

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Détection de l'activité cérébrale par des nanoparticules
superparamagnétiques d'oxide de fer**

PIERRE-OLIVIER CHAMPAGNE

Institut de génie biomédical

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de *Philosophiae Doctor*

Génie biomédical

Mai 2020

POLYTECHNIQUE MONTREAL

affiliée à l'Université de Montréal

Cette thèse intitulée :

**Détection de l'activité cérébrale par des nanoparticules
superparamagnétiques d'oxide de fer**

présentée par **Pierre-Olivier CHAMPAGNE**

en vue de l'obtention du diplôme de *Philosophiae Doctor*

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

Frédéric LESAGE, président

Mohamad SAWAN, membre et directeur de recherche

Alain BOUTHILLIER, membre et codirecteur de recherche

Sylvain MARTEL, membre

David FORTIN, membre externe

DÉDICACE

À Judith

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier toutes les personnes sans qui ces travaux auraient pu être menés à bien, à commencer par toute l'équipe du laboratoire d'électrophysiologie de l'hôpital Sainte-Justine et notamment de Nathalie Sanon pour son aide précieuse avec le modèle animal et les enregistrements électrophysiologiques. Je souhaite également remercier le centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal et Philippe Pouliot pour son aide avec l'IRM expérimental. Je souhaite aussi remercier mon co-directeur le Dr Alain Bouthillier pour son support ainsi que le laboratoire Polystim et mon directeur de thèse le Pr Mohamad Sawan pour son soutien maintenu et ses précieux conseils tout au long du processus.

RÉSUMÉ

La détection précise des régions du cerveau abritant une activité électrique accrue joue un rôle central dans la compréhension et le traitement de maladies telles que l'épilepsie. Parallèlement à l'activité électrique, le cerveau produit des champs magnétiques à partir de l'activité électrique neuronale. Cette étude explore une nouvelle méthode de détection de l'activité cérébrale basée sur l'agrégation de nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer (NPSOF) par les champs magnétiques neuronaux. Les nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer (NPSOF) peuvent réagir aux champs magnétiques en s'agréant et représentent un potentiel candidat en tant que nouvel indicateur de l'activité neuronale.

Nous avons émis l'hypothèse que les NPSOF à proximité de tissus cérébraux actifs s'agréeraient proportionnellement à l'activité électrique neuronale. Nous avons également supposé que cette agrégation pourrait être détectée en utilisant l'imagerie par résonance magnétique (IRM), une modalité sensible aux changements de susceptibilité magnétique. Nous avons utilisé une approche expérimentale par étapes, prouvant d'abord le concept en utilisant des tranches de cerveau de rats gardées actives et en observant l'agrégation en direct sous microscopie. Nous avons ensuite utilisé un modèle similaire de tranches de cerveau de rats *in vitro* avec une activité réglable. Dans cette deuxième partie des expérimentations, après exposition à divers degrés d'activité, l'agrégation a été évaluée en utilisant l'IRM et la diffusion dynamique de la lumière (Dynamic light scattering, - DLS). Nous avons ensuite réalisé une première étude de faisabilité dans un modèle de rat épileptique *in vivo*.

Nous avons constaté que l'augmentation de l'activité des tranches de cerveau était associée à des niveaux plus élevés d'agrégation mesurés par DLS, ce qui suggère que les champs magnétiques générés par le tissu neuronal pourraient induire une agrégation des NPSOF à proximité. Nous avons également constaté que les changements liés à l'agrégation des NPSOF peuvent modifier le signal IRM (temps de relaxation T_2), permettant une détection de l'agrégation non invasive combinée à la résolution spatiale et aux capacités d'imagerie de l'IRM. Dans les expériences *in vivo*, l'activité

cérébrale a été associée à une agrégation de NPSOF lorsque évaluée par IRM. Par contre, le modèle animal *in vivo* s'est démontré sous-optimal pour confirmer si l'activité épileptique peut engendrer une agrégation plus importante de NPSOF par rapport à l'activité cérébrale normale.

Ces travaux confirment le potentiel des NPSOF pour détecter l'activité épileptique cérébrale. Les changements de signal à l'IRM induits par l'agrégation de NPSOF peuvent s'avérer un outil puissant pour la détection de l'activité électrique du cerveau à l'aide de NPSOF.

ABSTRACT

Precise detection of brain regions harbouring heightened electrical activity plays a central role in the understanding and treatment of diseases such as epilepsy. Along with electrical activity, the brain produces magnetic fields from neuronal electrical activity. We explore in this thesis a new method of detection of electrical brain activity based on the aggregation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) under neuronal magnetic fields. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) can react to magnetic fields by aggregating and represent an interesting new candidate to monitor neuronal activity.

We hypothesized that SPIONs in close vicinity to active brain tissue would aggregate proportionally to the neuronal electrical activity. We also supposed that this aggregation could be detected using magnetic resonance imaging (MRI), a modality that is sensitive to changes in magnetic susceptibility. We used a stepwise experimental approach, first proving the concept of aggregation in living rats brain slices. We then used an *in vitro* rats brain slices model with adjustable activity. In that second portion of the experimentations, after exposure to various degree of activity, aggregation was assessed using MRI and dynamic light scattering (DLS). We finally performed a first feasibility study in an *in vivo* epileptic rat model.

We found that increasing brain slice activity was associated with higher levels of aggregation as measured by dynamic light scattering (DLS), suggesting that the magnetic fields generated by neuronal tissue could induce aggregation in nearby SPIONs in solution. We further found that the aggregation-related changes in SPIONs solutions can change the MRI signal (T_2 relaxation time), allowing non-invasive aggregation detection combined to the spatial resolution and imaging capabilities of MRI. In the *in vivo* experiments, brain activity was associated with increased aggregation as assessed with MRI, but the animal model was suboptimal to confirm if epileptic activity can be differentiated from normal brain activity using SPIONs.

This work confirms the potential of SPIONs to serve as a sensor of brain epileptic activity. MRI signal change induced by SPIONs aggregation can serve as a powerful tool for detection of brain electrical activity using SPIONs.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XVI
LISTE DES FIGURES.....	XVII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIX
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 L'activité cérébrale.....	1
1.1.1 Le neurone et le potentiel d'action.....	1
1.1.2 Activité électrique cérébrale.....	3
1.1.3 Activité magnétique cérébrale.....	4
1.1.4 Devis de mesure de l'activité cérébrale.....	6
1.2 L'épilepsie.....	12
1.2.1 Définitions.....	12
1.2.2 Chirurgie de l'épilepsie et localisation du foyer épileptique.....	13
1.3 Les nanoparticules superparamagnétiques d'oxide de fer.....	14
1.3.1 Nanoparticules d'oxide de fer	14
1.3.2 Superparamagnétisme	14
1.3.3 Utilisation actuelle des NPSOF dans l'épilepsie.....	18
1.4 Problématique.....	19

1.5	Objectifs et hypothèses.....	21
1.5.1	Objectif général	21
1.5.2	Objectifs spécifiques	22
1.5.3	Hypothèses	23
CHAPITRE 2 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE		24
2.1	Déterminants de la stabilité colloïdale des NPSOF	24
2.1.1	Mouvements Browniens.....	24
2.1.2	Flot hydrodynamique	25
2.1.3	Concentration	25
2.1.4	Forces de Van der Waals	25
2.1.5	Forces électrostatiques	25
2.1.6	Forces stériques.....	26
2.1.7	Forces magnétiques.....	26
2.1.8	Forces d'hydratation.....	26
2.1.9	Mesure de l'agrégation d'une suspension de NPSOF.....	27
2.2	Potentiel des champs magnétiques cérébraux pour induire l'agrégation de NPSOF à proximité	28
2.2.1	Effet des champs magnétiques cérébraux sur l'efficacité des collisions de NPSOF	29
2.2.2	Mouvements des NPSOF secondaires aux gradients des champs magnétiques cérébraux	33
2.2.3	Stabilité des NPSOF en regard de l'activité épileptique.....	36
2.2.4	Influence des champs magnétiques externes.....	39
2.3	Potentiel de l'IRM dans la détection de l'agrégation de NPSOF.....	41
2.3.1	Bases du fonctionnement de l'IRM.....	41
2.3.2	La relaxation.....	43

2.3.3	Influence de l'agrégation de NPSOF sur le signal de l'IRM	46
CHAPITRE 3 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE.....		49
3.1	Phase initiale: revue de la littérature et article de revue.....	49
3.1.1	Description de l'article	49
3.1.2	Statut actuel	49
3.1.3	Rôle de l'article par rapport aux objectifs	50
3.1.4	Influence sur les étapes futures	50
3.2	Première phase expérimentale: preuve de concept	51
3.2.1	Description de l'article	51
3.2.2	Statut actuel	51
3.2.3	Rôle de l'article par rapport aux objectifs	51
3.2.4	Influence sur les étapes futures	52
3.3	Deuxième phase expérimentale : modèle animal <i>in vitro</i>	52
3.3.1	Description de l'article	52
3.3.2	Statut actuel	52
3.3.3	Rôle de l'article par rapport aux objectifs	52
3.3.4	Influence sur les étapes futures	53
3.4	Troisième phase expérimentale: modèle animal <i>in vivo</i>	53
3.4.1	Description de l'article	53
3.4.2	Statut actuel	53
3.4.3	Rôle de l'article par rapport aux objectifs	54
3.4.4	Influence sur les étapes futures	54
CHAPITRE 4 ARTICLE 1 (COMPLÉMENT DE REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE): COLLOIDAL STABILITY OF SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM: A REVIEW		55

4.1	Abstract	55
4.2	Introduction	55
4.3	Determinants of colloidal stability of SPION in the CNS	57
4.3.1	Brownian motion.....	58
4.3.2	Hydrodynamic flow.....	60
4.3.3	Concentration	60
4.3.4	Van der Walls forces	61
4.3.5	Electrostatic forces	61
4.3.6	Steric forces and coating	64
4.3.7	Magnetic forces	68
4.3.8	Hydration forces	70
4.4	Implications of colloidal stability of SPIONs in the CNS	71
4.4.1	Delivery of SPIONs to the CNS.....	71
4.4.2	Stay of SPIONs in the CNS.....	74
4.4.3	Elimination of SPIONs from the CNS	76
4.5	Conclusion.....	77
4.6	Future perspective	77
4.7	Executive summary	77
CHAPITRE 5 ARTICLE 2: BEHAVIOR OF SUPERPARAMAGNETIC NANOPARTICLES IN REGARD OF BRAIN ACTIVITY – A PROOF OF CONCEPT		79
5.1	Abstract	79
5.2	Introduction	79
5.3	Objectives.....	80
5.4	Hypothesis.....	80
5.5	Methods.....	81

5.6	Results	83
5.7	Discussion	85
CHAPITRE 6 ARTICLE 3: INFLUENCE OF NEURONAL ACTIVITY ON SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES STABILITY		88
6.1	Abstract	88
6.2	Introduction	89
6.2.1	Objective	90
6.3	Methods	91
6.3.1	Nanoparticles preparation	91
6.3.2	Brain slice preparation and electrophysiology recording.....	93
6.3.3	Dynamic light scattering measurements	94
6.3.4	Magnetic resonance imaging relaxivity measurements	95
6.3.5	Statistical analysis	95
6.4	Results	96
6.4.1	Neuron viability and electrophysiology recording (Fig. 6.3).....	96
6.4.2	DLS measurements (Fig. 6.4)	98
6.4.3	MRI relaxivity measurements (Fig. 6.4)	99
6.5	Discussion	101
6.5.1	DLS measurements	102
6.5.2	MRI relaxivity measurements	103
6.5.3	Limitations of the <i>in vitro</i> slice model	106
6.6	Conclusion.....	107
CHAPITRE 7 ARTICLE 4: FEASIBILITY OF IMPLANTABLE IRON OXIDE NANOPARTICLES IN DETECTING BRAIN ACTIVITY – INITIAL EXPERIENCE IN A RAT MODEL.....		108

7.1	Abstract	108
7.1.1	Background	108
7.1.2	Methods	108
7.1.3	Results	108
7.1.4	Conclusions	109
7.2	Introduction	109
7.3	Methods	110
7.3.1	Study design	110
7.3.2	Nanoparticles preparation	110
7.3.3	SPIONs capsule implantation (figure 7.1)	111
7.3.4	Magnetic resonance imaging relaxivity measurements	112
7.3.5	Statistical analysis	113
7.4	Results	113
7.4.1	Surgical procedures	114
7.4.2	MRI relaxivity (figure 7.2)	114
7.5	Discussion	115
7.6	Conclusion	117
CHAPITRE 8	DISCUSSION GÉNÉRALE	118
8.1	Interprétation générale des résultats des articles expérimentaux	118
8.2	Limitations	119
CHAPITRE 9	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	121
9.1	Contribution à l'avancement des connaissances	121
9.2	Limitations	122
9.3	Recommandations et nouvelles voies de recherche	123

BIBLIOGRAPHIE 125

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Comparaison des différents devis de mesure de l'activité cérébrale.	12
Tableau 2.1: Paramètres utilisés pour le calcul de l'espacement inter-particules.....	32
Tableau 2.2: Paramètres utilisés pour le calcul de la vitesse des NPSOF.	35
Tableau 2.3: Amplitude des champs magnétiques externes.....	40
Table 4.1: Determinants of colloidal stability of SPIONs in the CNS.....	58
Table 4.2: Ionic composition of the CNS milieu and blood.....	64
Table 4.3: Surface coating for SPIONs used in CNS.....	66
Table 4.4: Consequences of SPIONs instability in the CNS.....	71

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Champs magnétiques simulés autour d'un neurone actif.....	5
Figure 1.2: Genèse du dipôle électrique par les mouvements d'ions au sein du milieu extracellulaire.	7
Figure 1.3: Section transverse de cortex cérébral démontrant des neurones et leurs dendrites orientés de façon tangentielle au cortex.	10
Figure 1.4: Représentation du dipôle magnétique généré par la décharge simultanée de neurones corticaux.	11
Figure 1.5: Organisation des moments magnétiques pour différents types de magnétisme.	16
Figure 1.6: Effet des champs magnétiques sur les NPSOF.....	17
Figure 2.1: Trajectoire de 70 nanoparticules sous l'influence d'une source magnétique.	37
Figure 2.2: Trajectoire de 15 nanoparticules sous l'influence de 3 sources magnétiques.....	38
Figure 2.3: trajectoire de 100 nanoparticules sous l'influence de 10 sources magnétiques.	38
Figure 2.4: <i>Spin</i> d'un noyau d'hydrogène.	41
Figure 2.5: Précession d'un spin d'hydrogène.	43
Figure 2.6: La relaxation longitudinale.	44
Figure 2.7: La relaxation transverse.	45
Figure 2.8: Variation du T2 et T2* selon l'agrégation de NPSOF.	47
Figure 4.1: Effect of aggregation of SPION on their magnetism.....	56
Figure 4.2: Schematic representation of the electric double layer (EDL) forming around nanoparticles.....	62
Figure 4.3: Dipole-dipole interaction of two SPIONs caused by an external magnetic field.	69
Figure 4.4: The blood-brain barrier and its cellular components.	72
Figure 4.5: Reduction of surface available for Fenton's reaction occurring with aggregation.	76

Figure 5.1: Experimental setup.	83
Figure 5.2: Aggregate formation under microscopic view.	84
Figure 5.3: Graph representing the mean number of aggregates per field for the 9 studied rats for each condition.	85
Figure 6.1: Depiction of the underlining rationale of the current study.....	90
Figure 6.2: Artist rendering of the experimental setup.	92
Figure 6.3: Electrical excitability of underlying brain slices.	97
Figure 6.4: Results of the aggregation analysis with DLS and MRI.....	100
Figure 6.5: Effect of MRI of SPIONs aggregates formation.	105
Figure 7.1: Experimental surgical setup.....	112
Figure 7.2: Results of the relaxivity of the 4 rats kept for analysis.....	115
Figure 9.1: Utilisation envisagée des NPSOF pour la détection d'un foyer épileptique.	122

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ACSF	Artificial cerebrospinal fluid
ADN	Acide désoxyribonucléique
AI	Aggregation index
ANOVA	Analysis of variance
ATP	Adenosine triphosphate
BBB	Blood-brain barrier
BIC	Bicuculline Methiodide
CNS	Central nervous system
CED	Convection-enhanced delivery
DLS	Dynamic light scattering
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek
DMSA	2,3-dimercaptosuccinic acid
ECM	Extracellular matrix
ECoG	Électrocorticographie
EDL	Electrostatic double layer
EEG	Électroencéphalogramme
EIP	Espacement inter-particules
ELR	Echo limited regime
FOV	Field of view
FPS	Field population spikes
FSEMS	Fast spin echo multi slice

GABA	Gamma aminobutyric acid
GEMS	Gradient echo multi slice
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IRMf	Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
MAR	Motional averaging regime
MEG	Magnétoencéphalographie
MRI	Magnetic resonance imaging
NSPOF	Nanoparticules superparamagnétiques d'oxide de fer
PdI	Polydispersity index
PEG	Polyethylene glycol
PET	Positron emission topography
PVA	Polyvinyl acrylate
PVC	Polyvinyl chloride
ROI	Region of interest
SDR	Static dephasing regime
SEMS	Spin-echo multi slice
SMR	Slow motion regime
SPECT	Single-photon emission computed tomography
SPION	Superparamagnetic iron oxide nanoparticle
SQUID	Superconducting quantum interference devices

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

L'étude de l'activité cérébrale est au cœur de l'investigation et du traitement de diverses maladies du système nerveux, notamment de l'épilepsie. Pour certains cas d'épilepsie, une carte précise de l'activité électrique cérébrale est nécessaire afin de localiser la zone épileptogène responsable des crises convulsives. Malgré l'existence de plusieurs techniques de détection, la localisation précise de ces zones épileptogènes reste ardue. Les travaux actuels visent à explorer une nouvelle méthode de détection de l'activité cérébrale se basant sur l'agrégation de nanoparticules superparamagnétiques d'oxide de fer (NPSOF) en présence des champs magnétiques cérébraux. Cette introduction fait un survol des trois aspects fondamentaux qui supportent les travaux de recherche présentés soit : l'activité cérébrale, l'épilepsie et les nanoparticules superparamagnétiques d'oxide de fer. Suite à la mise en place du cadre théorique, la problématique, les hypothèses et objectifs de l'étude sont détaillés.

1.1 L'activité cérébrale

1.1.1 Le neurone et le potentiel d'action

Les neurones constituent des cellules hautement spécialisées dans la signalisation électrique sur courtes et longues distances [1]. Un neurone est classiquement composé de trois parties : un corps, des dendrites et un axone. Dans le corps reposent plusieurs des organelles nécessaires au maintien de la cellule dont le noyau cellulaire porteur de l'acide désoxyribonucléique (ADN). L'axone et les dendrites constituent des excroissances partant du corps neuronal servant à la transmission des influx électriques. Les dendrites ont principalement un rôle dans la réception des influx électriques et sont la cible des influx synaptiques des neurones avoisinants [1]. L'axone est une extension unique partant du corps cellulaire qui peut mesurer de quelques micromètres jusqu'à 1 mètre. Son rôle en est un de transmission de l'influx électrique vers les cellules cibles, par le biais d'une communication entre la terminaison de l'axone et la cellule appelée synapse. Un seul neurone peut recevoir de multiples influx par le biais de synapses sur ses dendrites. Il intègre ces signaux et

génère un l'influx électrique le long de son axone par une suite d'évènements électriques appelés potentiels d'action. L'activité électrique est générée dans un neurone par les mouvements d'ions chargés électriquement à travers sa membrane.

Deux forces agissent sur les mouvements ioniques à travers la membrane du neurone : 1) le gradient de concentration et la force électromotrice (charges électriques) [1]. Au repos, un neurone génère activement un potentiel négatif : le voltage à l'intérieur du neurone étant inférieur qu'à l'extérieur (- 40 à -90 mV). Ceci est principalement dû à la perméabilité de la membrane à l'ion potassium (K^+) qui est pratiquement à l'équilibre électrochimique dans ces conditions [2]. Lorsqu'un neurone se trouve suffisamment dépolarisé (atteinte du seuil, autour de -40 mV), un potentiel d'action est déclenché dans l'axone et le transport d'ions inverse le voltage du neurone vers le positif [2]. Ceci est rendu possible par une perméabilité accrue de la membrane au sodium (Na^+) dont l'entrée massive inverse la polarité de la cellule (jusqu'à +58 mV, près de l'équilibre électrochimique du sodium) [3]. Le neurone se repolarise par la suite grâce à une sortie d'ions K^+ facilitée par une perméabilité accrue de la membrane spécifique à cet ion. Cette sortie de K^+ hyperpolarise temporairement le potentiel cellulaire, la rendant temporairement plus réfractaire à la génération d'un nouveau potentiel d'action.

La propagation de l'influx électrique le long des neurones se fait par un flot de courant passif. Il s'agit de la propagation passive du courant le long de la membrane à la suite d'une dépolarisation. Le courant se propage par transfert de charges et non pas par mouvement d'ions à l'intérieur de la cellule [4]. Le courant se propage de part et d'autre du lieu de la dépolarisation, perdant d'amplitude de voltage de façon exponentielle avec la distance.

Lorsqu'une dépolarisation est suffisante pour occasionner un potentiel d'action, le courant engendré se dissipe passivement de part et d'autre de ce dernier, dépolarisant la membrane à distance suffisamment pour qu'un autre potentiel d'action soit généré. Le potentiel d'action se propage ainsi de proche en proche le long de la membrane. Au niveau des axones, la propagation du potentiel d'action est plus rapide car un agent isolant, la myéline, entoure l'axone et augmente la résistance de la membrane le long de ce dernier [1]. Des trous dans cette gaine isolante, placés à

intervalle régulier, permettent les échanges ioniques transmembranaires. Le potentiel d'action se propage donc de façon saltatoire au niveau de l'axone par ce mécanisme.

Tel que mentionné précédemment, les neurones communiquent entre eux via une unité entre dendrite et axone appelé synapse. Lorsque le potentiel d'action atteint le bout de l'axone, des neurotransmetteurs agissant sur les canaux ioniques du neurone récepteur sont relâchés [1]. Une synapse peut être excitatrice ou inhibitrice, selon si les neurotransmetteurs qu'elle relâche favorisent la génération d'un potentiel transmembranaire au-delà de son seuil (excitateur) ou en-deçà de celui-ci (inhibiteur). La sommation spatio-temporelle des potentiels activateurs et inhibiteurs des synapses (souvent des milliers) sur les dendrites d'un neurone décide à un moment donné si un potentiel d'action est généré ou non au sein du neurone.

