

Stimulation mécanique de cellules vivantes par vibrations de particules magnétiques

Quand le magnétisme et la mécanobiologie se rencontrent
et ouvrent de nouvelles approches thérapeutiques

Bernard Dieny⁽¹⁾ (bernard.dieny@cea.fr), **Robert Morel**⁽¹⁾, **Hélène Joisten**⁽¹⁾, **Cécile Naud**⁽¹⁾,
Alice Nicolas⁽²⁾, **Andrea Visonà**^(1, 2) et **François Berger**⁽³⁾

(1) Université Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG, SPINTEC, CEA 1005, 17 avenue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9

(2) Université Grenoble Alpes, CNRS/LTM, CEA-LETI Minattec, 17 avenue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9

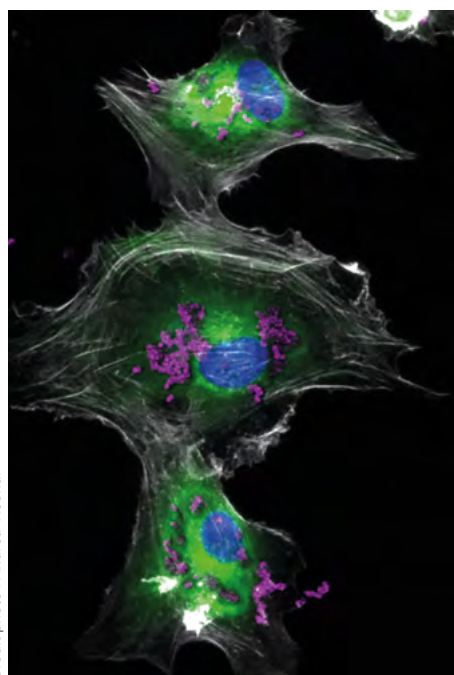
(3) Université Grenoble Alpes, INSERM/Brain Tech Lab, 2280 rue de la piscine, 38400 Saint-Martin d'Hères

Des particules magnétiques dispersées parmi des cellules vivantes et soumises à un champ magnétique variable permettent d'exercer une stimulation mécanique des cellules et d'induire des réactions physiologiques. Des études ont montré que cette stimulation mécanique à basse fréquence (entre 2 et 20 Hz) peut provoquer la mort de cellules cancéreuses et déclencher la sécrétion d'insuline de cellules de pancréas. Ce concept innovant ouvre des perspectives prometteuses liées à la mécanobiologie, notamment pour traiter des maladies comme le cancer ou le diabète, et pour la neurorégénération.

Les nanoparticules magnétiques pour le biomédical

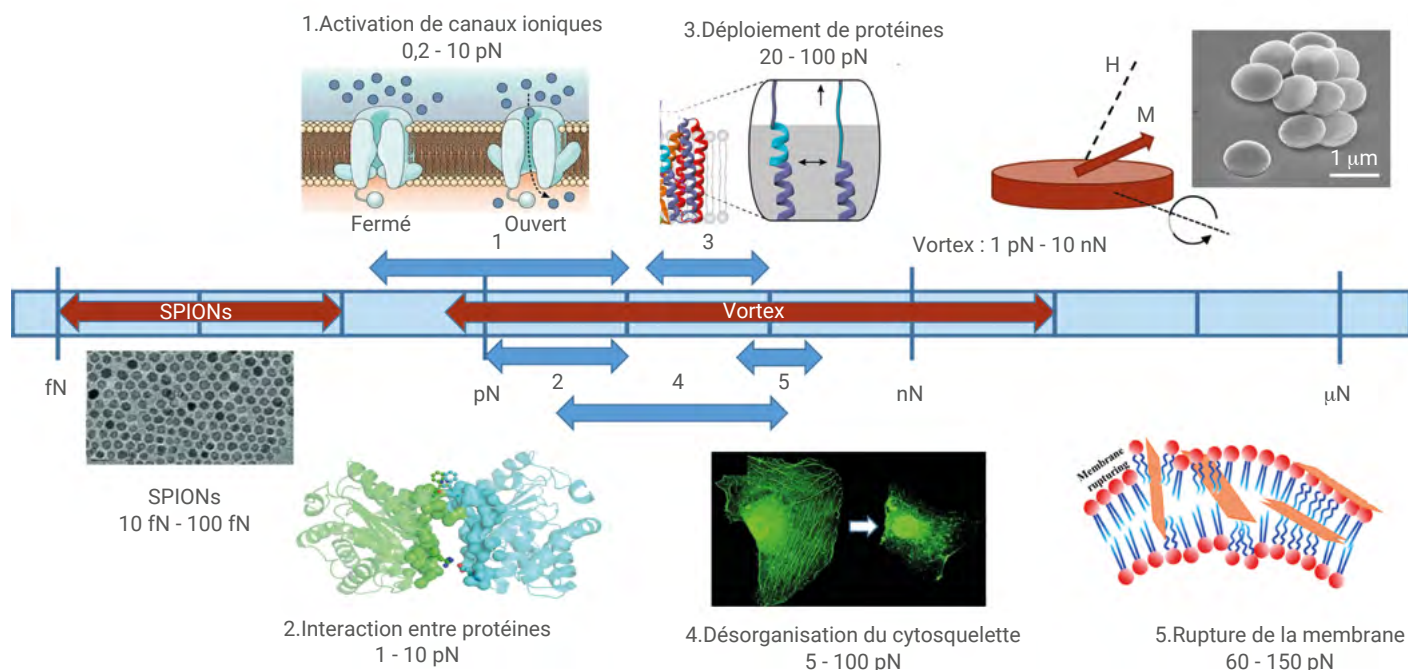
Les nanoparticules magnétiques (NPM) suscitent un intérêt croissant dans les domaines du diagnostic et de la thérapie [1]. Elles sont utilisées dans différentes techniques d'imagerie médicale, en particulier l'imagerie par résonance magnétique (IRM), car elles offrent une sensibilité accrue et une meilleure résolution spatiale par rapport aux agents de contraste traditionnels. Elles permettent la détection précoce de maladies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et les troubles neurologiques. Concernant les thérapies, des développements sont en cours sur l'hyperthermie, une approche thérapeutique contre certains cancers qui consiste à provoquer, sous l'effet d'un champ magnétique alternatif à haute fréquence (~100 kHz), l'échauffement de nanoparticules magnétiques biocompatibles dispersées parmi les cellules

