque domaine).

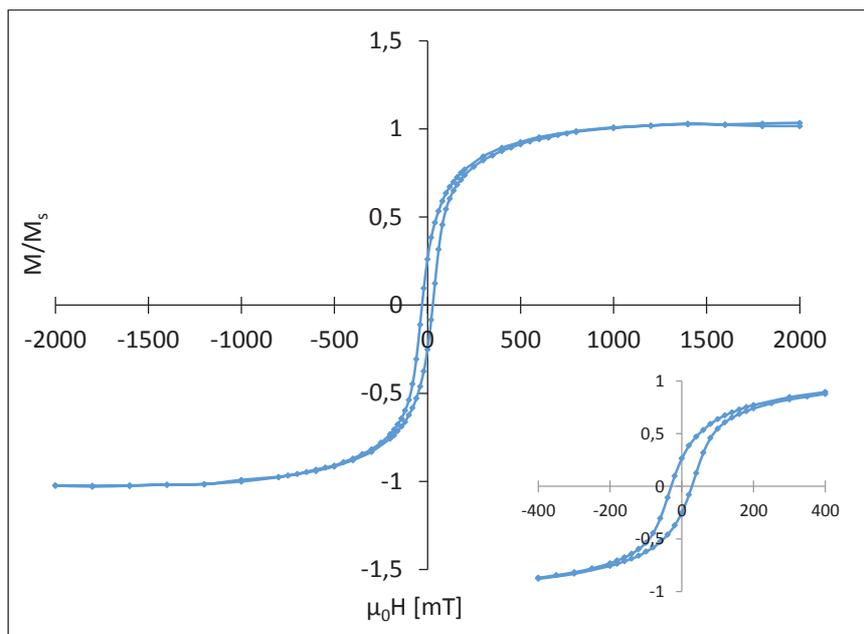


Figure 76. Cycle d'hystérésis de microparticules de magnétite mesuré au SQUID dans le plan de la particule. L'insert est un zoom en champ du cycle complet.

La rémanence de 25% est visible en MFM, comme le montre la Figure 77. En effet, cette image a été mesurée sur une particule de magnétite après sa saturation dans un champ de 1,5 T qui a été appliqué dans le plan de la particule. Les pôles clairs et sombres montrent que la particule n'a pas retrouvé un état parfaitement désaimanté, ce qui s'accorde donc avec la mesure d'une aimantation rémanente en champ nul. Nous investiguerons dans la prochaine section l'effet de cette rémanence sur le comportement de ces particules en suspension.

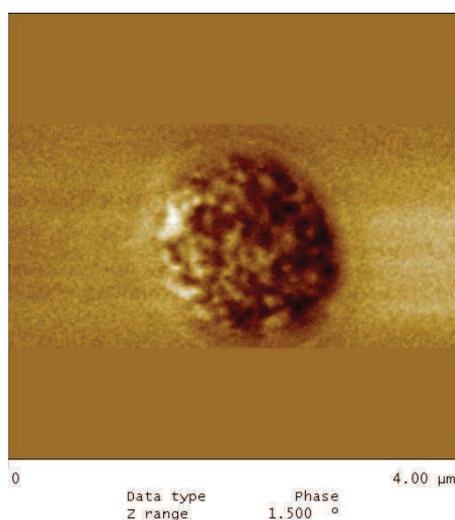


Figure 77. Image MFM d'une particule de magnétite après sa saturation dans un champ de 1,5 T appliqué dans le plan de la particule.

L'origine magnétique des contrastes observés sur les images MFM est désormais avérée. Cependant, on est en droit de se poser la question de la nature de ces domaines magnétiques. On sait que la magnétite déposée est polycristalline, puisqu'elle est déposée sur un polymère (le PMMA), qui est

amorphe et ne peut donc donner lieu à une croissance monocristalline de la magnétite. Deux hypothèses sont alors possibles :

- soit ces domaines correspondent aux grains structuraux du polycristal, auquel cas le contraste magnétique s'explique par le fait que l'anisotropie magnétocristalline est orientée aléatoirement au sein de chaque grain.
- soit les contrastes correspondent à la présence des parois antiphases, dont nous avons prouvé l'existence lors des caractérisations sur le matériau pleine couche (voir chapitre 2, section 3.2.1). On rappelle qu'une paroi antiphase délimite deux domaines couplés antiferromagnétiquement [161].

Plusieurs arguments viennent invalider la première hypothèse et corroborer la seconde : tout d'abord, il est possible d'estimer la taille des cristallites à partir d'un spectre de diffraction RX mesuré sur un échantillon de microparticules : la loi de Debye-Sherrer [236] [237] permet de relier la taille des grains structuraux à la largeur des pics de diffraction à la moitié de l'intensité, sachant que dans le cas d'une couche mince polycristalline, l'information est tronquée car relative uniquement aux cristallites qui diffractent à l'angle considéré. Nous obtenons en première approximation une taille de cristallite de $25 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$, ce qui ne correspond pas à la taille des domaines magnétiques observés sur les images MFM, dont on a estimé une longueur caractéristique d'environ 150 nm.

On peut également s'intéresser à l'évolution en température de la susceptibilité des microparticules de magnétite : supposons en première approximation que l'on puisse décrire le cycle des microparticules par une fonction de Langevin, quitte à rajouter dans cette fonction un terme d'anisotropie si jamais elle s'avérait pertinente. On rappelle que la fonction de Langevin vient de la description par la statistique de Boltzmann d'un système de moments paramagnétiques uniquement soumis à l'énergie de Zeeman, elle pourrait donc permettre de décrire approximativement le comportement des microparticules si l'on assimile les domaines magnétiques à des monodomaines [205]. On devrait alors observer une dépendance en $1/T$ de la susceptibilité initiale, puisque le développement limité de la fonction de Langevin en champ faible donne la relation suivante :

$$L(x) \approx \frac{x}{3}, \text{ soit } \frac{M}{H} = \chi \approx \frac{\mu_0 M_s^2 V}{3k_B T} \propto \frac{1}{T}$$

Or, la Figure 78, qui montre les cycles d'hystérésis des microparticules de magnétite à différentes températures, montre que la susceptibilité n'évolue quasiment pas en fonction de la température.

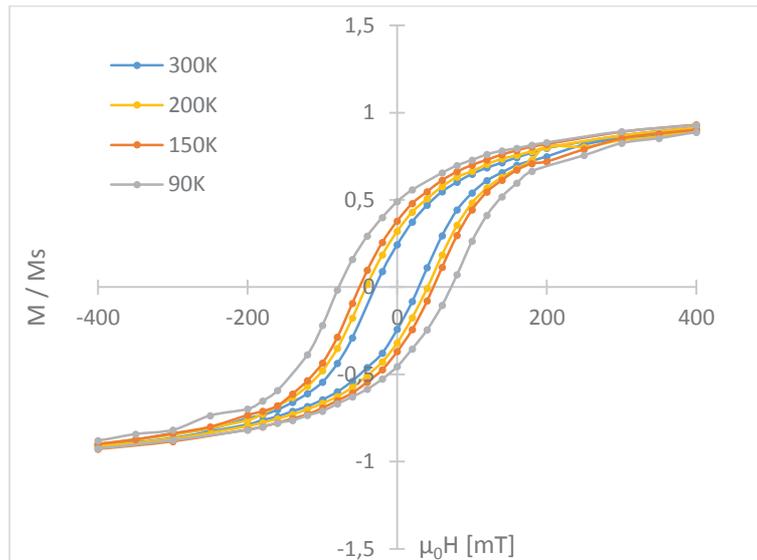


Figure 78. Evolution des cycles d'hystérésis des microparticules de magnétite en fonction de la température.

Enfin, la valeur du champ de saturation mesuré sur ces microparticules mis en relation avec la taille des domaines semble en accord avec une étude menée par Margulies *et al.* [161]. En effet, nous mesurons un champ de saturation d'environ 1 T pour des domaines de longueur caractéristique d'environ 150 nm (voir le cycle d'hystérésis Figure 76 et les images MFM Figure 75). Dans la référence [161], la figure 4.a montre que pour une épaisseur de film de 50 nm (même ordre de grandeur que notre épaisseur de 80 nm), le champ de saturation est d'environ 4 T. De plus, on peut extraire de la figure 1 une taille de domaine de longueur caractéristique d'environ 50 nm. Or, l'énergie de Zeeman nécessaire pour saturer un domaine magnétique est proportionnelle à l'énergie de couplage à travers la paroi, qui est proportionnelle à la surface de la paroi :

$$M_s V_{\text{domaine}} B_{\text{sat}} = A S_{\text{paroi}}$$

avec A l'énergie de couplage par unité de surface.

Si L est la longueur caractéristique d'un domaine, alors :

$$B_{\text{sat}} \propto \frac{A}{M_s L}$$

Le fait que l'on trouve un champ de saturation environ 4 fois plus faible pour une taille de domaine environ 3 fois plus large par rapport à l'étude de Margulies *et al.* est donc cohérent.

En conclusion, les particules de magnétite sont composées de domaines magnétiques séparés par des parois antiphases qui imposent un fort couplage antiferromagnétique de courte portée entre deux domaines adjacents.

En revanche, il ne semble pas y avoir d'interaction dipolaire prédominante entre les domaines : en effet, on compare sur la Figure 79 le cycle d'hystérésis d'un échantillon pleine couche de 100 nm d'épaisseur avec le cycle des microparticules de 80 nm d'épaisseur. Il n'y a pas de différence majeure de susceptibilité entre les deux cycles, ce qui prouve que la microstructuration de la magnétite n'a pas d'impact sur son comportement magnétique, dans la mesure où la taille des domaines reste inférieure à la taille de la microparticule. On peut donc les considérer comme indépendants entre eux.

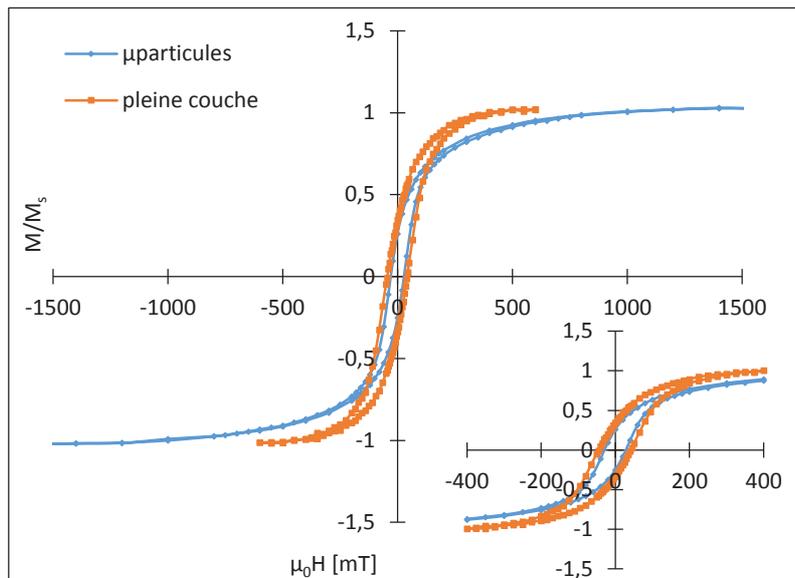


Figure 79. Comparaison des cycles d'hystérésis de la magnétite microstructurée et de la magnétite déposée sous forme de pleine couche. L'insert est un zoom en champ du cycle complet.

Cette structuration en domaines magnétiques indépendants va également avoir un impact sur le confinement de l'aimantation globale de la microparticule, dont on s'attend à ce qu'elle soit orientée préférentiellement dans le plan de la particule au vu de l'anisotropie de forme, comme nous l'avons constaté pour les particules de permalloy. On compare donc les cycles mesurés dans le plan et perpendiculairement au plan des particules :

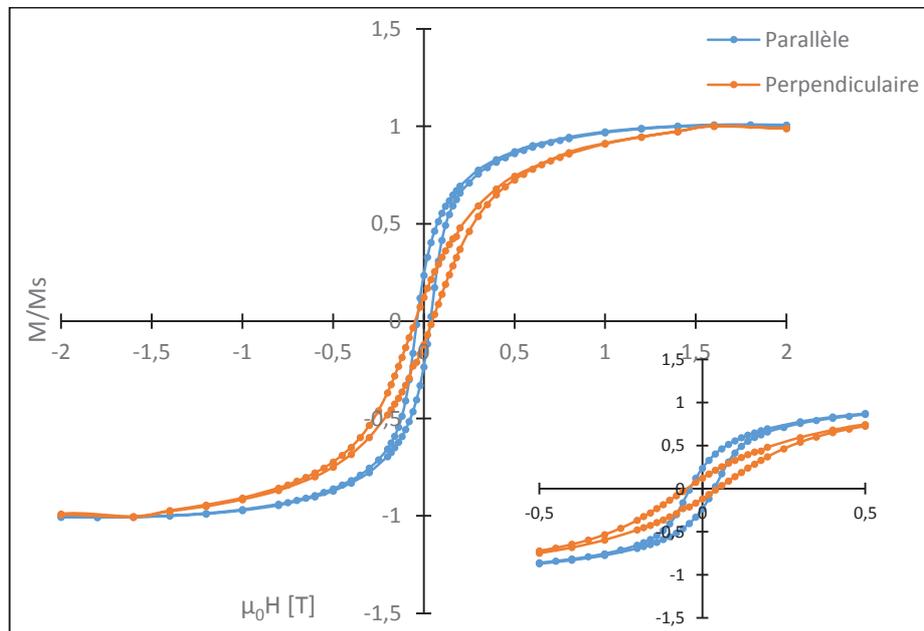


Figure 80. Cycles d'hystérésis de microparticules de magnétite mesurés dans le plan et perpendiculairement au plan de la particule. L'insert est un zoom en champ du cycle complet.

Ces cycles d'hystérésis donnent : $\chi_{\perp} = 43\% \chi_{\parallel}$.

On confirme avec ces mesures que l'aimantation de la particule est préférentiellement contrainte dans le plan, même si les effets de champ démagnétisants sont moins dominants dans le cas des particules

de magnétite que celles de permalloy, autorisant l'orientation partielle de l'aimantation perpendiculairement au plan de la particule. Cela explique que la différence de susceptibilité entre une mesure parallèle et une mesure perpendiculaire soit moins tranchée/nette que dans le cas des vortex de FeNi, l'énergie magnétostatique jouant un moindre rôle. Nous verrons dans la prochaine partie l'impact de ce résultat sur le couple exercé par un champ magnétique extérieur sur ces particules de magnétite.

4. Comparaison des comportements en suspension des microparticules de permalloy et de magnétite

Nous décrivons dans cette partie l'influence de la susceptibilité magnétique des microparticules sur leur comportement en suspension. Avec une rémanence nulle ou très faible, les particules ne s'agglomèrent pas spontanément une fois mises en suspension. En revanche, une fois soumises à un champ magnétique, elles vont s'agréger. Or, une étude réalisée à SPINTEC montre qu'une faible rémanence ne suffit pas à ce qu'elles se redispersent une fois le champ magnétique coupé, mais que la susceptibilité a également un rôle à jouer. Il a été démontré qu'il existe un seuil de susceptibilité au-delà duquel les particules, bien que d'aimantation nulle en champ nul, s'autopolarisent et ne se redispersent plus en suspension [222] [223]. La susceptibilité est également mise en relation avec l'efficacité du couple mécanique exercé par un champ magnétique extérieur sur les particules. Nous continuons à cette occasion la comparaison du comportement des particules de permalloy avec celles de magnétite.

Contrôle des phénomènes d'agglomération et de dispersion en solution :

A partir des observations sur les caractéristiques magnétiques des particules, il est important de vérifier qu'elles ne s'agglomèrent pas en champ nul une fois mises en suspension, notamment pour les particules de magnétite qui présentent une rémanence non nulle. De plus, il est nécessaire de s'assurer qu'une fois un champ magnétique appliqué puis coupé, elles vont se redisperser sans avoir besoin d'une aide mécanique, et ce toujours dans l'optique de les utiliser pour des applications biomédicales. Les particules ont donc été mises en suspension dans un bécher d'acétone, lequel a été inséré entre un système de bobines en cuivre placées sous un microscope. Les bobines sont alimentées par des alimentations Kepco pilotées par un programme Labview, lequel permet de les contrôler en champ ou en courant. Un champ statique de 4 mT est appliqué, ce qui provoque la polarisation des particules et leur formation en chaînes parallèlement à la direction du champ appliqué par interactions dipolaires. Lorsque ce champ est coupé, on observe que les chaînes se rompent et les particules se redispersent en solution, et ce aussi bien pour les particules de permalloy que de magnétite (Figure 81).

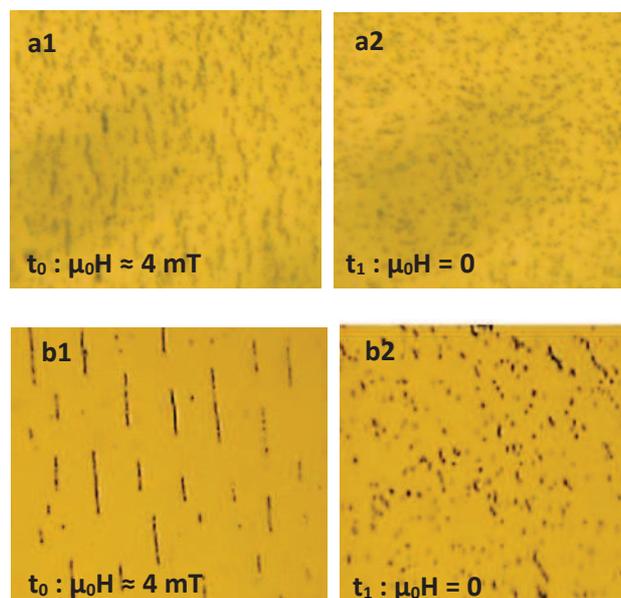


Figure 81. Comportement en suspension sous champ (a1 et b1) et une fois le champ coupé (a2 et b2) des particules de magnétite (a1 et a2) et de permalloy (b1 et b2).

Comme mentionné plus haut, la compétition entre agglomération et dispersion des particules en suspension a été considérée d'un point de vue théorique en relation avec les résultats expérimentaux dans une étude précédemment menée à SPINTEC, et interprétée à l'aide d'un modèle auto-consistant analogue à la théorie du champ moyen du ferromagnétisme [222] [223]. Ce modèle a permis de déterminer une condition pour laquelle les chaînes de particules, qui se forment au départ par l'application d'un champ extérieur ou spontanément par des rémanences locales, se redispersent après la suppression du champ appliqué. Lorsque la chaîne subsiste en champ nul, son propre maintien traduit l'existence d'un phénomène d'autopolarisation des particules magnétiques qui la forment.

Pour modéliser ce phénomène, les particules en chaîne sont assimilées à des dipôles magnétiques polarisables sous l'effet du champ dipolaire généré par l'ensemble de leurs voisines, considérant deux relations qui coexistent dans la chaîne : 1/ l'aimantation M d'une particule donnée est produite par le champ qu'elle reçoit de ses voisines et dépend de la susceptibilité du matériau ; 2/ le champ que la particule reçoit est créé par toutes les particules polarisées voisines, qui génèrent un champ de fuite dipolaire H dépendant de leur aimantation M . Pour ce dernier, une relation linéaire traduit la relation entre M (aimantation de chaque particule, source de champ) et H (somme des champs dipolaires reçus par une particule donnée en un point de la chaîne). Le modèle a permis de démontrer que les phénomènes d'autopolarisation / agglomération / redispersion de la chaîne de particules dépendent de la susceptibilité du matériau magnétique. Cette dernière doit être inférieure à un seuil de susceptibilité pour que la redispersion ait lieu, ce seuil correspondant à la pente d'une « droite dipolaire ». Lorsque la susceptibilité initiale des particules est supérieure à cette susceptibilité seuil, le champ de fuite des microparticules sur les voisines est suffisant pour maintenir leur polarisation, responsable de l'agglomération. Le cycle d'hystérésis du matériau est alors coupé en trois points d'intersection par la droite dipolaire $M(H)$, dont deux sont symétriques et d'abscisses non nulles, représentant l'état de la chaîne agglomérée. En revanche, ce phénomène d'agglomération est évité si la susceptibilité des particules est inférieure à la valeur seuil. Dans ce cas, la droite dipolaire, de pente supérieure à la susceptibilité initiale du matériau, ne coupe le cycle d'hystérésis des particules qu'en zéro, à son origine, et aucun état stable ne permet le maintien auto cohérent d'une chaîne de particules : les particules se redispersent une fois que le champ est coupé.

Cette valeur seuil de susceptibilité a été estimée en calculant la pente de cette « droite dipolaire ».

Calcul de la susceptibilité seuil d'agglomération :

Le calcul de la susceptibilité seuil ayant été réalisé dans une étude précédente [222] pour des particules de surfaces carrées, nous l'avons adapté dans notre étude aux particules en forme de disques de permalloy ou de magnétite : on considère une chaîne de N particules circulaires, de rayon R , adjacentes (donc en supposant que la distance d entre les centres de deux particules voisines est égale au diamètre des particules, $d = 2R$), alignées avec la direction du champ appliqué (voir Figure 82). Chaque particule est assimilée à un dipôle magnétique et porte un moment magnétique \vec{m} parallèle à la direction de la chaîne. Une particule rayonne le champ dipolaire \vec{B}_{dip} à la distance r :

$$\vec{B}_{dip} = \mu_0 \vec{H}_{dip} = \frac{\mu_0}{4\pi|\vec{r}|^3} \cdot \left(\frac{3(\vec{m} \cdot \vec{r})\vec{r}}{|\vec{r}|^2} - \vec{m} \right), \text{ soit } |\vec{B}_{dip}| = \frac{2\mu_0 m}{4\pi r^3}$$

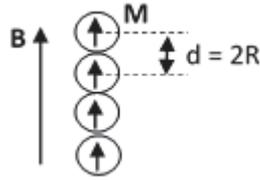


Figure 82. Schéma d'une chaîne de particules jointives, alignées par le champ B appliqué. d est la distance inter-centre égale au diamètre d'une particule.

Le champ ressenti par une particule de la chaîne, en particulier celle placée à une extrémité, a pour expression la somme des champs rayonnés par les N-1 particules voisines :

$$\mu_0 H = \frac{\mu_0}{4\pi} \cdot \frac{2m}{d^3} \sum_{k=1}^{N-1} \left(\frac{1}{k^3} \right) = \frac{\mu_0 e M}{8d} \cdot \sum_{k=1}^{N-1} \left(\frac{1}{k^3} \right)$$

avec $m = M \times V_{\text{part}} = M \times \pi R^2 \times e$, e étant l'épaisseur d'une particule.

Pour N grand, la somme converge rapidement vers 1,202, d'où

$$M = \frac{8d}{1,202 e} H$$

La susceptibilité seuil, pente de cette droite dipolaire, a pour expression :

$$\chi_{\text{seuil}} = \frac{8d}{1,202 e}$$

Elle est donc fonction du rapport de forme de la particule. Cette pente peut être comparée à la pente des cycles expérimentaux (susceptibilité à l'origine du permalloy ou de la magnétite), comme montré sur la Figure 83.

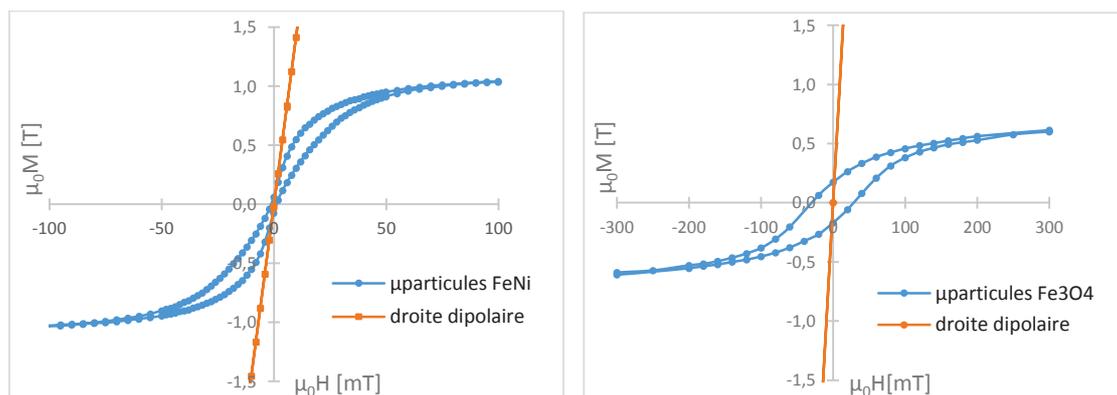


Figure 83. Comparaison des susceptibilités magnétiques des particules de permalloy et de magnétite avec la pente de la « droite dipolaire » donnant la valeur seuil de susceptibilité χ_{seuil} . Au-dessus de cette valeur, il y a théoriquement agglomération des particules.

Les courbes montrent que les susceptibilités des microparticules de FeNi et de Fe₃O₄ sont inférieures à la pente de la droite dipolaire. Le modèle prédit donc une dispersion des particules en suspension après la suppression du champ appliqué, ce qui est bien confirmé par l'observation de redispersion

des particules en champ nul en suspension (Figure 81). Comme modélisé, il n'y a pas d'agglomération due à l'autopolarisation des particules en suspension.