1.1.2 Activité électrique cérébrale

L'activité électrique est propre aux neurones et fait référence aux influx électriques transmis par ces derniers. Elle miroite l'activation électrique de certaines régions du cerveau en lien avec les différentes fonctions des réseaux de neurones impliqués. Un autre type d'activité cérébrale qui est fortement corrélé à l'activité électrique est l'activité métabolique [1]. L'activité métabolique fait référence à la consommation de métabolites (glucose, oxygène, lipides) afin de générer l'énergie nécessaire à la cellule sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) [5]. Cette activité fait appel à la phosphorylation oxydative et nécessite de l'oxygène. Par rapport à son activité métabolique, le neurone possède deux particularités de 1) ne consommer que du glucose et 2) d'avoir de très petites réserves de glucose. L'activité électrique est corrélée avec l'activité métabolique, puisque de l'énergie est nécessaire afin de générer les courants électriques neuronaux par les pompes ioniques dépendant de l'ATP [1]. Elle constitue donc un marqueur indirect de l'activité électrique.

1.1.3 Activité magnétique cérébrale

Les champs magnétiques issus des neurones proviennent de l'activité électrique de ces derniers. Des charges électriques se déplaçant d'un point à l'autre génèrent un champ magnétique perpendiculaire orienté selon la règle de la main droite [6]. Les champs magnétiques propres à un seul neurone n'ont encore jamais été mesurés, mais des modèles mathématiques expérimentaux nous donnent un aperçu de ce à quoi pourrait ressembler la direction et l'amplitude de ces derniers [7,8]. Dans l'un de ces modèles, on simule l'activité électrique d'un neurone dont la structure tridimensionnelle est inspirée de données sur le vivant obtenues grâce à la microscopie à fluorescence [7,9,10]. Le neurone modélisé est stimulé à 40 Hz via les synapses excitatrices et inhibitrices sur son arborisation dendritique (2500 en tout) de telle sorte qu'à tout moment, 2% de toutes les synapses sont activées de façon aléatoire. La distribution des synapses est telle que le 2/3 sont excitatrices et 1/3 inhibitrices. Pour les fins de calcul, le neurone est divisé en compartiments de 2 micromètres de longueur et le champ magnétique est calculé à l'aide de la loi de Biot-Savart, qui prend en compte un courant uniforme (direction et amplitude) dans un compartiment donné. Leur modèle considère également les courants extracellulaires qui sont provoqués par les déplacements des ions lors d'une excitation ou une inhibition aux synapses, qui contribuent à moindre échelle aux champs magnétiques cérébraux [11,12].

Le champ magnétique résultant possède une forme complexe qui épouse les contours du neurone dont l'intensité est de l'ordre du picotesla (10^{-12}) dans les environs immédiats du neurone (50 micromètres). L'intensité du champ varie également de façon complexe tout autour du neurone (figure 1.1).

La sommation spatiotemporelle des champs magnétiques locaux détermine le champ magnétique d'une région cérébrale à un moment donné. Le champ magnétique résultant d'une dépolarisation synchrone de plusieurs dendrites organisées de façon parallèle sera plus intense que le champ résultant de dépolarisations asynchrones de dendrites organisées de façon aléatoire. Via le même modèle mathématique [9,13,14], on a pu estimer que le champ magnétique local généré par l'activité synchrone d'une population de 40 000 neurones serait de l'ordre de 10^{-7} Tesla (T). Les

variations de forme et d'intensité de champ, complexes à proximité du neurone, se simplifient en se combinant avec la distance [15].

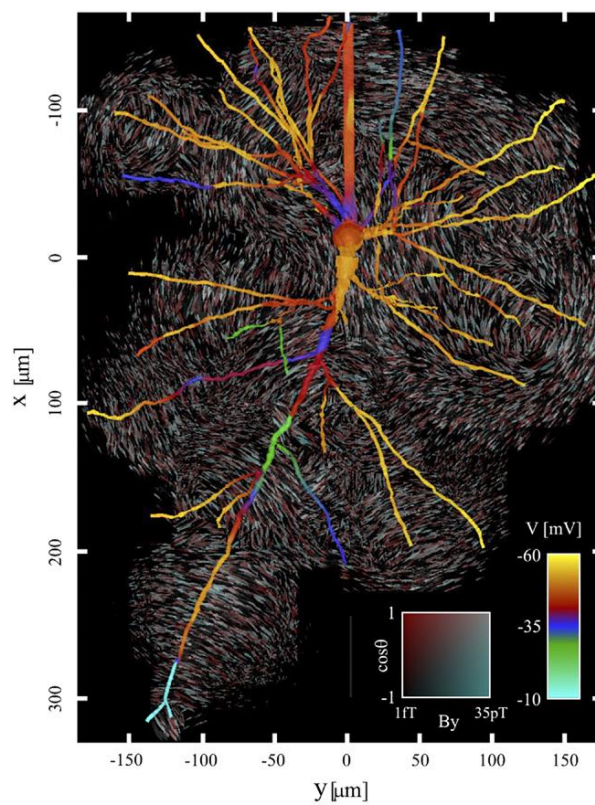


Figure 1.1: Champs magnétiques simulés autour d'un neurone actif.

Blagoev *et al.* [7] (Article *open access* libre de droits).

1.1.4 Devis de mesure de l'activité cérébrale

Plusieurs outils sont à disposition afin de mesurer l'activité cérébrale. Cette section donne un aperçu des techniques actuellement disponibles afin de mieux situer où se trouverait la nouvelle méthode à l'étude par rapport à ces dernières. Un tableau comparatif à la fin de cette dernière donne les avantages et désavantages de chacune (tableau 1.1).

Électroencéphalographie (EEG)

Il s'agit de la méthode la plus simple et la plus directe pour mesurer l'activité cérébrale. Par la mise en place d'électrodes à divers points sur le scalp, on enregistre les fluctuations de courants (voltage) émanant du cerveau. Les signaux enregistrés sont de l'ordre du microvolt [1] et émanent davantage des potentiels post-synaptiques que des potentiels d'action, ces derniers étant d'une durée beaucoup plus courte (1 à 10 millisecondes contre 200 millisecondes) [1]. Les enregistrements d'EEG captent les changements extracellulaires secondaires à l'activité neuronale plutôt que de l'activité intracellulaire [15,16]. Les potentiels d'action entraînent des changements extracellulaires d'amplitude plus petite que l'activité post-synaptique au niveau des dendrites, ceci est une autre raison pour laquelle l'EEG ne représente pas les potentiels d'action. La figure 1.2 explique la genèse des courants extracellulaires secondaire aux influx d'ions intracellulaires. Dans tous les cas, un dipôle électrique est formé par d'un côté l'entrée d'ions dans la cellule (le potentiel post-synaptique) et de l'autre côté par la perte de charges à travers la membrane à distance du potentiel post-synaptique.

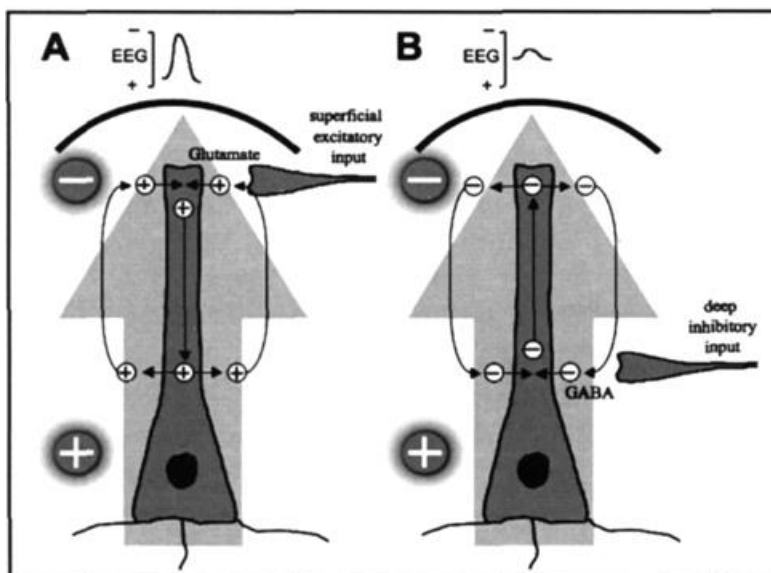


Figure 1.2: Genèse du dipôle électrique par les mouvements d'ions au sein du milieu extracellulaire.

Kirschstein *et al.* [16], avec permission.

Au niveau du cortex cérébral, l'organisation des dendrites des neurones pyramidaux est perpendiculaire à ce dernier. La sommation des courants de ces dendrites parallèles donne le signal capté à l'EEG. L'un des principaux désavantages de l'EEG provient du fait que le signal électrique doit traverser plusieurs couches (méninges, os et scalp) avant d'atteindre l'électrode, ce qui amenuise la précision de ce dernier.

Électrocorticographie (ECoG)

L'électrocorticographie utilise le même type d'électrodes que l'EEG mais avec ces dernières positionnées directement sur le cortex cérébral. Ceci possède l'avantage d'obtenir une moins grande distorsion de signal en se mettant plus proche de la source. Le principal désavantage revient au fait qu'une procédure chirurgicale doit être accomplie pour placer les électrodes. Le placement de ces dernières doit être planifié au préalable puisqu'une seule partie du cortex peut être enregistrée à la fois par la fenêtre chirurgicale obtenue [17]. Un autre désavantage concerne le fait

que le cortex est organisé en sillons, « cachant » donc une quantité substantielle de cortex aux électrodes positionnées à la surface de ce dernier [18].

Enregistrements électrophysiologiques

Cette méthode est utilisée en laboratoire pour enregistrer l'activité électrique à l'échelle du neurone. Elle implique l'insertion de microélectrodes au sein du parenchyme cérébral afin d'enregistrer l'activité extracellulaire ou intracellulaire. L'activité extracellulaire (« single unit recording ») enregistrée correspond aux potentiels d'action (activité « tout ou rien »). Les enregistrements intracellulaires quant à eux permettent de mesurer les petites variations de potentiel électrique dans la cellule qui peuvent mener au potentiel d'action [1]. Bien que ces enregistrements nous apportent des informations uniques sur l'activité à l'échelle du neurone, son application pratique en-dehors des études expérimentales est impossible vu le besoin de visualiser et de manipuler les neurones sous microscope en milieu contrôlé.

Résonance magnétique fonctionnelle (IRMf)

La résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) utilise les propriétés magnétiques du sang oxygéné et désoxygéné pour déduire la consommation d'oxygène propre à une région cérébrale. Une concentration augmentée de désoxyhémoglobine, dont la susceptibilité magnétique diffère de l'oxyhémoglobine, sera à l'origine du contraste observé en IRM fonctionnelle [19,20]. L'IRMf est donc une mesure indirecte de l'activité électrique cérébrale par une appréciation de son activité métabolique. Une nuance à apporter aux données issues de l'IRMf (ainsi qu'à toutes les méthodes de mesure de l'activité cérébrale métabolique) vient du fait que l'activité activatrice tant qu'inhibitrice consomme de l'énergie et qu'il peut y avoir une différence notable entre l'activité métabolique et électrique au sein d'un même réseau neuronal [21-23].

Médecine nucléaire

Les études de médecine nucléaire telles le SPECT (Single-Photon Emission Computed Tomography) et le PET (Positron Emission Topography) permettent d'apprécier l'activité cérébrale en captant à l'aide de caméras spécialisées les émissions émanant de substances injectées

auxquelles un isotope radioactif a été attaché [24]. Le SPECT utilise de l'exametazime liée au technetium-99m injecté dans la circulation afin de suivre la perfusion cérébrale. Cet agent traverse très rapidement la barrière hémato-encéphalique et sa rétention cérébrale au cerveau est suffisamment longue (30 minutes) pour permettre l'acquisition d'images [25]. Le PET quant à lui utilise du glucose lié à de la fluorine-18. Le glucose étant un substrat indispensable à la production d'énergie du neurone, une plus grande consommation de ce dernier est attendue dans les zones plus actives du cerveau [24]. Les études de médecine nucléaire sont des études de l'activité métabolique du cerveau.

Spectroscopie près de l'infrarouge

Cette technologie utilise les propriétés optiques d'ondes près de l'infrarouge pour déterminer la consommation en oxygène d'une région du cerveau [26]. Ces ondes peuvent aisément traverser le scalp et le crâne et sont absorbées de façon différente par l'oxyhémoglobine et la désoxyhémoglobine. Elle présente l'avantage de pouvoir s'administrer facilement et d'avoir une bonne résolution temporelle mais présente comme principal désavantage d'avoir une faible résolution spatiale (ne peut mesurer qu'une région cérébrale à la fois et les régions cérébrales profondes sont inaccessibles) [27,28].

Magnétoencéphalographie (MEG)

La magnétoencéphalographie est un marqueur indirect de l'activité électrique neuronale. Elle mesure un composant corolaire au courant électrique, dans ce cas-ci les champs magnétiques cérébraux créés par les courants électriques neuronaux. Des SQUID (superconducting quantum interference devices) qui émettent des signaux électriques lorsque traversés par un champ magnétique servent de capteurs de l'activité magnétique cérébrale dans la magnétoencéphalographie [6]. Les champs magnétiques captés par la MEG proviennent, comme pour l'EEG, des potentiels excitateurs et inhibiteurs post-synaptiques sur les dendrites [6,14]. L'organisation parallèle des dendrites le long du cortex permet la sommation spatiale de leurs champs magnétiques (figure 1.3). Même si les champs magnétiques générés par les potentiels d'action le long des axones ne sont pas captés en raison de leur très courte durée, on n'exclut pas

par contre que ces derniers puissent contribuer à des champs magnétiques de haute fréquence qui n'auraient pas encore été démontrés [14].

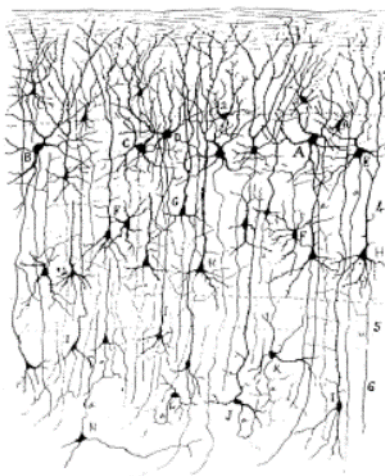


Figure 1.3: Section transverse de cortex cérébral démontrant des neurones et leurs dendrites orientés de façon tangentielle au cortex.

Hamalainen *et al.* [14], avec permission.

Les champs magnétiques générés par une décharge simultanée de 1 mm^2 de cortex sont de l'ordre du femtotesla (10^{-15}) lorsqu'ils arrivent aux SQUID. Ceci correspond au plus petit signal pouvant être détecté par la MEG [7]. L'analyse des signaux par les SQUID permet d'inférer le dipôle magnétique qui pourrait le mieux expliquer les champs magnétiques mesurés [29] (figure 1.4).

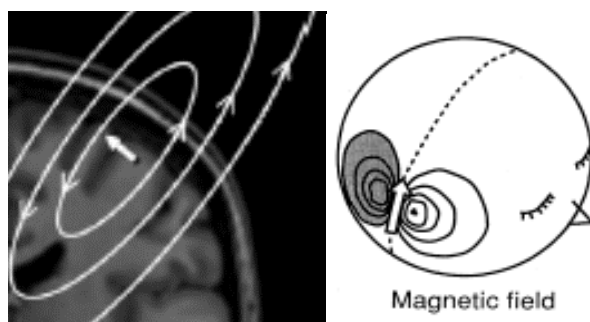


Figure 1.4: Représentation du dipôle magnétique généré par la décharge simultanée de neurones corticaux.

Image de gauche : la flèche représente le sens du courant et les cercles le champ magnétique généré. Image de droite : La flèche représente le dipôle magnétique en lien avec les champs magnétiques (cercles concentriques). Kharkar *et al.* [6] (image de gauche), Hamalainen *et al* [14] (image de droite) (avec permissions).

L'un des grands avantages de la MEG vient du fait que les signaux captés ne sont pas altérés par le passage au-travers du scalp, contrairement à l'EEG. Elle présente par contre le désavantage de mesurer un signal très faible qui estime un dipôle sans vraiment l'objectiver [6]. De plus, une partie du cortex est « silencieuse » à la MEG car son activité magnétique, bien qu'existante, n'est pas captée. Ceci s'explique en grande partie par l'annulation locale des champs magnétiques par d'autres champs magnétiques en sens inverse [14]. Ceci pourrait expliquer pourquoi seuls les courants tangentiels au crâne sont captés en MEG, ce qui la rend plus sensible pour détecter l'activité à l'intérieur des scissures du cortex qu'à la surface de ces dernières [30]. D'autres régions du cerveau sont silencieuses à la MEG en raison de leur profondeur. Les champs magnétiques perdant rapidement de leur intensité avec la distance, leur activité magnétique devient trop faible pour être captée [30-32].

Tableau 1.1: Comparaison des différents devis de mesure de l'activité cérébrale.

Devi	Avantages	Désavantages
Electroencéphalographie (EEG)	-Facile à administrer -Données sur temporalité de l'activité	-Signaux altérés par le scalp -N'échantillonne qu'une partie du cortex
Électrocorticographie (ECoG)	- Idem que EEG + : Signaux non altérés par scalp (électrodes directement sur cortex)	-Invasif (nécessite chirurgie) -N'échantillonne qu'une partie du cortex
Enregistrements électrophysiologiques	-Données précises sur activité intra et extra cellulaire	-Application uniquement en contexte de laboratoire
Résonance magnétique fonctionnelle	-Haute définition spatiale	-Mesure indirecte de l'activité électrique
Médecine nucléaire	-Données sur la consommation en énergie des zones cérébrales	-Mesure indirecte de l'activité électrique
Spectroscopie près de l'infrarouge	-Facile à administrer -Bonne résolution temporelle	-Faible résolution spatiale
Magnétoencéphalographie	-Signaux magnétiques non perturbés par passage au travers du scalp	-Très faible signal (distance) -Certaines zones cérébrales « silencieuses »

1.2 L'épilepsie

1.2.1 Définitions

L'épilepsie se définit comme un trouble cérébral caractérisé par une prédisposition durable à générer des crises épileptiques [33]. Une crise épileptique (ou convulsive) consiste en une activité excessive synchrone des neurones du cerveau [33]. L'épilepsie est considérée comme l'un des désordres neurologiques les plus communs et des plus invalidants [34], atteignant près de 50 millions de personnes à travers le monde [35]. L'épilepsie est considérée comme réfractaire au traitement après l'échec de deux régimes médicamenteux bien tolérés [36]. Malheureusement, près du tiers des épileptiques entrent dans cette catégorie [37,38]. Cette catégorie d'épileptiques est celle chez qui le fardeau sociétair est le plus grand en raison de la diminution de la qualité de vie et des

séquelles psychologiques encourues et des nombreuses comorbidités associées à une maladie non contrôlée [39-41]. Pour ces patients aux prises avec une épilepsie pharmaco-résistante, une chirurgie visant l'ablation de la zone épileptogène peut entraîner une guérison des crises. La zone épileptogène, ou foyer épileptique, réfère au réseau de neurones responsable de l'épilepsie et dont l'exérèse prodigue une disparition de ces dernières [42,43].

1.2.2 Chirurgie de l'épilepsie et localisation du foyer épileptique

Pour être candidat à une chirurgie visant l'ablation du foyer épileptique, un patient doit posséder un foyer identifiable et confiné à une zone accessible chirurgicalement. La détection par imagerie par résonance magnétique (IRM) d'une anomalie structurelle au site du foyer présumé augmente de beaucoup les chances de succès de la chirurgie (68% de succès) [44,45]. Malheureusement, près du tiers des patients avec épilepsie focale pharmacorésistante n'ont pas de lésion épileptogène évidente sur l'IRM [46-48]. Pour de tels cas la localisation du foyer épileptique repose sur les devis d'étude de l'activité cérébrale tels que l'EEG, l'imagerie par la médecine nucléaire et l'IRM fonctionnelle [49]. La mise en place d'électrodes intracrâniennes (électrocorticographie) est considérée comme la dernière ligne dans l'investigation d'un foyer épileptique, de par son caractère invasif et non exempt de complications [50,51]. Il est important de mentionner que l'activité cérébrale n'est pas élevée que lors des crises convulsives. Il existe chez de nombreux épileptiques une activité dite interictale, qui représente une activation synchrone de neurones du foyer épileptique. C'est le plus souvent cette activité qui est enregistrée par les devis d'étude de l'activité cérébrale.

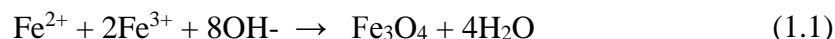
Récemment, l'ajout de la magnétoencéphalographie (MEG) a permis l'ajout d'une toute nouvelle dimension dans l'investigation du foyer épileptique [52,53]. Elle présente par contre les désavantages mentionnés plus haut. Lors de l'investigation d'un foyer épileptique, l'ensemble des tests disponibles doit être pris en compte, puisque la valeur prédictive de chaque devis pris individuellement est faible [54]. Malgré les modalités d'investigation présentement disponibles, le taux de succès global de la chirurgie dans les cas d'épilepsie réfractaire non lésionnelle n'est que de 43% [45,55-58]. Il y a donc un besoin pour une méthode plus précise d'identification du foyer épileptique.

1.3 Les nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer

1.3.1 Nanoparticules d'oxyde de fer

On définit un nanomatériau comme tout composé dont l'une des dimensions est entre 1 et 100 nanomètres (nm) [59,60]. Les oxydes de fer représentent des composés issus d'une combinaison d'oxygène et de fer, avec 16 différents types connus à ce jour. Les nanoparticules d'oxyde de fer qui reçoivent actuellement le plus d'attention en raison de leurs propriétés magnétiques sont celles issues de la magnétite (Fe_3O_4) et de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) [61]. Les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent être synthétisées par une co-précipitation de Fe^{2+} et de Fe^{3+} en solution aqueuse de sels par l'addition d'une base.

Par exemple, des nanoparticules de magnétite peuvent être synthétisées selon l'équation chimique suivante [62] :



Le contrôle de la taille, de la forme et de la composition des nanoparticules dépend du type de sel utilisé, du ratio Fe^{2+} et Fe^{3+} et du pH de la solution [63].