cancéreuses. Cet échauffement conduit à la mort de ces dernières lorsque la température atteint ~43°C. Les travaux actuels visent à augmenter l'efficacité de chauffage des particules et à améliorer le ciblage des cellules cancéreuses pour éviter d'affecter les tissus sains. Une autre utilisation des nanoparticules magnétiques en thérapie est la délivrance ciblée de médicaments, en particulier dans le cadre de chimiothérapies. Le but est de réduire les effets secondaires des chimiothérapies en apportant les molécules toxiques du traitement seulement à la tumeur. Ceci est réalisé grâce à des nanoparticules magnétiques doublement fonctionnalisées pour, d'une part, transporter les molécules toxiques de traitement et, d'autre part, reconnaître les cellules cancéreuses. Une fois les particules à destination, le relargage local des molécules toxiques est provoqué au site de la tumeur par un effet d'échauffement des particules magnétiques sous champ



Cellules de gliome (cellules de cancer du cerveau) ayant internalisé des particules magnétiques (en rose), le noyau apparaissant en fluorescence bleue.

Crédit photo : Andrea Visonà.



1. Comparaison des gammes de forces impliquées dans différents phénomènes biologiques et de celles pouvant être créées par des SPIONs et par des particules mésoscopiques anisotropes comme par exemple les microdisques en vortex magnétiques. Pour la stimulation magnéto-mécanique des cellules, les particules anisotropes mésoscopiques semblent plus appropriées que les SPIONs qui génèrent des forces trop faibles du fait de leur taille nanométrique.

alternatif. Les nanoparticules les plus utilisées jusqu'à présent sont des nanoparticules d'oxyde de fer (magnétite Fe_3O_4) appelées SPIONs pour *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*. Ces particules, dont la taille varie de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres, sont biocompatibles et approuvées par les agences de médicaments pour une utilisation dans le corps humain. Leur caractère superparamagnétique signifie qu'elles possèdent une aimantation nulle à champ nul pour éviter leur agglomération une fois dispersées en solution ou dans des tissus, mais qu'elles sont facilement polarisables sous champ magnétique.

Stimulation magnéto-mécanique des cellules

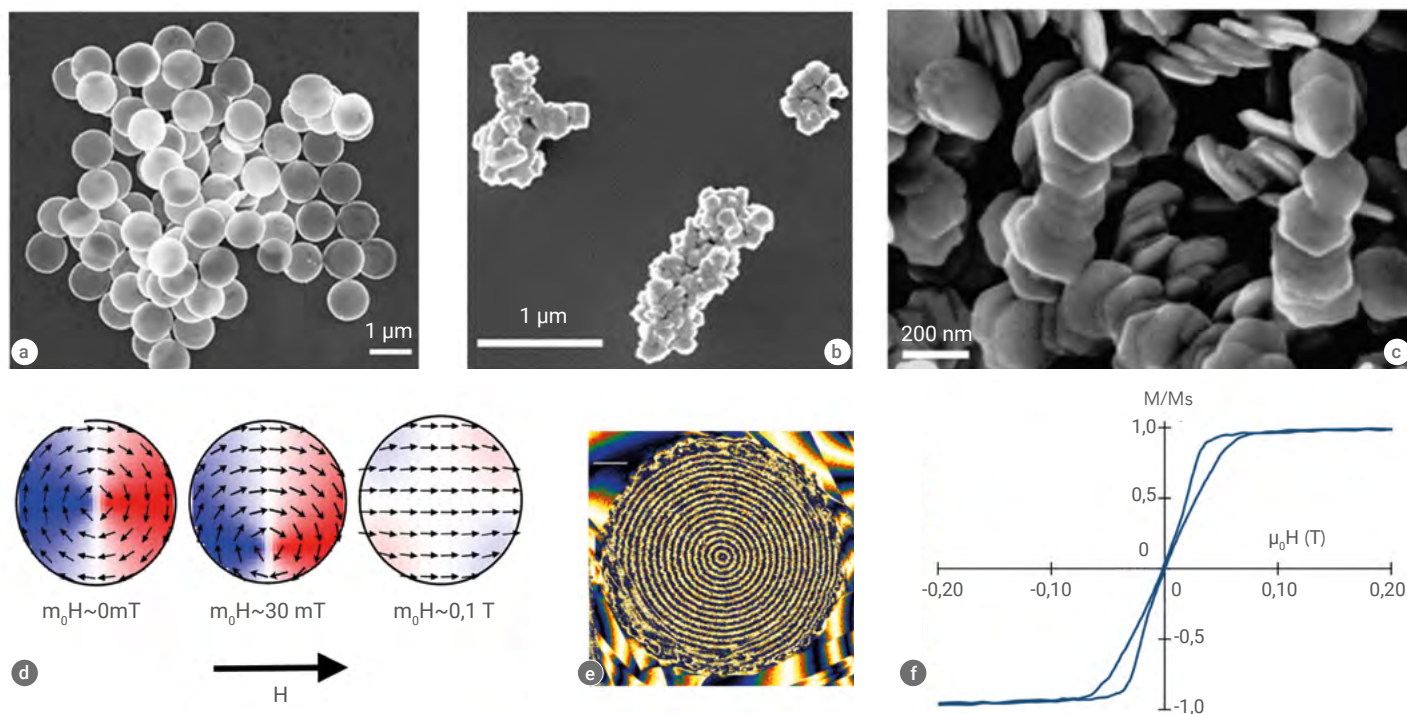
Plus récemment (depuis 2010 environ), d'autres approches thérapeutiques contre le cancer et le diabète et pour la neuro-régénération ont émergé, basées sur la stimulation mécanique des cellules sous l'effet de la vibration à basse fréquence de particules magnétiques dispersées parmi