Cependant, en comparant le comportement en suspension des particules de FeNi et de Fe₃O₄, nous avons remarqué que la formation en chaînes des particules de magnétite est beaucoup plus lente que celle des particules de permalloy, ces dernières étant beaucoup plus réactives au champ extérieur. Cela s'explique en observant que la susceptibilité des particules de permalloy est environ deux fois plus élevée que celle des particules de magnétite (voir Figure 84).

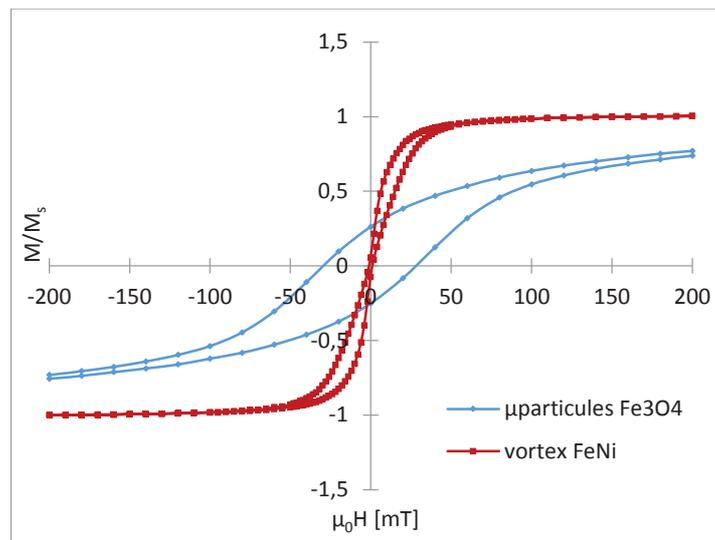


Figure 84. Comparaison des cycles d'hystérésis des microparticules de permalloy et de magnétite, montrant que les particules de magnétite ont une susceptibilité environ deux fois plus faible que celles de permalloy.

Quantitativement, on peut estimer cette différence de réactivité en calculant le couple magnétique exercé par le champ magnétique extérieur sur les deux types de particule, qui nous renseignera également sur le couple mécanique que les particules peuvent exercer sur les cellules une fois attachées à leur membrane. On rappelle que ces particules sont destinées à être attachées à la membrane des cellules puis actionnées par un champ magnétique alternatif afin d'engendrer leurs vibrations, ce qui transmettra un stress à la membrane afin de déclencher l'apoptose des cellules cancéreuses.

Actionnement des particules en suspension, efficacité des couples magnétiques :

Le couple exercé par un champ \mathbf{H} sur une particule de moment magnétique \mathbf{m} s'écrit :

$$\mathbf{\Gamma} = \mathbf{m} \wedge \mu_0 \mathbf{H} = \mu_0 V_{\text{part}} |\mathbf{M}| |\mathbf{H}| \sin(\gamma)$$

avec $\mathbf{m} = V_{\text{part}} \cdot \mathbf{M}$, \mathbf{M} l'aimantation de la particule et γ l'angle entre le champ appliqué et l'aimantation.

Si l'anisotropie de forme donnée par la forme de disque mince de la particule était très forte, nous pourrions assimiler la particule à un disque plat et supposer que l'aimantation est totalement confinée dans le plan de la particule, auquel cas γ correspondrait à l'angle entre le champ appliqué et le plan de la particule. Cela signifierait que la totalité du couple magnétique exercé par un champ magnétique appliqué hors du plan serait transformé en couple mécanique qui tendrait à faire tourner la particule.

Cette approximation pourrait être valable pour les particules de permalloy, pour lesquelles nous avons vu que le cycle d'hystérésis mesuré dans le plan perpendiculaire présente une susceptibilité bien moindre que le cycle mesuré parallèlement au plan de la particule (Figure 74). Cependant, ce n'est pas le cas pour les particules de magnétite, pour lesquelles les susceptibilités perpendiculaire χ_{\perp} et parallèle $\chi_{//}$ sont proches (Figure 80). L'aimantation va donc partiellement sortir du plan lorsque le champ est appliqué (voir Figure 85). Il faut donc prendre en compte cette part de l'aimantation qui est capable de suivre le champ appliqué et de sortir du plan de la particule, qui va diminuer la part de l'aimantation effectivement contributive au couple mécanique.

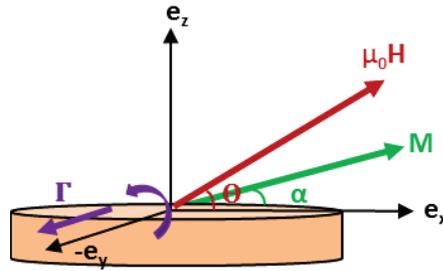


Figure 85. Schéma d'une particule et des directions de son aimantation et du champ appliqué dans le repère cartésien (Ox, Oy, Oz).

D'après les notations de la Figure 85, $\gamma = \theta - \alpha$. Les vecteurs « aimantation » et « champ appliqué » sont donnés par les équations suivantes :

$$\mathbf{H} = H_{//}\mathbf{e}_x + H_{\perp}\mathbf{e}_z = H \cdot \cos(\theta)\mathbf{e}_x + H \cdot \sin(\theta)\mathbf{e}_z$$

$$\mathbf{M} = M_x\mathbf{e}_x + M_z\mathbf{e}_z = \chi_{//}H \cdot \cos(\theta)\mathbf{e}_x + \chi_{\perp}H \cdot \sin(\theta)\mathbf{e}_z$$

Et

$$\tan(\alpha) = \frac{M_z}{M_x} = \frac{\chi_{\perp} H_{\perp}}{\chi_{//} H_{//}} = \frac{\chi_{\perp}}{\chi_{//}} \tan(\theta)$$

Le couple est alors donné par la formule suivante :

$$\Gamma = \mu_0 V_{\text{part}} H^2 \cdot \chi_{//} \sqrt{\cos(\theta)^2 + \left(\frac{\chi_{\perp}}{\chi_{//}}\right)^2 \sin(\theta)^2} \cdot \sin\left(\theta - \arctan\left(\frac{\chi_{\perp}}{\chi_{//}} \tan\theta\right)\right)$$

Ce couple est maximal pour $\theta = 45^\circ$. Si l'on fixe l'amplitude du champ H à 30 mT, champ qui sera appliqué par la suite dans les expériences *in vitro*, et que l'on injecte les valeurs expérimentales des susceptibilités magnétiques (à partir des cycles donnés Figure 84), on obtient :

$$\Gamma (\text{FeNi}, 30 \text{ mT}) \approx 0,76 \text{ fN.m}$$

$$\Gamma (\text{Fe}_3\text{O}_4, 30 \text{ mT}) \approx 0,19 \text{ fN.m}$$

On voit donc que le couple exercé sur les particules de magnétite est environ 4 fois plus faible que celui exercé sur les particules de permalloy. Ce résultat prend en compte d'une part le fait que la

susceptibilité des particules de magnétite est environ deux fois plus faible que celle des particules de permalloy, mais également le fait que le champ démagnétisant est moins dominant dans les particules de magnétite.

Dans l'idée d'augmenter le couple exercé par le champ extérieur sur les particules de magnétite, on peut essayer d'augmenter leur susceptibilité initiale. Les particules ont donc été recuites à 400°C pendant 1/2h sous atmosphère d'oxygène afin d'augmenter la mobilité des atomes et donc de faciliter leur réorganisation. L'effet attendu de ce traitement thermique est la diffusion des parois antiphases et donc l'augmentation de la taille des domaines magnétiques [154] [238]. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, section 3.2.1, on s'attend donc à une augmentation de la susceptibilité. L'image MFM de la Figure 86 montre que ce recuit a eu en effet pour conséquence d'augmenter la taille des domaines magnétiques, dont on estime une longueur caractéristique de 200 nm en moyenne.

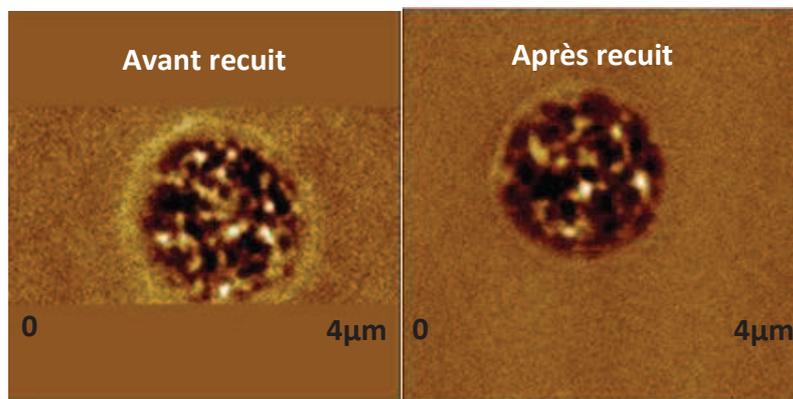


Figure 86. Images MFM mesurées avec une pointe PPP-LM-MFMR d'une particule de magnétite avant et après un recuit à 400°C. Le recuit a pour effet d'augmenter la taille des domaines magnétiques.

Les cycles d'hystérésis de la Figure 87 montrent que l'on a bien augmenté la susceptibilité par rapport aux particules non recuites. En revanche, le champ coercitif et la rémanence ont également augmenté, respectivement de 30 mT (non recuites) à 50 mT (recuites) et de 25% (non recuites) à 54% (recuites).

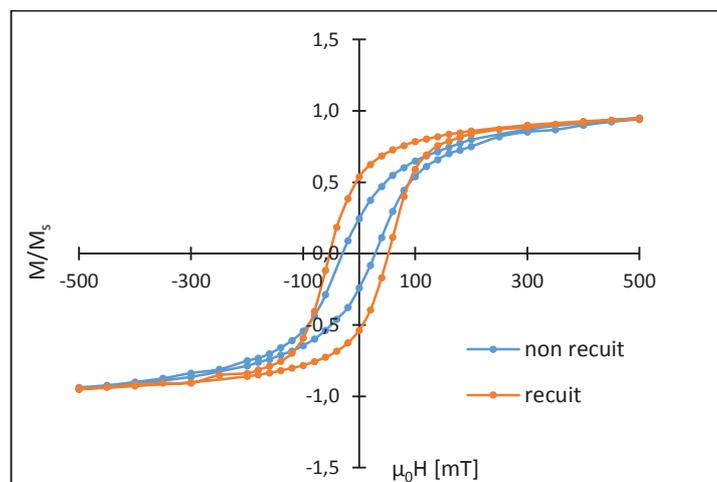


Figure 87. Comparaison des cycles d'hystérésis des particules de magnétite avant et après recuit.

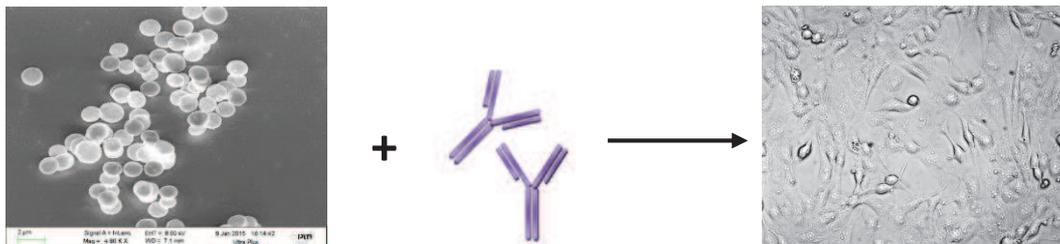
Il semblerait que cela aille à l'encontre du critère de redispersion des particules en suspension, puisqu'une augmentation de la rémanence va dans le sens de la présence d'un champ de fuite qui pourrait être responsable de l'autopolarisation des particules et donc de leur agglomération, comme discuté plus haut. Cela n'a pas pu être vérifié en pratique, puisque nous avons fait face à un problème concret lié à la technique de fabrication des particules qui sont, rappelons-le, fabriquées sur une double résine. Au moment du recuit, la résine superficielle a déjà été dissoute, les microparticules sont sur la résine sacrificielle, le PMMA. Or, le recuit à 400°C a pour effet de réticuler la résine, c'est-à-dire que des liaisons fortes se forment entre les chaînes du polymère, rendant la structure dure et insoluble, même dans un bon solvant. Il est donc impossible de récupérer les particules en suspension après le recuit, en tout cas avec ce procédé dans l'état actuel.

Il a donc été décidé de poursuivre l'étude avec les particules non recuites. Rappelons que les particules sont destinées à être greffées à la membrane des cellules afin d'engendrer un stress une fois le champ magnétique alternatif appliqué. Le but n'étant pas de rompre la membrane mais uniquement de provoquer la cascade biochimique responsable du déclenchement de l'apoptose, il n'est pas nécessaire d'appliquer des forces importantes sur la membrane. Peu de littérature existe sur la détermination des forces exercées par des particules ou tout autre élément sur des éléments biologiques. Parmi ce qui existe, on peut citer l'exemple du même calcul de couple qui a été fait sur des nanofils de nickel destinés à être internalisés dans des cellules d'un cancer du côlon et activés par un champ magnétique alternatif de faible fréquence [239]. Le couple exercé sur ces nanofils, estimé à $0,81 \cdot 10^{-3}$ fN.m, soit environ 200 fois plus faible que dans le cas de nos microparticules de magnétite, a été démontré comme suffisant pour induire un effet létal sur ces cellules. Dans le même sens, la référence [240] décrit une bactérie possédant la capacité de se mouvoir à l'aide de flagelles jouant le rôle d'un moteur et pouvant propulser la bactérie. Les forces exercées par ces flagelles ont été estimées à $5 \cdot 10^{-3}$ fN.m. Sans que cette valeur ne soit réellement une référence puisqu'il s'agit d'une force exercée sur un tout autre élément biologique et dans un autre but que celui d'agresser la membrane, elle est un premier repère qui montre que nos particules peuvent exercer des forces bien plus grandes que ce type de forces « naturelles » [241] [242].

L'idée est donc dans un premier temps d'effectuer les expériences *in vitro* avec les particules de magnétite dans les mêmes conditions que les expériences réalisées par S.Leulmi avec les particules de permalloy, et d'optimiser les paramètres tels que l'amplitude ou la fréquence du champ magnétique appliqué si nécessaire.

5. Fonctionnalisation des microparticules

Une fois les particules mises en suspension, elles doivent être fonctionnalisées afin de greffer l'anticorps à leur surface pour cibler spécifiquement l'antigène présent sur la membrane des cellules cancéreuses de la lignée cellulaire choisie. Nous verrons dans la section 6 quelles sont les propriétés de la lignée cellulaire utilisée dans ces travaux qui nous ont permis d'exploiter cette stratégie anticorps/antigène, et décrivons dans cette partie la stratégie de modification de surface des particules menant au greffage des anticorps.



5.1. Description du protocole

Afin d'immobiliser les anticorps de manière covalente sur les particules, une fonctionnalisation préalable de leur surface est nécessaire. C'est ici que le choix d'un dépôt d'or de chaque côté de la particule a toute son importance, puisque l'on peut facilement y ancrer des molécules thiols dont l'élément de tête, le sulfhydryle SH, présente une forte affinité avec l'or, laquelle est connue et largement étudiée dans la littérature [243] [217-219]. Cette stratégie présente également le réel avantage de pouvoir fonctionnaliser des particules composées de n'importe quel matériau magnétique, pourvu que celui-ci soit recouvert avec des couches d'or qui est, de façon toute aussi cruciale, non toxique. Ainsi, la stratégie de fonctionnalisation décrite dans ce chapitre se base sur celle élaborée dans la thèse de S.Leulmi en collaboration avec le SPRAM [97] sur les particules de permalloy, et sera appliquée sur les particules de magnétite recouvertes de 10 nm d'or de chaque côté. Les thiols seront ici utilisés sous forme de monocouches auto assemblées ou SAMs (Self Assembled Monolayers), qui décrivent l'organisation spontanée de certaines molécules en structures ordonnées par adsorption sur une surface métallique, comme illustré sur la Figure 88.

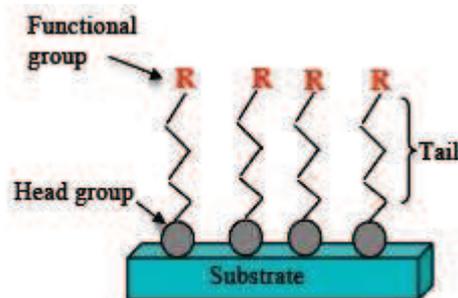


Figure 88. Schéma de l'organisation en monocouches d'une chaîne composée d'un groupement de tête adsorbé au substrat et d'un groupe actif R.

Le protocole de biofonctionnalisation se décrit en 3 étapes principales : l'immobilisation des SAMs de thiols à la surface des particules, l'activation des groupements de tête carboxyles *via* l'ajout de molécules spécifiques et enfin l'ancrage des anticorps.

1/ Immobilisation des SAMs de thiols :

Dans la référence [97], l'optimisation de l'ancrage des thiols à la surface des particules a été réalisée en choisissant d'élaborer un SAM mixte composé de carboxythiols longs et d'hydroxythiols courts avec un ratio 1/5 en faveur des thiols courts. Ces derniers jouent le rôle d'espaceur, évitant ainsi l'encombrement stérique entre les anticorps, tandis que les groupements actifs carboxyliques des thiols longs serviront de point d'ancrage aux molécules biologiques. Tous les résultats qui suivent seront présentés avec des particules fonctionnalisées avec ce SAM mixte. Cependant, un autre SAM a été testé, composé de PEGs thiolés. Les PEGs sont en effet largement étudiés dans la littérature et reconnus pour augmenter la furtivité des particules *in vivo* vis-à-vis du système immunitaire, puisque l'une des spécificités des chaînes de PEGs est de limiter l'adsorption des protéines, limitant ainsi la reconnaissance du système fonctionnalisé par les cellules du système immunitaire [215]. Un unique test a donc été réalisé en vue de la future utilisation des particules *in vivo*, où il a été prouvé que l'on peut remplacer sans problème le SAM de thiols par un SAM mixte de PEGs thiolés (HS-C₁₁-(EG)₃-OCH₂-COOH à 1 mM et HS-C₁₁-(EG)₃-OH à 5 mM) en conservant la mixité au même ratio 1/5 en faveur de la molécule la plus courte. Les chaînes de ce PEG thiolé sont en effet composées du même élément sulfhydryle en tant qu'élément de tête, et du même groupement carboxylique en tant que groupement actif, il n'y aura donc aucun changement dans la suite par rapport au protocole déjà mis en place. Concrètement, le thiol mixte est préparé à partir du 11-Mercapto undecanoic acid à 2 mM et du 6-Mercapto 1-hexanol à 10 mM dans de l'éthanol. Cette solution est ajoutée aux particules mises en suspension, lesquelles ont été lavées à l'éthanol deux fois afin d'éliminer toute trace d'acétone. La réaction se fait pendant 24h sous faible agitation. Un schéma d'une particule après cette étape est présentée Figure 89 :

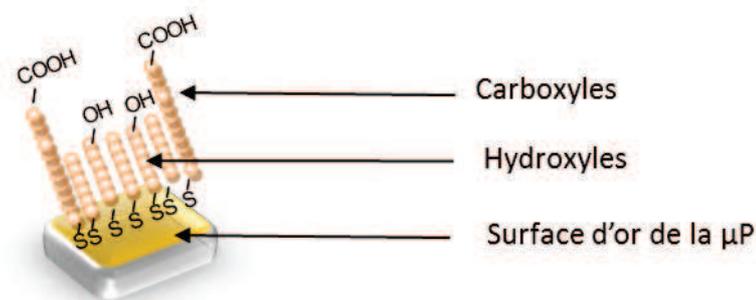


Figure 89. Schéma d'une microparticule fonctionnalisée avec des SAMs de thiols mixtes. Les groupements actifs carboxyliques vont servir de point d'ancrage aux molécules biologiques.

2/ Activation des groupements carboxyliques :

L'étape suivante est l'activation des groupements carboxyliques pour les transformer en ester activé afin de pouvoir greffer des molécules biologiques *via* des liaisons covalentes avec les fonctions amines, présentes en grand nombre sur les biomolécules (donc sur les anticorps). Cette étape nécessite l'ajout de deux molécules : EDC (1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide) dont le rôle est

effectivement de transformer le groupement carboxylique en ester activé, et NHS (N-Hydroxysuccinimide) dont le rôle est de stabiliser cet ester en solution aqueuse et donc d'augmenter l'efficacité du couplage entre l'amide et le groupement amine par la suite (voir Figure 90). Les solutions de EDC et NHS se préparent dans du PBS (Phosphate Buffered Saline) à pH 7,4 à partir des produits à 10 mM et 16 mM respectivement, et la réaction se fait pendant environ 1h30 après avoir lavé la suspension précédente deux fois dans de l'éthanol et une fois dans du PBS à pH 7,4 afin d'éliminer toutes les molécules qui ne se sont pas fixées à la surface des particules.

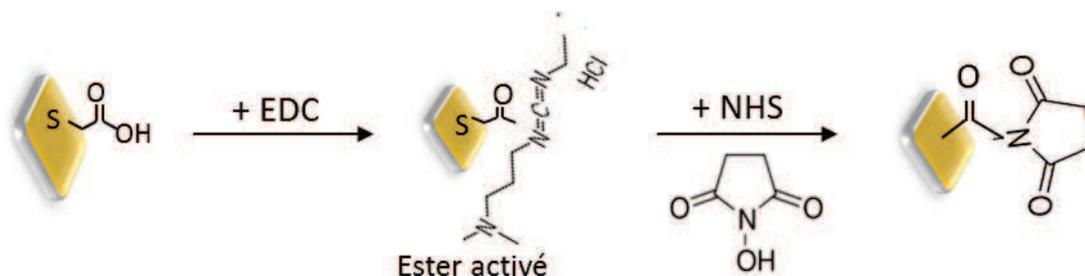


Figure 90. Schéma de principe de l'activation des groupements carboxyliques par l'ajout successif de EDC et NHS pour la formation d'un ester activé et sa stabilisation aqueuse.

3/ Ancrage des anticorps :

Une fois les groupements carboxyliques activés, les anticorps peuvent être greffés par liaison amide covalente. Les anticorps choisis sont d'origine commerciale (référence sc-25599 Santa Cruz Biotechnologies), choisis pour cibler spécifiquement l'antigène exprimé par la lignée de cellules choisie (voir section 6). La réaction a lieu dans du PBS à pH 8 pendant environ 1h30, après avoir lavé la suspension précédente deux fois au PBS à pH 7,4.

5.2. Tests de vérifications

5.2.1. Efficacité de la modification de surface des microparticules mises en suspension

Avant d'effectuer les tests *in vitro*, il est nécessaire de s'assurer que la modification de surface des particules décrite dans le paragraphe précédent est bien efficace. Plusieurs tests prouvant l'immobilisation des SAMs à la surface des particules ainsi que l'ancrage des anticorps et le maintien de leur fonction de reconnaissance ont été menés dans la référence [97] et ne seront pas repris ici. Cependant, ces tests ont été réalisés sur des particules attachées au substrat. Il a donc été nécessaire de compléter ces tests sur les particules libérées en suspension, afin de s'assurer que la modification de surface des particules est toute aussi efficace.

On cherche ici simplement à vérifier que la fonctionnalisation a été efficace, à savoir que les étapes précédentes aboutissent bien au greffage des anticorps à la surface des particules. La stratégie adoptée est d'utiliser une technique d'immunofluorescence, où un traceur fluorescent est greffé à l'anticorps *via* une structure sandwich. Ce traceur sera également ajouté dans une suspension de particules non fonctionnalisées qui servira de contrôle. Le traceur choisi est le fluorochrome phycoérythrine (PE), couplé à la protéine streptavidine, laquelle présente une forte affinité pour une autre molécule appelée biotine. Le principe de ce couplage est schématisé sur la Figure 91.

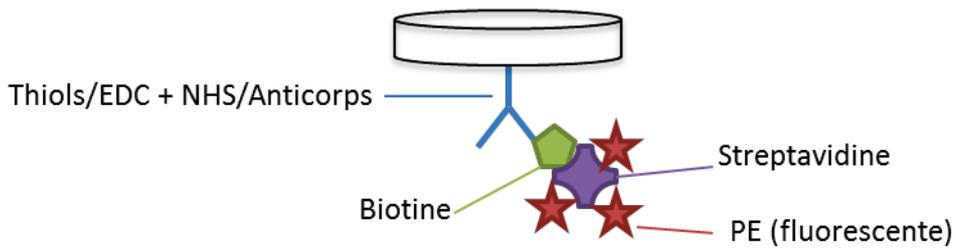


Figure 91. Schéma de principe de l'ancrage du fluorochrome sur les anticorps via le couple de molécules intermédiaires biotine/streptavidine. L'objectif est de vérifier l'efficacité du greffage des anticorps à la surface des particules.

Le couple biotine / streptavidine (PE) est ajouté aux deux suspensions de particules, dont l'une est une suspension de particules fonctionnalisées comme décrit précédemment (thiols/EDC-NHS/anticorps) et l'autre est une suspension contrôle de particules non fonctionnalisées. Les suspensions sont ensuite lavées deux fois au PBS à pH 7,4 avant d'être observées au microscope optique en transmission et à fluorescence afin de corrélérer la présence de fluorescence à la présence de microparticules.