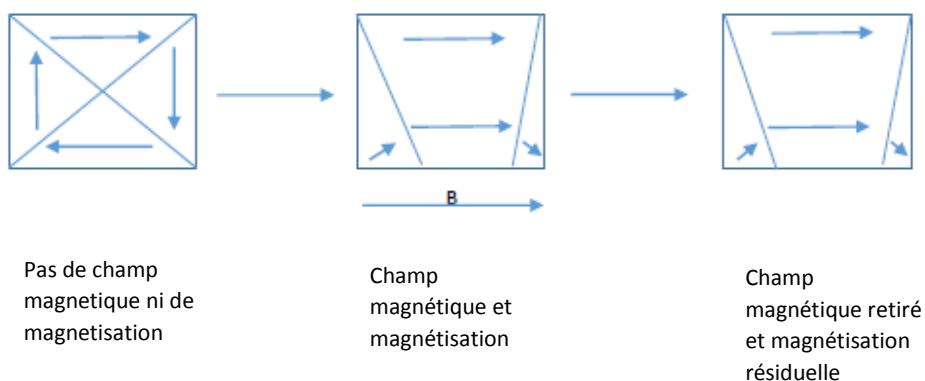
1.3.2 Superparamagnétisme

1.3.2 Superparamagnétisme

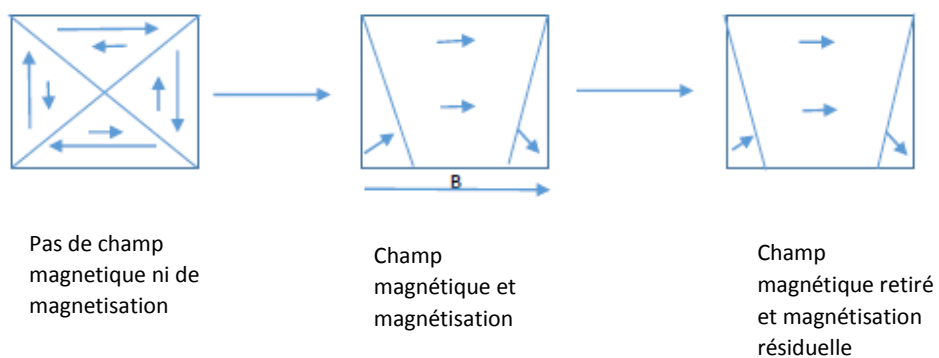
L'oxyde de fer sous forme de magnétite est ferromagnétique tandis que sous forme de maghémite il est ferrimagnétique [64]. Le ferromagnétisme et le ferrimagnétisme sont propres à des matériaux qui montrent une magnétisation intrinsèque spontanée organisée en domaines [64]. A l'intérieur d'un domaine, le moment magnétique de chaque atome est parallèle. Ces domaines génèrent des

moments magnétiques locaux qui la plupart du temps s'annulent les uns les autres, sans magnétisation résultante [65]. Toutefois, lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique, les domaines alignés avec le champ prennent de l'expansion au dépend des autres, et le matériau devient magnétisé. Après le retrait du champ, les matériaux ferromagnétiques et ferrimagnétiques restent magnétisés et continuent à générer des champs magnétiques [65]. Le ferrimagnétisme diffère de ferromagnétisme en ce qu'il est plus faible, le ferromagnétisme étant le type de magnétisme le plus puissant. Cette différence provient du fait qu'à l'intérieur des domaines d'un matériau ferrimagnétique, les moments magnétiques, bien que parallèles, alternent de direction et d'intensité d'atome à atome [64]. Les matériaux paramagnétiques, quant à eux, ne sont pas organisés en domaines. L'application d'un champ magnétique aura pour effet d'aligner les moments magnétiques des divers atomes du matériau, qui ne retiendra pas sa magnétisation une fois le champ retiré (figure 1.5).

Matériaux ferromagnétiques



Matériaux ferrimagnétiques



Matériaux paramagnétiques

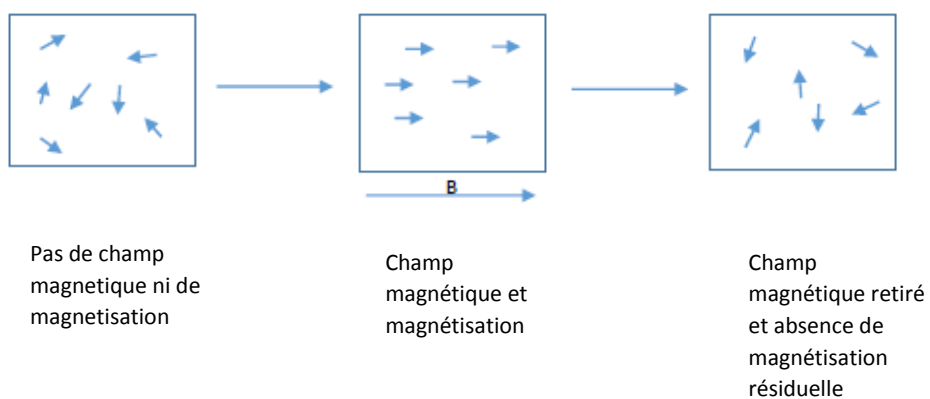


Figure 1.5: Organisation des moments magnétiques pour différents types de magnétisme.

Les matériaux ferromagnétiques et ferrimagnétiques organisés en domaines conservent une magnétisation résiduelle alors que les matériaux paramagnétiques n'en conservent pas.

En réduisant la taille de l'oxyde de fer à celle des nanoparticules, on modifie ses propriétés magnétiques. En dessous de la taille d'un seul domaine magnétique, il devient superparamagnétique [66,67]. Tout comme dans le ferromagnétisme et le ferimagnétisme, un matériau superparamagnétique est magnétisé et attiré par un champ magnétique, mais lorsque le champ magnétique est retiré, le matériau ne reste pas aimanté. Ceci peut être expliqué par le fait que le dipôle des nanoparticules (nord et sud) change constamment direction. Ces changements de direction peuvent être à l'intérieur de la particule (en alternance entre les 2 états orthogonaux le long d'un axe) ou secondaire à une agitation thermique des particules (mouvements browniens). Dans une solution de nanoparticules qui ne sont pas exposés à un champ magnétique, les moments magnétiques des dipôles mobiles s'annulent, ce qui ne produit aucune magnétisation nette. Sous l'influence d'un champ magnétique, les dipôles s'alignent dans la même direction que le champ magnétique, ce qui entraîne une forte aimantation (figure 1.6). Le superparamagnétisme diffère du paramagnétisme en ce que sa susceptibilité à se magnétiser en regard d'un même champ magnétique est beaucoup plus forte (plus proche de celle du ferromagnétisme).

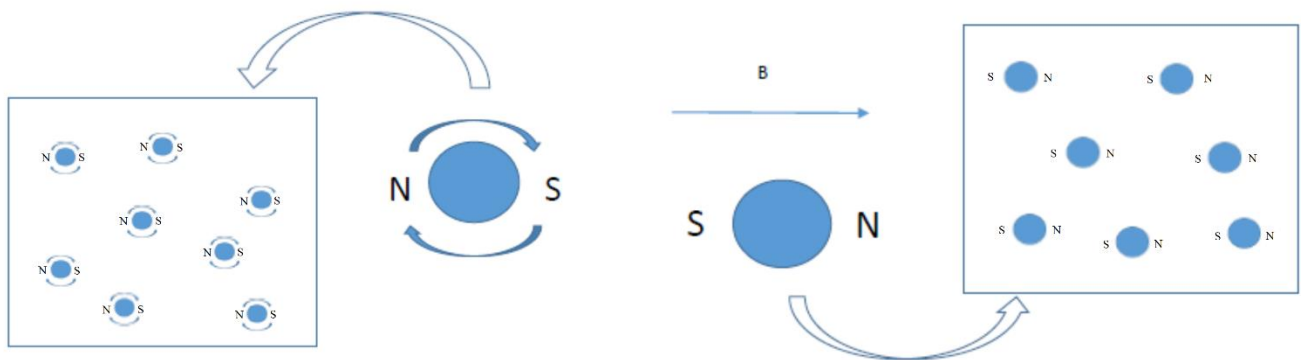


Figure 1.6: Effet des champs magnétiques sur les NPSOF.

Sans champ magnétique, des NPSOF (nanoparticules superparamagnétiques) en solution ne sont pas magnétisées, l'application d'un champ magnétique magnétise ces dernières

1.3.3 Utilisation actuelle des NPSOF dans l'épilepsie

Les travaux actuels portant sur l'utilisation de nanoparticules dans la prise en charge de l'épilepsie sont en grande partie centrés sur le potentiel des nanoparticules à améliorer le transport de médicaments anti-épileptiques par-delà la barrière hémato-encéphalique [68-70].

Les quelques travaux qui adressent le potentiel des nanoparticules dans la localisation du foyer épileptique utilisent ces dernières en conjonction avec un marqueur de l'activité métabolique cérébrale. Par exemple, Akhtari *et al.* profitent de la visibilité des NPSOF à l'IRM et lient à ces dernières un substrat métabolique qui est consommé par les neurones (alpha-méthyl-triptophan ou glucose) [71,72]. Les NPSOF sont injectées par voie intraveineuse à des rats lors d'une crise convulsive provoquée et leur accumulation préférentielle au foyer épileptique est confirmée à l'IRM. Cette méthode est similaire à l'imagerie par médecine nucléaire mais utilise les nanoparticules comme agent localisateur plutôt qu'un isotope radioactif. De ce fait les résultats obtenus sont similaires aux études d'imagerie par médecine nucléaire qui utilisent également un marqueur métabolique de l'activité cérébrale [73]. Le groupe de Fu *et al.* a quant à lui utilisé des NPSOF liées à un anticorps qui se lie spécifiquement à certaines protéines inflammatoires (interleukines) qui sont souvent présentes au sein de foyers épileptiques pour certains types d'épilepsie [74]. Dans ce cas précis, les nanoparticules sont des marqueurs indirects de l'activité épileptique en témoignant de l'inflammation secondaire à cette dernière. Le projet actuel se démarque de ces travaux principalement par le fait qu'il vise à détecter le foyer épileptique par son activité magnétique plutôt que par son activité métabolique ou inflammatoire. L'activité magnétique reflète selon nous de manière plus directe l'activité électrique neuronale que l'activité métabolique ou inflammatoire.

1.4 Problématique

L'épilepsie est la deuxième maladie neurologique la plus commune dans le monde [35]. Ce trouble des plus invalidants est associé à un important impact sociétair [34]. Malheureusement, près du tiers des épileptiques continuent à présenter des crises malgré la prise de médicaments anticonvulsivants [37,38]. C'est cette catégorie d'épileptiques, chez qui la qualité de vie est la moindre, qui apporte le plus important fardeau sociétair [39-41]. Pour ces patients aux prises avec une épilepsie pharmacorésistante, une chirurgie visant la résection de la zone responsable de l'épilepsie (foyer épileptique) peut entraîner une guérison des crises [42].

Les patients candidats à une telle chirurgie doivent avoir un foyer identifiable et confiné à une zone accessible chirurgicalement. La détection d'une lésion (tumeur, malformation, etc.) par IRM augmente de beaucoup les chances de guérison puisque la localisation de cette lésion est généralement congruente avec le foyer épileptique [44,45]. Malheureusement, près du tiers des patients avec épilepsie focale pharmacorésistante n'ont pas de lésion épileptogène évidente sur l'IRM [46-48]. La localisation du foyer repose alors sur plusieurs modalités non-invasives (EEG, PET, IRMf, SPECT) dont la résolution spatiale et/ou temporelle est sous-optimale [49]. Ainsi, il faudra parfois recourir à des électrodes intracérébrales pour mieux définir la zone épileptogène, technique dont le caractère invasif la rend sujette à des complications [50,51]. Cette technique invasive comporte non seulement son lot d'inconfort et de complications, mais elle ne garantit pas nécessairement de bons résultats.

Récemment, la mesure des champs magnétiques par la magnétoencéphalographie (MEG) a apporté une nouvelle dimension à l'investigation du foyer épileptique [52,53]. Son potentiel dans l'ajout d'informations afin de préciser la localisation du foyer épileptique est important. Elle comporte par contre les désavantages de ne pas échantillonner l'ensemble du cerveau, ceci étant en grande partie dû à la faiblesse des champs magnétiques émis par le cerveau et par l'annulation de certains champs à mesure qu'ils s'éloignent du cerveau [6,14,30].

Malgré toutes les modalités d'investigation présentement disponibles, le taux de succès global (éradication des crises) de la chirurgie dans les cas d'épilepsie réfractaire non lésionnelle n'est que de 43%[55,58]. Il y a donc un besoin pour une méthode plus précise d'identification du foyer épileptique. Une nouvelle technique de détection du foyer épileptique pourrait également ouvrir de nouvelles avenues dans l'étude plus générale de l'activité cérébrale.

1.5 Objectifs et hypothèses

1.5.1 Objectif général

L'objectif général consiste à prouver la faisabilité d'une nouvelle méthode de détection de l'activité électrique cérébrale se basant sur la réactivité magnétique de nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer. L'application principale envisagée serait de servir à identifier les zones cérébrales à activité électrique élevée correspondant au foyer épileptique. Cette méthode pourrait s'ajouter aux existantes pour aider à la délimitation précise des zones cérébrales épileptogènes. Pour des nanoparticules distribuées à proximité du cerveau, une agrégation préférentielle de ces dernières est attendue au foyer épileptique. Les nanoparticules changeant le temps de relaxation de leur environnement, l'agrégation de ces dernières pourrait être visible à l'imagerie par résonance magnétique [75]. Afin d'éviter les effets du milieu biologique sur l'agrégation des nanoparticules (voir chapitres 2 et 4), la méthode de rapprochement NPSOF avec le cerveau prévoit d'isoler les NPSOF à l'intérieur de capsules plastique mises en place chirurgicalement sur le cortex.

Plusieurs données probantes, détaillées plus tôt dans l'introduction et plus tard dans le chapitre 2 (revue critique de la littérature) ainsi que dans le chapitre 4 (article de revue), supportent le concept. De manière générale, on peut retenir que :

- 1) Les déplacements des NSPOF sont hautement sensibles aux gradients de champ magnétique environnant.
- 2) La présence de champs magnétiques est un facteur qui favorise l'agrégation des NSPOF.

- 3) Les champs magnétiques issus d'une zone cérébrale à activité électrique augmentée (épileptiques) sont plus importants que les champs magnétiques cérébraux lors de l'activité normale.
- 4) Le signal perçu par l'imagerie par résonance magnétique peut être altéré de façon proportionnelle à l'agrégation de NSPOF en solution.

Suivant l'ordre d'idées des points mentionnés ci-haut, la question centrale à laquelle veut répondre cette thèse est la suivante: les champs magnétiques cérébraux issus d'un foyer épileptique sont-ils en mesure d'occasionner une agrégation quantifiable et distincte de NSPOF environnantes au sein du cerveau? Une approche centrée sur trois objectifs spécifiques et trois hypothèses est préconisée.

1.5.2 Objectifs spécifiques

Objectif 1

Démontrer que les champs magnétiques cérébraux sont un facteur contributoire à l'agrégation de NPSOF à proximité.

Objectif 2

Démontrer que les champs magnétiques de type épileptiformes sont à l'origine d'une agrégation plus importante et détectable par l'IRM de NPSOF à proximité.

Objectif 3

Démontrer que des NPSOF s'agrègent de façon préférentielle face à un foyer épileptique connu dans un modèle de rat épileptique.

1.5.3 Hypothèses

Trois hypothèses principales seront testées au cours de ce projet:

Hypothèse 1

Les champs magnétiques cérébraux sont un facteur contributoire à l'agrégation de NSPOF d'oxyde de fer à proximité.

Hypothèse 2

Les champs magnétiques cérébraux de type épileptiformes sont à l'origine d'une agrégation plus importante et détectable par l'IRM de NPSOF à proximité.

Hypothèse 3

Des NPSOF s'agrègent d'une façon préférentielle face à un foyer épileptique connu dans un modèle de rat épileptique.

CHAPITRE 2 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE

Ce chapitre présente une analyse critique de la littérature en lien avec la stabilité colloïdale (propension à s'agréger) des NSPOF au sein du système nerveux central. Cette analyse permet de mettre en perspective l'ensemble des travaux de recherche présenté au chapitre 3. La première section traite des différents facteurs pouvant influencer la stabilité colloïdale des NSPOF. Puisque l'application envisagée vise d'utiliser la propension des NPSOF à s'agréger, une connaissance de tous les facteurs en jeu est essentielle. Puisque ceci est le sujet central de l'article de revue constituant le chapitre 4, un survol des facteurs est donné puisqu'ils seront traités en détails plus loin. La seconde section analyse les données existantes supportant l'hypothèse principale qui suppose que les champs magnétiques cérébraux ont le potentiel d'induire une agrégation significative de NSPOF à proximité. La dernière section révisé la littérature actuelle supportant la détection de l'agrégation de NSPOF par le biais de l'IRM, qui est la méthode de détection préconisée dans ces travaux.

2.1 Déterminants de la stabilité colloïdale des NPSOF

On définit la stabilité colloïdale d'une suspension de nanoparticules comme leur capacité à résister à la formation d'agrégats. La sommation des différentes forces attractives et répulsives au sein d'un système donné déterminera cette stabilité. L'agrégation obtenue est généralement irréversible. Plusieurs facteurs peuvent influencer la stabilité colloïdale des NPSOF au sein du système nerveux central.

2.1.1 Mouvements Browniens

Les mouvements Browniens correspondent aux mouvements aléatoires de petites particules en solution causés par les collisions entre ces particules et les molécules environnantes en mouvement [76]. Les mouvements Browniens de NPSOF sont influencés par la taille, la température ambiante

et la viscosité de la solution. L'effet net des mouvements Browniens sur la stabilité colloïdale d'une suspension de NPSOF peut être à la fois déstabilisateur (par l'augmentation des collisions entre les nanoparticules) et stabilisateur (par le bris de nouveaux agrégats faiblement formés).

2.1.2 Flot hydrodynamique

Au sein d'un fluide en mouvement, les forces de cisaillement sont les forces tangentielles à l'interface du liquide et de son contenant. Elles sont présentes par exemple entre le sang et le vaisseau sanguin dans lequel il circule. Ces forces ont un effet stabilisateur, en favorisant la dispersion des NPSOF [77].

2.1.3 Concentration

En augmentant la concentration d'une suspension de NPSOF, on augmente la probabilité de collisions entre les particules et ainsi leurs chances de s'agréger [78].

2.1.4 Forces de Van der Walls

Les forces de Van der Walls sont l'un des facteurs principaux favorisant l'agrégation d'une suspension de NPSOF. Elles proviennent des faibles interactions entre les dipôles des molécules constituant les nanoparticules et sont dépendantes de la nature de ces dernières, de leur rayon et de la distance entre les nanoparticules [79].

2.1.5 Forces électrostatiques

À l'inverse des forces de Van der Walls, les forces électrostatiques sont l'une des principales forces favorisant la stabilité de nanoparticules en solution [80]. Lorsque des nanoparticules sont en suspension dans un médium polaire tel que l'eau, elles acquièrent une charge de surface. Ces charges étant de la même nature (positive ou négative), elles se repoussent. L'ajout d'ions en solution a pour effet de diminuer ces forces et de favoriser l'agrégation [81].

2.1.6 Forces stériques

Ces forces sont l'un des mécanismes par lequel agissent certains agents d'enrobage (« coating ») qui sont utilisés pour aider à stabiliser les NPSOF en solution. Les molécules à chaîne longue qui composent ces agents d'enrobage à la surface des NPSOF sont comprimées lors du contact entre les nanoparticules. Lors de cette compression, l'entropie des molécules à chaîne longue diminue, créant une force de répulsion entre les nanoparticules [82].

2.1.7 Forces magnétiques

En l'absence de champs magnétique externe, la variation constante des dipôles magnétiques au sein des NPSOF donne une magnétisation nette nulle et une absence d'interactions magnétiques entre les nanoparticules. Lorsqu'on applique un champ magnétique, les dipôles des NPSOF s'alignent avec ce dernier, donnant lieu à de potentielles interactions entre leurs dipôles (positif et négatif), favorisant l'agrégation [83,84]. Tout comme pour les forces de Van der Waals, la force d'attraction entre deux dipôles magnétiques de NPSOF est inversement proportionnelle à la distance. C'est pour cette raison qu'un champ magnétique non-homogène (avec un gradient) qui entraîne un déplacement des NPSOF et pouvant les rapprocher est à même de déstabiliser de manière plus importante les NPSOF qu'un champ magnétique homogène [64,85].

2.1.8 Forces d'hydratation

Les forces d'hydratation ne sont encore que partiellement comprises et entrent en jeu lorsque les NPSOF sont en suspension aqueuse. Elles constituent une force répulsive provenant d'une restructuration des molécules d'eau en contact avec les nanoparticules dissoutes [86].

2.1.9 Mesure de l'agrégation d'une suspension de NPSOF

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'agrégation de nanoparticules en solution, telles que la microscopie par force atomique [87], la microscopie par balayage d'électrons [88], la spectroscopie Raman [89], la spectroscopie ultraviolet [90], la diffraction par rayon-X [91], la spectroscopie infrarouge par transformation de Fourier [92] et la microscopie par transmission d'électrons [88]. Bien que le signal de l'IRM puisse varier avec l'agrégation de NPSOF (détaillé plus loin), son utilisation pour caractériser l'agrégation de NPSOF n'est pas actuellement répandue. L'une des méthodes les plus utilisées est la diffusion dynamique de la lumière (« dynamic light scattering ») [93]. Cette méthode mesure la diffusion de la lumière venant d'une source lumineuse (laser) sur la solution de nanoparticules. Les nanoparticules étant en constant déplacement dus aux mouvements Browniens, l'intensité de la lumière diffusée varie [94]. Plus les nanoparticules sont de grande taille, plus les mouvements Browniens sont lents et les fluctuations de la lumière diffusée seront petites.

À partir de ces données, il est possible de calculer la taille des nanoparticules en solution. Puisque les agrégats agiront comme des particules de taille plus grande, l'augmentation de taille de nanoparticules au sein d'une même solution sera corrélée à l'agrégation.

2.2 Potentiel des champs magnétiques cérébraux pour induire l'agrégation de NPSOF à proximité

Cette section fait état et analyse les données probantes supportant le concept à la base de la recherche présentée, à savoir si les champs magnétiques cérébraux sont à même de pouvoir induire une agrégation observable de NPSOF. Les modèles actuels déterminant la stabilité colloïdale d'une solution de nanoparticules organisent les facteurs influençant l'agrégation selon s'ils influencent la fréquence des collisions ou l'efficacité des collisions [95]. Par exemple, une concentration croissante de nanoparticules au sein d'une solution augmentera la fréquence des collisions (en diminuant l'espace entre les nanoparticules) et aura un effet déstabilisateur.

Les trois principaux déterminants de l'efficacité des collisions pour les NPSOF sont les forces de Van der Waals (attractives), les forces électrostatiques (répulsives) et les interactions magnétiques (attractives) [96]. Les interactions magnétiques proviennent de l'attraction entre dipôles opposés (positif et négatif) des nanoparticules et diminuent avec la distance entre les nanoparticules. L'application d'un champ magnétique externe aura pour effet d'aligner les dipôles et de favoriser leur agrégation en chaînes. En présence d'un champ magnétique non-uniforme (avec gradient), un autre facteur pro-agrégation s'ajoute : le mouvement des nanoparticules. Suivant l'intensité du gradient, les NPSOF se déplacent, ce qui augmente la fréquence de leurs collisions et favorise l'agrégation [96-99]. Tel que vu au chapitre précédent, les champs magnétiques cérébraux sont complexes et ont le potentiel d'induire l'agrégation de NPSOF par ces deux mécanismes.