les cellules [2]. Un apport majeur du magnétisme dans ces approches est de pouvoir contrôler de manière non-invasive l'intensité du stress mécanique exercé sur les cellules en jouant sur les caractéristiques du champ magnétique appliqué (fréquence, amplitude, direction). Ce niveau de stress permet de déclencher différents types de réactions cellulaires, de façon différenciée selon la nature des cellules. Ces nouvelles approches thérapeutiques basées sur la stimulation magnéto-mécanique des cellules constituent l'objet de cet article.

Pour ces applications, les particules SPIONs utilisées jusqu'à présent en biotechnologies magnétiques ne sont pas les plus appropriées car les forces qu'elles peuvent générer sont très faibles du fait de leur taille nanométrique. La figure 1 compare les forces impliquées dans différents processus biologiques avec les forces susceptibles d'être générées par les SPIONs en utilisant des champs magnétiques facilement accessibles en laboratoire ou hôpital (gamme de champ de 10 mT à 1 T). Les forces impliquées dans les processus biologiques sont dans la gamme du pico-

newton (pN) à la centaine de pN. Or, les forces générées par les SPIONs sont plutôt de l'ordre de la dizaine ou centaine de fN. Pour générer des forces supérieures, il est donc préférable d'utiliser des particules plus grosses et magnétiquement anisotropes. Ceci permet de mettre en mouvement la particule par un changement de direction du champ magnétique (par exemple grâce à un champ tournant) alors qu'une particule isotrope ne peut être mise en mouvement que par un gradient de champ magnétique, lequel diminue très vite en fonction de la distance à la source du champ. Une façon commode de rendre une particule magnétiquement anisotrope est de lui donner une forme non sphérique, par exemple une forme de disque. Pour des raisons magnéto-statiques, l'aimantation préfère rester dans le plan de la particule de sorte que si un champ magnétique est appliqué hors du plan de la particule, celle-ci tend à se réorienter pour aligner son plan avec la direction du champ. Les expériences présentées dans cet article ont été réalisées avec des particules en forme de microdisques de 1,3 micron de diamètre et 60 nm d'épaisseur

>>>



2. Différents types de particules anisotropes imitant le superparamagnétisme, pouvant être utilisées pour la stimulation magnéto-mécanique des cellules.

- a) Microdisques de Permalloy ($\text{Ni}_{80}\text{Fe}_{20}$) enrobés d'or.
- b) Particules microniques de magnétite (Fe_3O_4) obtenues par broyage de poudre.
- c) Particules mésoscopiques de magnétite obtenues par synthèse chimique [3].
- d) Représentation schématisée de l'évolution de la configuration micromagnétique d'une particule microdisque magnétique avec en particulier sa configuration de vortex magnétique à champ magnétique nul. Les flèches représentent la direction locale de l'aimantation de la particule. Le code couleur est associé à la composante planaire de l'aimantation transverse au champ magnétique appliqué. À champ nul, la symétrie cylindrique de la configuration en vortex fait que le moment magnétique global de la particule est nul.
- e) Imagerie par holographie électronique (crédit A. Masseboeuf) d'une particule en vortex en champ nul montrant la configuration cylindrique de l'aimantation de la particule.
- f) Cycle d'hystérésis des particules microdisques (aimantation en fonction du champ appliqué dans le plan des particules). Ce cycle est très reproductible même répété « à l'infini ».

>>>

d'alliage ferromagnétique de Permalloy ($\text{Ni}_{80}\text{Fe}_{20}$) (fig. 2a). Ces particules permettent de générer des forces de l'ordre du pN à la dizaine de nN couvrant la gamme des forces impliquées dans beaucoup de processus biologiques.

Ces particules sont enrobées d'une couche de 10 nm d'or pour les rendre biocompatibles grâce au caractère chimiquement inerte de l'or et facilement fonctionnalisables, par exemple pour les rendre fluorescentes ou pour cibler des cellules spécifiques. Elles sont aussi conçues de sorte que leurs propriétés magnétiques imitent un comportement superparamagnétique, comme les SPIONs, pour éviter leur agglomération une fois dispersées en solution ou dans des tissus.