Ce test a été réalisé sur des particules de magnétite, mais le matériau en lui-même importe peu puisque les particules sont recouvertes d'or.

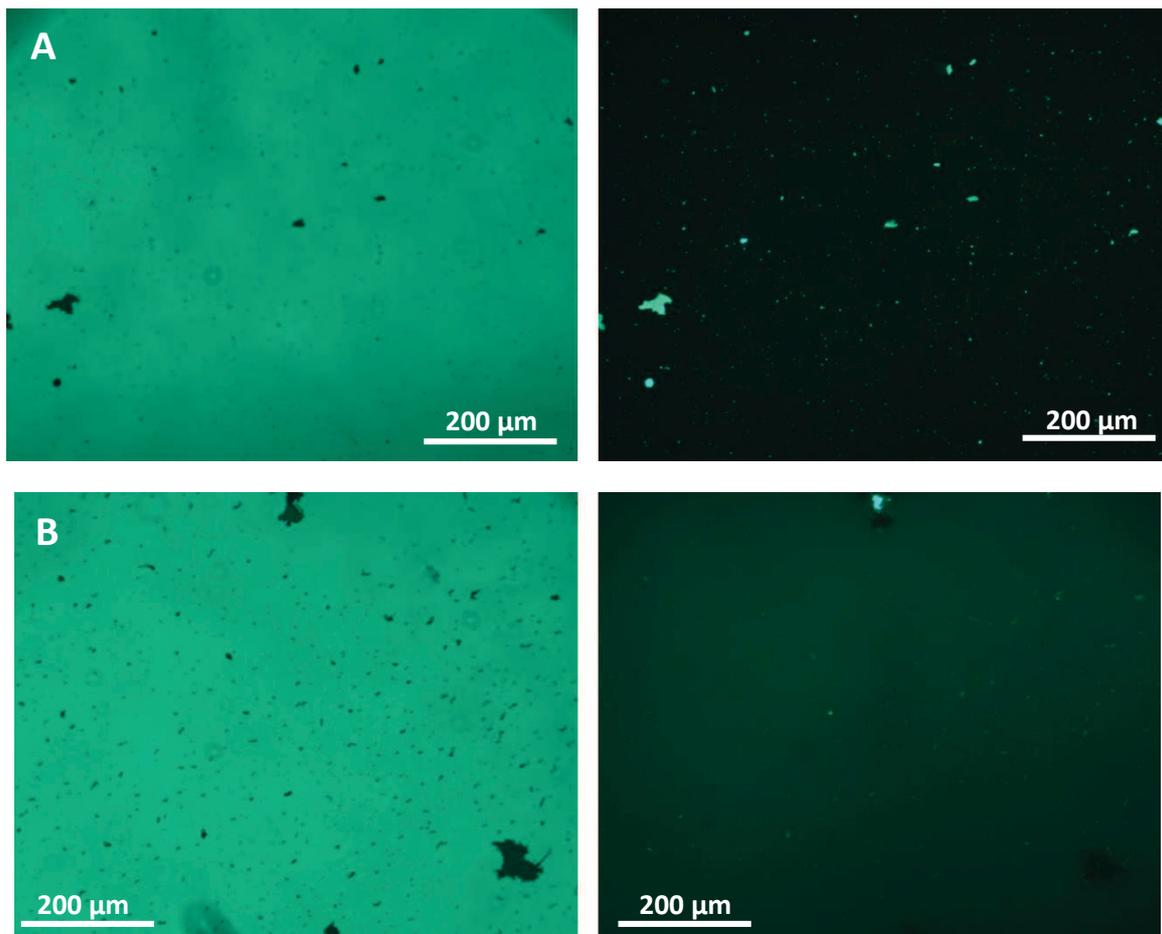


Figure 92. Images prises au microscope optique en transmission sur des particules A/ fonctionnalisées et B/ non fonctionnalisées (témoin), couplées au système biotine/streptavidine. Les images de gauche

correspondent aux images en lumière blanche, les images de droite sont les mêmes images prises en fluorescence.

La Figure 92 montre que la différence de contraste entre l'échantillon fonctionnalisé et l'échantillon témoin est très nette : le faible contraste observé sur l'échantillon témoin est dû à quelques fluorochromes résiduels non significatifs, tandis que l'échantillon fonctionnalisé présente une fluorescence nette localisée sur les particules, prouvant la localisation des anticorps à la surface des particules et donc l'efficacité de la modification de surface des particules en suspension jusqu'au greffage des anticorps.

5.2.2. Problématique de la perte des microparticules

Un des problèmes majeurs auquel nous avons fait face lors de cette biofonctionnalisation est la perte de la majorité des particules au fur et à mesure du protocole. En effet, lors de l'étape qui consiste à ajouter le PBS contenant EDC et NHS dans la suspension de microparticules thiolées, les particules s'accrochent aux parois du tube et ne sont plus récupérables. Afin d'empêcher cette accroche et de limiter la perte des particules, une idée mise en place a été de recouvrir préalablement les parois des tubes avec une solution de BSA (Bovine Serum Albumine, référence A7906, Sigma Aldrich), composée principalement de protéines qui vont créer une couche « antiadhésive » sur les parois du tube. L'efficacité de ce produit se vérifie visuellement instantanément en observant la couleur des tubes vides juste après leur utilisation, comme l'illustre la Figure 93:



Figure 93. Photo des tubes vides après la fonctionnalisation des microparticules. 1/ Les parois du tube ont été recouvertes de BSA pendant la fonctionnalisation. 3/ La fonctionnalisation a été faite sans BSA. 5/ Tube dans lequel les particules n'ont pas été fonctionnalisées, et dans lequel il n'y a donc pas eu de BSA.

Le tube n°1, dans lequel la BSA a été utilisée, présente des parois beaucoup moins grises que le tube n°3 dans lequel la fonctionnalisation a été faite sans ajout d'anti adhésif, prouvant que l'on récupère la majorité des particules lorsque l'on utilise la BSA. On peut également comparer l'état des parois du tube n°1 avec le tube n°5, dans lequel les particules n'ont pas été fonctionnalisées, donc dans lequel il n'y a pas de problème d'adhésion et dont on récupère toutes les particules.

Il a cependant été nécessaire de vérifier que l'ajout de ce produit n'altère pas la modification de surface des particules, ce qui pourrait se produire si les protéines contenues dans la BSA formaient une capsule autour des particules thiolées ou alors autour des particules fonctionnalisées avec EDC et NHS, et empêchaient ainsi l'accroche des anticorps. En effet, la BSA possède de nombreux groupements amines, tout comme les anticorps, et a donc *a priori* autant d'affinité pour les esters activés que les anticorps. Pour répondre à cette question, un test de fluorescence biotine / streptavidine identique à celui précédemment décrit a été réalisé, sur trois échantillons :

- un tube où les particules n'ont pas été fonctionnalisées et où la BSA n'a pas été utilisée ;

- un tube où les particules n'ont pas été fonctionnalisées mais où les parois du tube ont été recouvertes avec de la BSA ;
- un tube dont les parois ont également été recouvertes avec la BSA et où les particules ont été fonctionnalisées (thiols/EDC-NHS/anticorps).

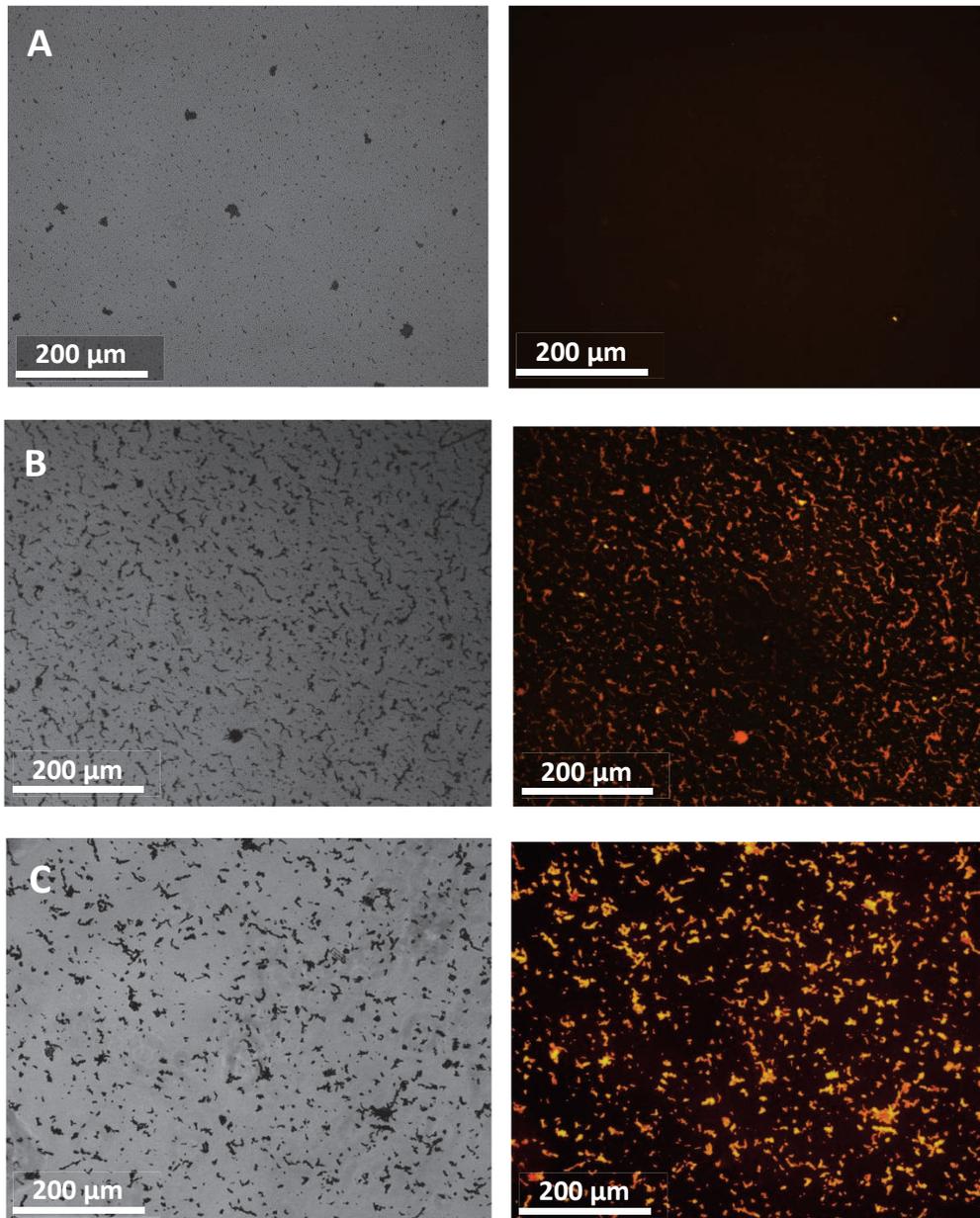


Figure 94. Images au microscope optique en transmission et en fluorescence de particules A/ non fonctionnalisées dont le tube n'a pas été recouvert de BSA, B/ non fonctionnalisées dont le tube a été recouvert de BSA et C/ fonctionnalisées dont le tube a été recouvert de BSA. Les trois conditions ont été couplées au système biotine/streptavidine et lavées plusieurs fois. Les images de gauche correspondent aux images en lumière blanche, les images de droite sont les mêmes images prises en fluorescence.

Plusieurs remarques sont à faire au vu des résultats imagés sur la Figure 94: tout d'abord, en comparant les intensités de fluorescence des particules non fonctionnalisées sans et avec BSA (Figure 94, A et B), il est clair que la BSA se greffe à la surface des particules : l'or est en effet une surface d'accroche d'un grand nombre de protéines et peut donc adsorber des protéines contenues dans la BSA, permettant l'ancrage de quelques molécules du système biotine/streptavidine *via* les liaisons

amines et donnant donc lieu à une certaine fluorescence, laquelle est bien localisée sur les particules. Ainsi, lorsque l'on fera référence aux particules non fonctionnalisées par la suite, il faudra avoir conscience qu'elles ont en réalité adsorbé quelques protéines de BSA.

L'autre résultat de ce test découle de la comparaison des intensités de fluorescence entre les particules non fonctionnalisées et fonctionnalisées, avec l'ajout de BSA dans les deux cas (Figure 94, B et C): l'intensité de fluorescence est beaucoup plus forte dans le cas où les particules sont fonctionnalisées que dans l'échantillon témoin, ce qui prouve que, bien que la BSA puisse se greffer en faible proportion sur les particules, cela n'empêche pas l'ancrage des anticorps à leur surface, dans la mesure où les molécules EDC et NHS ont été introduites bien en excès par rapport à la concentration des particules.

Nous pouvons donc poursuivre les tests en utilisant la BSA dans le procédé de fonctionnalisation, ce qui permet de limiter la perte des particules sur les parois des tubes sans altérer l'accroche des anticorps sur leur surface.

5.2.3. Maintien de la fonction de reconnaissance des anticorps

L'idée ici est de s'assurer qu'une fois les particules fonctionnalisées mises en suspension, les anticorps liés à leur surface conservent leur capacité de reconnaissance de l'antigène présent spécifiquement sur la membrane des cellules cancéreuses étudiées. On cherche donc à vérifier que les particules s'accrochent bien à la membrane des cellules une fois injectées dans le puits contenant le milieu de culture et les cellules adhérentes au fond du puits (voir la section 6.1 sur la culture cellulaire pour la description de la lignée cellulaire et les méthodes de culture). Cela requiert d'estimer et d'optimiser la durée nécessaire à la formation de la liaison anticorps/antigène. Nous avons tenu à inclure cette étape de vérification par rapport à la référence [97] dans la mesure où la durée donnée dans cette référence (45 minutes) ne nous a pas semblé suffisant, au cours de nos expériences, pour permettre le greffage des particules à la surface des cellules. En effet, après l'accroche des particules aux cellules, l'étape suivante est de soumettre le système {cellules + particules} à un champ magnétique alternatif, produit par un agitateur magnétique (voir paragraphe suivant). Or, au cours de cette étape, nous observons visuellement que de nombreuses particules, fonctionnalisées et censées être attachées à la membrane des cellules, se déplacent au contraire dans la solution sous l'action du gradient de champ magnétique, attirées le long des lignes de champ vers les champs les plus forts où elles s'agglomèrent, alors que les cellules restent fixées au fond des puits (voir le paragraphe suivant pour une cartographie magnétique de l'agitateur).

Nous avons donc dans un premier temps observé au microscope optique un puits dans lequel les particules ont été mises en contact avec les cellules, puis laissées sédimentées pendant 45 minutes. Avant l'observation, le milieu a été lavé deux fois au PBS afin d'éliminer la plupart des particules qui ne sont pas attachées à la membrane des cellules. La Figure 95 montre les images obtenues :

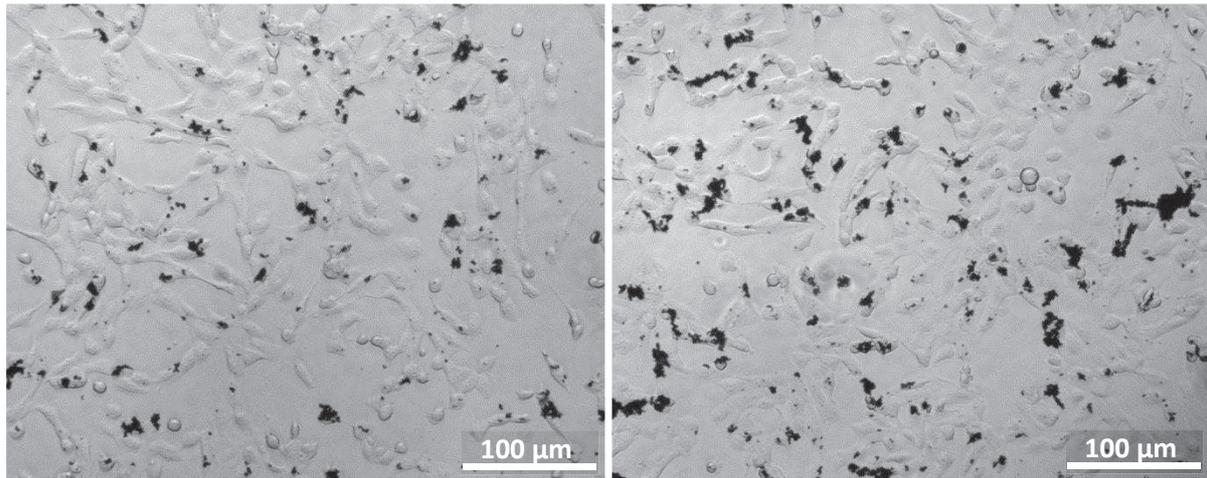


Figure 95. Images prises au microscope optique en transmission des particules mises en contact avec les cellules et laissées sédimentées pendant 45 minutes. L'excès de particules non attachées a été lavé deux fois au PBS.

Ces images ont été prises en périphérie du puits afin de voir si certaines particules ont « résisté » à l'attraction magnétique. Les amas noirs visibles sur la Figure 95 sont les particules agglomérées, quelques particules isolées sont visibles. Il semblerait donc que malgré la forte agglomération de la plupart des particules au centre du puits, un nombre suffisant de particules soient d'ores et déjà attachées à la membrane des cellules, même si elles ne sont pas réparties de façon parfaitement homogène sur les cellules, et que l'on pourrait donc se contenter d'un temps de sédimentation de 45 minutes.

Nous avons cependant tenu à vérifier que la liaison anticorps/antigène est un phénomène lent et qu'il est possible d'augmenter le nombre de particules attachées aux cellules en augmentant le temps de sédimentation. Le protocole adopté est le suivant : des particules de permalloy recouvertes d'or et fonctionnalisées ont été mises en contact avec les cellules en les injectant de façon homogène dans le puits contenant le tapis cellulaire. Elles sont laissées à sédimenter pendant 45 minutes, temps conseillé dans les travaux de S.Leulmi, puis le puits est mis au centre de l'agitateur magnétique. S'il y a une agglomération visible des particules au centre du puits, le puits est retiré de l'agitateur, les particules sont redispersées à la main et à nouveau laissées sédimentées pendant un certain temps, avant d'être replacé sur l'agitateur. Cette action est répétée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de déplacement visible des particules, ce qui signifierait que toutes les particules sont attachées aux cellules.

Résultats :

Au bout de 4h de sédimentation, on observe toujours le déplacement de nombreuses particules dans la solution, mais on voit également à l'œil que beaucoup d'autres restent attachées au fond du puits. Afin de déterminer s'il y a à ce stade un nombre suffisant de particules attachées aux cellules, deux lavages au PBS ont été réalisés afin d'enlever les particules non attachées, et la périphérie du puits est observée au microscope optique en transmission (Figure 96) :

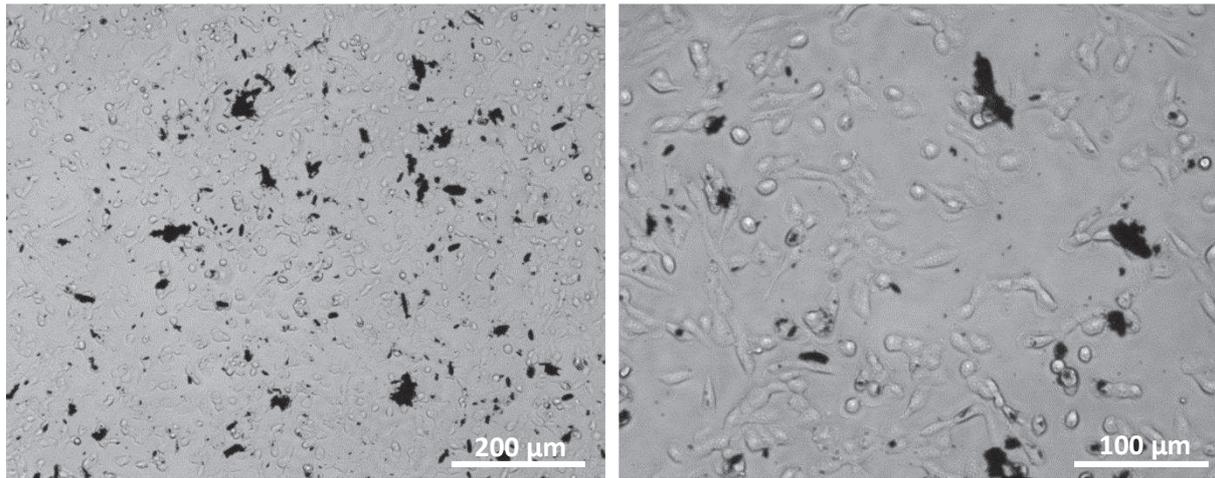


Figure 96. Images prises au microscope optique en transmission de particules mises en contact avec les cellules et laissées sédimentées pendant 4h. L'excès de particules non attachées a été lavé deux fois au PBS.

Il y a clairement un nombre conséquent de particules, mais la différence avec une sédimentation de 45 minutes n'est pas immédiatement visible. Il se peut qu'il y ait des effets de saturation expliquant cette observation. Il n'est donc apparemment pas nécessaire d'attendre 4h que la liaison antigène/anticorps se fasse, nous avons donc décidé de poursuivre les tests *in vitro* avec le temps préconisé dans les travaux de S.Leulmi de 45 minutes.

Conclusion : la fonctionnalisation de la surface des microparticules a été mise au point pour permettre le greffage des anticorps sur leur surface. Le protocole détaillé dans cette partie présente l'avantage d'être applicable à des particules composées de n'importe quel matériau, à condition que celui-ci soit recouvert d'or. De plus, ces couches d'or rendent les particules non toxiques. Les particules fonctionnalisées ont ainsi la capacité de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses présentant l'antigène correspondant, nous pouvons commencer les tests *in vitro* visant à traiter les cellules avec les particules et obtenir leur destruction.

6. Tests biologiques *in vitro*

Une fois les particules mises en suspension et fonctionnalisées, elles peuvent être mises en contact avec les cellules cancéreuses et ainsi se lier spécifiquement aux membranes cellulaires. Le traitement dont le but est la destruction des cellules cancéreuses peut alors être entrepris. Un champ magnétique de basse fréquence est appliqué, afin de provoquer les vibrations magnéto-mécaniques des particules et déclencher l'apoptose des cellules. Pour cette étude, le protocole mis au point dans la thèse de S.Leulmi avec les particules de permalloy [97] sera le point de départ de nos conditions expérimentales. On cherchera dans cette partie à comparer l'effet des particules de permalloy et celui des particules de magnétite sur le déclenchement de l'apoptose des cellules cancéreuses, sachant que les particules de magnétite présentent une susceptibilité magnétique environ deux fois moindre que celle des vortex de permalloy, et ne réagiront donc pas de la même façon au champ magnétique extérieur (voir sections 3 et 4).

6.1. Culture cellulaire

Les tests *in vitro* ont été réalisés à partir de la lignée cellulaire SKRC-59 provenant d'un carcinome rénal humain, un carcinome désignant un cancer des cellules épithéliales. C'est sur une lignée modifiée qu'ont été faites les premières expériences menées par S.Leulmi à SPINTEC, en collaboration avec le laboratoire de biologie SCIB. Cette dernière lignée, fournie par le Dr. X. Chauchet du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Grenoble, a été génétiquement modifiée afin d'assurer l'expression d'un antigène au niveau membranaire, l'anhydrase carbonique 9 (AC9 ou carbonic anhydrase CA9). Cet antigène, présent à la surface membranaire des cellules rénales, est naturellement surexprimé dans le cas de cancers, et représente une excellente cible dans le cas des traitements des cancers rénaux. La lignée traitée porte donc le nom SKRC-59 hCA9.

Ces tests *in vitro* ont nécessité la mise en culture des cellules, qui consiste à les faire pousser et les maintenir en vie en les approvisionnant en nutriments essentiels à leur croissance *via* un milieu de culture spécifique, et ce pendant toute la durée du test. Dans notre cas, on utilise du RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) Glutamin+ (Invitrogen), lequel est complété par du sérum de veau fœtal décomplémenté à 10% ainsi que par un mélange pénicilline / streptomycine afin d'éviter les infections bactériennes. Ce milieu contient des vitamines, des acides aminés ainsi qu'un tampon pour éviter les variations de pH (et dont l'indicateur est le rouge de phénol). Les cellules introduites dans ce milieu de culture dans des flasques de 75 cm² sont ensuite placées dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂. Elles peuvent alors adhérer au fond de la boîte et croître par divisions cellulaires. La croissance des cellules est surveillée tous les deux jours, et les cellules sont transférées dans une nouvelle flasque lorsqu'elles atteignent une confluence à environ 70-80% afin de diviser leur concentration et relancer la croissance. Pour ce faire, on réalise ce que l'on appelle une étape de trypsination ou « passage », qui consiste à décoller les cellules du fond de la flasque *via* une enzyme protéolytique appelée trypsine. Cette enzyme dégrade les protéines d'adhésion des cellules au support et entre elles au bout de quelques minutes. Puis son action est inhibée par l'ajout de milieu de culture. La suspension cellulaire peut ainsi être divisée et diluée dans une nouvelle flasque de 75 cm² ou alors dans tout autre contenant selon les besoins du test (plaques 6 puits, 96 puits, boîtes de Pétri...).