2.2.1 Effet des champs magnétiques cérébraux sur l'efficacité des collisions de NPSOF

L'efficacité des collisions entre NPSOF est donnée par le modèle étendu de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) [100,101]. Il considère que l'énergie potentielle totale (en joules) sera la résultante de trois forces : forces de Van der Waals (attractives), forces électrostatiques (répulsives) et interactions dipôle-dipôle (attractives). Ceci peut être exprimé par l'équation (2.1) suivante :

$$V_T = V_A + V_R + V_M \quad (2.1)$$

Où V_T est l'énergie d'interaction totale, V_A l'énergie d'attraction secondaire aux forces de Van der Waals, V_R l'énergie de répulsion secondaire aux forces électrostatiques et V_M l'énergie magnétique provenant des interactions dipôle-dipôle. Le système penchera en faveur de l'agrégation si la résultante des forces d'attraction surpasse celle des forces répulsives.

Forces de Van der Waals

Les forces d'interaction de Van der Waals entre deux nanoparticules sphériques sont données par l'équation (2.2) suivante [96] :

$$V_A = - \frac{A_{131}}{12} \left(\frac{1}{h} - \frac{5.32}{\lambda} \left(\frac{\ln \lambda}{5.32h} \right) \right) \quad (2.2)$$

Où A_{131} correspond à la constante d'Hamaker (en zJ), h la distance interparticules (en m) et λ la longueur d'onde des atomes des particules (en m).

Forces électrostatiques

Les forces électrostatiques répulsives entre deux particules sont données par l'équation (2.3) suivante [102]:

$$V_R = \frac{\epsilon a_1 a_2 (\psi_1^2 \psi_2^2)}{4(a_1 a_2)} \left(\frac{2\psi_1 \psi_2}{\psi_1^2 + \psi_2^2} \ln \frac{1 + e^{-\kappa h}}{1 - e^{-\kappa h}} + \ln(1 - e^{-2\kappa h}) \right) \quad (2.3)$$

Où ϵ correspond à perméabilité diélectrique du médium (en Fm^{-1}), a_i correspond au rayon d'une particule i (en m), ψ_i correspond au potentiel de plan d'Helmholtz d'une particule i (en V), κ est la longueur de Debye (en m) et h correspond à la distance interparticules (en m).

Forces magnétiques

Les forces magnétiques attractives entre deux particules sont données par l'équation (2.4) suivante [96] :

$$V_M = \frac{4\pi a^6 \chi^2 B_0^2}{\mu_0 (2a + h)^2} \quad (2.4)$$

Où μ_0 correspond à la perméabilité magnétique du vide (en H m^{-1}), a au rayon d'une particule, χ à la susceptibilité magnétique des particules, B_0 à l'induction magnétique provenant du champ magnétique externe (en T) et h à la distance interparticules (en m).

On peut résoudre l'équation précédente pour une suspension aqueuse de NPSOF de magnétite de 20 nm de diamètre. La susceptibilité magnétique des NPSOF étant connue [103], il reste à déterminer la distance interparticules ainsi que l'intensité du champ magnétique provenant des neurones. Il est possible d'estimer la distance moyenne entre les particules (l'espacement interparticules, EIP) à l'aide de l'équation (2.5) suivante [104] :

$$\text{EIP} = d_p \left(\left[\left(\frac{\Phi_m}{\Phi} \right)^{1/3} - 1 \right] \right) \quad (2.5)$$

Où d_p représente le diamètre des nanoparticules, Φ_m la fraction maximale de paquetage des nanoparticules et Φ la fraction volumique des nanoparticules. La fraction maximale de paquetage Φ_m représente la fraction volumique maximale de nanoparticules dans une solution où l'espacement inter-particules (EIP) devient zéro [104]. La fraction volumique des nanoparticules est le volume occupé par les nanoparticules en regard du volume du solvant. La fraction de paquetage maximale pour des NPSOF peut être retrouvée dans la littérature [105,106]. La fraction volumique d'une suspension de nanoparticules dépendra de leur concentration. En supposant que les NPSOF sont livrées directement au cerveau, la concentration de nanoparticules atteignant le système nerveux peut être estimée à partir d'études animales dans lesquelles des NPSOF sont livrées au cerveau par différents moyens [107,108]. Dans ces études, les animaux sont sacrifiés après la livraison des NPSOF, ce qui permet de mesurer la concentration de ces dernières directement sur les cerveaux. Pour les fins du calcul, la moyenne des concentrations trouvées dans ces études a été utilisée.

En résolvant l'équation ci-haut, l'EIP pour des NPSOF de 20 nm de diamètre en suspension aqueuse dans du tissu cérébral est inférieure à un micromètre (0,17 μm). Les détails concernant les données utilisées pour résoudre l'équation de l'EIP peuvent être trouvés dans le tableau 2.1.

L'amplitude du champ magnétique cérébral peut être inférée à partir d'études de simulation de champs magnétiques neuronaux [7] et de données de magnétoencéphalographie chez le vivant [109]. L'amplitude du champ magnétique qui a été utilisée représente le plus petit champ magnétique local perceptible émanant d'une population de neurones dont l'activité est synchrone sur une surface de 1 mm^2 [109]. En résolvant l'équation 2.4, la force d'attraction magnétique venant des interactions dipôle-dipôle donnée par les champs magnétiques cérébraux pour des NPSOF également distancées de $0,17 \text{ }\mu\text{m}$ est négligeable ($2,15 \text{ e}^{-27} \text{ J}$) et risque d'avoir peu d'impact face aux autres facteurs contributifs à l'efficacité des collisions.

Tableau 2.1: Paramètres utilisés pour le calcul de l'espacement inter-particules.

Paramètre	Symbole/unité	Valeur
Diamètre	d_p (nm)	20
Fraction volumique	Φ (-)	$1,57 \cdot 10^{-4}$
Fraction de paquetage maximale	Φ_m (-)	0,15
Masse volumique des NPSOF	ρ (g/cm ³)	$7,8 \cdot 10^6 \text{ g/m}^3$

2.2.2 Mouvements des NPSOF secondaires aux gradients des champs magnétiques cérébraux

Les principales forces applicables sur une seule NPSOF en suspension peuvent être divisés en 3: 1) la flottabilité, 2) les forces magnétiques et 3) la force de traînée, qui représente la résistance au mouvement appliqué sur la particule par le liquide environnant. Cette dernière est, par définition, une force « négative » qui oppose le mouvement. Afin d'inférer l'effet que pourraient avoir les champs magnétiques cérébraux sur la fréquence de collision de NPSOF environnantes, il est nécessaire de connaître quel genre de mouvement ces champs pourraient donner aux nanoparticules.

La force appliquée sur une NPSOF par un champ magnétique peut être exprimé par l'équation (2.6) suivante [110,111] :

$$F_m = \frac{V_p (\chi_p - \chi_f) \nabla B^2}{2\mu_0} \quad (2.6)$$

Où V_p représente le volume de la particule, χ_p et χ_f la susceptibilité magnétique de la particule et du médium, B le champ magnétique externe, ∇B le gradient magnétique, et μ_0 la perméabilité magnétique du vide.

La force de traînée agissant contre le mouvement de la nanoparticule est exprimée par l'équation (2.7) suivante [110,111] :

$$F_d = -3\pi\eta d_p v_p \quad (2.7)$$

Où η représente la viscosité du fluide, d_p le diamètre de la particule et v_p la vitesse de la particule.

Les équations (2.6) et (2.7) peuvent être fusionnés pour obtenir la vitesse de la particule lorsque $F_m = F_d$:

$$v_p = \frac{V_p (\chi_p - \chi_f) \nabla B^2}{3\pi\eta d_p 2\mu_0} \quad (2.8)$$

Nous avons résolu l'équation ci-dessus pour une NPSOF de magnétite pure de 20 nm de diamètre en suspension dans le liquide extracellulaire à proximité (à moins de 50 μm) de neurones actifs. Les informations relatives à la grandeur des champs magnétiques et gradients dans le voisinage des neurones proviennent d'expériences de simulation de champs magnétiques neuronaux [7] et de données de magnétoencéphalographie chez le vivant [109]. L'amplitude du champ magnétique qui a été utilisée représente le plus petit champ magnétique local perceptible émanant d'une population de neurones dont l'activité est synchrone sur une surface de 1 mm^2 [109]. La viscosité utilisée correspond à celle du milieu intracellulaire [112]. Les détails concernant les paramètres utilisés peuvent être trouvés dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2: Paramètres utilisés pour le calcul de la vitesse des NPSOF.

Paramètre	Symbole/unité	Valeur
Diamètre de la particule	d_p (m)	$20 \cdot 10^{-9}$
Viscosité du fluide	η (Pas)	$1,002 \cdot 10^{-4}$
Susceptibilité magnétique de la particule	χ_p (-)	$2 \cdot 10^5$
Susceptibilité magnétique du fluide	χ_f (-)	$-9,05 \cdot 10^{-6}$
Perméabilité du vide (constante magnétique)	μ_0 (T/A m)	$1,26 \cdot 10^{-6}$
Champ magnétique	B (T)	$14 \cdot 10^{-6}$
Gradient du champ magnétique	∇B (T/m)	1,2

En résolvant l'équation (2.8) avec les données mentionnées au tableau 2.2, nous constatons que la vitesse d'une seule NPSOF de magnétite sous l'influence des champs magnétiques cérébraux serait de l'ordre de $0,3 \mu\text{m/s}$.

Connaissant la vitesse approximative de NPSOF dans le système nerveux central, le deuxième facteur à déterminer dans l'interaction des particules est la distance entre elles dans le cerveau. Ceci a été démontré plus tôt lors des calculs de l'influence des champs magnétiques cérébraux sur l'efficacité des collisions des NPSOF (sous-section 2.2.1, équation (2.5)). En utilisant la même distance interparticules ($0,17 \mu\text{m}$), compte tenu de la vitesse précédemment calculée pour les NPSOF en suspension ($0,3 \mu\text{m/s}$), toutes les nanoparticules soumises aux champs magnétiques cérébraux pourraient parcourir la distance nécessaire à une collision avec une autre nanoparticule environ chaque seconde.

Selon les résultats obtenus à partir des données présentées dans les deux dernières sous-sections (2.2.1 et 2.2.2), les champs magnétiques cérébraux auraient le potentiel de favoriser l'agrégation

de NPSOF à proximité en influençant leur mouvement et la fréquence des collisions plutôt que l'efficacité des collisions. Par contre, plus la distance entre les NPSOF diminuera, plus les interactions magnétiques, en plus des forces de Van der Waals, seront importantes. De plus, les agrégats formés de NPSOF deviennent magnétisés et agissent eux-mêmes comme des aimants entraînant l'agrégation des NPSOF à proximité [64,85,113-116]. Dans ce contexte, il est possible de supposer que l'activité magnétique cérébrale aura pour effet de favoriser l'agrégation des nanoparticules à proximité en agissant comme facteur pro-agrégeant.

2.2.3 Stabilité des NPSOF en regard de l'activité épileptique

L'activité épileptique étant par définition une activité plus importante et synchronisée que l'activité cérébrale basale, il va de soi que les champs magnétiques qui en sont issus devraient être plus importants. Ceci est confirmé par des études de MEG qui ont pu capter des crises épileptiques [117-121]. Cette plus forte activité magnétique sera à l'origine de mouvements plus importants des nanoparticules à proximité, qui devrait mener à une agrégation plus importante. Un autre facteur à considérer est ce qui risque de se passer entre les crises. Il est vrai qu'au retrait d'un champ magnétique, une désagrégation progressive des nanoparticules peut survenir. Ceci a été démontré principalement dans des systèmes *in vitro* avec des nanoparticules bien espacées (certains enrobages spécifiques) et sans la présence d'autres facteurs qui favorisent l'agrégation (pro-agrégeant) [115,122].

Par contre, de nombreux autres facteurs pro-agrégeant restent présents entre les crises. Tout d'abord, tel que démontré précédemment, l'activité cérébrale *basale* peut constituer un facteur pro-agrégation. De plus, un foyer épileptique est le plus souvent animé d'une activité interictale, c'est-à-dire de décharges épileptiformes (associées à une activité magnétique augmentée [121,123-125]) qui sont présentes entre les crises, rendant son activité supérieure à celle du reste du cerveau. De plus, tel que mentionné précédemment, les agrégats formés de nanoparticules peuvent ne plus se comporter comme des composants superparamagnétiques et peuvent retenir leur magnétisation, ce qui pourrait aider au maintien local des champs magnétiques [126]. Leur magnétisation est

également plus grande [85,98]. Ces facteurs pris en compte, il est possible d'émettre l'hypothèse qu'autour d'un foyer épileptique, l'agrégation de NPSOF sera favorisée. Il est aussi important de mentionner que la vitesse d'agrégation au sein d'un système est dépendante de sa stabilité, plus ce dernier est stable et plus long cela prendra avant que des agrégats apparaissent [127].

Dans la littérature, un groupe s'est penché sur le potentiel des champs magnétiques épileptiques pour induire l'agrégation de NPSOF à proximité par le biais de simulations informatiques [128]. En se basant sur les modèles connus de champs magnétiques cérébraux venant de l'activité neuronale, ils calculent le déplacement et l'agrégation de nanoparticules dispersées dans la vicinity des champs magnétiques (figures 2.1-2.3). Ils concluent que les champs magnétiques cérébraux issus d'une zone épileptique sont à même de pouvoir induire l'agrégation de NPSOF à proximité.

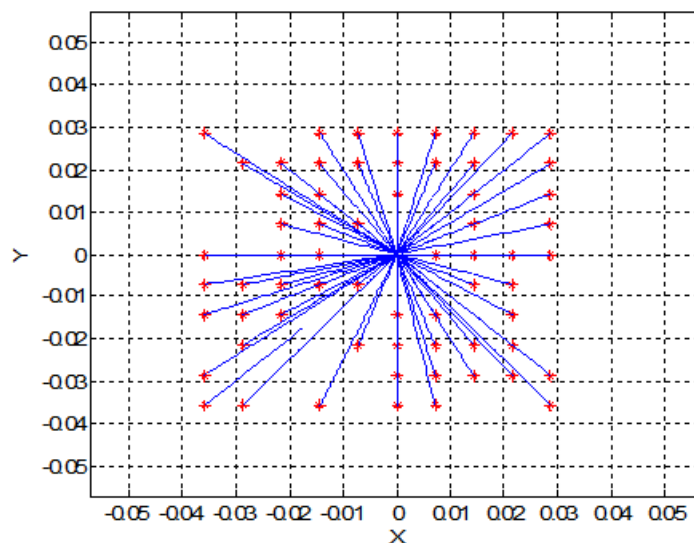


Figure 2.1: Trajectoire de 70 nanoparticules sous l'influence d'une source magnétique.

Pedram *et al.* [128] (avec permission)

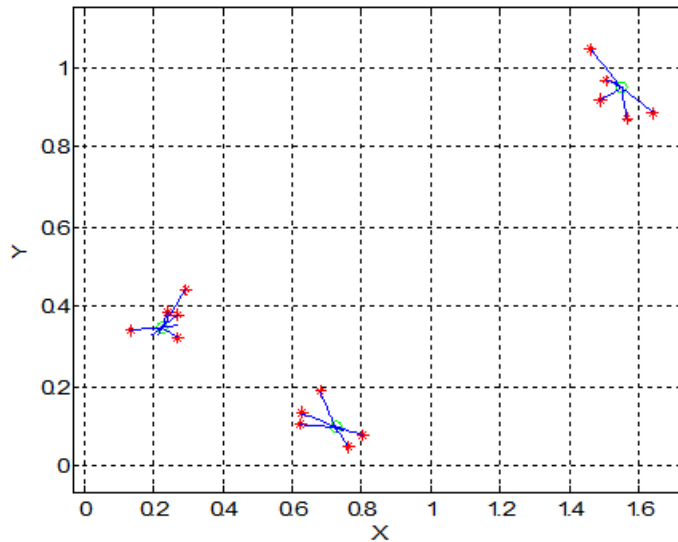


Figure 2.2: Trajectoire de 15 nanoparticules sous l'influence de 3 sources magnétiques.

Pedram *et al.* [128] (avec permission).

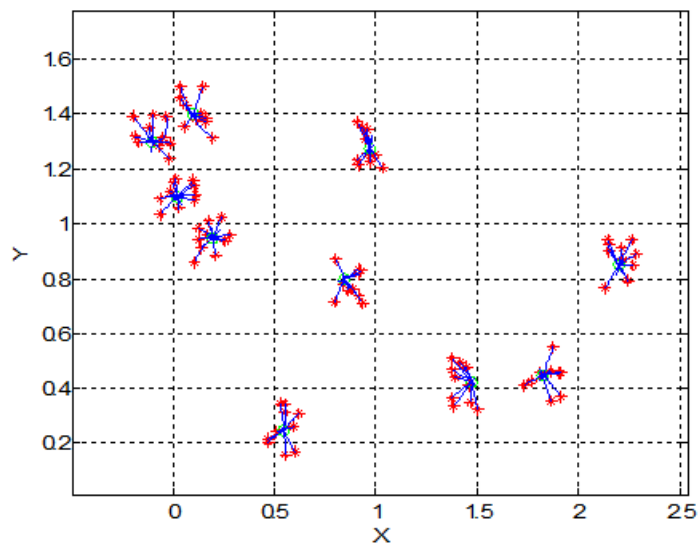


Figure 2.3: trajectoire de 100 nanoparticules sous l'influence de 10 sources magnétiques.

Pedram *et al.* [128] (avec permission).

2.2.4 Influence des champs magnétiques externes

En plus des champs magnétiques issus de l'activité cérébrale, des interférences provenant des champs magnétiques environnant pourraient être à même d'influencer l'agrégation des NPSOF. On peut diviser ces champs magnétiques entre les champs magnétiques environnementaux (champ magnétique terrestre, bruit urbain) et les autres champs magnétiques biologiques tels ceux produits par le cœur.

Le champ magnétique terrestre est causé par les courants électriques provenant des mouvements de convection de fer en fusion dans le noyau externe de la Terre [129]. Ces champs sont présents partout à la surface du globe et sont de l'ordre de 25-65 μT [130]. Afin de connaître l'influence potentielle des champs magnétiques terrestres sur l'efficacité des collisions de NPSOF en suspension nous avons remplacé les champs magnétiques cérébraux dans l'équation 2.6 par les champs magnétiques terrestres. On arrive ainsi à une influence négligeable des champs magnétiques terrestres sur l'efficacité des collisions ($2,22 \times 10^{-26} \text{ J}$), à peine plus grande que celle que pourraient induire les champs magnétiques cérébraux. Quant à la fréquence des collisions, puisque le champ terrestre est grandement homogène [131], il n'induirait pas de mouvement des NPSOF et donc son influence globale sur la stabilité de NPSOF en suspension risque d'être minime [96].

Les champs magnétiques en environnement urbain proviennent principalement des lignes à haute tension et des appareils électriques environnant [132]. Bien que variant selon la proximité de la source électrique, ils sont en moyenne de l'ordre de 0,11 μT [133] et sont généralement assez homogènes (sans gradient) dans la plupart des environnements urbains [134]. Puisque l'amplitude des champs magnétiques urbains est encore plus petite que celle du champ magnétique terrestre, leur influence sur l'efficacité des collisions de NPSOF n'a pas été calculée. Concernant la fréquence des collisions, comme il a été mentionné ces champs sont généralement homogènes. Pour fins d'exemple, l'un des gradients environnementaux urbains les plus élevés enregistrés sont créés par des trains à lévitation magnétique et sont de l'ordre de $4,25 \times 10^{-5} \text{ T/m}$ [135]. Ce gradient magnétique reste largement inférieur aux gradients locaux observés autour des neurones.

Plus près du cerveau, le cœur peut aussi être à l'origine de champs magnétiques qui pourraient faire interférence avec les champs magnétiques cérébraux. Le cœur génère les champs magnétiques les plus importants du corps humain. À la surface du thorax on enregistre des champs magnétiques cardiaques de l'ordre de 10^{-14} T [136,137]. Au niveau du cerveau, ces champs auront perdu en intensité et gagné en homogénéité, rendant encore minimale leur potentielle contribution à l'agrégation de NPSOF [138,139]. Le tableau 2.3 résume l'amplitude des différents champs magnétiques pouvant interférer avec les champs magnétiques cérébraux.

Tableau 2.3: Amplitude des champs magnétiques externes.

Paramètre	Amplitude (T)
Champs magnétiques terrestres	$4,5 \cdot 10^{-5}$
Champ magnétiques urbains	$1,1 \cdot 10^{-7}$
Champs magnétiques cardiaques	$1,0 \cdot 10^{-14}$

2.3 Potentiel de l'IRM dans la détection de l'agrégation de NPSOF

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une méthode d'imagerie non-invasive se basant sur les propriétés magnétiques et les interactions moléculaires des tissus [140]. L'absence de radiations ionisantes, sa haute résolution spatiale et sa capacité de différencier les tissus mous en font l'un des outils d'imagerie de choix dans le domaine médical [140]. Cette sous-section démontre comment l'IRM peut être utilisée pour mesurer le niveau d'agrégation de NPSOF en suspension aqueuse.

2.3.1 Bases du fonctionnement de l'IRM

Une majorité de noyaux d'atomes formant un tissu tournent autour de leur axe, un phénomène appelé *spin*. Ces noyaux en rotation (les *spins*) génèrent un dipôle magnétique (avec un pôle nord et un pôle sud) [141]. Les noyaux d'hydrogène sont généralement ceux étudiés en IRM puisqu'ils sont présents en abondance au sein du corps humain et qu'ils ont le dipôle magnétique le plus fort. La figure 2.4 donne une représentation d'un *spin* d'un noyau d'hydrogène.

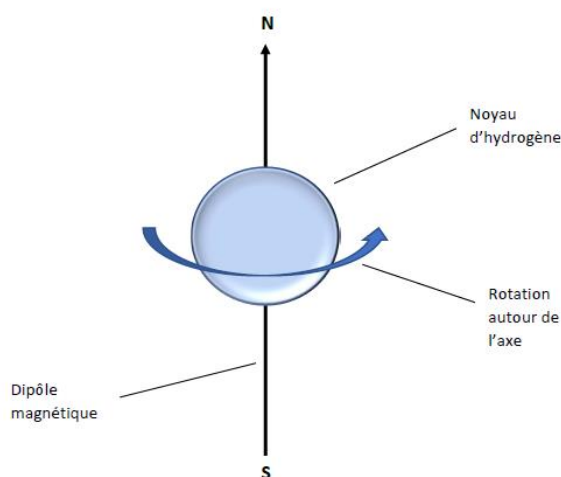


Figure 2.4: *Spin* d'un noyau d'hydrogène.