C'est le cas des microdisques de NiFe (fig. 2a) qui possèdent une configuration micromagnétique dite « en vortex » en champ nul comme cela est schématisé sur

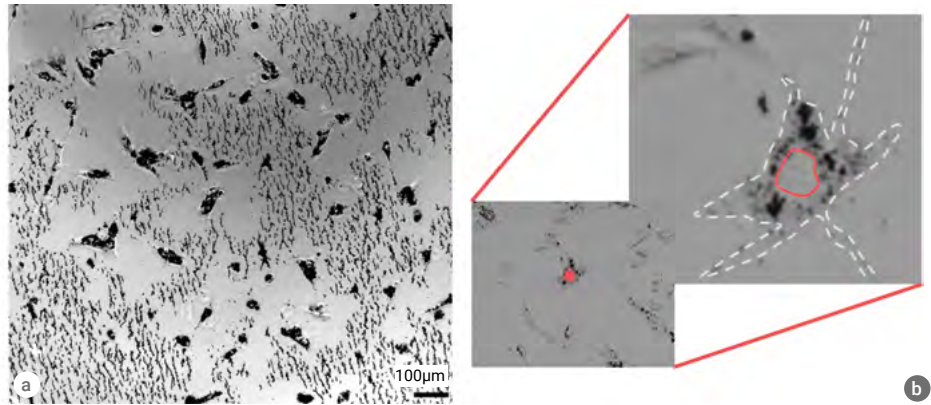
la figure 2d et une forte polarisabilité sous champ (fig. 2f). D'autres types de particules peuvent aussi être utilisées comme cela est illustré sur les figure 2b et 2c : il s'agit de particules de magnétite de beaucoup plus grande taille que les SPIONs. Celles de la figure 2b sont obtenues par broyage mécanique de poudre de magnétite (mécanosynthèse) ; celles de la figure 2c sont réalisées par synthèse chimique de particules d'hématite (Fe_2O_3) réduites ensuite sous hydrogène en magnétite [3]. L'avantage de ces deux dernières techniques de fabrication est de permettre une production en grande quantité de ces particules en vue de futures applications biomédicales, alors que les particules microdisques, produites par des technologies de salle blanche (lithographie, dépôt, *lift-off*) ne sont produites qu'en faible quantité (quelques mg par substrat).

Études *in vitro* de la stimulation magnéto-mécanique de cellules cancéreuses

La non-toxicité de ces différentes particules a été vérifiée sur des cellules de gliome appelées U87 (tumeur de cancer du cerveau) par différents tests qui vérifient le bon fonctionnement métabolique des cellules et l'intégrité de leur membrane. Ces tests ont confirmé la non-toxicité des particules magnétiques jusqu'à des concentrations 50 fois supérieures à celles utilisées dans les expériences de stimulation magnéto-mécanique des cellules. Non seulement les particules magnétiques ne sont pas toxiques du point de vue chimique pour les cellules, mais les cellules U87 sont avides de ces particules comme cela est illustré par la figure 3. En boîte de Petri, après 12h

d'incubation des cellules en présence des particules, il apparaît que les cellules ont absorbé toutes les particules rencontrées dans leur zone d'exploration. De plus, dans ces expériences *in vitro* en fond de boîte de Petri, au bout de 48h, la plupart des particules ont été internalisées dans les cellules malgré leur taille micronique.

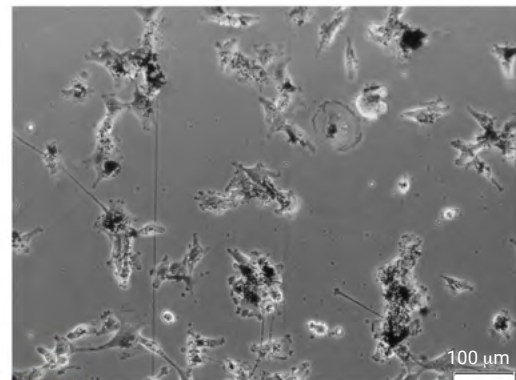
Une fois les particules magnétiques au contact des cellules cancéreuses, ou même internalisées, un champ magnétique tournant à basse fréquence (typiquement entre 2 et 20 Hz, amplitude 400 mT, durée d'exposition 30 à 45 minutes) est appliqué à la culture cellulaire grâce à un système d'aimants permanents en rotation. Le champ tournant met en vibration les particules magnétiques qui, au contact des cellules, stimulent mécaniquement ces dernières. L'effet de cette stimulation magnétique sur les cellules cancéreuses U87 est radical, comme l'illustre la figure 4. Plus de 80% des



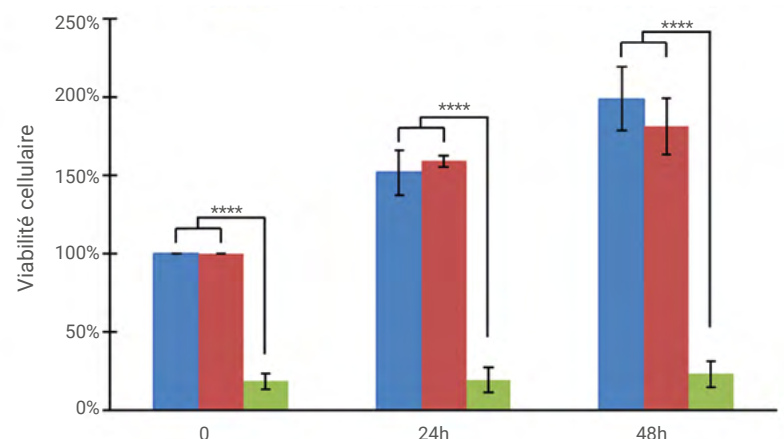
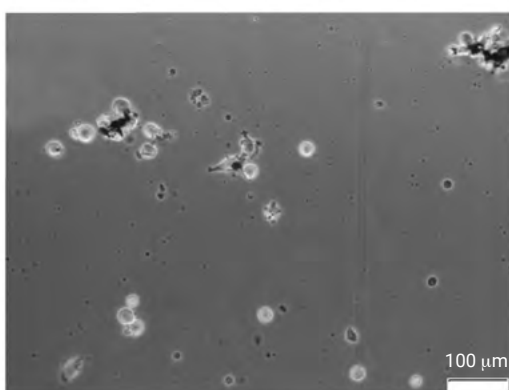
3. Non-toxicité des particules microdisques magnétiques recouvertes d'or pour les cellules cancéreuses U87 (cellules gliomes de cancer du cerveau) en l'absence de champ magnétique appliqué.