Cependant, on ne peut maintenir en vie des cellules indéfiniment, celles-ci perdent leur faculté de croissance naturellement au bout d'un certain nombre de passages, lequel dépend du type de cellules que l'on manipule. Dans notre cas, ce nombre est limité à environ une vingtaine de passages. Il est donc indispensable d'avoir à disposition une réserve de cellules exploitable, ce qui est rendu possible par la congélation de culots cellulaires dans de l'azote liquide à -180°C, qui peut se faire régulièrement au cours des passages.

6.2. Test de cytotoxicité

Avant d'utiliser les particules sur les cellules pour tenter de provoquer leur mort, il est nécessaire de s'assurer qu'elles ne présentent pas de toxicité intrinsèque au matériau qui altérerait la viabilité des cellules sans que cela ne soit voulu ni contrôlé. S'il y a toxicité liée au matériau magnétique, ce serait *a priori* dû à la tranche des particules qui ne sont pas recouvertes d'or (lequel est non toxique) pour des raisons inhérentes au procédé de fabrication (voir section 2).

La réponse des cellules à la présence des particules sera testée par un test de cytotoxicité classique, le test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium), qui est un test colorimétrique d'absorbance. En plus de mesurer l'état de viabilité des cellules, il donne également une information sur l'état de la fonction cellulaire mitochondriale, ce que n'apporte pas un test au bleu de trypan par exemple (voir la section **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). En effet, ce test permet de mesurer l'activité d'une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase, présente dans les cellules vivantes. Si cette enzyme est active, elle coupe le cycle du MTT, de couleur jaune initiale, en cristaux de formazan de couleur violette. Les cristaux sont ensuite dissous par l'ajout de DMSO (Diméthyl Sulfoxyde) dans la suspension cellulaire, puis une lecture de l'absorbance est réalisée à 568 nm. La couleur de la solution, et donc la valeur de l'absorbance, témoigne alors de l'activité des cellules dans la solution et l'intensité est proportionnelle au nombre de cellules vivantes : plus la solution est de couleur violette, plus la viabilité des cellules est importante, plus l'absorbance mesurée est importante.

Nous avons donc mis en contact des particules (non fonctionnalisées) de concentration croissante avec les cellules à confluence dans des plaques de 96 puits (la mesure sera faite sur 8 puits par condition afin d'obtenir une valeur moyenne), que nous avons alors laissées incuber pendant 24h. C'est donc la toxicité au bout de 24h qui est mesurée. Le MTT est ensuite ajouté, et le tout est remis à incuber pendant deux heures pour permettre la formation des cristaux. Le DMSO est ensuite ajouté pour dissoudre l'intégralité des cellules et des cristaux. Afin d'éviter que les nanoparticules n'altèrent la lecture de l'absorbance, le surnageant de chaque puits, contenant les cellules dissoutes, est transféré dans une nouvelle plaque après avoir pris soin que les particules aient sédimenté au fond des puits. La lecture de l'absorbance sur cette nouvelle plaque est alors réalisée. Le taux de mortalité des cellules est calculé comme suit :

$$\text{Taux de mortalité} = \frac{\text{Absorbance témoin} - \text{Absorbance}}{\text{Absorbance témoin}} * 100$$

L'absorbance témoin est l'absorbance moyenne des puits contenant uniquement des cellules. Le taux de mortalité de ces puits est alors ramené à 0 étant donné que l'effet toxique étudié est celui des particules uniquement, absentes du puits témoin. Ce test a été réalisé trois fois dans les mêmes

conditions, le graphe ci-dessous présente la moyenne de ces résultats avec les écarts-types correspondants.

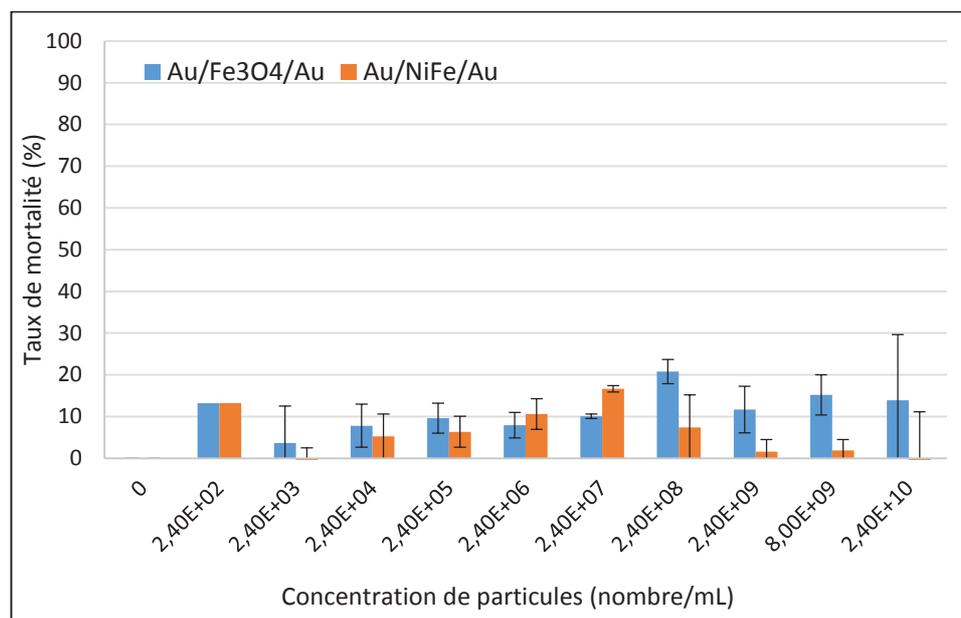


Figure 97. Résultats des tests MTT sur le taux de mortalité des cellules en fonction de la concentration de particules de permalloy ou de magnétite dans les puits.

Le premier résultat qui ressort de ces mesures est que quelle que soit la concentration des particules, le taux de mortalité des cellules ne dépasse jamais 20%, ce qui reste un taux de mortalité « normal ». En effet, à chaque passage des cellules, on enregistre une viabilité des cellules comprise entre 80 et 98%. Cela laisse penser que les particules ne présentent pas de toxicité pour les cellules. De plus, on confirme cette non-toxicité par des observations des puits au microscope optique après les 24h d'incubation (juste avant l'ajout du MTT), qui montrent que le tapis cellulaire est intact quelle que soit la concentration en particules, ce qui prouve que celles-ci n'ont aucun effet létal intrinsèque. En effet, si les cellules avaient subi un effet dommageable, elles se détacheraient du fond du puits et les débris cellulaires flotteraient dans la solution.

Cependant, on peut noter une dispersion élevée des résultats à forte concentration de particules, qui laisse supposer qu'il y a des interférences entre les particules et le test MTT en lui-même à fortes doses, ce qui viendrait fausser les mesures. Il faudrait *a priori* changer de test de cytotoxicité pour avoir une idée plus juste de l'effet des particules sur les cellules à forte concentration. Cependant, cela n'a pas pu être fait dans le cadre de cette étude. Le plus important pour nous a été de vérifier qu'aux concentrations que l'on utilise pour les tests *in vitro*, à savoir environ 8.10^9 particules/mL, les résultats sont fiables, et ni les particules de permalloy ni celles de magnétite ne sont intrinsèquement toxiques. Nous pouvons donc poursuivre les tests *in vitro* à cette concentration.

6.3. Description du protocole expérimental des tests *in vitro*

Les tests *in vitro* commencent par la mise en contact des particules avec les cellules en répartissant les particules de façon homogène dans les puits contenant les cellules adhérentes au fond de ceux-ci. Sauf si cela est mentionné autrement, les tests sont faits dans des puits faisant partie d'une plaque 6 puits de 1,6 cm de rayon et qui contiennent environ 1.10^6 cellules par puits lorsqu'elles sont à confluence.

Une fois les anticorps liés aux antigènes, c'est-à-dire les particules fonctionnalisées liées aux membranes cellulaires, la plaque 6 puits doit être soumise à un champ magnétique alternatif afin de faire vibrer les particules. Le système d'application du champ utilisé dans cette étude est un agitateur magnétique, qui présente l'avantage d'être un outil simple d'utilisation. Cet agitateur est composé de deux aimants tournants à une fréquence réglable, dont le maximum est de 25 Hz (1500 rpm). La cartographie du champ rayonné par les deux aimants tournants à l'intérieur de l'agitateur est présentée Figure 98 :

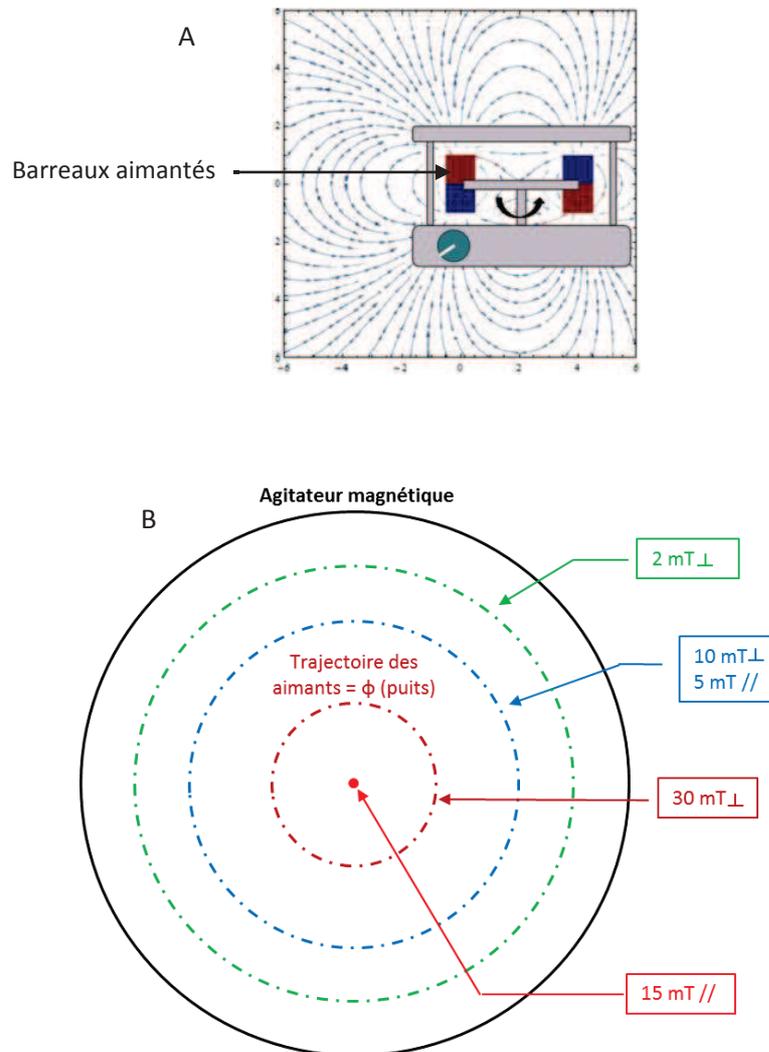


Figure 98. A/ cartographie du champ rayonné par les deux barreaux aimantés tournant à une fréquence f comprise entre 0 et 25 Hz et générant un champ perpendiculaire d'amplitude maximale 30 mT. B/ Schéma de principe de l'agitateur magnétique et des valeurs du champ parallèle (//) et perpendiculaire (\perp) au plan de l'agitateur en fonction de la position par rapport au centre. L'échelle est respectée.

Les valeurs du champ ont été mesurées à l'aide d'un gaussmètre. Ainsi, sur un cercle de rayon d'environ 1,5 cm qui correspond à la trajectoire des aimants, on peut considérer que le champ est vertical et alternatif d'amplitude 30 mT, même si en réalité les particules positionnées sur ce rayon vont plutôt ressentir des pulses de champ très courts. Cependant, la fermeture des lignes de champ montre qu'il y a également une forte composante horizontale du champ au centre de l'agitateur, d'amplitude constante 15 mT mais en rotation permanente lorsque l'agitateur est en fonctionnement, d'où l'agglomération des particules au centre de l'agitateur observée lorsque celles-ci ne sont pas

fonctionnalisées ou que la liaison anticorps/antigène n'a pas eu le temps de se faire. En effet, les puits d'une plaque 6 puits, dans lesquels sont réalisés la plupart des tests *in vitro*, font environ 1,6 cm de rayon et sont donc relativement gros par rapport à la surface de l'agitateur, notamment par rapport au rayon de la trajectoire des aimants : le champ ressenti par les cellules au sein d'un puits n'est donc pas homogène, peu importe où celui-ci est placé sur l'agitateur.

Ainsi, nous ne pouvons pas contrôler parfaitement la forme du champ ressenti par le système {particules + cellules}. Néanmoins nous pouvons les voir vibrer à l'œil nu lorsque ce champ est appliqué, ce qui suggère qu'elles sont capables de suivre les changements de direction du champ et qu'elles sont donc en mesure d'exercer une force sur la membrane des cellules. Même si cet outil n'est pas idéal, il permettra tout de même d'apprécier les effets d'un champ non statique sur la viabilité des cellules *via* une interaction magnéto-mécanique avec les particules.

Une fois les particules accrochées à la membrane des cellules, le puits centré sur la trajectoire des aimants est donc soumis au champ magnétique « alternatif » à 12,5 Hz pendant 45 minutes, fréquence et temps ayant été optimisés dans les travaux de S.Leulmi [97]. Ensuite, le système est mis à incuber pendant 6h. Encore une fois, cette durée est le fruit d'une optimisation précédemment réalisée sur les particules de permalloy. D'une manière générale, le temps nécessaire entre l'action et le déclenchement des premiers signes de l'apoptose dépend d'une manière assez fine de plusieurs paramètres, en particulier le mode de déclenchement de l'apoptose, la voie de ce déclenchement (intrinsèque ou extrinsèque, voir chapitre 1, section 3.2.3) ou encore la nature des cellules, et peut varier d'une demi-heure à plusieurs dizaines d'heures [244]. Il n'y a donc pas de règle préétablie sur la durée à laquelle nous devons nous attendre dans nos expériences, et cette durée devra peut-être être optimisée dans le cas du traitement avec les particules de magnétite. Les premières observations et analyses présentées dans ce manuscrit sont donc faites 6h après le traitement.

6.4. Résultats

6.4.1. Images au microscope optique

Les expériences menées dans cette étude tendent à démontrer que le traitement décrit précédemment appliqué aux cellules est capable de déclencher la mort cellulaire à plusieurs niveaux, c'est-à-dire que l'on peut soit engendrer leur mort par nécrose, soit tendre vers un déclenchement de la mort par apoptose, en fonction notamment de la concentration en particules. D'autres paramètres tels que l'amplitude du champ ou la fréquence seront à affiner pour obtenir de meilleurs résultats.

Démonstration de l'effet brut des particules sur les cellules :

La première expérience que nous avons menée tend à démontrer que l'on est capable de provoquer la mort des cellules de manière relativement simple et directe, en provoquant la vibration de particules en surnombre sur les cellules. Comme nous l'avons mentionné dans la section 5, un grand nombre de particules ne se greffent pas aux cellules lors de la sédimentation de 45 minutes destinée à favoriser la liaison anticorps/antigène. Ainsi, si l'on place le puits contenant le tapis cellulaire et les particules au centre de l'agitateur sans avoir lavé au préalable le milieu, la plupart des particules s'agglomèrent au centre du puits sous l'effet de la composante longitudinale du champ et vibrent à cet endroit. On peut alors penser que les cellules se trouvant au centre vont présenter un taux de mortalité plus élevé que les cellules situées en périphérie.

Le protocole adopté est le suivant : les cellules sont mises en culture dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre (recouvrant donc toute la surface de l'agitateur), puis des particules de permalloy recouvertes d'or et fonctionnalisées sont ajoutées et laissées sédimentées 45 minutes. La boîte de Pétri est ensuite placée sur l'agitateur, le champ magnétique est appliqué pendant 45 minutes, entraînant l'agglomération de la plupart des particules en son centre. Les cellules sont ensuite laissées incubées pendant 6h. A ce terme, deux lavages du milieu sont effectués au PBS afin d'éliminer toutes les particules non attachées et tous les débris cellulaires, et le puits est observé au microscope optique en transmission (Figure 99).

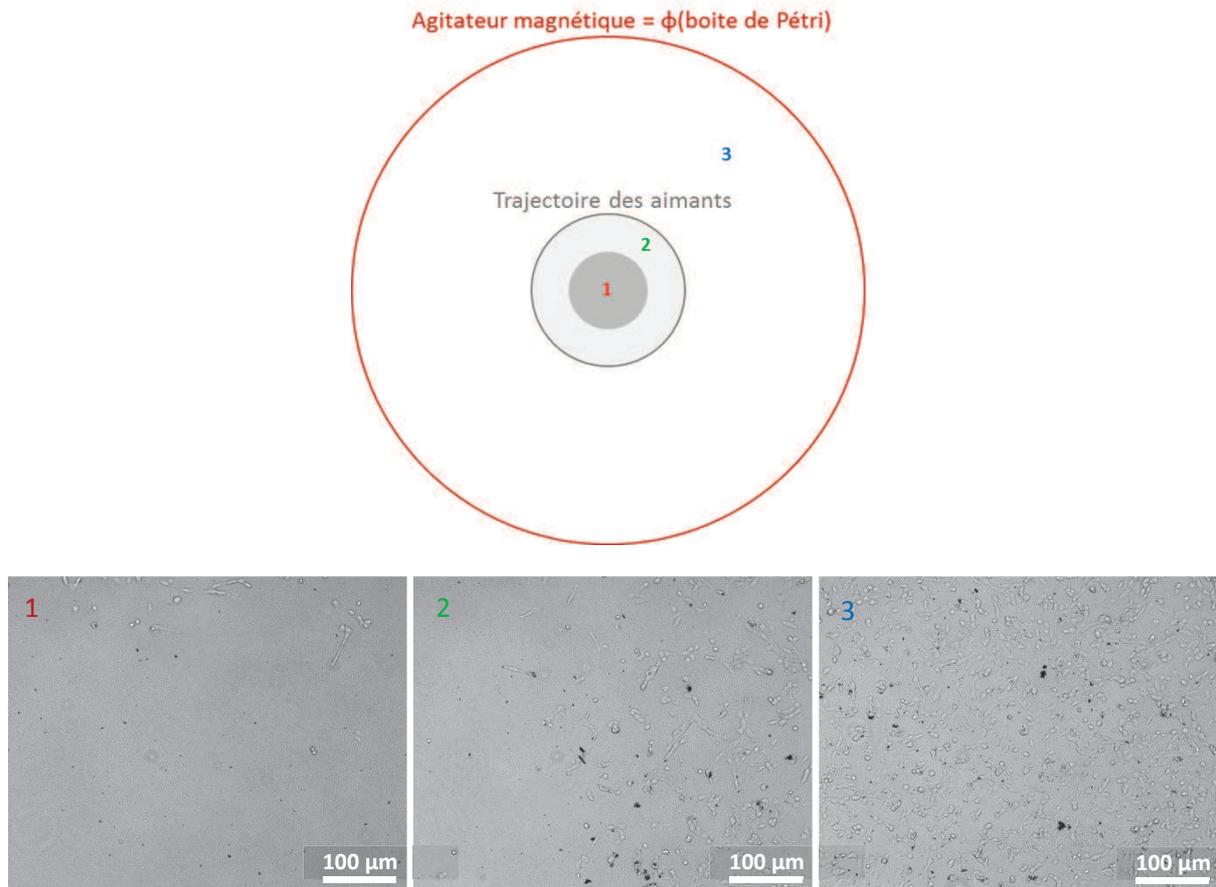


Figure 99. Images prises au microscope optique en transmission des cellules à trois positions différentes dans la boîte de Pétri, reportées sur le schéma de l'agitateur. Plus on s'éloigne du centre, plus la concentration en particules était faible au cours du traitement, plus la viabilité des cellules augmente.

D'après la Figure 99, il est clair qu'à l'endroit où la plupart des particules se sont concentrées (zone 1), aucune cellule n'a survécu, elles se sont toutes détachées du fond de la boîte. Plus on s'éloigne du centre, plus la concentration en particules diminue, et plus on observe sur les images au microscope que la viabilité des cellules semble augmenter. On voit sur l'image 2 apparaître une nette transition à l'endroit de la limite où les particules se sont agglomérées. On peut donc en déduire que l'effet de la forte concentration des particules combiné à l'effet de leur vibration provoque la mort des cellules. Cela prouve qu'il est possible, dans des conditions drastiques, de détruire les cellules cancéreuses.

A ces observations, on peut ajouter le fait qu'il est fort probable que les cellules se trouvant au centre de la boîte de Pétri, à l'endroit de l'accumulation des particules, ont subi une mort cellulaire par nécrose. Cela n'a pas été vérifié et on ne peut exclure totalement l'hypothèse selon laquelle les cellules

ont subi un phénomène d'apoptose, mais ce dernier est un phénomène relativement subtil et les particules ont vraisemblablement provoqué la rupture membranaire des cellules de façon brutale. Or, la mort par nécrose est une mort que l'on peut qualifier d'agressive, dans le sens où, à la suite de la rupture membranaire, le milieu intracellulaire est déversé dans le milieu extracellulaire, ce qui provoque des inflammations sur le milieu environnant chez un organisme vivant. Si l'on souhaite éviter ce phénomène, il est nécessaire d'adoucir le traitement afin de déclencher de façon certaine une mort cellulaire par apoptose. Cette mort programmée aboutit à la formation de corps apoptotiques qui seront phagocytés sans qu'il n'y ait de rupture membranaire, et n'a donc aucun effet nocif sur le milieu environnant. En ce sens, il est nécessaire de laver le milieu de toutes les particules qui ne sont pas attachées aux membranes des cellules au bout du temps de sédimentation avant de provoquer leur vibration magnétique, afin d'éviter ces effets d'agglomération et de destruction brutale des cellules.

Ainsi, on peut d'ores et déjà émettre l'hypothèse que les cellules se trouvant un peu à l'écart du centre de l'agitateur, où il y a en moyenne moins de particules par cellules, ont pu subir une mort par apoptose, comme démontré au préalable dans les travaux de Kim *et al.* [96] et S.Leulmi *et al.* [98] sur des particules de permalloy. Les expériences décrites dans les prochains paragraphes visent à reproduire les résultats de déclenchement de l'apoptose de cellules cancéreuses en remplaçant les particules de permalloy par des particules de magnétite.

Remarque : le test décrit dans ce paragraphe a été réalisé avec des particules de permalloy fonctionnalisées. Sans que cela n'ait été vérifié, on peut s'attendre avec de fortes présomptions à ce que l'effet des particules de magnétite soit identique, l'effet de la concentration jouant ici un rôle très important.

6.4.2. Test en fluorescence du déclenchement de l'apoptose : activation des caspases

Nous allons donc montrer qu'un traitement similaire à celui décrit dans le paragraphe précédent mais à plus faible concentration de particules peut déclencher la mort cellulaire par apoptose. Pour ce faire, nous allons détecter l'activation des caspases exécutrices 3 et 7, enzymes qui font partie des caspases exécutrices connues pour être à l'origine de la rupture du cytosquelette et donc de la mort cellulaire par apoptose. Leur activation est donc un phénomène hautement caractéristique du phénomène d'apoptose. Cet événement intervient juste avant ou en même temps que la formation des corps apoptotiques bulbeux dans le procédé d'apoptose.

Pour la détection, nous avons choisi un marqueur fluorescent du kit commercial CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent d'Invitrogen, hautement spécifique aux caspases 3 et 7. Ce système est composé de 4 peptides conjugués à un acide nucléique fluorescent. En présence de caspases 3 ou 7 activées, celles-ci viennent cliver les peptides du système et ainsi permettre l'accroche du système à l'ADN et l'émission de la fluorescence (Figure 100).

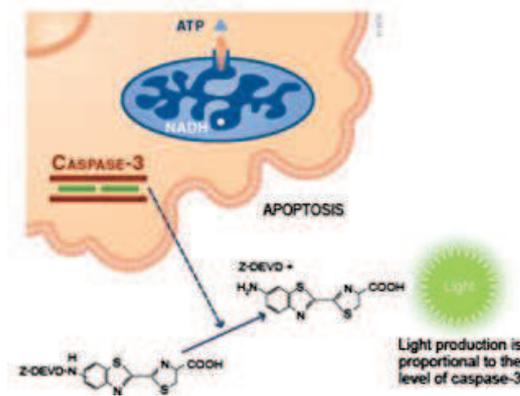
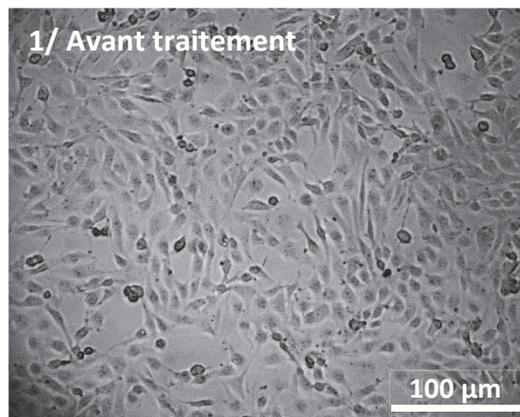


Figure 100. Schéma du fonctionnement du système de détection des caspases activées par le kit commercial choisi.