Le noyau d'hydrogène en rotation autour de son axe induit un dipôle magnétique (Nord-Sud).

À la base de l'IRM, un patient est installé à l'intérieur d'un champ magnétique statique (qui ne varie pas avec le temps) très puissant (appelé B_0). Ceci a pour effet d'aligner les *spins* dans la direction du champ magnétique. Les spins vont s'aligner de façon parallèle et antiparallèle dans une proportion près de 50%, favorisant légèrement la direction parallèle au champ B_0 . Cette magnétisation dans la direction du champ externe est appelée M_0 [140]. Par la suite, un deuxième champ magnétique (appelé B_1) venant d'une pulsation dans l'ordre de la radiofréquence est créé. Ce deuxième champ a pour effet de déplacer les *spins* selon un certain angle variant entre 0 et 90 degrés. Les spins déplacés débiteront un mouvement de rotation (appelé précession) autour du champ B_0 . Cette phase est appelée l'excitation. La fréquence à laquelle les spins font précession est dictée par B_0 et la fréquence d'oscillation donnée par B_1 doit correspondre à cette fréquence pour initier la précession (on dit que les deux fréquences sont en résonances, d'où le nom de la modalité). Les *spins* excités en précession vont induire un courant électrique dans des bobines réceptrices et constituera le signal capté par l'IRM [140]. La figure 2.5 représente la précession d'un atome d'hydrogène suite à l'excitation par B_1 .

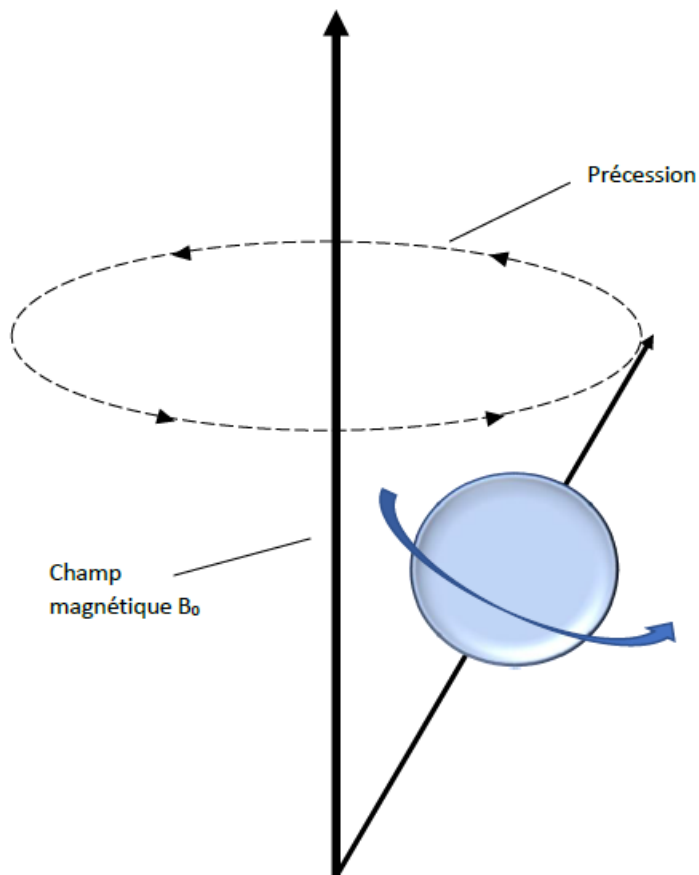


Figure 2.5: Précession d'un spin d'hydrogène.

Précession d'un *spin* d'atome d'hydrogène autour du champ magnétique B_0 suite à l'excitation par B_1 .

2.3.2 La relaxation

Les *spins* excités par B_1 vont éventuellement revenir dans leur état de base aligné sur B_0 . On appelle ce phénomène la relaxation. On divise la relaxation en IRM selon les axes donnés par les champs magnétiques B_0 et B_1 [140,141]. Après l'excitation, la magnétisation dans le sens de B_0 se voit diminuée car les *spins* ne sont plus alignés avec B_0 . Dans le cas d'une excitation à 90 degrés, la magnétisation dans le sens de B_0 devient nulle. La relaxation longitudinale fait référence à l'augmentation de la magnétisation dans le sens de B_0 (vers sa valeur de base) après l'excitation

(figure 2.6). La rapidité avec laquelle la relaxation longitudinale se fait est spécifique à différents tissus biologiques et caractérisée par un temps de relaxation appelé T_1 . T_1 ne correspond pas au temps pris pour revenir à l'état de base mais correspond plutôt à la vitesse de la relaxation. La relaxation longitudinale est un processus exponentiel et T_1 correspond environ au temps pris pour que 63% de la magnétisation dans le sens de B_0 soit revenue [142].

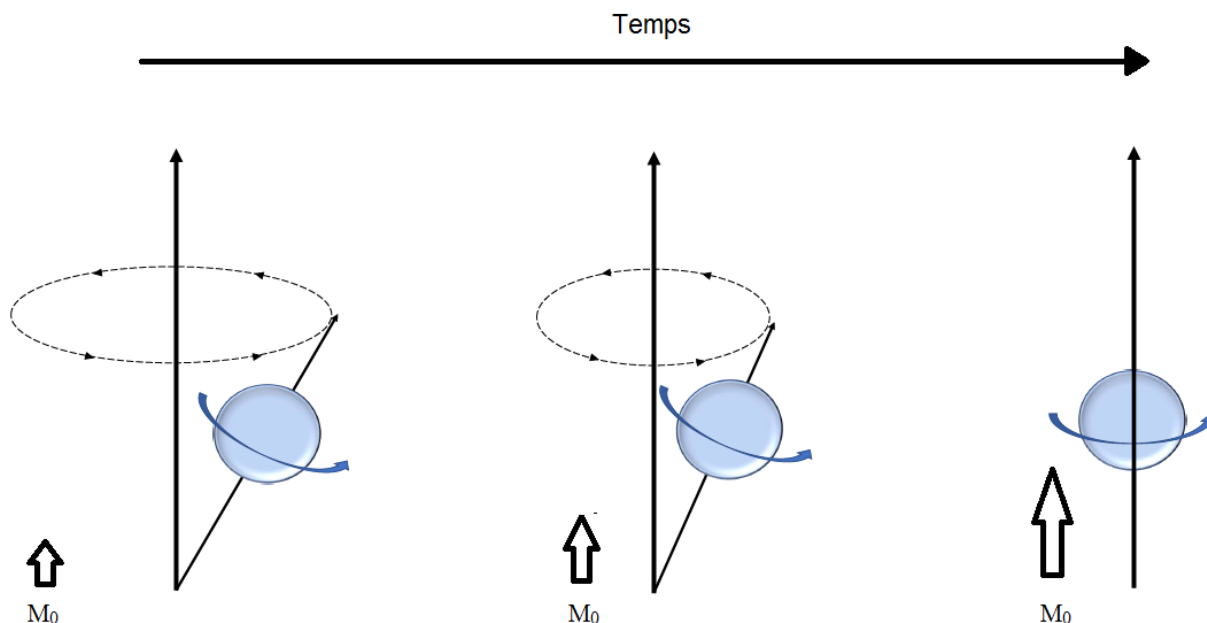


Figure 2.6: La relaxation longitudinale.

Après un certain temps un *spin* excité reprend sa position originale, rétablissant la magnétisation M_0 .

Après l'excitation, une magnétisation dans le sens de B_1 est créée et cette dernière revient à 0 après un certain temps. Ce processus est appelé la relaxation transverse. À l'inverse de la relaxation longitudinale qui fait référence à un gain de magnétisation vers son état de base, la relaxation transverse fait référence à une perte de magnétisation vers zéro. La vitesse de relaxation transverse sera aussi tissu-dépendante et caractérisée par un temps de relaxation appelé T_2 [140,142]. De la même manière que pour T_1 , la relaxation transverse est un processus exponentiel et T_2 correspond à une vitesse de relaxation. Due aux interactions entre les dipôles des spins et aux inhomogénéités

du champ magnétique B_0 , la précession des différents *spins* excités deviendra rapidement asynchrone (figure 2.7). Cette perte de synchronisme dans la précession fait que la relaxation transverse peut être plus courte que la relaxation longitudinale, puisque les *spins* asynchrones s'annulent et mènent à une magnétisation nulle dans le plan transverse même si leur précession n'est pas terminée et donne toujours une plus petite magnétisation dans le plan longitudinal [141].

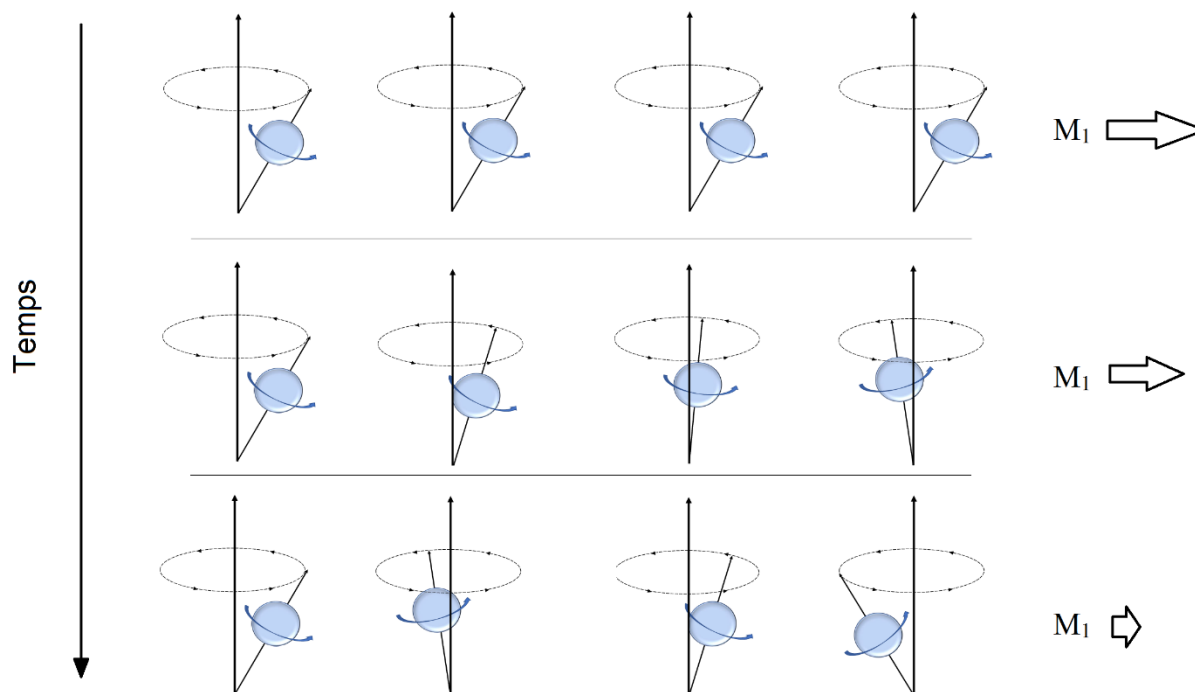


Figure 2.7: La relaxation transverse.

Le déphasage des *spins* avec le temps mène à la relaxation transverse et à une diminution de M_1

Il est possible de corriger l'effet des inhomogénéités dues au champ B_0 par des champs magnétiques pulsés dans le sens inverse de B_1 , qui auront pour effet de remettre en phase (synchroniser) une partie des *spins*. Le temps $T2^*$ fait référence à la « vrai » relaxation captée tandis que le temps $T2$ fait référence à la relaxation en présence de re-phasage des spins [143].

2.3.3 Influence de l'agrégation de NPSOF sur le signal de l'IRM

Les NPSOF étant magnétiques, elles perturbent les champs magnétiques environnants en ajoutant aux inhomogénéités du champ. Ceci contribue au déphasage des *spins* dans le plan transverse et donc raccourcit les temps T2 et T2* [144]. En s'agréant, les agrégats de NPSOF se comportent comme des nanoparticules paramagnétiques de plus grosse taille. L'influence de la taille de nanoparticules magnétiques a été modélisée en trois modèles de relaxation (régimes) [145]. Pour les plus petites particules, un régime dit de « moyenne de mouvement » domine et prédit un déclin du T2 et T2* avec une augmentation de taille des nanoparticules [146-148]. Ce déclin de T2 et T2* est dû au fait qu'en augmentant la taille des nanoparticules, les protons en diffusion aux alentours (les *spins*) seront davantage exposés aux perturbations de champ magnétique par les nanoparticules environnantes. Lorsque la taille des nanoparticules atteint une valeur critique, un autre régime appelé « régime de déphasage statique » prend le dessus. Cette valeur est atteinte lorsque le temps pris par un proton en diffusion pour parcourir le rayon d'une nanoparticule est plus grand que $\pi\sqrt{3}/2\Delta\omega$, où $\Delta\omega$ représente l'étendue des fréquences de Larmor à la surface des nanoparticules. Dans ce régime, T2 et T2* ont atteint leur minimum et ne varient plus avec la taille des nanoparticules [147,149-151].

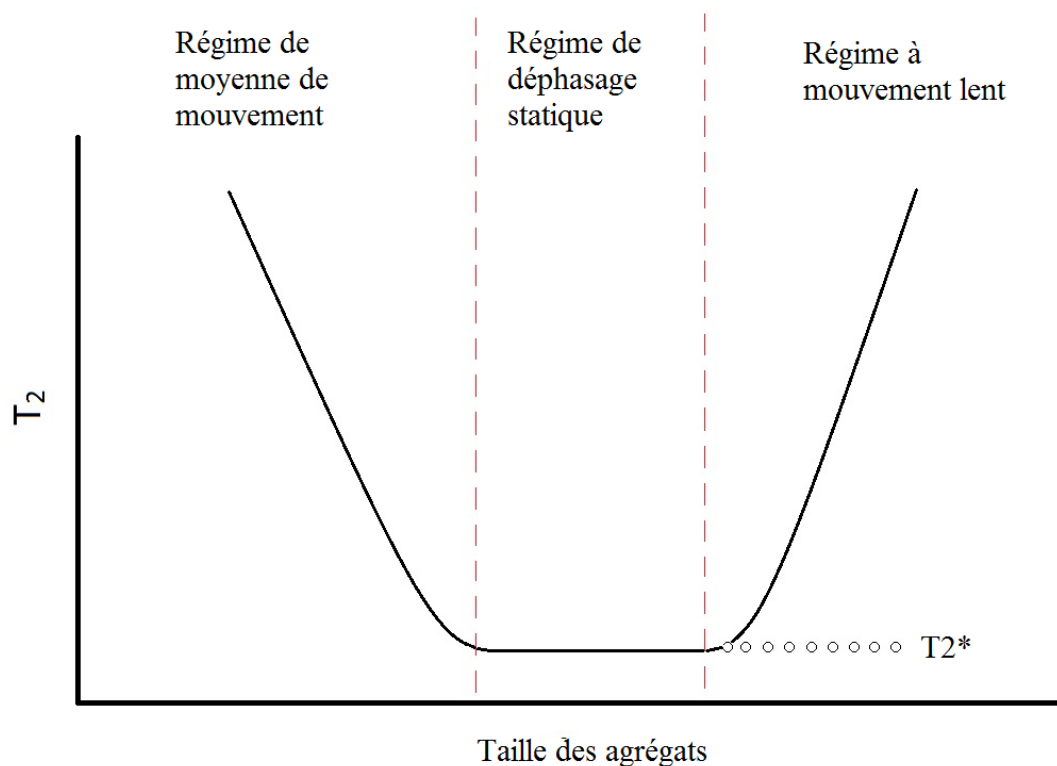


Figure 2.8: Variation du T_2 et T_2^* selon l'agrégation de NPSOF.

Ligne pointillée : T_2^*

Lorsque la taille des nanoparticules continue d'augmenter, on entre dans le dernier régime appelé « régime à mouvement lent ». Dans ce régime, le temps pris par les protons pour diffuser sur le rayon des nanoparticules devient plus long que le temps entre les pulsations de re-phasage des *spins* [146]. Ceci a pour effet de rendre significatif le re-phasage des *spins* et d'allonger T_2 . Dans ce régime, plus la taille des nanoparticules augmentera et plus cet effet sera significatif avec une élongation de T_2 [145,146]. Puisque ce régime est dépendant du re-phasage des *spins*, seul T_2 est affecté et T_2^* restera à sa valeur minimale malgré l'augmentation de taille des nanoparticules. La figure 2.8 résume les différents régimes.

En considérant qu'avec l'agrégation, la taille moyenne des nanoparticules ira en augmentant, l'agrégation de NPSOF suivra ces régimes. Ces comportements de T2 et T2* avec l'agrégation ont été observés dans la littérature [147,149,152,153]. De cette manière, il est possible de suivre l'agrégation d'une solution de NPSOF en suivant les temps T2 et T2* de la solution.

CHAPITRE 3 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE

Ce chapitre présente la démarche générale du travail de recherche en y précisant la place de chaque article et son impact sur les étapes de recherche subséquentes. Le rôle de chaque article par rapport aux objectifs de recherche et hypothèses y est également discuté.

3.1 Phase initiale: revue de la littérature et article de revue

3.1.1 Description de l'article

Le premier article est un article de revue portant sur la stabilité colloïdale des NPSOF au sein du système nerveux central. Il fait en premier lieu une revue exhaustive des facteurs pouvant influencer la stabilité colloïdale de NPSOF au sein du système nerveux central. En plus de mentionner ces facteurs, leur impact dans les conditions biologiques du système nerveux central (température, concentration ionique, etc.) est analysé. En deuxième lieu, l'impact potentiel de l'agrégation de NPSOF au sein du système nerveux central est exploré selon 3 phases qui résument le passage de NPSOF dans le système nerveux central : la livraison, le séjour et l'élimination.

3.1.2 Statut actuel

Cet article est publié dans la revue « Nanomedecine » depuis juin 2018. Nanomedecine est un journal publiant des articles revus par les pairs et indexé dans les principales banques de données du domaine médical tel que Medline. Le co-auteurs de cet article sont : Pierre-Olivier Champagne, Harrison Westwick, Alain Bouthillier et Mohamad Sawan.

3.1.3 Rôle de l'article par rapport aux objectifs

L'article nous a permis de faire une partie de la revue critique de la littérature au départ du travail de recherche afin de savoir si l'objectif général était réalisable. Ceci nous a permis de savoir où en étaient les connaissances actuelles sur le sujet et quelle place pourraient avoir nos travaux dans la recherche future. Grâce à l'article de revue, nous avons pu jeter les bases du projet et acquérir les informations nécessaires pour pouvoir élaborer les phases expérimentales subséquentes.

3.1.4 Influence sur les étapes futures

L'un des apports les plus importants de cet article dans la démarche du travail de recherche a été de changer notre approche sur la méthode de livraison des NPSOF envisagée pour l'application. Au départ une livraison directe de NPSOF au système nerveux central par le système sanguin était envisagée. Cependant, comme il a été mis évidence dans l'article, une myriade d'autres facteurs pro-agrégants sont présents dans le vivant et leur influence sur l'agrégation risque de masquer tout effet que pourraient avoir les champs magnétiques cérébraux. De plus, la livraison sanguine de NPSOF se bute à deux autres problèmes : le passage de la barrière hémato-encéphalique et l'élimination de particules d'oxyde de fer qui pourraient s'avérer toxiques. Dans ce contexte, il a été décidé que les NPSOF seraient isolées dans des capsules plastique qui seraient déposées directement sur le cortex par une intervention chirurgicale. De cette manière, on résout à la fois le problème de la livraison/élimination et de l'influence des autres facteurs pro-agrégation. Les NPSOF étant physiquement isolées du vivant, les champs magnétiques cérébraux seront le seul facteur pro-agrégant externe pouvant influencer les NPSOF. De plus, puisque l'application envisagée des NPSOF est pour la détection de foyers épileptiques en vue d'une chirurgie, l'implantation des NPSOF pourrait se faire à l'intérieur du processus chirurgical. Dans l'application envisagée, les NPSOF sont d'abord implantées lors d'une première chirurgie. Après une certaine période de temps pendant laquelle les NPSOF s'agrègent sous l'influence des champs magnétiques cérébraux on procède à une IRM qui permettrait de discerner les zones où les NPSOF sont plus agrégées, correspondant au foyer épileptique qui serait enlevé lors d'une deuxième intervention pendant laquelle les NPSOF seraient aussi enlevées.

3.2 Première phase expérimentale: preuve de concept

3.2.1 Description de l'article

Le deuxième article est un article de conférence qui constitue une première preuve de concept supportant les travaux de recherche actuels. Dans les travaux décrits dans l'article, l'activité cérébrale provient de tranches de cerveau de rat maintenues en vie grâce une solution nutritive. On ajuste l'activité des tranches de cerveau soit en induisant la mort de la tranche (aucune activité), en la laissant dans le liquide nutritif (activité basale) ou en ajoutant une drogue (bicuculine) qui augmente son activité (activité augmentée). Des NPSOF fluorescentes enrobées d'amidon sont acheminées directement dans l'épaisseur des tranches par le biais de micropipettes de verre. Les NPSOF en suspension aqueuse restent à l'intérieur des micropipettes pour éviter tout contact direct entre les NPSOF et le tissu. Une agrégation plus importante des conditions basale et activité augmentée par rapport à la condition sans activité a pu être observée sous microscope à fluorescence.

3.2.2 Statut actuel

Cet article a été publié en aout 2016 dans les procédés de l'« IEEE Engineering in Medecine and Biology Society ». Il a été présenté oralement à cette conférence (Orlando, USA) en aout 2016. Les co-auteurs de cet article sont : Pierre-Olivier Champagne, Dang Nguyen, Lionel Carmant, Alain Bouthillier, Nathalie Sanon et Mohamad Sawan.

3.2.3 Rôle de l'article par rapport aux objectifs

Cet article a pour but de répondre à l'hypothèse 1 qui suppose que les champs magnétiques cérébraux sont un facteur contributoire à l'agrégation de NSPOF d'oxyde de fer à proximité. En démontrant une agrégation plus importante de NPSOF en présence d'activité cérébrale au sein des tranches de cerveau, cet article a rempli son objectif au sein de la démarche de l'ensemble du travail de recherche.

3.2.4 Influence sur les étapes futures

Une fois cette preuve de concept conclue, il a été possible d'entamer la suite des phases expérimentales plus complexes et demandant davantage de ressources mais également plus près des méthodes envisagées de livraison et de visualisation de l'agrégation de NPSOF.

3.3 Deuxième phase expérimentale : modèle animal *in vitro*

3.3.1 Description de l'article

Le troisième article rassemble les principaux résultats des travaux de recherche actuels. Le modèle de tranches de cerveau à 3 niveaux d'activité introduit dans l'article 2 est réutilisé. Cette fois-ci des NPSOF sans enrobage en suspension aqueuse sont contenues dans des capsules plastiques directement posées sur les tranches de cerveau. L'agrégation des NPSOF a été quantifiée à l'aide de deux méthodes : par la diffusion dynamique de la lumière et par IRM. Les résultats présentés dans l'article sont positifs, avec une agrégation des NPSOF proportionnelle à l'activité cérébrale vue à la fois par la technique de diffusion dynamique de la lumière et par l'IRM.