a) Les cellules cancéreuses U87 ont été incubées pendant 24 h avec les particules (en noir) en boîte de Petri. Les cellules apparaissent quasiment transparentes au centre des zones dégagées de particules mais sont en fait recouvertes d'amas de particules (noires). Ceci indique que les cellules U87 sont très « friandes » des particules magnétiques et les absorbent sur toute la zone explorée par les cellules en 24h.

b) Zoom sur une cellule de taille de l'ordre de 30 μm . Dans ces expériences *in vitro*, au bout de 48 h, les particules sont internalisées par les cellules. Les tirets blancs soulignent la membrane de la cellule. Le cercle rouge indique le noyau de la cellule. Les particules pénètrent à l'intérieur de la cellule mais pas dans le noyau.



a b
c d



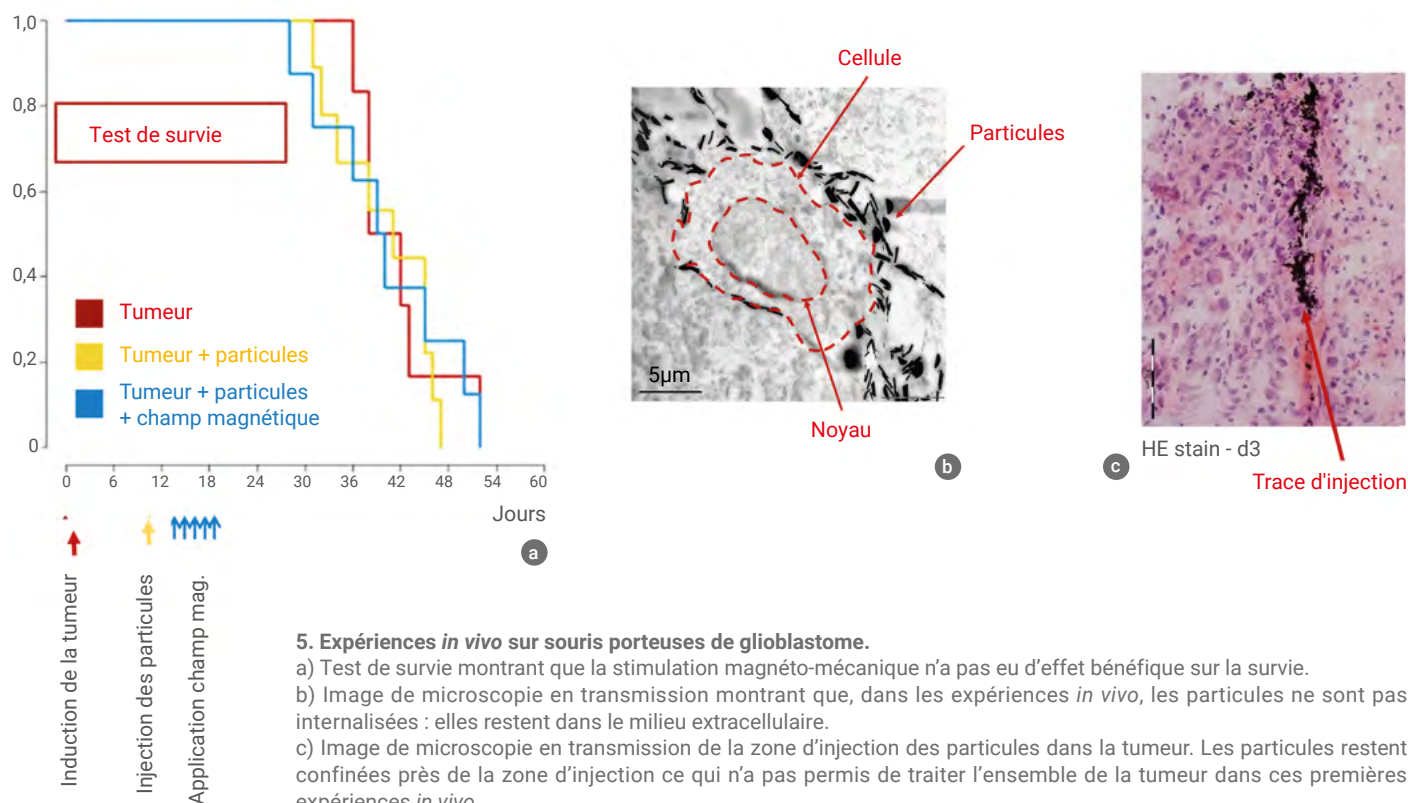
4. Tests *in vitro* de stimulation magnéto-mécanique de cellules de gliome U87.

a) Échantillon de contrôle : cellules seules.

b) Échantillon de contrôle : cellules + particules magnétiques.

c) Échantillon cellules + particules magnétiques (100 mg/ml) + champ magnétique alternatif (20 Hz, 400 mT, 45 min.)

d) Évolution du nombre de cellules viables, juste après le traitement magnéto-mécanique puis 24 h et 48 h après : barres bleues = contrôle cellules seules (a) ; barres rouges = cellules + particules (b) ; barres vertes = cellules + particules + champ magnétique tournant (c). Noter que les cellules des contrôles continuent à proliférer (le nombre de cellules croît après 24 h et 48 h) alors que le traitement magnéto-mécanique stoppe la prolifération pendant au moins 48 h.