Le protocole est le suivant : la culture cellulaire est cette fois-ci réalisée dans des puits d'une plaque 6 puits, lesquels sont centrés sur la trajectoire des aimants sur l'agitateur magnétique lors du traitement magnétique. La solution du détecteur de caspases est ajoutée dans les puits contenant le tissu cellulaire avec les particules de magnétite (recouvertes d'or et fonctionnalisées), le tout après traitement et incubation pendant 6h. La réaction se fait pendant 30 minutes, puis on observe au microscope à fluorescence à une longueur d'onde de 530 nm.

Avant d'observer en fluorescence, on peut s'intéresser comme précédemment à l'état du tapis cellulaire après traitement, observable en microscopie optique, et que l'on peut comparer à l'état du tapis cellulaire avant le traitement. La Figure 101 montre les images correspondantes, dont les cellules ont été traitées avec des particules de magnétite fonctionnalisées :



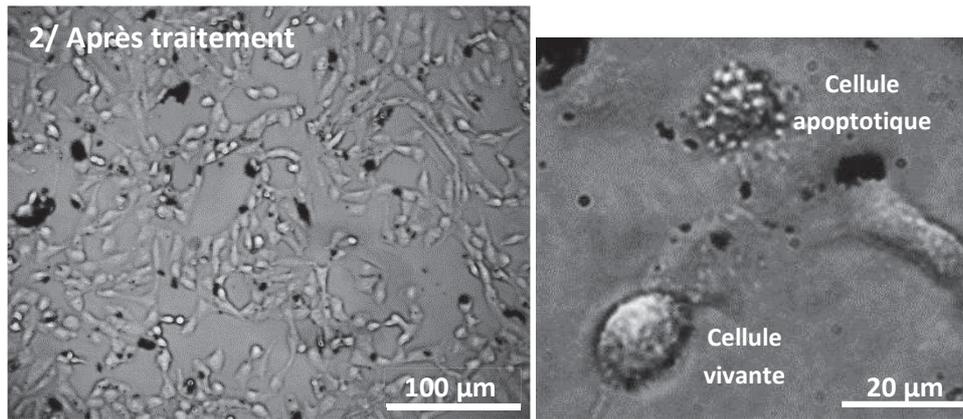
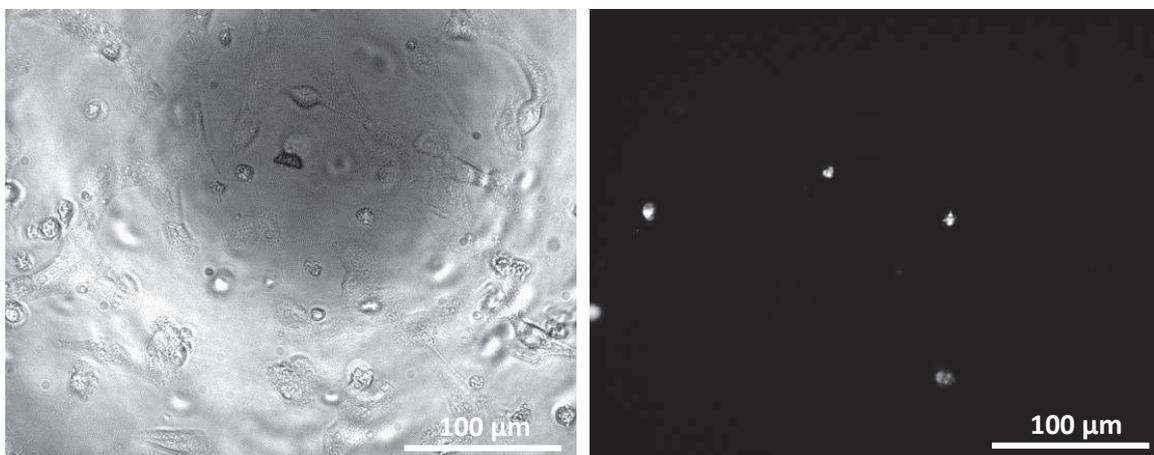


Figure 101. Images prises au microscope optique du tapis cellulaire 1/ avant et 2/ après le traitement avec des particules de magnétite fonctionnalisées. Quelques cellules apoptotiques sont reconnaissables.

Il est difficile de juger s'il y a une diminution de la qualité du tapis cellulaire après le traitement par rapport aux cellules avant traitement, puisqu'il semble en tout cas qu'il n'y ait pas une diminution très nette du nombre de cellules adhérentes. En revanche, un indicateur très positif quant au résultat que l'on cherche à obtenir est que l'on reconnaît la présence de quelques cellules apoptotiques par leur forme très particulière (Figure 101, image 2). En effet, on distingue parfaitement la déformation de la membrane et la formation de bulbes, phénomènes qui peuvent être rapprochés d'une des caractéristiques physiques principales ayant lieu dans une cellule apoptotique et qui sont principalement dus à la condensation de la chromatine. Ces phénomènes sont à l'origine de la formation de corps apoptotiques, lesquels finissent par se détacher de la cellule et sont phagocytés si le milieu le permet. Il nous a donc semblé pertinent d'effectuer ce test de fluorescence sur les cellules traitées avec les particules de magnétite dans ces conditions qui sont, rappelons-le, les conditions mises au point dans les travaux de thèse de S.Leulmi (45 minutes de sédimentation des particules, 45 minutes de vibrations magnétiques à 12,5 Hz et 6h d'incubation).

Résultats du test de fluorescence:

Nous présentons Figure 102 les images prises au microscope optique en transmission et les images correspondantes en fluorescence.



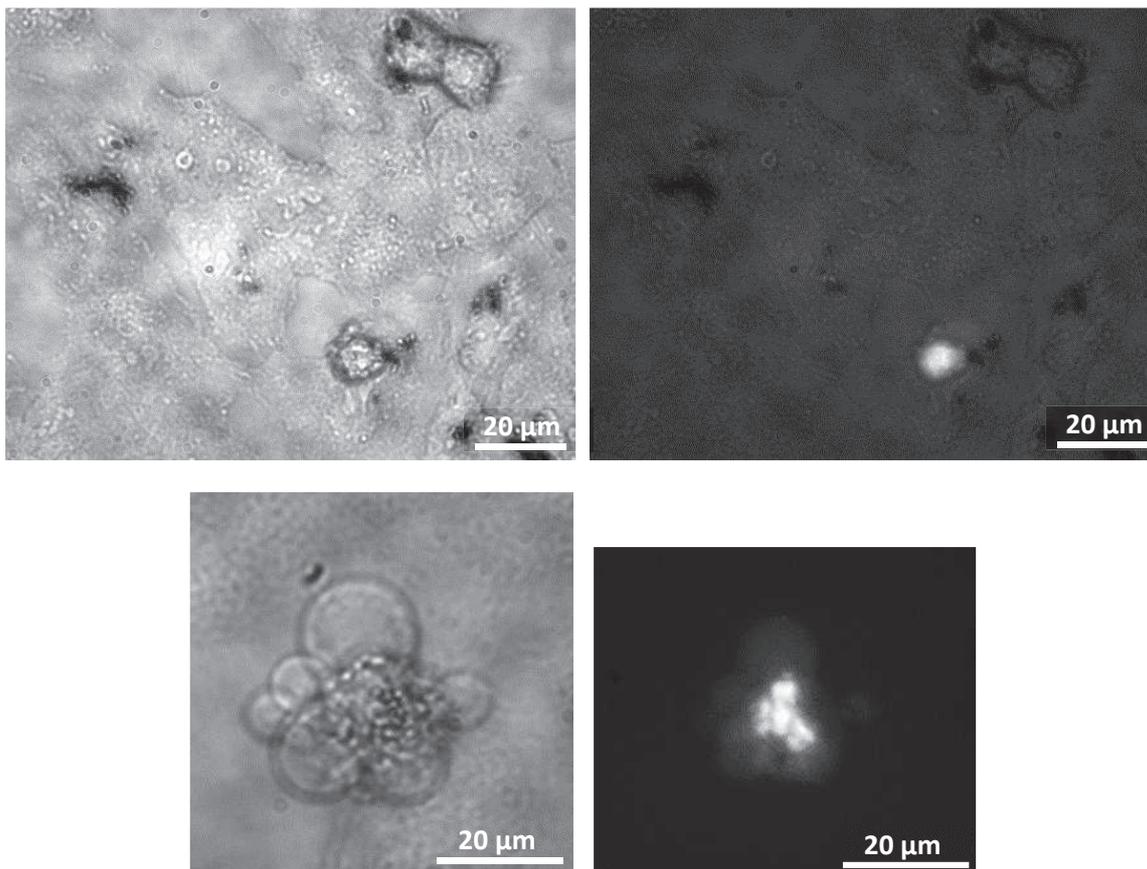


Figure 102. Images au microscope optique en transmission et en fluorescence de cellules traitées avec des particules de magnétite fonctionnalisées. La fluorescence est significative de cellules dont les caspases 3 et 7 sont activées, et qui sont donc en cours d'apoptose.

On détecte donc une fluorescence significative dans les puits où les cellules sont traitées avec les particules fonctionnalisées, qui peut être rapprochée d'un état « bulbeux » comme on peut le voir sur les images en transmission. Ces observations sont révélatrices de l'activité des caspases et vont donc dans le sens que le traitement a l'effet escompté sur les cellules. Cependant, ce test visuel ne permet pas de faire des analyses statistiques, il est difficile d'estimer si le nombre de cellules apoptotiques observé est vraiment significatif, de même qu'il est difficile d'estimer si ce nombre est plus important dans le puits où les particules sont fonctionnalisées que dans le puits témoin où les particules ne le sont pas. C'est pourquoi il est nécessaire de se tourner vers d'autres tests plus statistiques qui permettent le comptage et le tri des cellules en fonction de leur état de viabilité.

Avant de poursuivre vers ce type de tests, nous avons essayé à ce stade d'optimiser l'expérience en jouant dans un premier temps sur le paramètre le plus facile à modifier, à savoir la fréquence du champ magnétique appliqué, afin de voir si cela permet aux particules d'avoir un effet un peu plus agressif sur la membrane des cellules ainsi que d'homogénéiser leur effet sur le puits. Cependant, que ce soit sur les cellules traitées à 14 Hz (850 rpm) ou 25 Hz (1500 rpm), ni l'état du tapis cellulaire ni le test de détection de l'activation des caspases n'indiquent de façon claire une augmentation du taux d'apoptose chez les cellules. En réalité, le paramètre le plus pertinent à faire varier est l'amplitude du champ appliqué, puisque l'on a vu dans la section 4 que le couple exercé par ce champ sur les particules varie en fonction de son carré jusqu'à la saturation. Augmenter le champ extérieur aurait donc un réel impact sur le couple mécanique exercé par la particule sur la cellule. Cependant, l'agitateur

magnétique ne nous permet pas de faire varier ce paramètre. Nous poursuivons donc les tests dans les conditions optimisées précédemment pour les particules de permalloy.

6.4.3. Test de cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique qui présente plusieurs avantages : c'est d'abord une méthode quantitative qui permet de faire des analyses statistiques, puisque la suspension cellulaire est injectée dans l'appareil et focalisée dans une gaine très fine où les cellules passent à travers un faisceau laser les unes après les autres et sont donc analysées une par une (Figure 103). Selon les appareils de cytométrie, la quantité analysée est contrôlée de différentes manières : soit l'appareil fonctionne en fonction d'un volume de suspension cellulaire fixe, et dans ce cas le nombre de cellules analysées peut être différent d'une condition à l'autre, soit il fonctionne en fonction d'un nombre de cellules comptées, lequel est alors choisi par l'opérateur et doit être identique d'une condition à l'autre. L'appareil que nous utilisons exploite ce dernier mode de fonctionnement. Dans ce cas, il est communément admis que plus le nombre de cellules analysées est faible, plus l'expérience doit être reproduite de nombreuses fois dans les mêmes conditions afin de diminuer l'erreur statistique. Dans nos expériences, nous avons pris soin de comptabiliser entre 30 000 et 50 000 cellules pour chaque condition.

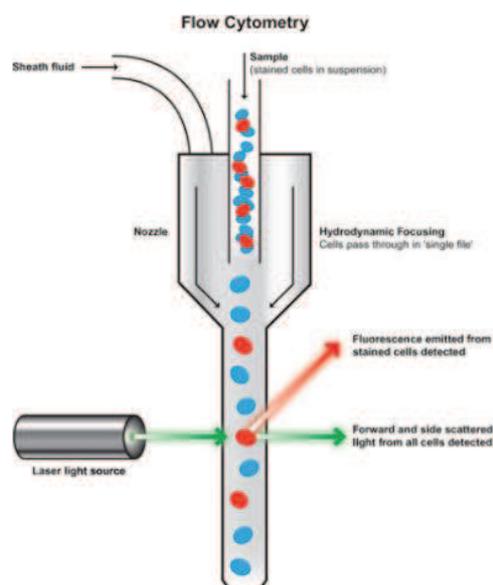
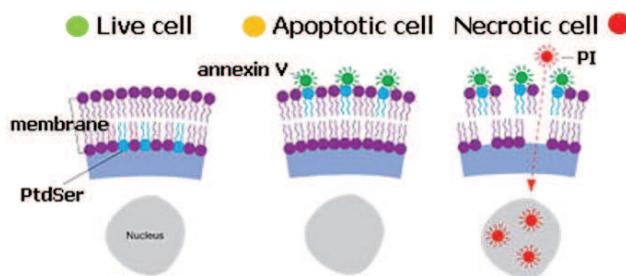


Figure 103. Schéma du principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux, dans lequel les cellules passent une par une à travers un faisceau laser, lequel permet l'analyse de signaux de fluorescence.

L'autre raison qui fait de la cytométrie une mesure incontournable dans le cas de cette étude est le fait que l'appareil permet de différencier la mort cellulaire entre une mort par apoptose et une mort par nécrose ou apoptose tardive. En effet, l'appareil fonctionne sur l'analyse et la différenciation de signaux optiques tels que la fluorescence, dont il est capable d'analyser l'intensité et le type à l'aide de plusieurs détecteurs. Or, l'un des premiers événements ayant lieu lors du déclenchement de l'apoptose est l'externalisation d'une protéine appelée la phosphatidylsérine, laquelle présente une forte affinité avec une protéine appelée annexine V (AV). Si cette annexine est couplée à un fluorochrome, elle peut donc être détectée comme un marqueur d'apoptose. De la même manière, la nécrose et l'apoptose tardive (qui correspond à un état où les corps apoptotiques ont suffisamment déformé la membrane de la cellule pour la rendre perméable) se caractérisent par une rupture

membranaire, ce qui permet au marqueur fluorescent IP (Iodure de Propidium) de pénétrer à l'intérieur de la cellule et de se fixer à l'ADN. Ainsi, l'utilisation simultanée des deux marqueurs fluorescents permet de distinguer entre des cellules en apoptose et des cellules en nécrose ou apoptose tardive (voir Figure 104.1). Dans le cytomètre, où les cellules sont traitées une par une, la fluorescence est détectée et reportée sur un graphe tel que celui de la Figure 104.2. Chaque point représente un événement, donc une cellule, et les différents cadrans représentent les différents états possibles d'une cellule : une faible intensité en IP et AV correspond à des cellules vivantes, une faible intensité d'IP conjuguée à une forte intensité en AV correspond à des cellules en apoptose, et une forte intensité d'IP et d'AV correspond à des cellules en apoptose tardive ou en nécrose.

1/



2/

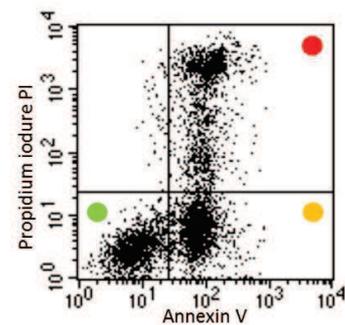


Figure 104. 1/ Schéma de principe de la différence d'intégrité membranaire selon l'état de viabilité de la cellule, qui permet à des marqueurs fluorescents de distinguer les cellules vivantes, en apoptose ou en nécrose. 2/ Exemple d'un graphe présentant la répartition des populations cellulaires par double marquage AV/IP, permettant de distinguer les cellules vivantes, apoptotiques et nécrotiques.

Ici, il est important de comprendre que la distinction entre les différentes populations cellulaires est faite par l'opérateur en plaçant les barres horizontale et verticale. Il y a différentes manières de procéder pour placer ces barres, dont la plus facile et intuitive est de les placer en estimant visuellement quelle intensité correspond à la séparation entre deux populations. Cette méthode se justifie dans le cas où les nuages de points sont bien distincts, mais n'est pas évidente dans le cas où il y a un chevauchement des populations cellulaires. Un très léger décalage peut alors avoir des conséquences non négligeables sur l'interprétation des résultats. Il est alors nécessaire de procéder à une technique plus précise qui consiste à extraire le profil d'intensité de fluorescence des deux fluorochromes. Celui-ci est composé de deux profils gaussiens qui se croisent, correspondant aux deux populations. Il est possible d'imposer au logiciel de placer les barres à l'intersection de ces courbes représentatives (Figure 105).

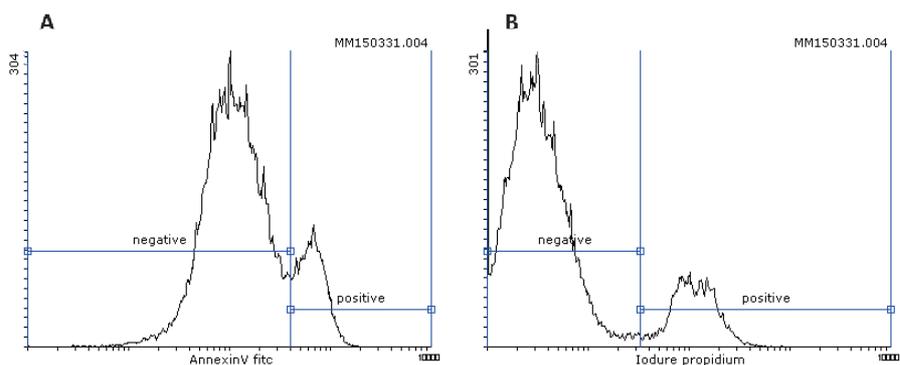


Figure 105. Exemple d'histogrammes de l'intensité de fluorescence de l'AV (A) et de l'IP (B) et le placement des barres qui en découle, réalisé sur une lignée SKRC-59 hCA9 traitée avec des particules de magnétite.

La position de ces barres est ensuite reportée sur les graphes de fluorescence.

Une autre donnée importante dans nos expériences et fournie par la cytométrie en flux est l'analyse de la morphologie de la cellule, donnée par deux paramètres : la taille, donnée en unité arbitraire, et la granularité, laquelle correspond à l'état de surface de la cellule : plus la membrane est granuleuse ou rugueuse, plus la granularité est élevée. Dans la phase initiale de l'apoptose, une cellule présente une taille moyenne réduite et une forte granularité par rapport à une cellule vivante, puisque sa membrane subit des distorsions et des contractions dues à la condensation de la chromatine. Ensuite, dans la phase tardive de l'apoptose de même que lors de la nécrose, la cellule présente une taille et une granularité réduites par rapport à une cellule vivante. Ces paramètres sont accessibles par l'analyse de la diffusion du faisceau laser dans son axe (FSC - Forward Scatter, en corrélation avec la taille) et perpendiculairement à son axe (SSC - Side Scatter, en corrélation avec la granularité). Les images D, E et F de la Figure 106 donnent un exemple de graphes de granularité en fonction de la taille, extraits de mesures sur des cellules traitées avec des particules de magnétite.

Ce test de cytométrie avait donné de très bons résultats sur les cellules traitées avec les particules de permalloy [97] [98], dans la mesure où le taux d'apoptose des cellules cancéreuses traitées avec les particules a augmenté de 25% par rapport aux cellules seules. C'est cet effet que nous cherchons à reproduire avec les particules de magnétite.

Protocole :

Nous avons choisi de travailler avec les fluorochromes du kit commercial Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor® 488 & Propidium Iodide de Life Technologies, lesquels sont ajoutés à la suspension cellulaire une fois le traitement d'agitation magnétique et le temps d'incubation terminés, selon le protocole détaillé en annexe1. Le graphe ci-dessous donne un exemple de résultat obtenu sur des cellules traitées avec des particules de magnétite fonctionnalisées sous un champ à 12.5 Hz, en comparaison avec des cellules seules ayant également subi le champ magnétique.

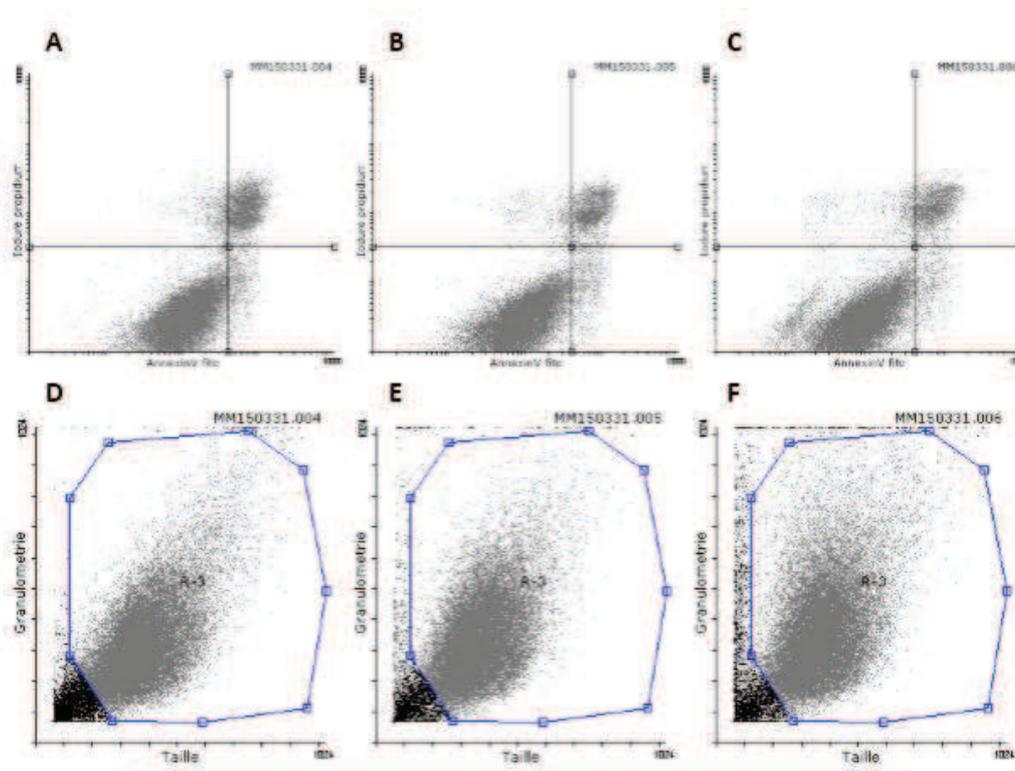


Figure 106. Résultats de cytométrie en flux pour des cellules seules (A & D), des cellules traitées avec des particules de magnétite non fonctionnalisées (B & E) et des cellules traitées avec des particules de magnétite fonctionnalisées (C & F).

Le Tableau 7 résume le nombre de cellules compris dans chaque cadran du graphe de cytométrie, en pourcentage par rapport au nombre de cellules comptabilisées, pour chaque condition :

	Cellules vivantes (en bas à gauche)	Cellules en apoptose (en bas à droite)	Cellule en nécrose ou apoptose tardive (en haut à droite)
Cellules seules	80,2	3,1	13,6
Cellules + particules non fonctionnalisées	85,7	3,3	9,1
Cellules + particules fonctionnalisées	86,2	2,7	8,4

Tableau 7. Résultat d'une mesure de cytométrie en flux : pourcentage des états de viabilité des cellules en fonction des conditions dans lesquelles elles ont été traitées.

Ainsi, si l'on s'intéresse à l'évolution du taux d'apoptose, il semble que l'on ne puisse pas conclure qu'il y ait l'effet escompté des particules fonctionnalisées sur cette expérience précise, puisqu'il n'y a pas d'évolution du taux d'apoptose entre les cellules seules et les cellules traitées avec les particules.

Cependant, comme mentionné plus haut, une autre donnée exploitable dans une expérience de cytométrie est l'évolution de la granularité et de la taille des cellules avec le traitement. Les graphes

de la Figure 106 semblent indiquer qu'il y a bel et bien une augmentation de la granularité des cellules lorsque celles-ci sont traitées avec les particules, puisque l'on voit le nuage de points s'étirer vers les granularités les plus élevées. Nous avons donc décidé d'exploiter cette donnée pour comparer l'effet des particules de permalloy et celles de magnétite dans les mêmes conditions. Afin d'être plus précis, nous avons extrait sur chaque expérience réalisée le barycentre de ces nuages de points à partir de la position de chaque élément compris dans la zone délimitée en bleue, laquelle est arbitraire et a pour but d'éliminer les plus petits éléments considérés comme des débris non significatifs. Le résultat de cette analyse est présenté Figure 107.