3.3.2 Statut actuel

L'article est actuellement soumis à la revue « Scientific Reports » (journal avec comité de pairs) depuis novembre 2019. Une première demande de révision a été demandée et est en préparation. Le co-auteurs de cet article sont : Pierre-Olivier Champagne, Nathalie Sanon, Lionel Carmant, Dang Nguyen, Sylvain Deschênes, Philippe Pouliot, Alain Bouthillier et Mohamad Sawan.

3.3.3 Rôle de l'article par rapport aux objectifs

L'article 3 a pour but de répondre à l'hypothèse 2 qui suppose que les champs magnétiques cérébraux de type épileptiformes sont à l'origine d'une agrégation plus importante et détectable

par l'IRM de NPSOF à proximité. L'agrégation a d'abord été mesurée à l'aide d'une méthode plus éprouvée (diffusion dynamique de la lumière) puis confirmée à l'aide de l'IRM, permettant d'affirmer qu'avec l'IRM il est possible de détecter l'agrégation de NPSOF induite par l'activité cérébrale. Ces résultats sont au cœur de l'objectif principal des travaux de recherche actuels et permettent de soutenir la faisabilité d'une nouvelle méthode de détection de l'activité cérébrale utilisant des NPSOF et l'IRM.

3.3.4 Influence sur les étapes futures

Les résultats *in vitro* obtenus dans l'article 3 ont pu permettre la transition vers le modèle *in vivo* de l'article 4, qui se rapproche encore davantage de l'utilisation projetée dans le domaine clinique.

3.4 Troisième phase expérimentale: modèle animal *in vivo*

3.4.1 Description de l'article

Le quatrième article relate l'expérience initiale d'implantation de capsules de NPSOF chez le rat vivant. Des capsules de NPSOF ont été implantées chirurgicalement directement sur le cortex de rats sains et de rats rendus épileptiques. Des capsules non implantées ont servi de contrôle (capsules non-exposées à l'activité cérébrale) et l'agrégation a été mesurée à l'aide de l'IRM. Une agrégation plus importante a été notée dans les capsules implantées que dans les capsules servant de contrôle. Une différence significative d'agrégation n'a pas pu être démontrée entre les capsules implantées chez les rats sains et épileptiques.

3.4.2 Statut actuel

Cet article est actuellement soumis à la revue « Epilepsy Research » (journal avec comité de pairs) depuis janvier 2020. Le co-auteurs de cet article sont : Pierre-Olivier Champagne, Nathalie Sanon, Lionel Carmant, Philippe Pouliot, Alain Bouthillier et Mohamad Sawan.

3.4.3 Rôle de l'article par rapport aux objectifs

L'article 4 a pour but de répondre à l'hypothèse 3 qui suppose que des nanoparticules d'oxyde de fer s'agrègent d'une façon préférentielle face à un foyer épileptique connu dans un modèle de rat épileptique. Cet article est une preuve de concept du produit final désiré: une capsule implantable directement sur le cortex dont le signal à l'IRM peut être altéré selon l'activité cérébrale. Bien que les capsules implantées aient démontré un niveau d'agrégation supérieur à celles non-implantées, une différence significative entre rats épileptique et sains n'a pu être démontrée. Ceci est attribué majoritairement à des difficultés d'ordre technique en lien avec le modèle animal (mort d'animaux, complications neurologiques, absence de crises épileptiques lorsque désirées et présence de crises épileptiques lorsque non désirées).

3.4.4 Influence sur les étapes futures

Cet article a permis d'établir une première transition des trouvailles du modèle *in vitro* vers un modèle *in vivo*. Il a aussi mis en évidence que le modèle de rat utilisé est sous-optimal pour démontrer correctement si un foyer épileptique connu peut engendrer une agrégation préférentielle de NPSOF à proximité. Les étapes futures devront envisager l'utilisation d'un modèle animal plus gros, en mesure de supporter plus aisément une intervention chirurgicale d'implantation.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1 (COMPLÉMENT DE REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE): COLLOIDAL STABILITY OF SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM: A REVIEW

Auteurs : Pierre-Olivier Champagne, Harrison Westwick, Alain Bouthillier, Mohamad Sawan

Revue : Nanomedecine

4.1 Abstract

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) consist of nanosized metallic-based particles with unique magnetic properties. Their potential in both diagnostic and therapeutic applications in the central nervous system (CNS) is at the source of an expanding body of literature in recent years. Colloidal stability of nanoparticles represents their ability to resist aggregation and is a central aspect for the use of SPION in biological environment such as the CNS. This review gives a comprehensive update of the recent developments and knowledge on the determinants of colloidal stability of SPIONs in the CNS. Factors leading to aggregate formation and the repercussions of colloidal instability of SPION is reviewed in detail pertaining to their use in the CNS.

4.2 Introduction

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) consist of particles of magnetite (Fe_3O_4) or maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) in which the individual size of the particles is smaller than the size of a single magnetic domain for the given material [67]. Iron oxide particles are considered to be superparamagnetic when smaller than 10 nanometers (nm) [67]. Superparamagnetism in nanoparticles can be explained by the fact that the dipole (south and north) of each particle is constantly changing direction along an orthogonal axis (fig. 4.1). These changes in direction are due to both intrinsic flipping of the poles and thermic agitation of the particles (Brownian movements). When no external magnetic field is applied, there is no net dipole of the SPION suspension due to the constant movement of the individual dipoles counterbalancing themselves.

(fig. 4.1). With the application of an external magnetic field, the dipoles align and the SPIONs become strongly magnetised, and when the field is removed, the SPIONs revert to their original un-magnetised state.

The magnetic properties of SPIONs (superparamagnetism), which renders them highly susceptible to magnetic fields without keeping an apparent magnetisation once the field is removed [154]. It is this important characteristic of SPIONs that allows them to react to strong magnetic fields [67] and to generate heat when submitted to alternate fields [155]. Unfortunately, superparamagnetic properties are lost when SPION aggregate into clusters (fig. 4.1), rendering these assemblies permanently magnetised [126]. Colloidal stability of SPION is thus paramount for their in vivo applications.

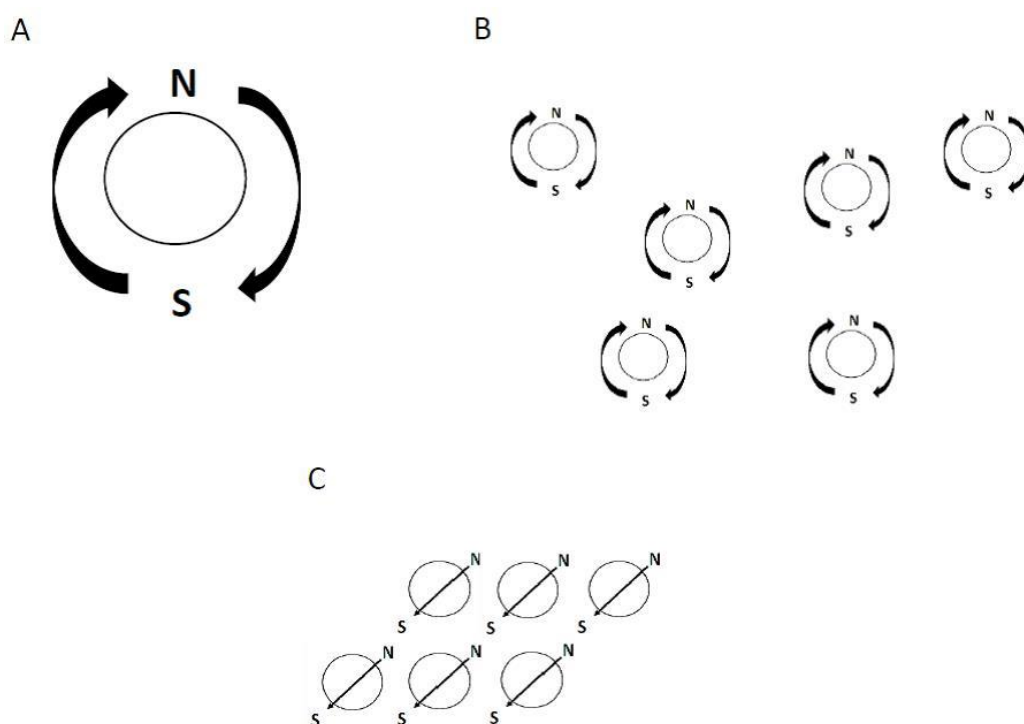


Figure 4.1: Effect of aggregation of SPION on their magnetism.

a: single SPION with an alternating dipole (North and South), b: multiple SPIONs with each having alternating dipoles, the resulting effect is that the net magnetisation is null, c: a representation of an aggregate of SPIONs, the dipoles interactions aligned the dipoles of the SPIONs, creating a net magnetisation

The unique magnetic properties of SPION offer novel and innovative bio-medical applications, and have recently been the focus of many studies for applications regarding the central nervous system (CNS). From targeted drug delivery [156] to heat-induced cell death [157], magnetothermal stimulation [158], blood-brain-barrier remodeling [159] and brain imaging using magnetic resonance imaging (MRI) [160], SPION seem to have many promising uses for future applications in the CNS

The goal of this review is to comprehensively address the factors involved in the colloidal stability of SPIONs in the CNS. Individual factors and implications of SPION colloidal stability in CNS is discussed and analyzed. For the purpose of this review, the passage of SPIONs through the CNS will be presented as a 3-step process: 1) delivery, 2) stay, and 3) elimination.

4.3 Determinants of colloidal stability of SPION in the CNS

Stability of a nanoparticles suspension is defined by its ability to resist aggregate formation. This is influenced by the frequency and efficiency of collisions between particles [161]. The 3 main factors determining the frequency of collisions are Brownian motion, hydrodynamic flow, and nanoparticle concentration. Many factors can affect the efficiency of collision of suspended nanoparticles. These factors can be divided in attractive and repulsive forces, with aggregation occurring when attractive forces surpass repulsive forces. Table 1 summarises the main factors that could affect the stability of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in neural tissue. A landmark theory in determining the stability of nanoparticles in suspension is the Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) theory that aims to predict the aggregation behavior of particles in aqueous colloidal suspensions [162]. It takes into account the 2 major forces at play in the efficiency of nanoparticle interaction, namely the Van der Waals forces (attractive) and the electrostatic double layer (EDL) forces (repulsive). The next section depicts each determinant of the colloidal stability of SPIONs aimed to be delivered in the CNS.

Table 4.1: Determinants of colloidal stability of SPIONs in the CNS.

Factor	Effect on stability
<i>Collision frequency</i>	
Brownian motion (size, temperature, viscosity)	Pro or anti-aggregation
Hydrodynamic flow	Anti-aggregation
Concentration	Pro-aggregation
<i>Collision efficiency</i>	
Van der Waals forces	Pro-aggregation
Electrostatic forces (electrolytes, pH)	Anti-aggregation
Steric forces	Anti-aggregation
Magnetic forces	Pro-aggregation
Hydration forces	Anti-aggregation

4.3.1 Brownian motion

First observed by the botanist Robert Brown while observing grains of pollen under microscope [163], what is referred today as Brownian motion refers to the seemingly random movement of small particles in a fluid caused by their collisions with ambient moving molecules [76]. Brownian motions could influence nanoparticles both towards aggregation and disaggregation [164]. Increased movements of the nanoparticles lead to an elevated rate of collisions, augmenting the odds of aggregate formation. On the other hand, the kinetic energy given by Brownian motions could lead to the breakup of weakly formed aggregates. Three factors can influence the Brownian motion of nanoparticles: size of the particles, the viscosity of the medium and ambient temperature.

Size

With decreasing size, Brownian motions augment and as previously said, this could increase both instability and stability. However, what is mostly observed is that with decreasing size, aggregates form more easily [165]. This emphasizes that other factors than Brownian motion must be at play. Some mention that with smaller nanoparticles, a higher surface volume is exposed and available for collision [81]. Also, in line with the DVLO theory, with decreasing size, shielding effect of diluted ions is more pronounced and the repulsive electrostatic forces (discussed later) will be weaker.

With respect to the CNS, as it will be further discussed later (see: delivery of SPIONs to the CNS), a certain (smaller) size of SPIONs is optimal for passing through the blood-brain-barrier to reach the CNS [166]. Another aspect to keep in mind in regard of the size of SPIONs is that their magnetic susceptibility augments with size. Thus, bigger SPIONs will react more to external applied magnetic fields. This can be taken into account in applications such as magnetic targeting and magnetic heating.

Temperature

Augmenting temperature leads to elevated Brownian motion which can lead to either aggregation or desegregation, with both behaviours being observed in different studies [164]. Since the brain is the most heat-sensitive organ in the human body [167], temperature is tightly regulated in the CNS. In normal physiological conditions, the brain temperature fluctuates within 3 °C [168], which might have minimal impact on SPIONs stability since significant impact on aggregation was seen in studies with temperature gaps above 10 °C [164]. However, local temperature elevations up to 50 °C are seen when using magnetic thermotherapy [169]. Thus, the effect of temperature on SPIONs (and as discussed in the “magnetic forces” section, the effect of the magnetic field itself) in this application could influence significantly their stability and further use.

Viscosity

Viscosity represents the internal resistance of a liquid to flow or shear. Augmenting viscosity will reduce the Brownian motion of particles diluted in a solvent [170]. As it varies with fluid composition, viscosity changes between blood, extracellular and intracellular environment [112]. However, at the nanoscale, the viscosity experienced by nanoparticles is different than the viscosity of whole fluid [171]. The nanoparticles, being small enough, are still surrounded by solvent and experience a viscosity closer to that of the solvent (microviscosity) than the one of the more complex solution in which it is (macroviscosity). Thus, being in blood or intra/extra cellular environment, SPIONs will generally be subjected to the viscosity of water instead of the viscosity of blood or extra/intra cellular fluid. Thus, the fluid composition in the CNS will have little impact on the viscosity-related aggregation of SPIONs. Interestingly, aggregates formation augments the

macroscopic viscosity and aggregates augmenting in size will progressively be subjected to the influence of macroviscosity, diminishing their Brownian motion [172].

4.3.2 Hydrodynamic flow

Shear forces in fluid dynamic represent the tangential forces at the interface between a moving fluid and its boundary. The effect of shear forces on nanoparticle aggregation results in augmented stability, via enhancement of dispersion of particles (diminishing their collisions) and rupture-like deformation preventing aggregation [77]. Grabinski *et al.* developed a model simulating blood flow in vessels and measured the effect of flow on nanoparticles aggregation. Their finding was that dynamic flow decreased the aggregation of nanoparticles [173]. In the CNS, fluids in motion are mainly represented by blood and cerebrospinal fluid (CSF). Regarding the vascular apparatus, shear stress in the vascular system is actually higher than some experimental values studied and it is inferred that its effect on slowing aggregate formation would be more important than those observed in these studies [173]. Thus, vascular delivery of SPIONs to the CNS would contribute to the stability of SPIONs via shear stress. As the vascular branching progresses to the level of the capillaries in the brain, the level of flow and shear stress is subjected to an important heterogeneity [174], making the impact of shear unequal in different areas. In physiologic conditions, flow (and shear) varies in the brain according to brain activity in different regions, a phenomenon called the hemodynamic response [175]. This added heterogeneity could impact further on the effect of shear stress on the stability of SPIONs brought to the CNS via the vessels. Cerebral blood flow and shear stress can also vary in pathological conditions such as seizures, head trauma and occlusive vascular disease [176].

4.3.3 Concentration

A higher concentration of nanoparticles is expected to increase the rate of aggregation of the later. This can be explained by the fact that a higher number of nanoparticles increases the probability of collisions between them, elevating the probability of their aggregation [78]. This behavior was observed in SPIONs by He *et al.*, who confirmed an increase in aggregation with elevated concentration [78]. The final concentration of SPIONs in various regions of the CNS will depend

on various factors such as their size, the dose used, the pathway taken to deliver them and their specific coating.

The most direct mean of delivery of SPIONs is through surgical injection, which allows to control the exact concentration of SPIONs delivered. The technique of using a pressure gradient while injecting nanoparticles directly in the brain is called convection-enhanced delivery (CED) [177]. SPIONs delivered by CED have been investigated for the treatment of brain tumors [178]. Coating also affects the dispersion of nanoparticles delivered by CED; for example PEG coated nanoparticles were able to diffuse more into the brain than those without PEG coating because of the diminution of the interactions with the extracellular matrix [179]. Details regarding the impact of SPION stability on their delivery to the CNS will be reviewed in the “Delivery of SPIONs to the CNS” section.

4.3.4 Van der Waals forces

The van der Waals forces consists of the weak interactions between the permanent and induced dipoles of molecules. They are distance-dependant (the closer the nanoparticles, the stronger the van der Waals forces) and act as an attractive force between similar nanoparticles since they are always attractive between identical materials [180]. In the classic DLVO theory, they consist of the main attractive force driving aggregation between nanoparticles [181]. Be it in the central nervous system or anywhere else, the van der Waals forces are always present between particles since they represent an intrinsic property of the materials. The van der Waals forces between two spherical nanoparticles will vary with radius of the particles, interparticle distance, and the nature of the particles [79].

4.3.5 Electrostatic forces

When in suspension in a polar medium such as water, most substances acquire a surface charge. The equally charged (positive or negative) nanoparticles in solution will then repulse each other due to electrostatic forces, leading to better colloidal stability [80]. Diluted ions in solution

organises around nanoparticles, creating the electrical double layer (EDL) [182]. The “double” composition of the EDL comes from the 2 layers of ions that composes it (fig. 4.2). The innermost layer, named “Stern layer” after the German physicist Otto Stern, is composed of counter-ions (ions of opposed charge of that of the nanoparticle) attached strongly enough to the nanoparticles that thermal diffusion cannot move them [182]. The outermost layer is called the diffuse layer and counter-ions being farther away from the nanoparticle move more freely [183]. Ions of opposite charge attracted by the counter-ions are also present in the diffuse layer. The presence of the EDL creates a voltage gradient in the order of millivolts that diminishes as the distance to the nanoparticle augments.

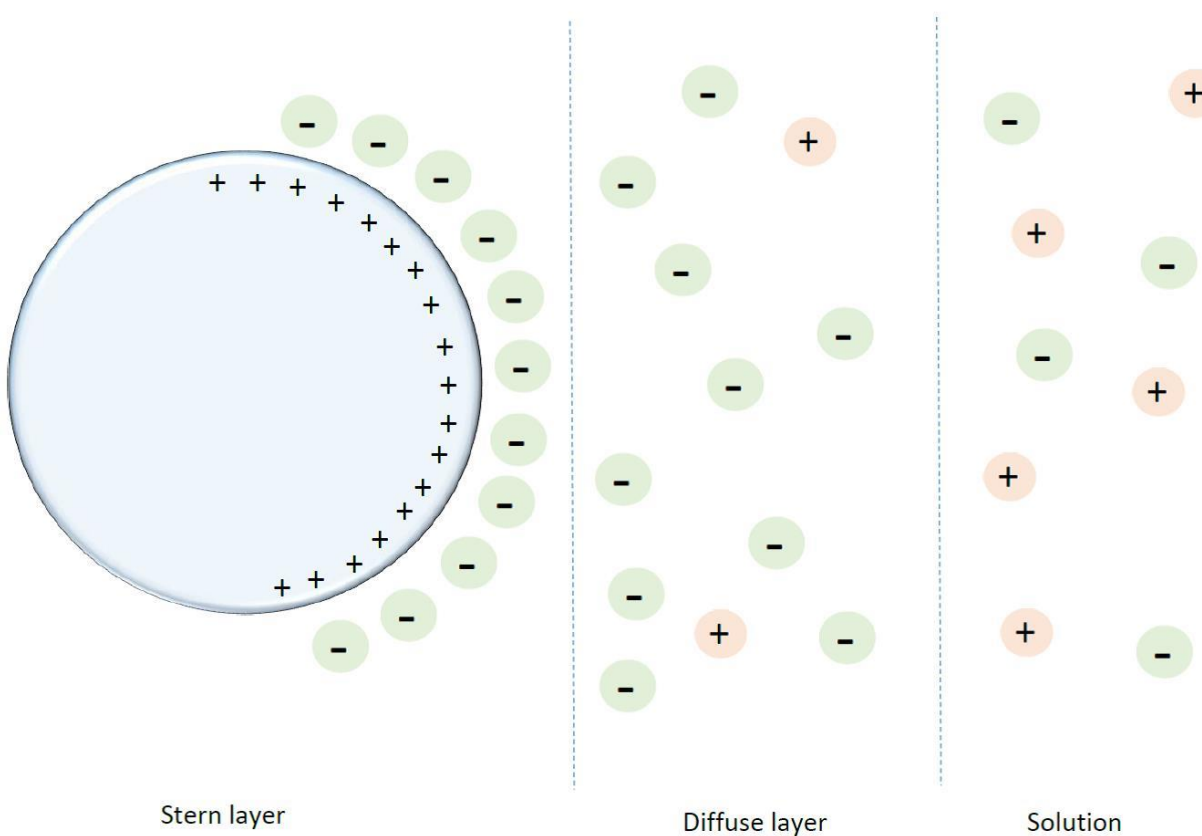


Figure 4.2: Schematic representation of the electric double layer (EDL) forming around nanoparticles.

A positively charged nanoparticle is surrounded by firmly adherent negative counter-ions in the Stern layer while and less adherent negative counter-ions in the diffuse layer.

In the diffuse layer exists a “slipping plane”, a point from which ions inside will move along with the nanoparticle. The electrical potential between the slipping plane and the solution is called the zeta potential (ζ) [184]. A higher zeta potential is associated with higher charges at the vicinity of the slipping plane which can more effectively repulse each other, leading to a more stable nanoparticle suspension. One of the main factors influencing the importance of the repulsive electrostatic forces is the concentration of ions in solution. With higher ionic concentration the electrostatic forces decrease, favouring aggregation. This can be explained by a shielding effect of the ions in the diffuse layer: with more ions in solution, more ions negate the counter ions in the diffuse layer, diminishing the net charge at the border (zeta potential) and the repulsive electrostatic forces [81]. The solution’s composition leading to a zeta potential of zero is referred to as the “point of zero charge”. At this point the repulsive effect of EDL is null. Another important factor for the electrostatic forces is the valence of diluted ions, with multivalent ions (e.g. Ca^{++}) being more potent to shield the charges of counter ions than monovalent ions (e.g. Na^+) [185]. The effect of ions concentration on SPION stability has been observed extensively in experimental conditions [78]. Smaller size of SPION could render them more susceptible to charge titration (shielding), since more of their surface is exposed [78].