>>>

cellules cancéreuses ont été détruites par la stimulation magnéto-mécanique (fig. 4d, barres vertes). De plus, il apparaît que les cellules survivantes sont devenues quasi sphériques (fig. 4c), ce qui traduit une profonde altération de leur cytosquelette. On observe également que les cellules survivantes cessent de proliférer pendant au moins 2 jours après traitement alors que les cellules non stimulées prolifèrent normalement (fig. 4a et barres bleues de la fig. 4d ; fig. 4b et barres rouges de la fig. 4d). Le traitement magnéto-mécanique peut être répété plusieurs fois à quelques jours d'intervalle pour continuer de détruire les cellules cancéreuses survivantes. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant les particules de magnétite préparées par broyage mécanique, ainsi que sur différents types de cellules cancéreuses (glioblastome, cancer rénal, mélanome) [2].

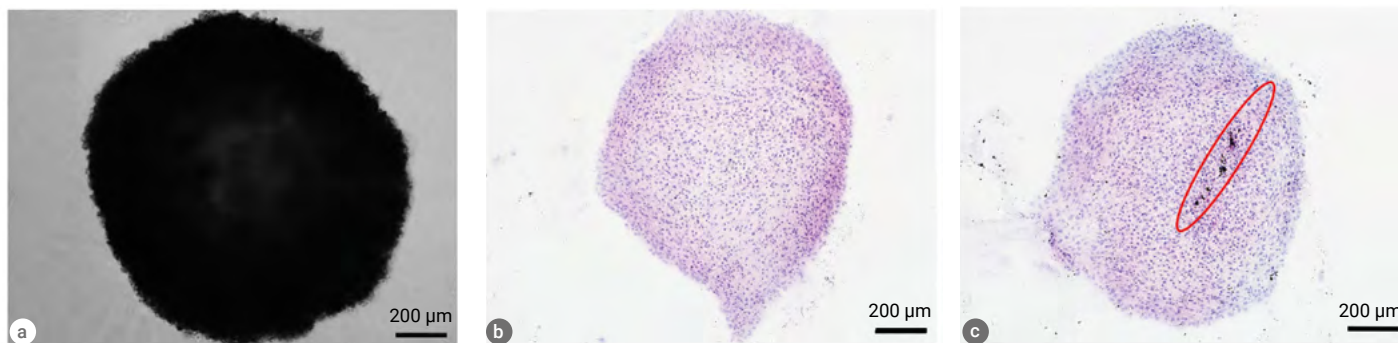
Premières études *in vivo*

Fort de ces résultats très encourageants *in vitro*, des expériences ont été conduites *in vivo* sur des souris porteuses de glioblastome. Les expériences ont consisté à

injecter les particules magnétiques dans la tumeur à l'aide d'une seringue, puis à appliquer le champ magnétique tournant, une fois par jour pendant 5 jours. Hélas, en suivant ce protocole expérimental, les résultats en termes de survie n'ont pas montré de bénéfice lié à la stimulation magnéto-mécanique (fig. 5a).

Les analyses qui ont suivi ont permis de comprendre l'origine des différences entre expériences *in vitro* et *in vivo*. D'une part, les particules ont faiblement diffusé dans le volume de la tumeur, de sorte que seule la zone au plus près de la trace d'injection des particules a été traitée par la stimulation mécanique (fig. 5c). De ce fait, la tumeur a continué de croître par sa périphérie. D'autre part, il a été observé que, dans ces expériences *in vivo*, les particules ne sont pas internalisées mais restent confinées dans le milieu extra-cellulaire, ce qui constitue une forte différence par rapport aux expériences *in vitro* (voir le contraste entre la fig. 3d et la fig. 5b) et peut réduire l'efficacité de la stimulation magnéto-mécanique. Ceci souligne l'importance du micro-environnement, et notamment de sa rigidité et de son hétérogénéité, dans ces expé-

riences. Il est probable que des particules plus petites, comme celles de la figure 2c (disques hexagonaux de 200 nm environ), seront plus facilement internalisées *in vivo* que les microdisques de 1,3 micron de diamètre. Leurs dimensions devraient suffire pour produire les forces permettant de déclencher la mort des cellules cancéreuses. Concernant la dispersion des particules dans la tumeur, une solution envisageable consisterait à appliquer sur la zone péri-tumorale, lors de l'ablation de la tumeur, un gel biocompatible chargé en particules magnétiques. L'application du champ tournant permettrait alors de traiter plus efficacement cette zone péri-tumorale, siège habituel de l'invasion cancéreuse. La stimulation magnéto-mécanique pourrait être aussi appliquée en synergie avec un traitement de chimiothérapie. En effet, la contraction cellulaire résultant de la stimulation (fig. 4c) implique que les cellules survivantes adoptent un comportement individualisé alors qu'habituellement les cellules cancéreuses interagissent – les fortes aidant les faibles – et développent collectivement une résistance aux traitements chimiothérapeutiques. L'efficacité



6. Sphéroïde de cellules cancéreuses de gliome prélevées par biopsie sur patient atteint de cancer du cerveau.

(a) Image en microscopie optique.