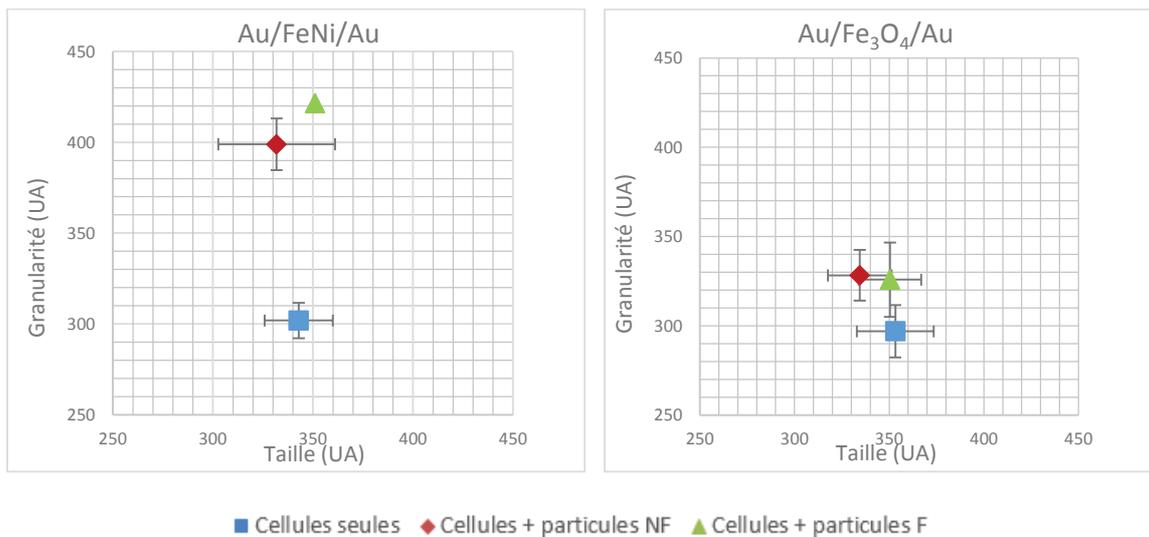


Figure 107. Evolution de la granularité des cellules traitées avec des particules de permalloy ou de magnétite dans les mêmes conditions.

Ainsi, l'évolution de la granularité chez les cellules traitées avec les particules de magnétite n'est que de 10% par rapport aux cellules seules, ce qui reste donc relativement faible, en comparaison avec l'évolution de cette granularité chez les cellules traitées avec les particules de permalloy, qui enregistrent une augmentation de 30% par rapport à la granularité des cellules seules. Bien que l'on ne puisse pas corréler directement cette augmentation de la granularité avec le fait que les particules soient en apoptose, cela reste tout de même un signe démonstratif d'un changement de morphologie des cellules : la granularité est en effet liée à la diffusion du faisceau laser par la cellule, qui est influencée par des changements d'indices optiques du milieu. Ces changements d'indice sont en lien avec des changements de densité, et signifient donc que la cellule est fragmentée ou plus rugueuse.

7. Conclusion générale du chapitre 3

Nous avons mis en évidence dans ce chapitre l'efficacité à plusieurs niveaux de microparticules de permalloy et de magnétite sur la destruction de cellules cancéreuses. Pour cela, il a été nécessaire de caractériser leur comportement magnétique, ce qui a permis de comparer la configuration en vortex des particules de permalloy avec la configuration multidomaine des particules de magnétite. Bien que très différentes sur le plan des propriétés magnétiques, ces deux types de particules sont exploitables pour l'application visée, d'une part car elles ne s'agglomèrent pas en suspension, et d'autre part car les couches d'or recouvrant les particules permettent une fonctionnalisation identique pour les deux types de particules.

En ce qui concerne les expériences *in vitro*, plusieurs points sont à retenir : tout d'abord, nous avons démontré qu'il y a bien un effet létal des particules sur les cellules lorsqu'on expose celles-ci à de très fortes concentrations de particules et que l'on applique un champ magnétique alternatif de faibles fréquence et amplitude (12,5 Hz et 30 mT). Nous sommes donc capables de provoquer la destruction de cellules cancéreuses par un traitement brutal, sachant que cette destruction passe dans ce cas vraisemblablement par une mort cellulaire par nécrose. Si l'on souhaite maintenant affiner le traitement pour réactiver l'apoptose de ces cellules cancéreuses, il est nécessaire de réduire cette concentration en particules. Cependant, les effets de mortalité mesurés au bleu de trypan ainsi que la détection de l'activation des caspases chez les cellules traitées avec des particules de magnétite ne sont que partiellement confirmés par les analyses en cytométrie en flux. De toute évidence, les paramètres de l'expérience sont encore à optimiser dans le cas d'un traitement avec les particules de magnétite, notamment l'amplitude du champ appliqué ainsi que son homogénéité, comme discuté plus haut. En effet, l'inhomogénéité du champ magnétique généré par l'agitateur magnétique implique une disparité des couples mécaniques ressentis par les particules, ce qui réduit l'efficacité globale du système.

Conclusion générale et perspectives

Nous nous sommes intéressés au cours de ces travaux de thèse à différents aspects de l'utilisation de nanoparticules magnétiques pour des applications biomédicales. Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur l'aspect fabrication et caractérisation de nanoparticules en développant un procédé de fabrication très peu exploité dans la littérature pour la fabrication de nanoparticules. L'utilisation des propriétés particulières d'un système de copolymère dibloc permet d'obtenir un réseau hexagonal compact de nanoparticules de 35 nm de diamètre sur n'importe quel substrat, à condition de neutraliser ce substrat par une couche de copolymère statistique. Ce procédé est versatile en ce qui concerne la nature des nanoparticules, dont le matériau constitutif est déposé par évaporation ou pulvérisation cathodique. Ainsi, les nanoparticules peuvent être rendues biocompatibles si l'on dépose un oxyde de fer tel que la magnétite. Le réel avantage d'un tel procédé, outre sa simplicité de mise en œuvre, est la dispersion en taille très étroite des nanoparticules obtenues, celle-ci n'excédant pas 7%. Elles sont donc *a priori* de bonnes candidates pour être exploitées en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie médicale, domaine dans lequel une dispersion en taille des agents de contraste engendre du bruit sur la mesure et donc amoindrit la qualité de l'image. Les caractérisations géométriques et magnétiques ont cependant montré que le procédé de fabrication nécessite encore des améliorations, notamment afin d'éviter la gravure de la couche magnétique lors de la gravure de la matrice de PS. En effet, bien que les nanoparticules présentent un comportement superparamagnétique très intéressant pour des applications biomédicales, leur moment magnétique s'en trouve fortement réduit par rapport à ce que l'on pourrait obtenir pour des particules de ces dimensions. Cependant, la flexibilité des propriétés du copolymère dibloc PS-PMMA laisse penser qu'il sera relativement facile de modifier les étapes critiques. Nous avons tout de même démontré qu'il est possible de libérer ces particules en suspension grâce à la couche sacrificielle de germanium, laquelle est soluble dans l'eau oxygénée. Des tests préliminaires ont enfin démontré qu'une fois la suspension nettoyée de tous résidus, la fonctionnalisation des nanoparticules sera rendue possible par la présence des couches d'or entourant le matériau magnétique.

Avant d'aller encore plus avant, il sera indispensable d'améliorer le moment magnétique des particules en améliorant les procédés de gravure. Des pistes qui vont dans ce sens ont été données dans le chapitre 2, section 3.3. Par la suite, dans l'optique de les utiliser en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie médicale, leurs performances en RMN devront être mesurées, à savoir leurs temps de relaxation T_1 et T_2 afin de déterminer leur relaxivité et donc leur effet sur les protons de l'eau. Les particules étant de forme anisotrope, il sera intéressant de comparer ces temps de relaxation à des particules commerciales sphériques de même volume.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à un mode de réactivation de l'apoptose chez les cellules cancéreuses : l'idée, reprise de la thèse de S.Leulmi effectuée à SPINTEC, est de provoquer la vibration de microparticules magnétiques attachées à la membrane des cellules cancéreuses *via* l'application d'un champ magnétique alternatif. Ces vibrations transmettent un stress à la membrane, ce qui déclenche des réactions chimiques en cascade jusqu'à l'activation des caspases responsables de la mort cellulaire par apoptose. Dans l'objectif de rendre cette expérience envisageable à un niveau clinique, des microparticules de magnétite ont été fabriquées par approche top-down et comparées

avec les particules de permalloy utilisées dans les précédents travaux. Il a été démontré que leur configuration magnétique diffère de façon radicale avec les particules de permalloy, puisqu'elles ne sont pas en configuration vortex mais sont composées de domaines magnétiques séparés par des parois antiphases. Cette structure magnétique leur confère une certaine rémanence, qui n'est cependant pas assez forte pour provoquer leur agglomération en suspension : elles sont donc bien dispersées, et plus important se redispersent après l'application et la suppression d'un champ magnétique. Elles sont donc exploitables pour des applications biomédicales et ont été testées dans l'expérience de greffage sur les cellules cancéreuses *via* une modification de surface destinée à ancrer des anticorps spécifiques sur leur surface. Une fois cette fonctionnalisation réalisée et dont l'efficacité a été vérifiée, les particules sont greffées à la membrane des cellules cancéreuses et le champ magnétique alternatif est appliqué. Selon les conditions, principalement en fonction de la concentration en particules ou de la fréquence du champ (entre 10 et 20 Hz), nous avons montré qu'il est possible de provoquer la mort des cellules à plusieurs niveaux : dans des conditions « drastiques », c'est-à-dire à fortes concentrations de particules, on peut déclencher la mort des cellules par nécrose. A plus faibles concentrations, les premiers tests montrent des signes de déclenchement de l'apoptose, même si l'effet statistique est encore à démontrer avec les particules de magnétite, pour lesquelles le montage expérimental est à améliorer. Il est notamment crucial de pouvoir augmenter l'amplitude et l'homogénéité du champ appliqué, ce qui n'est pas possible avec le montage actuel. C'est pourquoi un autre système est en cours de fabrication à SPINTEC (réalisé par Eric Billiet), qui permettra d'atteindre un champ homogène de 1 T. Il s'agit d'un cylindre de Halbach motorisé ou cylindre magique, constitué de l'assemblage judicieux de plusieurs aimants permanents de NdFeB dont l'aimantation est orientée dans chacun d'eux et tourne de $\frac{\pi}{2}$ entre deux aimants consécutifs (voir Figure 108) [245].

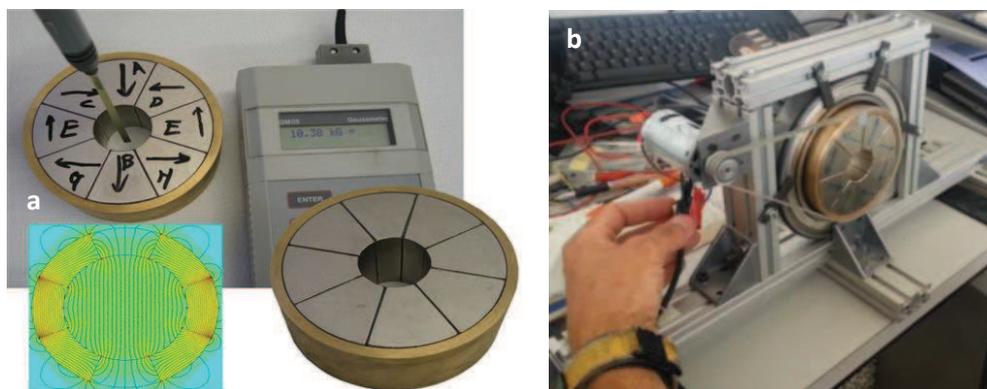


Figure 108. a/ Photo du cylindre magique commercial acheté à SPINTEC, dont le champ mesuré au centre est homogène et d'amplitude 1 T. b/ Photo du montage réalisé à SPINTEC permettant au cylindre de tourner autour de son axe et de créer ainsi un champ tournant.

L'espace au centre est suffisant pour y insérer des plaques LabTek pour des tests *in vitro*, ainsi qu'un tube falcon dans lequel il est possible d'insérer une souris de laboratoire pour des tests *in vivo*, lesquels sont prévus au cours des travaux de thèse qui ont débuté en octobre 2015 en collaboration avec Clinatéc.

Cependant, avant de procéder à des tests *in vivo*, il sera nécessaire de caractériser au mieux l'interaction particule/cellule qui a lieu lors de la mise en contact des particules avec les cellules. En effet, plusieurs phénomènes peuvent se passer lorsqu'un corps étranger entre en contact avec une cellule, qui dépendent de l'état de surface du corps étranger, du type de cellule, des conditions de mise

en contact, etc. Cette interaction est complexe car caractérisée par de nombreuses forces de différentes origines : forces hydrodynamiques, électrodynamiques, électrostatiques, interactions stériques, interactions dues au solvant, au polymère recouvrant la particule, etc [246]. Dans certaines conditions, le corps étranger peut être internalisé par la cellule, là aussi de plusieurs façons.

Ainsi, au cours d'une expérience préliminaire, nous avons cherché à savoir si les particules pouvaient être internalisées par les cellules, et ce en fonction de leur état de surface, à savoir si elles sont fonctionnalisées ou non. Une seule expérience a été réalisée, dans laquelle les particules de magnétite recouvertes d'or et fonctionnalisées ou non ont été mises en contact avec les cellules, lesquelles ont alors été mises à incuber pendant 24h. Après ce délai, un fixateur est ajouté aux cellules afin de figer le système en l'état, puis les cellules sont préparées pour des observations au TEM (Transmission Electron Microscopy) selon le protocole détaillé en annexe2.

Comme on peut le voir sur les images TEM (Figure 109), quelle que soit la condition observée, les particules sont systématiquement internalisées. Cela prouve qu'en 24h, les cellules ont poussé et ont donc absorbé tout ce qui se trouvait sur leur chemin.

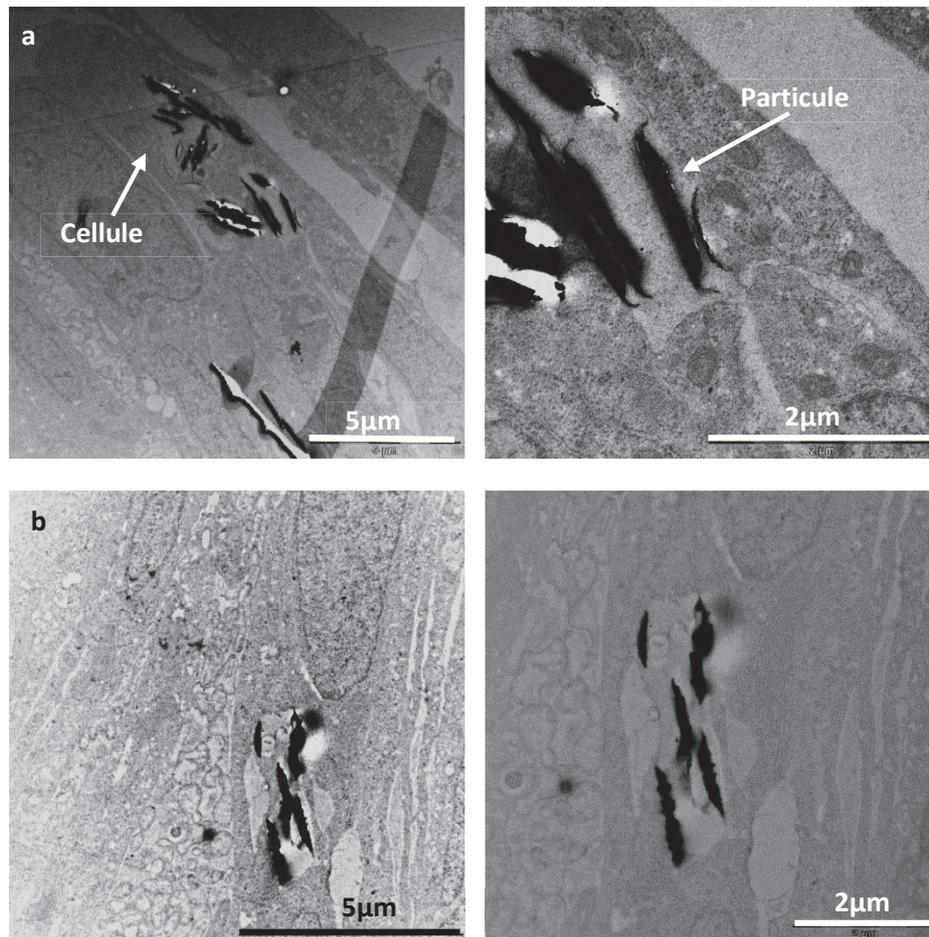


Figure 109. Images TEM de disques de magnétite recouverts d'or a/ fonctionnalisés et b/ non fonctionnalisés, internalisés par les cellules cancéreuses.

L'idée qu'il y a derrière ces premières observations serait de modifier le protocole expérimental de déclenchement de l'apoptose des cellules cancéreuses en ne fonctionnalisant plus les particules, mais en les faisant internaliser par les cellules afin de n'appliquer le champ magnétique qu'une fois les

particules à l'intérieur des cellules. On imagine qu'alors les vibrations des particules à l'intérieur de la cellule causeraient des dommages sur le milieu intracellulaire, lesquels pourraient avoir un effet comparable au stress exercé par la particule sur la membrane d'une cellule. Cette idée trouverait son intérêt dans des expériences *in vivo*, où les particules seraient directement injectées dans la tumeur. Dans ce cas, la problématique de ciblage et de fonctionnalisation spécifique perdrait son sens. Cela permettrait de s'affranchir de l'étape de la fonctionnalisation, coûteuse en temps et délicate.

En résumé, un nombre impressionnant d'études sur l'exploitation de nanoparticules dans le vaste domaine du biomédical est en cours à ce jour. L'immense panel des propriétés accessibles pousse ces nanoparticules sur le devant de la scène pour des applications incroyablement variées, et en fait des outils sans aucun doute incontournables pour la médecine du futur.

Bibliographie

- [1] U.Häfeli, *Magnetism in Medicine: A Handbook*, Berlin: Wiley-VCH, 1998, p. 15.
- [2] P.C.Lauterbur, «Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance,» *Nature*, vol. 242, pp. 190-191, 1973.
- [3] A.N.Garroway. Brevet US Patent 4021726, 1977.
- [4] R.Damadian, M.Goldsmith et L.Minkoff, «NMR in cancer: XVI. FONAR image of the live human body,» *Physiol Chem Phys*, vol. 9, n°11, pp. 97-100, 1977.
- [5] A.Detappe, S.Kunjachan, J.Rottmann, J.Robar, P.Tsiamas, H.Korideck, O.Tillement et R.Berbeco, «AGuIX nanoparticles as a promising platform for image-guided radiation therapy,» *Cancer Nano*, vol. 6, n°4, 2015.
- [6] L.Sancey, F.Lux, S.Kotb, S.Roux, S.Dufort, A.Bianchi, Y.Crémillieux, P.Fries, J.-L.Coll, C.Rodriguez-Lafrasse, M.Janier, M.Dutreix, M.Barberi-Heyob, F.Boschetti, F.Denat, C.Louis, E.Porcel, S.Lacombe, G.LeDuc, E.Deutsch, J.-L.Perfettini, A.Detappe, C.Verry, R.Berbeco, K.T.Butterworth, J.McMahon, K.M.Prise, P.Perriat et O.Tillement, «The use of theranostic gadolinium-based nanoprobcs to improve radiotherapy efficacy,» *Br J Radiol*, vol. 87, 2014.
- [7] Z.Wu, «RBC micromotors carrying multiple cargos towards potential theranostic applications,» *Nanoscale*, vol. 7, p. 13680, 2015.
- [8] L.Chen, H.Li, H.He, H.Wu et Y.Jin, «Smart Plasmonic Glucose Nanosensors as Generic Theranostic Agents for Targeting-Free Cancer Cell Screening and Killing,» *Anal. Chem.*, vol. 87, p. 6868–6874, 2015.
- [9] A.Fernandez-Fernandez, R.Manchanda et A.J.McGoron, «Theranostic applications of nanomaterials in cancer: Drug delivery, image-guided therapy and multifunctional platforms,» *Appl Biochem Biotechnol.*, vol. 165, n°17-8, pp. 1628-1651, 2011.
- [10] W.Wu, «Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies,» *Nanoscale Res Lett*, vol. 3, 2008.
- [11] L.H.Reddy, J.L.Arias, J.Nicolas et P.Couvreur, «Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications,» *Chem. Rev.*, vol. 112, 2012.
- [12] P.Tartaj, M. del Puerto Morales, S.Veintemillas-Verdaguer, T.Gonzalez-Carreno et C.J.Serna, «The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine,» *J. Phys. D: Appl. Phys.*, vol. 36, 2003.

- [13] D.Ling et T.Hyeon, «Chemical Design of Biocompatible Iron Oxide Nanoparticles for Medical Applications,» *Small*, vol. 9, n°19-10, 2013.
- [14] T.Hyeon, «Chemical synthesis of magnetic nanoparticles,» *Chem. Commun.*, pp. 927-934, 2003.
- [15] A.K.Gupta et M.Gupta, «Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications,» *Biomaterials*, vol. 26, 2005.
- [16] V.K.Lamer et R.H.Dinegar, «Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols,» *J Am Chem Soc*, vol. 72, 1950.
- [17] J.P.Jolivet, P.Belleville, E.Tronc et J.Livage, «Influence of the Fe(II) on the formation of the spinel iron oxide in alkaline medium,» *Clays and Clay Minerals*, vol. 40, n°15, 1992.
- [18] E.Tronc, P.Belleville, J.-P.Jolivet et J.Livage, «Transformation of Ferric Hydroxide into Spinel by Fe1 Adsorption,» *Langmuir*, vol. 8, 1992.
- [19] J.P.Jolivet, C.Chaneac et E.Tronc, «Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks,» *Chem. Commun.*, vol. 5, 2004.
- [20] J.P.Jolivet, E.Tronc et C.Chanéac, «Synthesis of iron oxide-based magnetic nanomaterials and composites,» *C. R. Chimie*, vol. 5, 2002.
- [21] J.P.Jolivet, L.Vayssieres, C.Chaneac et E.Tronc, «Precipitation of Spinel Iron Oxide : Nanoparticle Size Control,» *Res. Symp. Proc.*, vol. 432, 1997.
- [22] Q.Chen, A.Rondinone, B.C.Chakoumakos et Z.J.Zhang, «Synthesis of superparamagnetic MgFe₂O₄ nanoparticles by coprecipitation,» *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 194, 1999.
- [23] L.Han, «Comparison of magnetite nanocrystal formed by biomineralization and chemosynthesis,» *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 313, 2007.
- [24] L.Shen, Y.Qiao, Y.Guon, S.Meng, G.Yang, M.Wu et J.Zhao, «Facile coprecipitation synthesis of shape-controlled magnetite nanoparticles,» *Ceramics International*, vol. 40, 2014.
- [25] Z.Li, B.Tan, M.Allix, A.I.Cooper et M.J.Rosseinsky, «Direct Coprecipitation Route to Monodisperse Dual-Functionalized Magnetic Iron Oxide Nanocrystals Without Size Selection,» *Small*, vol. 4, n°12, 2008.
- [26] S.-J.Lee, J.-R.Jeong, S.-C.Shin, J.-C.Kim et J.-D.Kim, «Synthesis and characterization of superparamagnetic maghemite nanoparticles prepared by coprecipitation technique,» *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 282, 2004.
- [27] L.Vayssières, C.Chanéac, E.Tronc et J.P.Jolivet, «Size Tailoring of Magnetite Particles Formed by Aqueous Precipitation: An Example of Thermodynamic Stability of Nanometric Oxide Particles,» *J Colloid Interface Sci*, vol. 205, 1998.

- [28] S.Sun, «Monodisperse MFe₂O₄ (M = Fe, Co, Mn) Nanoparticles,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, 2004.
- [29] F.X.Redl, C.T.Black, G.C.Papaefthymiou, R.L.Sandstrom, M.Yin, H.Zeng, C.B.Murray et S.P.O'Brien, «Magnetic, Electronic, and Structural Characterization of Nonstoichiometric Iron Oxides at the Nanoscale,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, 2004.
- [30] W.W.Yu, J.C.Falkner, C.T.Yavuz et V.L.Colvin, «Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts,» *Chem. Commun.*, pp. 2306-2307, 2004.
- [31] S.Navaladian, B.Viswanathan, R.P.Viswanath et T.K.Varadarajan, «Thermal decomposition as route for silver nanoparticles,» *Nanoscale Res Lett.*, vol. 2, 2007.
- [32] K.Simeonidis, S.Mourdikoudis, M.Moulla, I.Tsiaoussis, C.Martinez-Boubeta, M.Angelakeris, C.Dendrinou-Samara et O.Kalogirou, «Controlled synthesis and phase characterization of Fe-based nanoparticles obtained by thermal decomposition,» *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 316, 2007.
- [33] M.Stefanescu, O.Stefanescu, M.Stoia et C.Lazau, «Thermal decomposition of some metal-organic precursors Fe₂O₃ nanoparticles,» *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 88, 2007.
- [34] D.Maity, S.-G.Choo, J.Yi, J.Ding et J.M.Xue, «Synthesis of magnetite nanoparticles via a solvent-free thermal decomposition route,» *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 321, pp. 1256-1259, 2009.
- [35] D.Maity, S.N.Kale, R.Kaul-Ghanekar, J.M.Xue et J.Ding, «Studies of magnetite nanoparticles synthesized by thermal decomposition of iron (III) acetylacetonate in tri(ethylene glycol),» *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 321, 2009.
- [36] J.Park, K.An, Y.Hwang, J.-G.Park, H.-J.Noh, J.-Y.Kim, J.-H.Park, N.-M.Hwang et T.Hyeon, «Ultra-large-scale synthesis of monodisperse nanocrystals,» *Nature Materials*, vol. 3, 2004.
- [37] V.Chhabra, V.Pillai, B.K.Mishra, A.Morrone et D.O.Shah, «Synthesis, Characterization, and Properties of Microemulsion-Mediated Nanophase TiO₂ Particles,» *Langmuir*, vol. 11, 1995.
- [38] F.J.Arriagada et K.Osseo-Asare, «Synthesis of Nanosize Silica in a Nonionic Water-in-Oil Microemulsion: Effects of the Water/Surfactant Molar Ratio and Ammonia Concentration,» *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 211, 1999.
- [39] X.Zhang, «Water-in-Oil Microemulsion Synthesis of Platinum-Ruthenium Nanoparticles, Their Characterization and Electrocatalytic Properties,» *Chem. Mater.*, vol. 15, 2003.
- [40] H.Ohde, F.Hunt et C.M.Wai, «Synthesis of Silver and Copper Nanoparticles in a Water-in-Supercritical-Carbon Dioxide Microemulsion,» *Chem. Mater.*, vol. 13, 2001.