Ions such as Na^+ , K^+ , Cl^- and Ca^{++} are ubiquitous in living tissues (CNS is no exception). Table 2 represents the average ion concentration in the brain and in blood [186]. The Na^+ and Cl^- concentrations present in the extracellular CNS compartment is in the upper range of the tested conditions on the effect of salts of SPIONs stability [78]. It is thus expected that the ionic concentrations present in the CNS extracellular milieu will favour aggregation. The ionic charge inside neurons being slightly less, its effect on charge shielding could also be less. Looking at table 2, the ionic charge in blood is comparable to the one in the CNS. The effect of ions on stability of SPION is thus not expected to change much from their passage from blood to the CNS.

Table 4.2: Ionic composition of the CNS milieu and blood.

Ion	Concentration (meq/L)		
	CNS: neuron	CNS: extracellular	Blood
Potassium (K ⁺)	140	5	4,2
Sodium (Na ⁺)	5-15	145	142
Chloride (Cl ⁻)	4-30	110	108
Calcium (Ca ²⁺)	0,0001	1-2	1,3

Acidity, Potential of hydrogen (pH)

The acidity, potential of hydrogen (pH) will also impact on the particle's surface charge and electrostatic forces. With increasing pH, charge shielding gets more important, diminishing the electrostatic forces and favouring aggregation [78]. This behavior was observed experimentally in SPIONs [122]. The pH is tightly regulated in the human organism and does not vary much between blood (7.35) and the CNS (7.3) [185]. Brain tumors such as malignant gliomas and metastasis can however harbour a much lower pH (6.5 to 6.9) in their extracellular environment. One of the main cause for this is the “Warburg effect”, a tendency for tumors to derive energy through the anaerobic glycolytic pathway creating lactates (lactic acid) [187]. These variations in pH could affect stability of SPIONs delivered to tumours. Interestingly, Liu *et al.* used to their advantage the influence of tumoral acidotic pH on nanoparticles stability to tailor aggregation in tumors [188]. Using gold nanoparticles with specifically designed pH-sensitive zwitterionic surface, they were able to promote aggregation and retention of nanoparticles in tumors. Another acidotic environment lies in the endosomes and lysosomes (pH 4.5-5.5), the vesicles by which the cells can internalise nanoparticles [189].

4.3.6 Steric forces and coating

Coating of nanoparticles with various agents can serve to augment stability and to add specific functionality. Stabilisation through coating is a necessity for most of the nanoparticles meant to be used in biological environment. Stability using surface coating can be achieved by an increase of surface charge (electrostatic forces) and by steric repulsion. Since electrostatic forces were

discussed earlier, this section mainly focuses on the later. The types of surface coating used to stabilise nanoparticles in solution are sometime divided into 2 types: surfactant and polymers. Both of them can use steric and electrostatic forces to stabilise the system and the main difference relies in the strength of attachment between the coating agent and the nanoparticles. Surfactants adsorb onto the surface of the nanoparticles usually in a reversible fashion, and environmental variations can affect this adsorption-desorption behaviour [185]. On the other hand, polymer's attachment via adsorption or covalent bounds onto nanoparticle's surface is usually irreversible [190].

Steric forces comes from the overlap of coating layers composed of long chain molecules. With compression of the coating layers, the entropy of the long chain molecules decreases, creating a repulsive force. If the material coating the nanoparticles possess a good solubility in the given solvent, the resulting steric forces will be repulsive and favour stability [82]. On the other hand, a coating material with poor solubility will favour coalescence of the nanoparticles to diminish the contact with the solvent [191]. Polymers used to coat nanoparticles usually have a good solubility, favouring stability through steric repulsion. Given the reversible nature of coating with surfactant and that some of them can be toxic for cells, current coating trends for applications in the CNS are favouring polymers. Table 4.3 lists the main coatings studied in SPIONs to be used in the CNS [61,192-197]. For a more exhaustive list of possible coatings of SPIONs, the reader is encouraged to look into this review [198]. One of the most popular coatings for in vivo applications at large is poly(ethylene glycol) (PEG). PEG is hydrophilic and stabilises nanoparticles through steric forces. It also possesses the advantage of resisting excessive protein adsorption (protein fouling) and has good biocompatibility [199]. Stabilizing coatings relying mostly on electrostatic forces are rarely stable in biological medium because of the strong ionic charge present [200]. Interestingly, coating SPIONs can influence on their magnetic behavior by reducing their magnetic moment. Three factors could explain this phenomenon: 1) diminution of the core size due to the chemical reaction at the surface of the SPIONs, 2) the reaction between the SPIONs and coating leading to oxidation of magnetite to the less magnetic maghemite, and 3) the formation of new bonds with the coating leading to a spin canting phenomenon (tilt of the magnetic spin, diminishing their net magnetisation) [201].

Table 4.3: Surface coating for SPIONs used in CNS.

Coating	Mechanism of stability enhancement	Properties	Examples of potential uses in the CNS	References
Poly(ethylene glycol) (PEG)	-Steric repulsion	-Biocompatible -Longer circulation in the bloodstream -Possibility to add functional groups -Augments cell internalisation	-Imaging of brain tumors -Imaging cerebral ischemia -Crossing the BBB when conjugated (e.g. with lactoferrin)	[202]
Dextran	-Steric repulsion -Electrostatic forces	-Biocompatible -Longer circulation in the bloodstream -Possibility to add functional group	-Targeting tumors when conjugated (e.g. epithelial growth factor) -Tumor margin visualisation	[198]
Starch	-Steric repulsion	-Biocompatibility -Possibility to add functional group	-Drug delivery -Hyperthermia	[199]
Chitosan	-Steric repulsion (depending on which derivative) -Electrostatic forces (depending on which derivative)	-Biocompatibility -Antibacterial -Easily cross cell membrane	-Drug delivery -Gene therapy	[200]
Silica	-Steric repulsion -Electrostatic forces	-Biocompatibility -Possibility to add functional group (e.g. fluorophore)	-Stem cell transplantation -Neural stem cell labeling -Brain tumor targeting	[201]
Polyvinyl alcohol (PVA)	-Steric repulsion	-Biocompatibility -Possibility to add functional group	-Drug delivery -Hyperthermia	[203]
Dimercaptosuccinic acid (DMSA)	-Steric repulsion -Electrostatic forces * Interparticle disulfide bond could hinder stability	-Biocompatibility -Possibility to add functional group	-Amyloid Abeta labeling for Alzheimer Disease	[204]
Alginate	-Steric repulsion -Electrostatic forces	-Biocompatibility -Possibility to add functional group	-Gene delivery to brain tumor cells -Imaging of brain tumors	[199]

Protein adsorption and the concept of biological identity

Nanoparticles used in a biological environment will come in contact with proteins, lipids, cells and ions. Charged nanoparticles will attract proteins, creating a layer around them, the “Corona” [203]. Many factors involving both the nanoparticle and the protein composition of the medium will influence the nature and size of the corona surrounding SPION over time. Regarding the nanoparticles, two of the most important factors influencing the adsorption of proteins are their hydrophobicity and surface charge [204]. The importance of protein binding is directly proportional with their surface charge and inversely proportional to their hydrophobicity [202]. The protein crown can affect the interactions of the nanoparticles with the organism, defining their biological identity [205].

The effect of the corona on colloidal stability can be both stabilizing and destabilizing [200]. Adsorbed proteins on the surface of nanoparticles can stabilise them the same way other coatings do: through steric repulsion and/or electrostatic forces. For example, Chen et al observed in vitro that SPIONs coated with 2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) were stabilised by the adsorbed protein corona while they aggregate in the absence of proteins [206]. On the other hand, protein corona can also destabilise nanoparticles in suspension through charge shielding (the same way ions can) and/or interactions (bridging) between the coating proteins [207]. The degree of protein coating also influences the aggregation behaviour, with nanoparticles that are not completely covered by proteins aggregating through bridging and intercalation of proteins [208]. Hirsch *et al.* showed in vitro that charged PVA coated SPIONs were more unstable in the presence of proteins [204]. Interestingly, some have observed a stabilizing effect of high ions concentration when nanoparticles are covered with proteins. This so-called “anomalous stability” is explained by short-range (0.2 nm) repulsive hydration forces [209]. These forces arise from the layering of water molecules around the charged proteins. When the particles get in close vicinity there is necessity for ions to lose their bound water in order to allow their approximation. From this energy barrier arises the repulsive hydration force. The ionic charge at which anomalous stabilisation of protein-covered nanoparticles begins is in the lower range than the one in the CNS. Thus, anomalous stability could play a small role in the stability of protein-covered SPIONs in the CNS. Apart from

the ionic charge, another factor influencing the strength of hydration forces is the type of proteins, with coverage by more hydrophilic proteins leading to stronger repulsive hydration forces [209].

The exact effect of proteins on stability is still not entirely understood. It was even demonstrated that proteins from the same family can have opposite effects on nanoparticle stability [210]. Given this unpredictable effect of the corona, preventing protein adsorption with coating is one of the best ways to ensure stability. As stated earlier, neutral and hydrophilic coatings provide the least adsorption. Coatings such as PEG have been shown to greatly reduce or prevent protein corona formation, consequently enhancing the stability [211]. The density of the PEG coating as well as its conformation also impact on its ability to prevent protein adsorption.

4.3.7 Magnetic forces

A characteristic that separates SPIONs from many other nanoparticles is their superparamagnetism. It is however a double-edged sword, giving unique properties on one side while having the potential to promote aggregation on the other. Superparamagnetism helps the nanoparticles to remain stable in solution in the absence of an applied field. As stated earlier, with the permanently fluctuating dipole of each SPIONs, the net magnetisation of all nanoparticles remains null and thus there is no magnetic interaction between the particles. With the application of an external magnetic field, the magnetic dipoles of each SPIONs align with the field, which can give rise to dipole-dipole interaction (with opposed dipoles aligned) [83]. These interactions are attractive and favor aggregation (fig. 4.3). The structure of magnetically-induced aggregates will depend on many factors but will be most of the time linear (chain) in the direction of the applied field [83]. This behaviour of SPIONs was observed in many experiments and simulations [84]. As seen earlier, formed aggregates of SPIONs lose their superparamagnetism and become permanently magnetised (ferromagnetic). These magnetic aggregates have a constant dipole that can interact with and attract other aggregates and surrounding SPIONs, further compromising the stability of the system [61]. Thus, the use of stabilisation methods such as surfactant or polymer coating are vital for the colloidal stability of SPIONs that will be subjected to magnetic fields. However, coating might not prevent completely magnetic aggregation, as shown by Chin *et al.* who observed aggregation of coated superparamagnetic particles in high magnetic fields of 0.4 T (Tesla) [115].

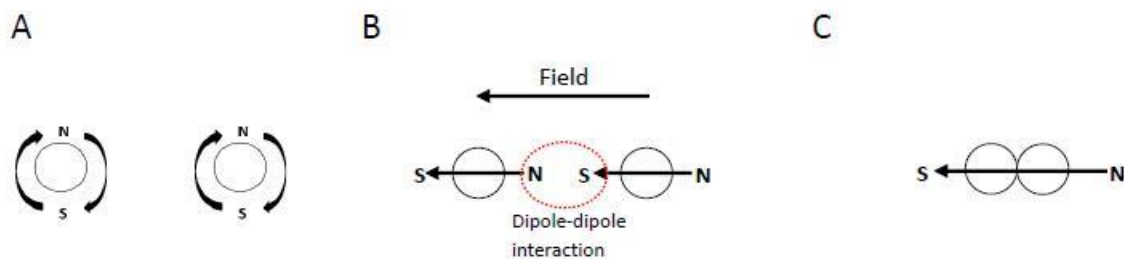


Figure 4.3: Dipole-dipole interaction of two SPIONs caused by an external magnetic field. a: alternating magnetic fields of the two SPIONs prior to field application, b: field application and dipole-dipole interaction, c: chain cluster formation with net magnetisation even when the external field is removed.

SPIONs in the CNS could be affected by two types of magnetic field: the intrinsic fields of the brain and the extrinsic applied fields. Brain magnetic fields come from the electric impulses of neural networks and are very weak. In an elegant simulation by Blagoev *et al.*, the magnetic field of a single neuron was calculated to be in the order of the picotesla (10^{-12} T) in its vicinity [7]. The overall magnetic field affecting SPIONs in the CNS would be the sum of local neuronal fields at a given moment. From data measuring human magnetic activity using magnetoencephalography (MEG), the minimal local magnitude of the magnetic field that could affect SPIONs in the CNS would be in the order of the microtesla (10^{-6} T) [7]. Certain situations favouring simultaneous neuronal firing such as tasks execution or epileptic discharges produce higher magnetic fields [212]. Magnetic aggregation of SPIONs has been documented with magnetic fields as low as 10^{-4} T [213]. In a pilot study, Champagne *et al.* observed an aggregation behaviour of SPIONs proportional to the magnetic activity on mice brain slices [214]. If brain magnetic fields could influence on the stability of SPIONs is still unclear and if present, their contribution among other factors might be minimal.

Extrinsic fields comprise those used in the various potential applications of SPIONs such as MRI for imagery, alternating fields for thermotherapy and magnetic fields gradients for guided therapy. They are on a much larger scale than local brain magnetic fields and their influence on SPIONs stability has been studied. Bae *et al.* observed aggregation for SPIONs under magnetic fields similar to those of MRI [215]. David *et al.* showed in an *in vitro* model that magnetic targeting of starch-coated SPIONs using fields in the order of 0,4T would lead to aggregates formation in the brain capillaries [85]. Similarly, static strong magnetic fields were proven to cause aggregation of PEG-coated SPIONs in biological environment [216]. Sun *et al.* also observed a destabilizing effect of alternating magnetic fields for hyperthermia on SPIONs [217].

4.3.8 Hydration forces

Hydration forces are still not completely understood and are often viewed as the mechanism by which hydrophilic particles repulse each other in solution [209]. Current understanding of hydration forces state that it is due to the ordering and restructuring of water molecules in contact with the surface of the dissolved particle [218]. It is the overlap of the two layers of ordered water molecules at the surface of approaching particles that would create the repulsive force. The most observed effect of dissolved ions is to promote hydration forces [86], however it is not always the case. Chen *et al.* observed a destabilizing effect of magnesium ions (Mg^{2+}) on dextran-coated SPIONs at high temperature while observing a stabilizing effect of calcium ions (Ca^{2+}) in the same conditions, explaining their results by the fact that surface-bound Ca^{2+} favoured hydration while unbound Mg^{2+} could not provide enough hydration [219]. However, SPIONs were stable with both ions at room temperature. The amplitude of hydration forces will also be dependent on the solvent pH, augmenting with increasing pH. Other factors impacting on hydration involve the surface of the particles, such as their amorphous or crystalline nature. Regarding SPIONs, hydration forces were proved to play a role in the stability of uncoated and polymer-covered SPIONs [220]. Hydration forces play a part in the previously discussed hydrophilic-favoured stability of coatings and their role is central in the non-fouling properties of coatings such as PEG. The potential role of protein corona in regard of hydration forces was discussed in a previous section.

4.4 Implications of colloidal stability of SPIONs in the CNS

In this section, the potential implications of SPIONs aggregates formation in the CNS will be reviewed, dividing the process of SPIONs travel through the CNS in three parts: delivery, stay and elimination. Table 4.4 summarizes the potential consequences of SPIONs instability in the CNS.

Table 4.4: Consequences of SPIONs instability in the CNS.

Delivery to the CNS	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ Blood Bioavailability - ↓ Passage through the Blood-Brain Barrier - ↓ Intra-nasal delivery - ↓ Diffusion into the brain parenchyma
Stay in the CNS	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ Entry into cells - ↓ T2 relaxation rate on MRI - ↓ Toxicity secondary to reactive oxygen species
Elimination from the CNS	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ Resistance to degradation - ↓ Rate of elimination from the CNS

4.4.1 Delivery of SPIONs to the CNS

SPIONs delivery to the CNS can be described using mainly 3 routes: blood, intra-nasal and direct delivery. The most studied and convenient way to deliver SPIONs to the CNS is via the bloodstream, since it is a non-invasive route that has the potential to reach the whole CNS. However, a major obstacle is encountered in the blood-borne delivery on SPIONs to the CNS, namely the blood-brain-barrier (BBB) (fig. 4.4).

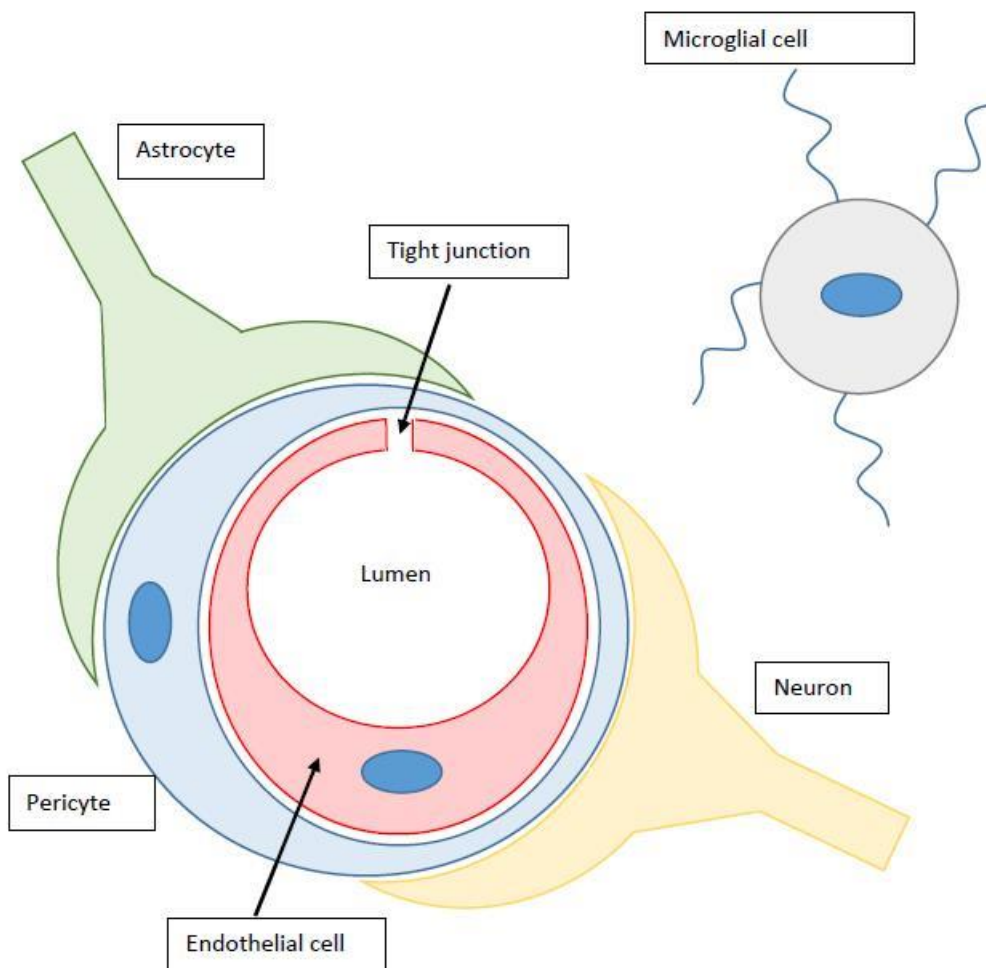


Figure 4.4: The blood-brain barrier and its cellular components.

Endothelial cells (red) lack fenestrations, allowing very few components either through it or via its tight junctions; pericytes surrounding the endothelial cells (blue) phagocytose unwanted elements that passed through; astrocytes (green) and neurons (yellow) modulate the permeability of the BBB while microglial cells play the role of antigen-presenting cells for lymphocytes.

Bare SPIONs do not naturally cross the BBB [221]. Passage of the BBB by SPIONs can be achieved either by coating them with ligands or by BBB disruption. Ligands facilitate SPIONs

uptake by the endothelial cells of the BBB via interaction with specific receptors at the luminal side of the later. Various functional ligands can be attached to SPIONs in order to facilitate their passage through the BBB. Ligands such as lactoferrin, ferritin, transferrin, BBB-penetrating peptides, curcumin, polyethylene glycol (PEG)/chitosan and serum albumin [222] have been shown to increase the quantity of SPIONs in the CNS. Specific ligands that target tumors, functionally active regions and zones of inflammation [74] have also been described. A method through the BBB specific to SPIONs is magnetic targeted delivery in which magnetic gradients are used to direct SPIONs to the brain [223].

Another way to enhance the passage of SPIONs through the BBB is by using “opening” techniques that augment the permeability of the BBB. Intra-carotid injection of mannitol, focused ultrasound and heat generated through the application of an alternating magnetic field to the SPIONs [224] are all techniques that have been demonstrated to increase the permeability of the BBB allowing SPIONs to access the CNS. The percentage of SPIONs delivered via the bloodstream that reaches the CNS can vary from 17 to 30% according to rodent studies [225]. Variations in the blood-borne delivery of SPIONs within different regions of the CNS is also to be expected. For example, Sousa *et al.* studied gold nanoparticles coated with human serum albumin and found a greater concentration of nanoparticles in the cortex, thalamus and hippocampus [226]. Also, certain sections of the CNS are devoid of BBB and belong to an apparatus called the circumventricular organs. Being devoid of BBB, an augmented blood-borne delivery of nanoparticles in these organs has been observed [227].

If the SPIONs aggregate in the bloodstream before reaching the CNS, their elimination by the reticuloendothelial system will be faster, diminishing the total fraction reaching the CNS [228]. Regarding passage through the BBB per se, Kurokawa *et al.* demonstrated that size augmentation of nanoparticles secondary to aggregation can switch their mechanism of passage of BBB from endocytosis to micropinocytosis, diminishing their uptake through the BBB [229]. Thus, the resulting effect of aggregation in blood-borne delivery will be to diminish the quantity of SPIONs reaching the CNS, either by the accelerated clearance of aggregates or by the lowered permeability of the BBB to aggregates. As seen earlier, strong magnetic fields can promote aggregation.

However, two methods of BBB passage (magnetic hyperthermia and magnetic guidance) use strong magnetic fields to either locally disrupt the BBB or direct SPIONs through the BBB. The efficiency of these methods to cross the BBB has been showed [159], but their potential in making more SPIONs reach the CNS in the form of aggregates has not been addressed.

Intranasal delivery is an interesting way to reach the CNS since it bypasses the BBB and is non-invasive. Compounds reach the CNS through the olfactory mucosa via the olfactory or trigeminal nerves, translocating into their axons. This mean of delivery has however the shortcomings of having a relatively local distribution and being limited to small doses [230]. Possibly due to these factors, limited data exists on the understanding of SPIONs passage through the nerves into the CNS, with some reports stating that augmenting size (and thus aggregation) could be an obstacle to SPIONs translocation into the CNS via the nerves of the olfactory mucosa [231].