(b) Image en microscopie après marquage coloré faisant ressortir les noyaux des cellules.

(c) Organoïde dans lequel ont été injectées des particules microdisques magnétiques grâce à une seringue (zone d'injection entourée en rouge).

de la chimiothérapie pourrait donc être augmentée par synergie avec la stimulation magnéto-mécanique des cellules.

Nécessité de développer des modèles *in vitro* plus proches de l'*in vivo*

Les différences très nettes observées entre les expériences *in vitro* à 2 dimensions en boîte de Petri et les expériences *in vivo* ont montré qu'il est primordial de trouver un modèle *in vitro* plus proche des conditions *in vivo*. Un tel modèle a été mis au point sous la forme de sphéroïdes qui sont des amas auto-organisés de cellules (pouvant être humaines) présentant des textures proches

des tissus biologiques. Ces assemblages cellulaires à 3 dimensions peuvent être obtenus en cultivant les cellules pendant quelques jours dans des tubes à fond en U à faible adhésion. La figure 6 montre à titre d'exemple un sphéroïde de cellules de gliome.

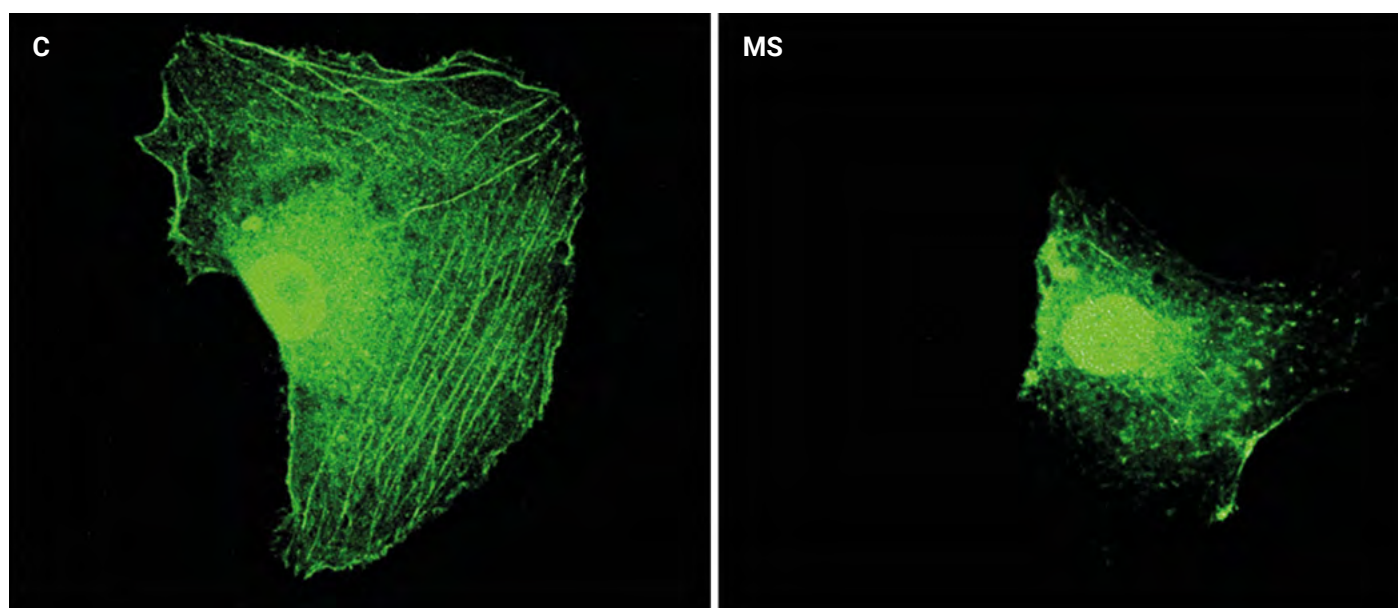
Une fois le sphéroïde formé, il est possible d'y injecter les particules magnétiques à l'aide d'une seringue (fig. 6c) et d'appliquer la stimulation magnéto-mécanique comme dans les conditions *in vivo*. L'avantage est que le microenvironnement est ici plus proche de celui rencontré *in vivo*. En effet, la texture et l'organisation des cellules dans ces sphéroïdes est très proche de celles des tissus biologiques ce qui rend ces

modèles *in vitro* très pertinents pour ce type d'études avant passage à l'*in vivo*.

Les expériences sur sphéroïdes permettent de tester *in vitro* de nombreux paramètres tels que la concentration de particules et les caractéristiques du champ magnétique de stimulation (intensité, fréquence) tout en permettant une observation plus facile des réactions cellulaires. Elles permettent aussi de travailler sur des cellules humaines prélevées par biopsie sur des patients atteints de cancer. Elles évitent également une grande part du recours à l'expérimentation animale.