- [41] S.Santra, R.Tapeç, N.Theodoropoulou, J.Dobson, A.Hebard et W.Tan, «Synthesis and Characterization of Silica-Coated Iron Oxide Nanoparticles in Microemulsion: The Effect of Nonionic Surfactants,» *Langmuir*, vol. 17, 2001.
- [42] C.Feldmann, «Polyol-mediated synthesis of nanoscale functional materials,» *Solid State Sciences*, vol. 7, 2005.
- [43] C.Feldmann, «Polyol-Mediated Synthesis of Nanoscale Functional Materials,» *Adv. Funct. Mater.*, vol. 13, 2003.
- [44] B.Wiley, T.Herricks, Y.Sun et Y.Xia, «Polyol Synthesis of Silver Nanoparticles: Use of Chloride and Oxygen to Promote the Formation of Single-Crystal, Truncated Cubes and Tetrahedrons,» *Nano Letters*, vol. 4, n°19, 2004.
- [45] J.Wan, W.Cai, X.Meng et E.Liu, «Monodisperse water-soluble magnetite nanoparticles prepared by polyol process for high-performance magnetic resonance imaging,» *Chem. Commun.*, pp. 5004-5006, 2007.
- [46] B.K.Park, S.Jeong, D.Kim, J.Moon, S.Lim et J.S.Kim, «Synthesis and size control of monodisperse copper nanoparticles by polyol method,» *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 311, 2007.
- [47] E.Alphandéry, «Applications of magnetosomes synthesized by magnetotactic bacteria in medicine,» *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 2, 2014.
- [48] H.Fischer, G.Mastrogiacomo, J.F.Löffler, R.J.Warthmann, P.G.Weidler et A.U.Gehring, «Ferromagnetic resonance and magnetic characteristics of intact magnetosome chains in *Magnetospirillum gryphiswaldense*,» *Earth and Planetary Science Letters*, vol. 270, 2008.
- [49] J.-B.Sun, F.Zhao, T.Tang, W.Jiang, J.S.Tian, Y.Li et J.L.Li, «High-yield growth and magnetosome formation by *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 in an oxygen-controlled fermentor supplied solely with air,» *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 79, 2008.
- [50] C.J.Brinker et G.W.Sherer, *Sol-Gel Science-The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press INC, 1990.
- [51] M.Popovici, M.Gich, D.Niznansky, A.Roig, C.Savii, L.Casas, E.Molins, K.Zaveta, C.Enache, J.Sort, S.d.Brion, G.Chouteau et J.Nogués, «Optimized Synthesis of the Elusive E-Fe₂O₃ Phase via Sol-Gel Chemistry,» *Chem. Mater.*, vol. 16, 2004.
- [52] A.Cabanas et M.Poliakoff, «The continuous hydrothermal synthesis of nano-particulate ferrites in near critical and supercritical water,» *J. Mater. Chem.*, vol. 11, 2001.
- [53] T.Gonzalez-Carreno, M.P.Morales, M.Gracia et C.J.Serna, «Preparation of uniform Y-Fe₂O₃ particles with nanometer size by spray pyrolysis,» *Materials Letters*, vol. 18, 1993.

- [54] H.R.Kahn et K.Petrikowski, «Anisotropic structural and magnetic properties of arrays of Fe₂₆Ni₇₄ nanowires electrodeposited in the pores of anodic alumina,» *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 1, pp. 215-216, 2000.
- [55] E.H.Kim, H.S.Lee, B.K.Kwak et B.-K.Kim, «Synthesis of ferrofluid with magnetic nanoparticles by sonochemical method for MRI contrast agent,» *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 289, 2005.
- [56] X.Lu, H.-Y.Tuan, B.A.Korgel et Y.Xia, «Facile Synthesis of Gold Nanoparticles with Narrow Size Distribution by Using AuCl or AuBr as the Precursor,» *Chemistry*, vol. 14, n°15, 2008.
- [57] X.M.Lin, H.M.Jaeger, C.M.Sorensen et K.J.Klabunde, «Formation of Long-Range-Ordered Nanocrystal Superlattices on Silicon Nitride Substrates,» *J. Phys. Chem. B*, vol. 105, 2001.
- [58] L.J.Guo, «Nanoimprint Lithography: Methods and Material Requirements,» *Adv. Mater.*, vol. 19, 2007.
- [59] S.Y.Chou, P.R.Krauss et J.Preston, «Nanoimprint lithography,» *J. Vac. Sci. Technol. B*, vol. 14, n°16, 1996.
- [60] L.Maurizi, «Elaboration de nanoparticules fonctionnelles: applications comme agents de contraste en IRM,» 2010.
- [61] W.R.Hendee et C.J.Morgan, «Magnetic Resonance Imaging Part I-Physical Principles,» *West J Med*, vol. 141, pp. 491-500, 1984.
- [62] G.deMarco, A.Roch, I.Peretti, Y.Gossuin, P.Lehmann, C.Menuel, J.N.Vallée et R.N.Muller, «Agents de contraste en IRM : approche théorique des mécanismes de relaxation,» *Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique*, vol. 30, n°110, 2006.
- [63] B.Basly, «Conception et caractérisation de nano-objets magnétiques pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM),» 2010.
- [64] M.Port, «<http://culturesciences.chimie.ens.fr/content/principe-de-lirm-les-agents-de-contraste-759>,» 2010. [En ligne].
- [65] B.Gleich et J.Weizenecker, «Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles,» *Nature*, vol. 435, 2005.
- [66] P.W.Goodwill, K.Lu, B.Zheng et S.M.Conolly, «An x-space magnetic particle imaging scanner,» *REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS*, vol. 83, 2012.
- [67] F.Ludwig, T.Wawrzik et M.Schilling, «Characterization of Magnetic Nanoparticles for Magnetic Particle Imaging by Magnetorelaxometry, AC Susceptibility, Magnetic Particle Spectroscopy and Static Magnetization Measurements,» *SPPHY*, vol. 140, 2012.

- [68] A.P.Khandhar, R.M.Ferguson, H.Arami et K.M.Krishnan, «Monodisperse magnetite nanoparticle tracers for in vivo magnetic particle imaging,» *Biomaterials*, vol. 34, 2013.
- [69] R.M.Ferguson, K.R.Minard et K.M.Krishnan, «Optimization of nanoparticle core size for magnetic particle imaging,» *J Magn Magn Mater.*, vol. 321, n°110, 2009.
- [70] D.Eberbeck, F.Wiekhorst, S.Wagner et L.Trahms, «How the size distribution of magnetic nanoparticles determines their magnetic particle imaging performance,» *Appl. Phys. Lett.*, vol. 98, 2011.
- [71] G.Storm, S.O.Belliot, T.Daemen et D.D.Lasic, «Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 17, 1995.
- [72] T.Neuberger, B.Schöpf, H.Hofmann, M.Hofmann et B.v.Rechenberg, «Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system,» *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 293, 2005.
- [73] K.S.Soppimath, T.M.Aminabhavi, A.R.Kulkarni et W.E.Rudzinski, «Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices,» *Journal of Controlled Release*, vol. 70, 2001.
- [74] T.M.Cullis et P.R.Allen, «Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream,» *SCIENCE*, vol. 303, 2004.
- [75] W.B.Liechty et N.A.Peppas, «Expert opinion: Responsive polymer nanoparticles in cancer therapy,» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 80, 2012.
- [76] B.Haley et E.Frenkel, «Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment,» *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, vol. 26, 2008.
- [77] S.-D.Li et L.Huang, «Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles,» *Molecular Pharmaceutics*, vol. 5, n°14, 2008.
- [78] D.E.Owens et N.A.Peppas, «Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 307, 2006.
- [79] O.S.Nielsen, M.Horsman et J.Overgaard, «A future for hyperthermia in cancer treatment?,» *European Journal of Cancer*, vol. 37, 2001.
- [80] G.Vallejo-Fernandez, O.Whear, A.G.Roca, S.Hussain, J.Timmis, V.Patel et K.O'Grady, «Mechanisms of hyperthermia in magnetic nanoparticles,» *J. Phys. D: Appl. Phys.*, vol. 46, 2013.
- [81] S.Laurent, S.Dutz, U.O.Häfeli et M.Mahmoudi, «Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles,» *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 166, 2011.

- [82] R.Hergt, S.Dutz, R.Müller et M.Zeisberger, «Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy,» *J. Phys.: Condens. Matter.*, vol. 18, 2006.
- [83] S.Dutz et R.Hergt, «Magnetic nanoparticle heating and heat transfer on a microscale: Basic principles, realities and physical limitations of hyperthermia for tumour therapy,» *Int J Hyperthermia*, vol. 29, n°18, 2013.
- [84] S.Dutz et R.Hergt, «Magnetic particle hyperthermia—a promising tumour therapy?,» *Nanotechnology*, vol. 25, p. 452001, 2014.
- [85] S.Y.R.Wong, «Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment,» *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, vol. 30, 2011.
- [86] S.W.Lowe et A.W.Lin, «Apoptosis in cancer,» *Carcinogenesis*, vol. 21, n°13, 2000.
- [87] H.Kiaris et A.V.Schally, «Apoptosis Versus Necrosis: Which Should Be the Aim of Cancer Therapy?,» *Exp Biol Med*, vol. 221, 1999.
- [88] I.K.H.Poon, C.D.Lucas, A.G.Rossi et K.S.Ravichandran, «Apoptotic clearance_basic biology and therapeutic potential,» *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, n°13, 2014.
- [89] D.Liu, L.Wang, Z.Wang et A.Cuschieri, «Magnetoporation and Magnetolysis of Cancer Cells via Carbon Nanotubes Induced by Rotating Magnetic Fields,» *Nano Letters*, vol. 12, 2012.
- [90] B.Wang, C.Bienvenu, J.Mendez-Garza, P.Lançon, A.Madeira, P.Vierling, C.Di Giorgio et G.Bossis, «Necrosis of HepG2 cancer cells induced by the vibration of magnetic particles,» *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 344, 2013.
- [91] M.F.Contreras, R.Sougrat, A.Zaher, T.Ravasi et J.Kosel, «Non-chemotoxic induction of cancer cell death using magnetic nanowires,» *International Journal of Nanomedicine*, vol. 10, 2015.
- [92] M.H.Kang et C.P.Reynolds, «Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy,» *Clin Cancer Res.*, vol. 15, n°14, 2009.
- [93] R.J.Mannix, S.Kumari, F.Cassiola, F.Montoya-Zavala, E.Feinstein, M.Prentiss et D.E.Ingber, «Nanomagnetic actuation of receptor-mediated signal transduction,» *Nature Nanotechnology*, vol. 3, 2008.
- [94] M.H.Cho, E.J.Lee, M.Son, J.-H.Lee, D.Yoo, J.-W.Kim, S.W.Park, J.-S.Shin et J.Cheon, «A magnetic switch for the control of cell death signalling in in vitro and in vivo systems,» *Nature Materials*, vol. 11, 2012.
- [95] E.Zhang, M.F.Kircher, M.Koch, L.Eliasson, S.N.Goldberg et E.Renström, «Dynamic Magnetic Fields Remote-Control Apoptosis via Nanoparticle Rotation,» *ACS NANO*, vol. 8, n°14, 2014.

- [96] D.-H.Kim, E.A.Rozhkova, I.V.Ulasov, S.D.Bader, T.Rajh, M.S.Lesniak et V.Novosad, «Biofunctionalized magnetic-vortex microdiscs for targeted cancer-cell destruction,» *Nature Materials*, vol. 9, 2010.
- [97] S.Leulmi, «Destruction de cellules cancéreuses par vibrations magnéto-mécaniques de micro/nano particules magnétiques: Elaboration des particules par approche top-down, biofonctionnalisation et tests in vitro,» 2014.
- [98] S.Leulmi, X.Chauchet, M.Morcrette, G.Ortiz, H.Joisten, P.Sabon, T.Livache, Y.Hou, M.Carrière, S.Lequien et B.Dieny, «Triggering the apoptosis of targeted human renal cancer cells by the vibration of anisotropic magnetic particles attached to the cells membrane,» *Nanoscale*, 2015.
- [99] F.S.Fredrickson et G.H.Bates, «Block Copolymers-Designer Soft Materials,» *Physics Today*, vol. 52, n°12, 1992.
- [100] I.W.Hamley, «Nanostructure fabrication using block copolymers,» *Nanotechnology*, vol. 14, 2003.
- [101] S.Querelle, «Synthèse et utilisation de copolymères triblocs ABA pour l'élaboration de membranes poreuses à morphologies et performances contrôlées,» 2008.
- [102] M.W.Matsen et M.Schick, «Stable and Unstable Phases of a Diblock Copolymer Melt,» *Physical Review Letters*, vol. 72, n°116, 1994.
- [103] M.W.Matsen et M.Schick, «Microphase Separation in Starblock Copolymer Melts,» *Macromolecules*, vol. 27, 1994.
- [104] M.W.Matsen et F.S.Bates, «Unifying Weak- and Strong-Segregation Block Copolymer,» *Macromolecules*, vol. 29, n°14, 1996.
- [105] L.Leibler, «Theory of Microphase Separation in Block Copolymers,» *Macromolecules*, vol. 13, n°16, 1980.
- [106] J.Bang, U.Jeong, D.Y.Ryu, T.P.Russell et C.J.Hawker, «Block Copolymer Nanolithography: Translation of Molecular Level Control to Nanoscale Patterns,» *Adv. Mater.*, vol. 21, 2009.
- [107] A.Andreozzi, E.Poliani, G.Seguini et M.Perego, «The effect of random copolymer on the characteristic dimensions of cylinder-forming PS-b-PMMA thin films,» *Nanotechnology*, vol. 22, 2011.
- [108] P.Mansky, Y.Liu, E.Huang, T.P.Russell et C.Hawker, «Controlling Polymer-Surface Interactions with Random Copolymer Brushes,» *SCIENCE*, vol. 275, 1997.
- [109] P.Mansky, T.P.Russell, C.Hawker, M.Pitsikalis et J.Mays, «Ordered Diblock Copolymer Films on Random Copolymer Brushes,» *Macromolecules*, vol. 30, 1997.

- [110] T.Thurn-Albrecht, R.Steiner, J.DeRouchev, C.M.Stafford, E.Huang, M.Bal, M.Tuominen, C.J.Hawker et T.P.Russell, «Nanoscopic Templates from Oriented Block Copolymer Films,» *Adv. Mater.*, vol. 12, n°111, 2000.
- [111] T.Thurn-Albrecht, J.DeRouchev, T.P.Russell et H.M.Jaeger, «Overcoming Interfacial Interactions with Electric Fields,» *Macromolecules*, vol. 33, 2000.
- [112] A.Böker, A.Knoll, H.Elbs, V.Abetz, A.H.E.Müller et G.Krausch, «Large Scale Domain Alignment of a Block Copolymer from Solution Using Electric Fields,» *Macromolecules*, vol. 35, 2002.
- [113] A.Böker, «Microscopic Mechanisms of Electric-Field-Induced Alignment of Block Copolymer Microdomains,» *Physical Review Letters*, vol. 89, n°113, 2002.
- [114] T.Thurn-Albrecht, J.Schotter, G.A.Kästle, N.Emley, T.Shibauchi et L.Krusin-Elbaum, «Ultrahigh-Density Nanowire Arrays Grown in Self-Assembled Diblock Copolymer Templates,» *SCIENCE*, vol. 290, 2000.
- [115] G.Kim et M.Libera, «Kinetic Constraints on the Development of Surface Microstructure in SBS Thin Films,» *Macromolecules*, vol. 31, 1998.
- [116] G.Kim et M.Libera, «Morphological Development in Solvent-Cast Polystyrene-Polybutadiene-Polystyrene (SBS) Triblock Copolymer Thin Films,» *Macromolecules*, vol. 31, 1998.
- [117] S.H.Kim, M.J.Misner, T.Xu, M.Kimura et T.P.Russell, «Highly Oriented and Ordered Arrays from Block Copolymers via Solvent Evaporation,» *Adv.Mater.*, vol. 16, p. 226, 2004.
- [118] S.H.Kim, M.J.Misner et T.P.Russell, «Solvent-Induced Ordering in Thin Film Diblock Copolymer/Homopolymer Mixtures,» *Adv. Mater.*, vol. 16, p. 2119, 2004.
- [119] S.Ham, C.Shin, E.Kim, D.Y.Ryu, U.Jeong, T.P.Russell et C.J.Hawker, «Microdomain Orientation of PS-b-PMMA by Controlled Interfacial Interactions,» *Macromolecules*, vol. 41, 2008.
- [120] I.A.Zucchini, E.Poliani et M.Perego, «Microdomain orientation dependence on thickness in thin films of cylinder-forming PS-b-PMMA,» *Nanotechnology*, vol. 21, 2010.
- [121] T.Pan, K.Huang, A.C.Balazs, M.S.Kunz, A.M.Mayes et T.P.Russell, «Macro- vs Microphase Separation in Copolymer/Homopolymer Mixtures,» *Macromolecules*, vol. 26, 1993.
- [122] K.A.Orso et P.F.Green, «Phase Behavior of Thin Film Blends of Block Copolymers and Homopolymers: Changes in Domain Dimensions,» *Macromolecules*, vol. 32, 1999.
- [123] A.M.Mayes, T.P.Russell, S.K.Satija et C.F.Majkrzak, «Homopolymer Distributions in Ordered Block Copolymers,» *Macromolecules*, vol. 25, 1992.

- [124] T.Hashimoto, H.Tanaka et H.Hasegawa, «Ordered Structure in Mixtures of a Block Copolymer and Homopolymers. 2. Effects of Molecular Weights of Homopolymers,» *Macromolecules*, vol. 23, 1990.
- [125] H.Tanaka, H.Hasegawa et T.Hashimoto, «Ordered Structure in Mixtures of a Block Copolymer and Homopolymers. 1. Solubilization of Low Molecular Weight Homopolymer,» *Macromolecules*, vol. 24, 1991.
- [126] U.Jeong, H.-C.Kim, R.L.Rodriguez, I.Y.Tsai, C.M.Stafford, J.K.Kim, C.J.Hawker et T.P.Russell, «Asymmetric Block Copolymers with Homopolymers: Routes to Multiple Length Scale Nanostructures,» *Adv. Mater.*, vol. 14, n°14, 2002.
- [127] U.Jeong, D.Y.Ryu, J.K.Kim, D.H.Kim, X.Wu et T.P.Russell, «Precise Control of Nanopore Size in Thin Film Using Mixtures of Asymmetric Block Copolymer and Homopolymer,» *Macromolecules*, vol. 36, 2003.
- [128] Y.S.Jung et C.A.Ross, «Orientation-Controlled Self-Assembled Nanolithography Using a Polystyrene-Polydimethylsiloxane Block Copolymer,» *Nano Letters*, vol. 7, n°17, 2007.
- [129] M.D.Ninago, A.E.Ciolino, M.A.Villar, F.C.Giacomelli, P.Cernoch, P.Stepánek, V.Schmidt et C.Giacomelli, «Self-Assembly of Well-Defined PS-b-PDMS Copolymers in Bulk and in Selective Solvent,» *Chemical Engineering Transactions*, vol. 17, 2009.
- [130] T.L.Bucholz et Y.-L.Loo, «Phase Behavior of Near-Monodisperse Semifluorinated Diblock Copolymers by Atom Transfer Radical Polymerization,» *Macromolecules*, vol. 39, 2006.
- [131] T.Nose, «Coexistence curves of polystyrene/poly(dirnethylsiloxane) blends,» *Polymer*, vol. 36, n°111, 1995.
- [132] I.W.Hamley, «Ordering in thin films of block copolymers: Fundamentals to potential applications,» *Progress in Polymer Science*, vol. 34, 2009.
- [133] F.H.Schacher, P.A.Rupar et I.Manners, «Functional Block Copolymers: Nanostructured Materials with Emerging Applications,» *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 51, 2012.
- [134] K.-V.Peinemann, V.Abetz et P.F.W.Simon, «Asymmetric superstructure formed in a block copolymer via phase separation,» *nature materials*, vol. 6, 2007.
- [135] A.C.Edrington, A.M.Urbas, P.DeRege, C.X.Chen, T.M.Swager, N.Hadjichristidis, M.Xenidou, L.J.Fetters, J.D.Joannopoulos, Y.Fink et E.L.Thomas, «Polymer-Based Photonic Crystals,» *Adv. Mater.*, vol. 13, n°16, pp. 421-425, 2001.
- [136] E.J.W.Crossland, M.Kamperman, M.Nedelcu, C.Ducati, U.Wiesner, D.-M.Smilgies, G.E.S.Toombes, M.A.Hillmyer, S.Ludwigs, U.Steiner et H.J.Snaith, «A Bicontinuous Double Gyroid Hybrid Solar Cell,» *Nano Letters*, vol. 9, n°18, pp. 2807-2812, 2009.

- [137] Y.Geng, P.Dalhaimer, S.Cai, R.Tsai, M.Tewari, T.Minko et D.E.Discher, «Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery,» *Nature Nanotechnology*, vol. 2, pp. 249-255, 2007.
- [138] R.Duncan, J.K.Coatsworth et S.Burtles, «Preclinical toxicology of a novel polymeric antitumour agent: HPMA copolymer-doxorubicin (PK1),» *Hum. Exp. Toxicol.*, vol. 17, n°12, pp. 93-104, 1998.
- [139] R.C.Hayward et D.J.Pochan, «Tailored Assemblies of Block Copolymers in Solution: It Is All about the Process,» *Macromolecules*, vol. 43, pp. 3577-3584, 2010.
- [140] C.Park, J.Yoon et E.L.Thomas, «Enabling nanotechnology with self assembled block copolymer patterns,» *Polymer*, vol. 44, 2003.
- [141] K.Shin, K.A.Leach, J.T.Goldbach, D.H.Kim, J.Y.Jho, M.Tuominen, C.J.Hawker et T.P.Russell, «A Simple Route to Metal Nanodots and Nanoporous Metal Films,» *Nano Letters*, vol. 2, n°19, 2002.
- [142] P.P. Barros, S.Barnola, A.Gharbi, M.Argoud, I.Servin, R.Tiron, X.Chevalier, C.Navarro, C.Nicolet, C.Lapeyre, C.Monget et E.Martinez, «Etch challenges for DSA implementation in CMOS via patterning,» *Advanced Etch Technology for Nanopatterning III*, vol. 90540G, 2014.
- [143] Y.-W.Jun, J.H.Lee et J.Cheon, «Chemical Design of Nanoparticle Probes for High-Performance Magnetic Resonance Imaging,» *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 47, 2008.
- [144] J.Vidal-Vidal, J.Rivas et M.A.Lopez-Quintela, «Synthesis of monodisperse maghemite nanoparticles by the microemulsion method,» *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, vol. 288, 2006.
- [145] S.A.Kahani et Z.Yagini, «A Comparison between Chemical Synthesis Magnetite Nanoparticles and Biosynthesis Magnetite,» *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2014.
- [146] M.Fang, V.Ström, R.T.Olsson, L.Belova et K.V.Rao, «Particle size and magnetic properties dependence on growth temperature for rapid mixed co-precipitated magnetite nanoparticles,» *Nanotechnology*, vol. 23, 2012.
- [147] M.V.Smoluchowski, «Versuch einer mathematischen Theorie der Koagulationskinetik kolloider Lösungen.,» *Zeitschrift. Physik. Chemie. XCII.*, 1916.
- [148] R.Lang et N.X.Xanh, «Smolushowski's Theory of Coagulation in Colloids Holds Rigorously in the Boltzmann-Grad-Limit,» *Z. Wahrscheinlichkeitstheorie verw. Gebiete*, vol. 54, 1980.
- [149] S.K.Friedlander et C.S.Wang, «The Self-Preserving Particle Size Distribution for Coagulation by Brownian Motion,» *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 22, 1966.
- [150] L.B.Kiss, J.Söderlund, G.A.Niklasson et C.G.Granqvist, «New approach to the origin of lognormal size distributions of nanoparticles,» *Nanotechnology*, vol. 10, 1999.