Ces expériences ont démontré le fort impact de la stimulation sur le cytosquelette des cellules (fig. 7). Ce dernier est constitué

>>>



7. Illustration de la désorganisation du cytosquelette suite à la stimulation magnéto-mécanique (C = échantillon de contrôle non stimulé, MS = après stimulation magnéto-mécanique). Les fibres d'actine clairement visibles sur l'échantillon de contrôle ont totalement disparu après stimulation et la cellule s'est fortement contractée.



la stimulation magnéto-mécanique de cellules ouvre à la fois un champ d'études fondamentales très intéressantes dans le cadre de la mécanobiologie et de prometteuses perspectives d'applications biomédicales.



de protéines fibreuses présentes dans le cytoplasme (colorées en vert sur la fig. 7C obtenue avant stimulation). Son rôle principal est de fournir une structure à la cellule, et de participer à des processus cellulaires essentiels tels que la division, la migration, le transport intracellulaire et la signalisation cellulaire. La stimulation magnéto-mécanique des cellules provoque une forte désorganisation du cytosquelette (voir la figure 7MS après stimulation comparée à la figure 7C qui correspond au contrôle avant stimulation). Cette désorganisation du cytosquelette explique pourquoi les cellules se contractent, deviennent quasi sphériques (fig. 4c) et cessent de se reproduire pendant un certain temps après stimulation mécanique (fig. 4d).

Selon l'intensité de la stimulation mécanique, différents effets peuvent être observés. Une faible stimulation provoque seulement une contraction temporaire de la cellule s'accompagnant d'une perte de la capacité à migrer (la motilité) et d'un arrêt temporaire de la division cellulaire (la mitose). Une stimulation plus forte peut déclencher la mort spontanée de la cellule par apoptose. L'apoptose est un processus de mort cellulaire naturelle par lequel les cellules se divisent en petits corps apoptotiques qui sont absorbés par les macro-

phages. C'est le processus qui permet à nos vieilles cellules mourantes d'être éliminées du corps. Ce processus ne produit pas de débris cellulaires. Une stimulation encore plus forte peut déchirer la membrane cellulaire et provoquer sa nécrose. Ce dernier régime n'est pas souhaitable car il génère des débris cellulaires, sources d'inflammation et de possibles métastases dans le cas de cellules cancéreuses. Les seuils entre ces différents régimes dépendent de la nature des cellules. Par exemple, les cellules de gliome sont plus sensibles à la stimulation mécanique que des cellules saines car elles présentent sur leur membrane de nombreux canaux mécano-transducteurs PIEZO 1. Sous l'effet de la stimulation mécanique, ces canaux s'ouvrent et génèrent un flux entrant de calcium dans le cytoplasme déclenchant l'apoptose de la cellule. Les cellules saines, qui possèdent moins de canaux PIEZO 1, sont moins sensibles à la stimulation mécanique. Cette différence devrait permettre de trouver des conditions de stimulation détruisant les cellules cancéreuses sans affecter de façon durable les cellules saines. C'est ce type de conditions que l'on recherche en travaillant *in vitro* sur sphéroïdes avant passage à *in vivo*.

Utilisation de la stimulation magnéto-mécanique de cellules pour d'autres pathologies : exemple du diabète

Cet article a jusque-là décrit l'effet de la stimulation magnéto-mécanique dans le cadre du cancer mais celle-ci peut trouver d'autres applications dans le domaine du diabète ou de la neurodégénérescence. Ainsi notre équipe a montré que la stimulation magnéto-mécanique de cellules pancréatiques peut entraîner une sécrétion d'insuline ce qui peut se révéler très intéressant dans le contexte de certaines formes de diabète [4]. En effet, le pancréas a pour fonction de réguler la glycémie dans le sang en produisant de l'insuline, une hormone qui favorise la pénétration du glucose dans les cellules, lequel sert ensuite à la production de l'énergie dont les cellules ont besoin. Dans une première expérience, nous avons d'abord contrôlé que des cellules de pancréas exposées à une solution de

glucose produisent de l'insuline, ce qui correspond à leur fonctionnement normal. Dans une deuxième expérience, nous avons exposé ces mêmes cellules à la vibration magnéto-mécanique de particules microdisques magnétiques dispersées parmi les cellules. Nous avons observé que cette stimulation mécanique provoquait la sécrétion d'insuline par les cellules, même en l'absence de glucose. En induisant la sécrétion d'insuline par des moyens physiques plutôt que chimiques, cette méthode pourrait offrir une alternative innovante pour contrôler la glycémie et améliorer la qualité de vie de certains patients diabétiques de type 2.

En conclusion, la stimulation magnéto-mécanique de cellules ouvre à la fois un champ d'études fondamentales très intéressantes dans le cadre de la mécanobiologie et de prometteuses perspectives d'applications biomédicales. Ces perspectives sont à explorer dans le cadre du cancer, du diabète et potentiellement d'autres maladies telles que les maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives. ■



1. Antony V. Samrot *et al.*, A review on synthesis, characterization and potential biological applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *Current Research in Green and Sustainable Chemistry* **4** (2021) 100042 ; <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2020.100042>.
2. Cécile Naud *et al.*, Cancer treatment by magneto-mechanical effect of particles, a review, *Nanoscale Adv.* **2** (2020) 3632-3655 ; <https://doi.org/10.1039/D0NA00187B>
3. Danijela Gregurec *et al.*, Magnetic Vortex Nanodiscs Enable Remote Magnetomechanical Neural Stimulation, *ACS Nano* **14** (2020) 8036-8045; <https://dx.doi.org/10.1021/acsnano.0c00562>
4. Svetlana Ponomareva *et al.*, Magnetic particles for triggering insulin release in INS-1E cells subjected to a rotating magnetic field, *Nanoscale* **14** (2022) 13274; <https://doi.org/10.1039/D2NR02009B>