- [151] L.B.Kiss, J.Söderlund, G.A.Niklasson et C.G.Granqvist, «The real origin of lognormal size distributions of nanoparticles in vapor growth processes,» *NanoStructured Materials*, vol. 12, 1999.
- [152] J.Söderlund, L.B.Kiss, G.A.Niklasson et C.G.Granqvist, «Lognormal Size Distributions in Particle Growth Processes without Coagulation,» *Physical Review Letters*, vol. 80, n°111, 1998.
- [153] R.B.Bill et A.Bergmann, «On the origin of logarithmic-normal distributions: An analytical derivation, and its application to nucleation and growth processes,» *Journal of Crystal Growth*, vol. 310, 2008.
- [154] W.Eerenstein, «Spin-dependent transport across anti-phase boundaries in magnetite films,» 2003.
- [155] M.Pauly, «Structuration de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer en films et étude de leurs propriétés magnétiques et de magnéto-transport».
- [156] F.Walz, «The Verwey transition—a topical review,» *J. Phys.: Condens. Matter.*, vol. 14, 2002.
- [157] J.Garcia et G.Subias, «The Verwey transition - a new perspective,» *J. Phys.: Condens. Matter.*, vol. 16, 2004.
- [158] I.Leonov et A.N.Yaresko, «On the Verwey charge ordering in magnetite,» *J. Phys.: Condens. Matter.*, vol. 19, 2007.
- [159] Ö.Özdemir et D.J.Dunlop, «The effect of oxidation on the verwey transition in magnetite,» *Geophysical Research Letters*, vol. 20, n°116, 1993.
- [160] G.F.Goya, T.S.Berquó, F.C.Fonseca et M.P.Morales, «Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles,» *Journal of Applied Physics*, vol. 94, n°15, 2003.
- [161] D.T.Margulies, F.T.Parker, M.L.Rudee, F.E.Spada, J.N.Chapman, P.R.Aitchison et A.E.Berkowitz, «Origin of the Anomalous Magnetic Behavior in Single Crystal Fe₃O₄ Films,» *Physical Review Letters*, vol. 79, n°125, 1997.
- [162] P.Li, E.Y.Jiang et H.L.Bai, «Grain boundaries controlled magnetic and magnetotransport properties of reactively sputtered polycrystalline and epitaxial Fe₃O₄ films,» *J.Phys.D:Appl.Phys.*, vol. 43, p. 265002, 2010.
- [163] J.B.Moussy, «From epitaxial growth of ferrite thin films to spin-polarized tunnelling,» *J. Phys. D: Appl. Phys.*, vol. 46, p. 143001, 2013.
- [164] S.Celotto, W.Eerenstein et T.Hibma, «Characterization of anti-phase boundaries in epitaxial magnetite films,» *Eur. Phys. J. B*, vol. 36, p. 271–279, 2003.

- [165] F.C.Voogt, T.T.M.Palstra, L.Niesen, O.C.Rogojanu, M.A.James et T.Hibma, «Superparamagnetic behavior of structural domains in epitaxial ultrathin magnetite films,» *Physical review B*, vol. 57, n°114, pp. 8107-8110, 1998.
- [166] F.Delille, B.Dieny, J.-B.Moussy, M.-J.Guittet, S.Gota, M.Gautier-Soyer et C.Marin, «Study of the electronic paraprocess and antiphase boundaries as sources of the demagnetisation phenomenon in magnetite,» *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 294, 2005.
- [167] J.-B.Moussy, S.Gota, A.Bataille, M.-J.Guittet, M.Gautier-Soyer, F.Delille, B.Dieny, F.Ott, T.D.Doan, P.Warin, P.Bayle-Guillemaud, C.Gatel et E.Snoeck, «Thickness dependence of anomalous magnetic behavior in epitaxial Fe₃O₄ (111) thin films: Effect of density of antiphase boundaries,» *Physical Review B*, vol. 70, 2004.
- [168] C.A.F.Vaz, T.J.Hayward, J.Llandro, F.Schackert, D.Morecroft, J.A.C.Bland, M.Kläui, M.Laufenberg, D.Backes, U.Rüdiger, J.Castano, C.A.Ross, L.J.Heyderman, F.Nolting, A.Locatelli, G.Faini, S.Cherifi et W.Wernsdorfer, «Ferromagnetic nanorings,» *J. Phys.: Condens. Matter*, vol. 19, p. 255207, 2007.
- [169] R.P.Cowburn, D.K.Koltsov, A.O.Adeyeye et M.E.Welland, «Single-Domain Circular Nanomagnets,» *Physical Review Letters*, vol. 83, 1999.
- [170] T.Shinjo, T.Okuno, R.Hassdorf, K.Shigeto et T.Ono, «Magnetic Vortex Core Observation in Circular Dots of Permalloy,» *SCIENCE*, vol. 289, 2000.
- [171] C.A.F.Vaz, «Energetics of magnetic ring and disk elements: Uniform versus vortex state,» *Physical Review B*, vol. 73, 2006.
- [172] M. Eltschka, M.Kläui, U.Rüdiger, T.Kasama, L.Cervera-Gontard, R.E.Dunin-Borkowski, F.Luo, L.J.Heyderman, C.-J.Jia, L.-D.Sun et C.-H.Yan, «Correlation between magnetic spin structure and the three-dimensional geometry in chemically synthesized nanoscale magnetite rings,» *Applied Physics Letters*, vol. 92, 2008.
- [173] P.-O.Jubert et R.Allenspach, «Analytical approach to the single-domain-to-vortex transition in small magnetic disks,» *Physical Review B*, vol. 70, 2004.
- [174] T.Wren, B.Gribkov, V.Petrashov et O.Kazakova, «Phase diagram of magnetic states in nickel submicron disks,» *Journal of Applied Physics*, vol. 118, 2015.
- [175] Y.Yang, X.-L.Liu, J.-B.Yi, Y.Yang, H.-M.Fan et J.Ding, «Stable vortex magnetite nanorings colloid: Micromagnetic simulation and experimental demonstration,» *Journal of Applied Physics*, vol. 111, 2012.
- [176] P.Landeros, J.Escrig, D.Altbir, M.Bahiana et J.d'Albuquerque e Castro, «Stability of magnetic configurations in nanorings,» *Journal of Applied Physics*, vol. 100, 2006.

- [177] E.M.Markink, «Relaxation behaviour of spherical and cylindrical magnetic nanoparticles in liquid media,» 2012.
- [178] D.J.Dunlop, «Superparamagnetic and Single-Domain Threshold sizes in Magnetite,» *Journal of Geophysical Research*, vol. 78, n°111, 1973.
- [179] W.T.Coffey et Y.P.Kalmykov, «Thermal fluctuations of magnetic nanoparticles: Fifty years after Brown,» *J.Appl.Phys.*, vol. 112, p. 121301, 2012.
- [180] X.Battle et A.Labarta, «Finite-size effects in fine particles: magnetic and transport properties,» *J. Phys. D: Appl. Phys.*, vol. 35, 2002.
- [181] D.H.Han, J.P.Wang et H.L.Luo, «Crystallite size effect on saturation magnetization of fine ferrimagnetic particles,» *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 136, 1994.
- [182] M.P.Morales, S.Veintemillas-Verdaguer, M.I.Montero et C.J.Serna, «Surface and Internal Spin Canting in gamma-Fe₂O₃ Nanoparticles,» *Chem. Mater.*, vol. 11, 1999.
- [183] B.Issa, I.M.Obaidat, B.A.Albiss et Y.Haik, «Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications,» *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, 2013.
- [184] S.Morup, E.Brok et C.Frandsen, «Spin Structures in Magnetic Nanoparticles,» *Journal of Nanomaterials*, 2013.
- [185] O.Iglesias et A.Labarta, «Role of surface disorder on the magnetic properties and hysteresis of nanoparticles,» *Physica B*, vol. 343, 2004.
- [186] R.V.Pickrodt, M.C.Fuentes, P.Carolina, J.Baeza, N.Duran et S.Sharma, «Influence of stirring velocity on the synthesis of magnetite nanoparticles (Fe₃O₄) by the coprecipitation method,» *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 488, 2009.
- [187] G.Gnanaprakash, S.Mahadevan, T.Jayakumar, P.Kalyanasundaram, J.Philip et B.Raj, «Effect of initial pH and temperature of iron salt solutions on formation of magnetite nanoparticles,» *Materials Chemistry and Physics*, vol. 103, 2007.
- [188] M.Fang, V.Ström, R.T.Olsson, L.Belova et K.V.Rao, «Rapid mixing: A route to synthesize magnetite nanoparticles with high moment,» *Applied Physics Letters*, vol. 99, 2011.
- [189] A.Demortière, P.Panissod, B.P.Pichon, G.Pourroy, D.Guillon, B.Donnio et S.Bégin-Colin, «Size-dependent properties of magnetic iron oxide nanocrystals,» *Nanoscale*, vol. 3, 2011.
- [190] T.J.Daou, G.Pourroy, S.Bégin-Colin, J.M.Grenèche, C.Ulhaq-Bouillet, P.Legaré, P.Bernhardt, C.Leuvrey et G.Rogez, «Hydrothermal Synthesis of Monodisperse Magnetite Nanoparticles,» *Chem. Mater.*, vol. 18, 2006.
- [191] D.Jiles, *Introduction to Magnetism and Magnetic Materials*, London: Chapman and Hall, 1991.

- [192] C.M.Fu, P.C.Kao, M.S.Tsai, H.S.Hsu, C.C.Yu et J.C.A.Huang, «Magnetic anisotropy of permalloy thin film on Mo stepped surface,» *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 239, 2002.
- [193] L.F.Yin, D.H.Weij, N.Lei, L.H.Zhou, C.S.Tian, G.S.Dong et X.F.Jin, «Magnetocrystalline Anisotropy in Permalloy Revisited,» *Physical Review Letters*, vol. 97, 2006.
- [194] F.Bodker, S.Morup et S.Linderoth, «Surface Effects in Metallic Iron Nanoparticles,» *Physical Review Letters*, vol. 72, n°12, 1974.
- [195] P.Poddar, «Dipolar interactions in two- and three-dimensional magnetic nanoparticle arrays,» *Physical Review B*, vol. 66, 2002.
- [196] B.Frankamp, A.K.Boal, M.T.Tuominen et V.M.Rotello, «Direct Control of the Magnetic Interaction between Iron Oxide Nanoparticles through Dendrimer-Mediated Self-Assembly,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, 2005.
- [197] D.Farrell, Y.Cheng, R.W.McCallum, M.Sachan et S.A.Majetich, «Magnetic Interactions of Iron Nanoparticles in Arrays and Dilute Dispersions,» *J. Phys. Chem. B*, vol. 109, 2005.
- [198] J.L.Dormann, L.Spinu, E.Tronc, J.P.Jolivet, F.Lucari, F.D'Orazio et D.Fiorani, «Effect of interparticle interactions on the dynamical properties of gamma-Fe₂O₃ nanoparticles,» *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 183, 1998.
- [199] J.L.Dormann, L.Bessais et D.Fiorani, «A dynamic study of small interacting particles: superparamagnetic model and spin-glass laws,» *J. Phys. C: Solid State Phys.*, vol. 21, 1988.
- [200] D.Kechrakos, «Magnetic properties of dipolar interacting single-domain particles,» *Physical Review B*, vol. 58, n°118, 1998.
- [201] D.Kechrakos et K.N.Trohidou, *Dipolar interaction effects in the magnetic and magnetotransport properties of ordered nanoparticle arrays*, 2008.
- [202] W.C.Nunes, F.Cebollada, M.Knobel et D.Zanchet, «Effects of dipolar interactions on the magnetic properties of gamma-Fe₂O₃ nanoparticles in the blocked state,» *Journal of Applied Physics*, vol. 99, 2006.
- [203] C.J.Bae, S.Angappane et J.-G.Parka, «Experimental studies of strong dipolar interparticle interaction in monodisperse Fe₃O₄ nanoparticles,» *Applied Physics Letters*, vol. 91, 2007.
- [204] J.L.Dormann, R.Cherkaoui, L.Spinu, M.Noguès, F.Lucari, F.D'Orazio, D.Fiorani, A.Garcia, E.Tronc et J.P.Jolivet, «From pure superparamagnetic regime to glass collective state of magnetic moments in γ -Fe₂O₃ nanoparticle assemblies,» *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 187, 1998.
- [205] S.Blundell, *Magnetism in Condensed Matter*, Oxford University Press, 2001.

- [206] M.Genua, N.Reinhardt, J.Faure-Vincent, R.Calemczuk, T.Livache et Y.Hou, «Integrating Multi-Functionalities Into Non-Spherical Microparticles Fabricated by Top-Down Approach,» *Sci. Adv. Mater.*, vol. 7, 2015.
- [207] V.F.Puntes, K.M.Krishnan et P.Alivisatos, «Synthesis, self-assembly, and magnetic behavior of a two-dimensional superlattice of single-crystal ϵ -Co nanoparticles,» *Applied Physics Letters*, vol. 78, n°115, 2001.
- [208] W.M.Gelbart, R.P.Sear, J.R.Heath et S.Chaney, «Array formation in nano-colloids : Theory and experiment in 2D,» *Faraday Discuss.*, vol. 112, 1999.
- [209] C.Petit, A.Taleb et M.-P.Pileni, «Self-Organization of Magnetic Nanosized Cobalt Particles,» *Adv. Mater.*, vol. 10, n°13, 1998.
- [210] L.Motte, F.Billoudet et M.P.Pileni, «Self-Assembled Monolayer of Nanosized Particles Differing by Their Sizes,» *J. Phys. Chem.*, vol. 99, 1995.
- [211] L.Motte, «Self-Organization into 2D and 3D Superlattices of Nanosized Particles Differing by Their Size,» *J. Phys. Chem. B*, vol. 101, 1997.
- [212] A.Taleb, C.Petit et M.P.Pileni, «Synthesis of Highly Monodisperse Silver Nanoparticles from AOT Reverse Micelles: A Way to 2D and 3D Self-Organization,» *Chem. Mater.*, vol. 9, 1997.
- [213] V.Torrisi, A.Graillot, L.Vitorazi, Q.Crouzet, G.Marletta, C.Loubat et J.-F.Berret, «Preventing Corona Effects: Multiphosponic Acid Poly(ethylene glycol) Copolymers for Stable Stealth Iron Oxide Nanoparticles,» *Biomacromolecules*, vol. 15, p. 3171–3179, 2014.
- [214] H.Hillaireau et P.Couvreur, «Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery,» *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 66, p. 2873–2896, 2009.
- [215] J.V.Jokerst, T.Lobovkina, R.N.Zare et S.SGambhir, «Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy,» *Nanomedicine*, vol. 6, n°14, p. 715–728, 2011.
- [216] C.D.Bain, J.Evall et G.M.Whitesides, «Formation of Monolayers by the Coadsorption of Thiols on Gold: Variation in the Head Group, Tail Group, and Solvent,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 111, n°118, 1989.
- [217] R.I.Carey, J.P.Folkers et G.M.Whitesides, «Self-Assembled Monolayers Containing w-Mercaptoalkylboronic Acids Adsorbed onto Gold Form a Highly Cross-Link€d, Thermally Stable Borate Glass Surface,» *Langmuir*, vol. 10, n°17, 1994.
- [218] J.P.Folkers, P.E.Laibinis et G.M.Whitesides, «Self Assembled Monolayers of Alkanethiols on Gold: Comparison of Monolayers Containing Mixtures of Short- and Long-Chain Constituents with CH₃ and CH₂OH Terminal groups,» *Langmuir*, vol. 8, n°15, 1992.

- [219] J.-C.Love, L.A.Estroff, J.K.Kriebel, R.G.Nuzzo et G.M.Whitesides, «Self-Assembled Monolayers of Thiulates on Metals as a Form of Nanotechnology,» *Chem. Rev.*, vol. 105, 2005.
- [220] J.Camps, «Notions de biocompatibilité,» 2009-2010.
- [221] J.-L.Pariente, L.Bordenave et P.Conort, «Biomatériaux, Biomatériels et Biocompatibilité,» *Progrès en Urologie*, vol. 15, 2005.
- [222] H.Joisten, T.Courcier, P.Balint, P.Sabon, J.Faure-Vincent, S.Auffret et B.Dieny, «Self-polarization phenomenon and control of dispersion of synthetic antiferromagnetic nanoparticles for biological applications,» *Applied Physics Letters*, p. 97, 2010.
- [223] S.Leulmi, H.Joisten, T.Dietsch, C.Iss, M.Morcrette, S.Auffret, P.Sabon et B.Dieny, «Comparison of dispersion and actuation properties of vortex and synthetic antiferromagnetic particles for biotechnological applications,» *Applied Physics Letters*, vol. 103, 2013.
- [224] C.P.Gibson et K.J.Putzer, «Synthesis and Characterization of Anisometric Cobalt Nanoclusters,» *SCIENCE*, vol. 267, 1995.
- [225] C.Lam, Y.F.Zhang, Y.H.Tang, C.S.Lee, I.Bello et S.T.Lee, «Large-scale synthesis of ultrafine Si nanoparticles by ball milling,» *Journal of Crystal Growth*, vol. 220, 2000.
- [226] J.-E.Munoz, J.Cervantes, R.Esparza et G.Rosas, «Iron nanoparticles produced by high-energy ball milling,» *J Nanopart Res*, vol. 9, 2007.
- [227] Y.B.Li, B.Q.Wei, J.Liang, Q.Yu et D.H.Wu, «Transformation of carbon nanotubes to nanoparticles by ball milling process,» *Carbon*, vol. 37, 1999.
- [228] Y.Wang, «Sm–Co hard magnetic nanoparticles prepared by surfactant-assisted ball milling,» *Nanotechnology*, vol. 18, 2007.
- [229] W. Hu, «Patterning of high density magnetic nanodot arrays by nanoimprint lithography,» *J. Vac. Sci. Technol. A*, vol. 25, n°14, 2007.
- [230] S.H.Ko, I.Park, H.Pan, C.P.Grigoropoulos, AP.Pisano, C.K.Luscombe et J.M.J.Fréchet, «Direct Nanoimprinting of Metal Nanoparticles for Nanoscale Electronics Fabrication,» *Nano Letters*, vol. 7, n°17, 2007.
- [231] G.M.McClelland, M.W.Hart, C.T.Rettner, M.E.Best, K.R.Carter et B.D.Terris, «Nanoscale patterning of magnetic islands by imprint lithography using a flexible mold,» *Applied Physics Letters*, vol. 81, n°18, 2002.
- [232] J.Moritz, B.Dieny, J.P.Nozières, S.Landis, A.Lebib et Y.Chen, «Domain structure in magnetic dots prepared by nanoimprint and e-beam lithography,» *Journal of Applied Physics*, vol. 91, n°110, 2002.

- [233] W.Wu, B.Cui, X.-Y.Sun, W.Zhang, L.Zhuang, L.Kong et S.Y.Chou, «Large area high density quantized magnetic disks fabricated using nanoimprint lithography,» *J. Vac. Sci. Technol. B*, vol. 16, n°16, 1998.
- [234] K.Y.Guslienko, V.Novosad, Y.Otani, H.Shima et K.Fukamichi, «Field evolution of magnetic vortex state in ferromagnetic disks,» *Applied Physics Letters*, vol. 78, n°124, 2001.
- [235] A.Masseboeuf, «Microscopie Electronique en Transmission pour l'étude de phénomènes magnétiques à l'échelle du nanomètre,» 2008, <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00384346>.
- [236] E.F.Bertaut, «Raies de Debye-Scherrer et Répartition des Dimensions des Domaines de Bragg dans les Poudres Polycristallines,» *Acta Cryst.*, vol. 3, p. 14, 1950.
- [237] J.I.Langford et D.Louër, «Powder diffraction,» *Rep. Prog. Phys.*, vol. 59, pp. 131-234, 1996.
- [238] W.Eerenstein, T.T.M.Palstra, T.Hibma et S.Celotto, «Diffusive motion of antiphase domain boundaries in Fe₃O₄ films,» *Physical Review B*, vol. 68, p. 014428, 2003.
- [239] M. F. Contreras, «Non-chemotoxic induction of cancer cell death using magnetic nanowires,» *International Journal of Nanomedicine*, vol. 10, 2015.
- [240] Y.Sowa et R.M.Berry, «Bacterial flagellarmotor,» *Quarterly Reviews of Biophysics*, vol. 41, n°12, 2008.
- [241] G.Volpe et D.Petrov, «Torque Detection using Brownian Fluctuations,» *Physical Review Letters*, vol. 97, 2006.
- [242] Z.Bryant, M.D.Stone, J.Gore, S.B.Smith, N.R.Cozzarelli et C.Bustamante, «Structural transitions and elasticity from torque measurements on DNA,» *Nature*, vol. 424, 2003.
- [243] C. D. Bain, «Formation of Monolayers by the Coadsorption of Thiols on Gold: Variation in the Head Group, Tail Group, and Solvent,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 111, n°118, 1989.
- [244] T.Sundquist, R.Moravec, A.Niles, M.O'Brien et T.Riss, «Timing your apoptosis assays,» *CELL NOTES*, vol. 16, 2006.
- [245] R.Bjork, C.R.H.Bahl, A.Smith et N.Pryds, «Comparison of adjustable permanent magnetic field sources,» *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 322, n°122, 2010.
- [246] A.-E.Nel, L.Mädler, D.Velegol, T.Xia, E.M.V.Hoek, P.Somasundaran, F.Klaessig, V.Castranova et M.Thompson, «Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface,» *Nature Materials*, vol. 8, 2009.

Annexe 1

Protocole du marquage des cellules cancéreuses pour les tests de cytométrie en flux *via* les fluorochromes Iodure de Propidium (IP) et AnnexinV (AV)

Les cellules sont cultivées dans des puits faisant partie de plaques 6 puits pour atteindre un nombre d'environ 10^6 cellules par puits. L'appareil de cytométrie en flux ayant besoin d'être calibré, nous aurons besoin de 3 tubes « calibrage » : un tube contenant uniquement des cellules, un tube contenant des cellules marquées à l'IP et un tube contenant des cellules marquées à l'AV. En plus viennent s'ajouter les tubes « mesure » qui sont au nombre de deux : un tube contenant les cellules qui auront été traitées avec les particules fonctionnalisées et marquées à l'IP et à l'AV, et un tube témoin contenant les cellules traitées avec les particules non fonctionnalisées et marquées à l'IP et à l'AV. Les fluorochromes et la solution tampon viennent du kit commercial Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor® 488 & Propidium Iodide de Life Technologies. Le protocole de marquage est le suivant :

- Après traitement et incubation des cellules, le surnageant des puits est transféré dans des tubes de 5 mL, cela afin de ne pas perdre les débris cellulaires significatifs de mort cellulaire.
- Les cellules encore adhérentes au fond des puits sont ajoutées à ces tubes après les avoir trypsinées.
- Le contenu des tubes est centrifugé, le surnageant est rincé deux fois avec du PBS froid, puis remplacé par 100 μ L de solution tampon (binding buffer), qui aura été diluée au 1/5 dans le l'eau déionisée MilliQ.
- Les cellules sont comptées (on prélève 10 μ L de suspension cellulaire de chaque tube, auxquels on ajoute 10 μ L de bleu de trypan) afin de vérifier que l'on a bien environ 10^6 cellules par tube.
- La solution d'IP est préparée en diluant le produit brut au 1/10 dans la solution tampon. Cette manipulation est à faire dans le noir afin de limiter l'exposition du fluorochrome à la lumière. Le tube contenant la solution est entouré d'aluminium pour la même raison.
- Dans les tubes correspondants, on ajoute 5 μ L d'AV et 1 μ L de la solution d'IP par tranche de 100 μ L de suspension cellulaire.
- Les tubes sont emballés dans l'aluminium, on laisse agir le marquage pendant 15 minutes à température ambiante.
- Si le test de cytométrie n'est pas réalisé tout de suite, les tubes sont placés dans de la glace.

Annexe 2

Protocole de fixation des cellules après incubation pendant 24h avec des microparticules pour des observations au TEM

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre, et incubées pendant 24h en présence de microparticules. Au bout de 24h, il s'agit de figer le système en l'état par une méthode de fixation dans de la résine :

- Un fixateur contenant 2 % de glutaraldéhyde et 2 % de cacodylate est ajouté aux cellules.
- Celles-ci sont prélevées du fond des boîtes de Pétri en les grattant à l'aide d'une racle nommée « cell scriper » et insérées dans des tubes Eppendorf.
- Elles sont centrifugées, le surnageant est lavé et remplacé par de la gélatine.
- Les culots sont découpés en cubes de dimension inférieure à 1 mm³ et mis en présence d'osmium puis d'acétate d'uranyle. L'osmium a pour fonction de révéler les lipides qui composent les membranes. L'acétate d'uranyle permet quant à lui de révéler les protéines.
- Les échantillons sont ensuite progressivement déshydratés avec de l'éthanol.
- Ils sont ensuite mis en résine (23 mL d'Epoxy, 16 mL de DDSA et 13 mL de NMA) dans des tubes avec un fond de forme pyramide tronquée.
- Une fois la résine solidifiée, les échantillons sont découpés en coupe fine de 63 nm d'épaisseur avec un UltraMicrotome.
- Les coupes obtenues, de forme carrée, sont récupérées sur une grille et peuvent être observées au TEM.