Direct brain delivery can be achieved by injecting SPIONs directly in the brain parenchyma. If a pressure gradient is used to push the particles away from the site of injection via the extracellular matrix (ECM), the method is named convection-enhanced delivery (CED). Local delivery of SPION can be done when local effect is desired, for example in tumour hyperthermia or wireless brain stimulation. CED could also be used to deliver pharmaceutical agents to tumours. The size of injected nanoparticles plays a direct role in their capacity to move in the ECM, with nanoparticles above 100 nm often being too large to transit in normal ECM. Thus, aggregation of SPIONs could greatly limit the distance traveled with CED [232].

4.4.2 Stay of SPIONs in the CNS

Once in the CNS, aggregation can have repercussions on the desired applications of SPIONs and potentially on their toxicity. These two topics are detailed in this section. Since cell penetration is required for a great number of drugs to act, aggregate formation could hinder the delivery of drugs carried by SPIONs by diminishing their entry into cells. Aggregated SPIONs were found to penetrate less neurons in culture and size above 200 nm (which can easily be the size of aggregates) was found to be associated with poor penetration of SPIONs in non-phagocytic cells in vitro [233].

Aggregation also changes the MRI signal of SPIONs, most of the time by shortening the T2 relaxation rate [147]. Unwanted aggregation could then give rise to unpredictable signal changes. However this change in MRI signal can also be of use. For example, Harris *et al.* designed nanoparticles in which aggregation would be promoted in neoplastic environment, using the MRI signal change to detect tumours [234]. Another negative impact of SPIONs aggregates would be for their use in magnetic hyperthermia, with aggregates greatly reducing the heating capability of SPIONs under alternating magnetic fields [235].

SPIONs toxicity is a vital aspect for their *in vivo* application. The main mechanism by which SPIONs could damage cells in the CNS is by the production of reactive oxygen species (ROS) coming from iron reaction with oxygen peroxide present in biological environment (Fenton's reaction) [236]. Numerous studies reported *in vivo* and *in vitro* cytotoxicity of SPIONs while multiple others also reported their safety [236]. Although the potential for toxicity is clear, many factors including coating, size, surface charge and concentration (>300 ug/mL is a commonly seen threshold) will ultimately determine the toxic effect of SPIONs reaching the CNS. Regarding aggregation, it is however suggested that it could lower toxicity. Aggregates formation, by reducing the surface area per mass available for Fenton's reaction will slow down the generation of ROS (fig. 4.5) [237].

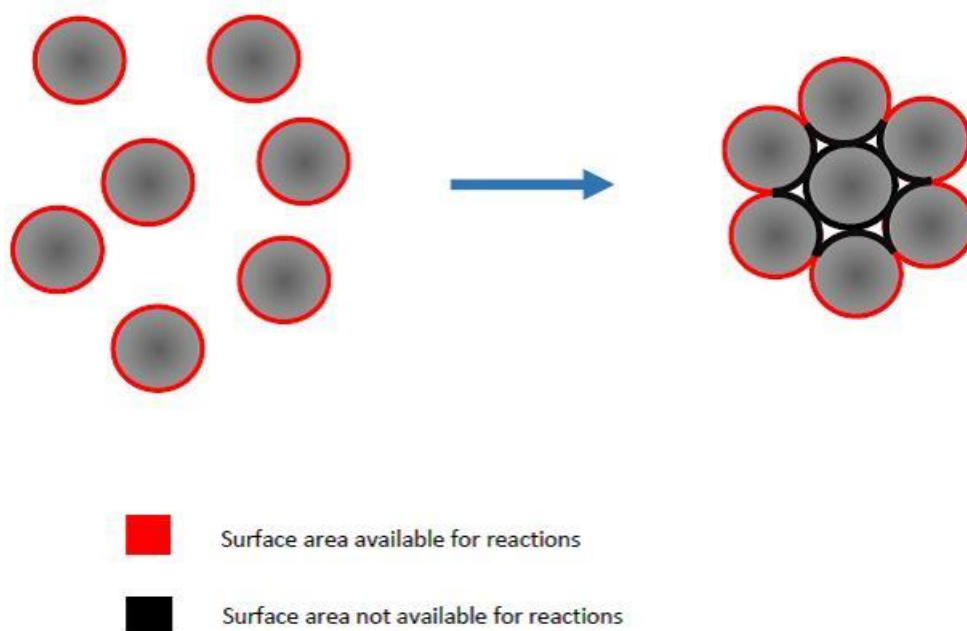


Figure 4.5: Reduction of surface available for Fenton's reaction occurring with aggregation.

4.4.3 Elimination of SPIONs from the CNS

Elimination of SPIONs from the CNS is thought to be made mainly through their metabolism into cells. All of the cells in the CNS were proven to internalise SPION to a different extent, with astrocytes and microglia being those with the strongest ability to take in SPIONs [238]. Once into the cells, SPIONs are eventually moved into the acidotic lysosomal compartment where they are degraded and produce free iron. Iron from SPIONs degradation can then be stored in the storage protein ferritin, used for protein synthesis or exported towards the bloodstream via the transporting protein transferrin. Aggregates of SPIONs have been proven *in vivo* to be more resistant to degradation, prolonging their potential stay in the neural tissue [239]. This resistance to degradation is due to the fact that aggregates present less surface for chemical reaction at a given time than would individual nanoparticles. Other factors such as the type of coating can also affect the degradation rate of SPIONs.

4.5 Conclusion

With their tremendous potential in both diagnostic and therapeutic applications, it is no surprise literature about SPIONs has been growing at a steady state through the last years. However, the potential effects of colloidal stability on observed results are still overlooked. The ultimate aggregation behaviour of SPIONs delivered to the CNS will depend on a variety of factors involving both the particles themselves and the environment. As shown in this review, interactions between SPIONs and the CNS biological milieu are complex and still not completely understood. Given the repercussions of aggregates formation, understanding and predicting colloidal stability of SPIONs in the CNS should be sought before their use. We encourage future research considering the interactions between nanomaterial and biological environment and their effect on colloidal stability.

4.6 Future perspective

The domain of nanoparticles application to the CNS is rapidly evolving one. Future work on SPIONs will allow a better understanding and predictability of their aggregation behaviour in the CNS. With this knowledge, control over the stability of SPIONs in the CNS will be made easier, with the possibility to tune aggregation whether it is desired or not, depending on the circumstances and needs.

4.7 Executive summary

- Determinants of colloidal stability of SPIONs in the CNS
 - o Many factors can influence the aggregation behaviour of SPIONs in the CNS:
 - Brownian motion: which can be both stabilizing and destabilizing and is influenced by the size of the SPIONs, temperature and viscosity of the medium
 - Hydrodynamic flow: which enhance stability by dispersing the SPION and breaking up loosely formed aggregates

- Concentration: which decreases stability by augmenting the collision rate between SPIONs
 - Van der Waals forces: which encourages instability by favouring attraction between SPIONs
 - Electrostatic forces: which promote stability by favouring repulsion between SPIONs and is inversely proportional to the ionic charge of the medium
 - Steric forces: which provides additional stability via repulsive forces and represent one of the main mechanism to enhance the stability of SPIONs in a biological environment through coating
 - Magnetic forces: which can destabilize SPIONs via dipole-dipole interaction
 - Hydration forces: which are still not completely understood and are thought to enhance stability via water molecules ordering around SPIONs
- Implications of colloidal stability of SPIONs in the CNS
- Aggregation can impact the whole process of SPIONs passage through the CNS:
 - Delivery: aggregates could diminish the delivery of SPIONs to the CNS by speeding up their elimination from the blood stream and hindering their passage of the BBB
 - Stay: aggregates formation could limit SPIONs utilisation in various applications such as magnetic hyperthermia and MRI visualisation. SPIONs toxicity could be lowered by aggregation by a reduction of the available surface for oxidative reactions
 - Elimination: aggregates are more resistant elimination from the CNS since they present less area available for their degradation
- Conclusion
- Interactions between SPIONs and biological environment are complex, a better understanding of their aggregation behaviour is important for their proper use in the CNS

CHAPITRE 5 ARTICLE 2: BEHAVIOR OF SUPERPARAMAGNETIC NANOPARTICLES IN REGARD OF BRAIN ACTIVITY – A PROOF OF CONCEPT

Auteurs: Pierre-Olivier Champagne, Dang Nguyen, Lionel Carmant, Alain Bouthillier, Nathalie Sanon, Mohamad Sawan

Revue: Procédés de l'« IEEE Engineering in Medicine and Biology Society »

5.1 Abstract

The study of cerebral magnetic activity is very promising for the understanding and care of diseases involving impaired cerebral activity such as epilepsy. One of the main hurdles in the recording of cerebral magnetic activity is that the intensity of cerebral magnetic fields is very weak. In this regard, we explore another potential way to appreciate the magnetic cerebral activity using superparamagnetic nanoparticles. These particles react to magnetic fields and can aggregate under their influence. Being superparamagnetic, they are also visible on magnetic resonance imaging (MRI). Superparamagnetic nanoparticles distributed in cerebral tissue could aggregate under the influence of local magnetic fields, with this aggregation being visible using MRI. In order to explore the feasibility of this new concept, we observed the behaviour of nanoparticles brought in proximity of living rat's brain slices of different levels of activity. A statistically significant aggregation of nanoparticles that is proportional to the rat's brain activity was observed in the study of 9 rats. These results favour the statement that brain electrical magnetic fields are sufficient to induce an aggregation of superparamagnetic nanoparticles in their vicinity. These results serve as a first “stepping stone” for the basis of a new method to appreciate brain magnetic activity using aggregation of nanoparticles as a marker of increased brain activity.

5.2 Introduction

Epilepsy affects more than 2,2 million people in the United States [240,241]. Its tremendous impacts on quality of life and its cost to society make of this disease one of the most problematic

brain disorder. It is defined as an enduring predisposition to generate epileptic seizures [33]. These seizures are the result of the abnormal synchronous firing of a network of neurons. This zone of increased brain activity is often labeled as the “epileptic focus”. To understand and treat epilepsy, it is essential to study brain activity. Recently, the measurement of brain magnetic fields using magnetoencephalography added a completely new angle to our comprehension of brain activity [242]. However, brain magnetic fields generated by the electrical impulses of neurons are very weak (in the order of the femtotesla), diminishing the precision of measurements [242]. From this problem emerged the concept of using superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) in order to map the brain magnetic activity. Instead of picking up a weak signal in the distance, very sensitive “sensors” could be brought directly to the source of magnetic fields. SPION can aggregate in the presence of magnetic fields [243] and produce a visible signal on MRI [71]. SPIONS distributed through the brain tissue could produce more intense signals on MRI in the areas of increased brain magnetic activity, thus allowing a precise mapping of the brain’s magnetic activity. The very first question to be answered in regard of this new concept is: are brain weak magnetic fields sufficient to generate an aggregation of nearby SPION? This proof of concept using an animal model of living brain slices serves to answer that question.

5.3 Objectives

The main objective is to observe and characterise the aggregation behaviour of SPION in aqueous suspension when exposed to local magnetic fields generated by a living brain slice in an animal model.

5.4 Hypothesis

We suppose that SPIONS in the vicinity of cerebral tissue will aggregate in a proportionate and quantifiable fashion in regard of cerebral activity. A more important network of neurons firing simultaneously generates a more important magnetic field, since the individual field of each neurons add up spatiotemporally [71,244]. The movement of SPION in liquid suspension being proportional to the intensity of magnetic fields, the collisions between particles leading to aggregation should augment with the augmented magnetic field.

5.5 Methods

A model of living rat's brain slices is used to generate the biological magnetic fields. The use of the animal model was approved by the Research Ethic Committee of the institution (Sainte-Justine Hospital). Healthy Sprague-Dawley rats are put under general anesthesia using inhaled isoflurane (Baxter Corporation, Mississauga, ON, Canada). After sacrifice of the rats by beheading, the brains are extracted and put in a cold (4 C°) preservation solution containing electrolytes and glucose. The solution is oxygenated using a continuous flow of pure oxygen. The 2 hemispheres are cut in slices of 300 µm using a vibratome while in the preservation solution. At this point, every step involving the brain slices are done in the preservation solution in order to maximise the longevity of the cells of the slices. The thickness of the slice allows for the glucose and oxygen to diffuse to every cell in order to allow them to undergo oxidative phosphorylation, the process by which the cells produce their energy in the form of adenosine triphosphate (ATP). The lifespan of the brain slices under these conditions is approximately 6 hours.

It is possible to change the electrical activity of an entire slice by changing its environment. 3 levels of activity were tested: 1) no activity, 2) basal activity and 3) augmented activity. To render a slice inactive (first condition), the slice is put in unfavorable conditions for its survival, killing most of its cells. It is transferred in deionised non oxygenated water for an entire hour. Cell death is always confirmed under microscope at 60x magnification before proceeding with further experiments.

The slices with basal activity (second condition) are those with no change of their environment. Their electrical activity is therefore referred as "basal", indicating the activity under normal conditions. To augment the electrical activity (third condition), the drug bicuculine (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) is added to the solution containing the slice. This molecule inhibits the GABA receptor on the neurons. GABA being the main neurotransmitter in charge of diminishing the neuron electrical activity, the lack of stimulation of GABA produced by bicuculine has the net effect augmenting the electrical activity of the neurons.

Commercial SPION are used (Chemicell, Berlin, Germany). They consist of a core of magnetite (iron oxide) coated with starch and a fluorophore (Lumogen Red). The iron oxide core has a diameter of 65 nm and the hydrodynamic diameter of the complete particle is 100 nm. The choice of these nanoparticles is explained by 1) their superparamagnetic behaviour (best reaction to magnetic field), 2) their inert coating preventing spontaneous aggregation and 3) their fluorescent coating facilitating the visualisation of clusters of nanoparticles under microscope. A solution of $3,8 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ of SPION in deionised water is prepared and sonicated to assure a good dispersion and eliminate existing aggregates. The solution is then inserted in a thin-wall borosilicate glass micropipette. The tip of the micropipettes has been previously closed using heat. The micropipette is then inserted obliquely in the thickness of the brain slice. This position of the micropipette maximises the contact between the micropipette and the slice. The inside of the micropipette is observed under fluorescence microscope (60x magnification) for 30 minutes for the appearance of aggregates (fig. 5.1). For each rat sacrificed, 3 brain slices representing each condition (inactive, basal and augmented) are studied.

This method of observation of aggregation has been chosen because it brings the nanoparticles the closest to the brain slices while preventing direct contact between the brain tissue and the nanoparticles, since direct contact between the particles and the brain might bring into play many other factors that can influence the aggregation of the particles (method of delivery and flow, presence of ions in the solution, contact with the tissue, etc.) [245,246]. The fact that nanoparticles are physically separated from the brain tissue also assures that only the magnetic forces within the brain tissue will affect the aggregation of the nanoparticles. For an eventual application, the particles will have to be in contact with the tissue. However at this stage, isolating the nanoparticles allows to study more specifically their behaviour in regard to brain magnetic fields.

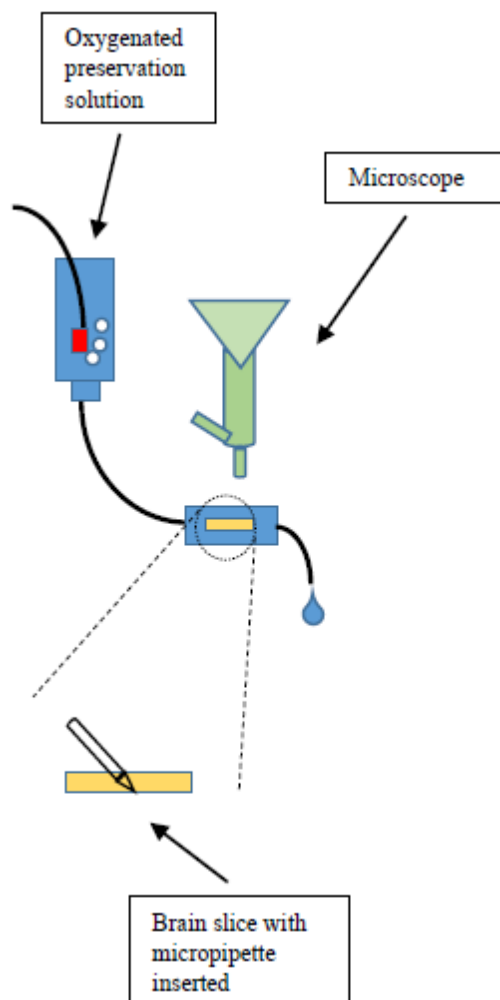


Figure 5.1: Experimental setup.

Representation of the experimental apparatus necessary to maintain the living brain slices while observing aggregation inside of the micropipette.

5.6 Results

The images obtained with the fluorescence microscope are analysed using the Image J software. For each condition, the micropipette is screened after 30 minutes for aggregates. The aggregates appear as mobile fluorescent corpuscles inside of the micropipette (fig. 5.2). The difference in size between aggregates was not accounted for in the present study. The aggregates are counted manually in each microscopic field starting at the tip of the micropipette. The count of aggregates continues moving onward and ends just above the slice. Thereafter the mean number of aggregates

per microscopic field is calculated using the total number of aggregates seen and the number of fields traveled from the tip of the micropipette. This number represents the average number of aggregates per field of visualisation in the section of the micropipette that is inside the brain slice.

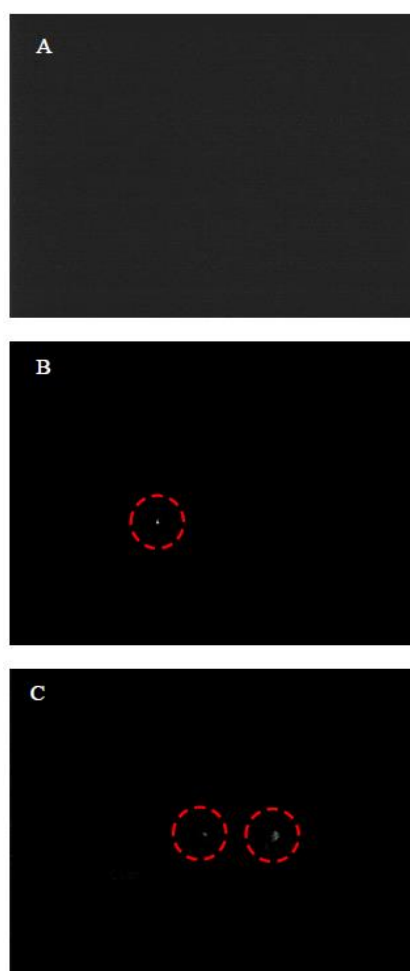


Figure 5.2: Aggregate formation under microscopic view.

Images taken with the fluorescence microscope (60x magnification) showing aggregates (circled in red) in suspension inside of the micropipette after 30 minutes of exposure to brain slice activity. A: inactive slice showing no aggregates. B: basal activity slice showing 1 aggregate in the field. C: augmented activity slice showing 2 aggregates in the field.

A total of 9 rats were sacrificed. For each rat, the 3 conditions of brain activity were tested using 3 brain slices. Fig. 3 demonstrates the mean number of aggregates per field observed under each condition for the 9 rats. As supposed, the number of aggregates is higher in the conditions with the most brain activity. Both the basal and augmented conditions have a significantly ($p < 0,001$, t test) higher number of aggregates per field than the inactive condition (0,16 for the inactive against 1,62 for the basal and 2,12 for the augmented brain activity). However, the difference in mean number of aggregates between the slices with basal activity (1,62) and those with augmented activity (2,12) is not statistically significant ($p = 0,23$).

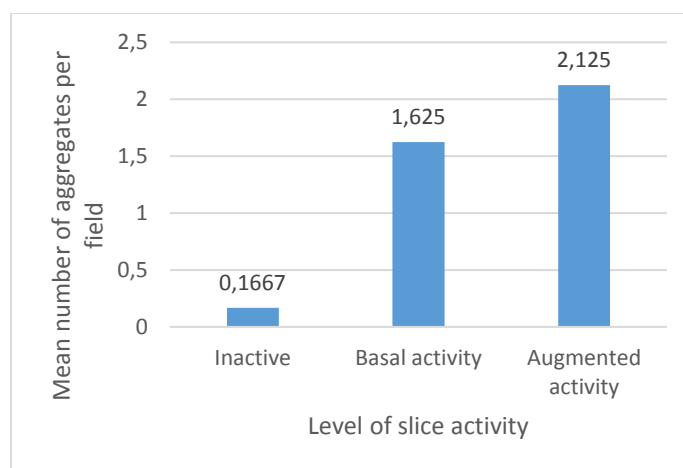


Figure 5.3: Graph representing the mean number of aggregates per field for the 9 studied rats for each condition.

5.7 Discussion

The aggregation behaviour of SPION in an aqueous solution exposed to different levels of activity of brain slices follows the predicted pattern: an augmented brain activity leads to an augmented number of aggregates visualised under the microscope. All but 2 of the inactive brain slices had no visible aggregates after 30 minutes of exposure to the slice, thus explaining the very low number of mean aggregates for this category (Fig. 5.3). Even if the mean number of aggregates in the slices with augmented activity is higher than those with basal activity, the difference is not statistically

significant. Two factors can explain this to our eyes: 1) the number of studied slices was too low to prove the existing difference (lack of statistical power), 2) the effect of the drugs did not result in an augmentation of the magnetic field of the expected magnitude. As stated earlier, the magnetic field generated by an epileptic focus is more important than those of the normal brain because the neurons fire their electrical impulses in a synchronous fashion. The drug given to augment the activity of the slice (bicuculline) allows for more firing of all the neurons but not necessarily in a synchronous fashion, thus the generated magnetic field might not be higher than the one in the slices of basal activity.

Regardless of the lack of significant difference between the 2 types of active slices, the actual results show strongly that the sole presence of brain activity is sufficient to induce the aggregation of SPION in the vicinity of the active brain tissue after 30 minutes of activity. A longer time of exposure to the cerebral magnetic field might also lead to a more important number of aggregates. The time limit of 30 minutes in the presented experiments reflects the maximal time of observation that could be achieved in order to test all of the 3 conditions using 1 rat without exceeding the lifespan limit of the model.

This proof of concept sets the basis for the future use of SPION as ultrasensitive detectors of elevated brain activity in diseases such as epilepsy. The capacity of SPION to aggregate in the presence of the weak cerebral magnetic fields coupled to their detectability by MRI makes them a potential marker that could precisely map the regions of epileptiform activity.

Among the eventual challenges for this technique are the other interactions between the living organism and the nanoparticles. The delivery itself of any agent to the brain is hindered by the presence of the blood-brain barrier at the level of the cerebral capillaries. The nanoparticles are no exception but much advance has been made regarding ways to get pass it using different coatings for the nanoparticles [108]. Regarding aggregation, other in situ biological factors such as the presence of ions and proteins or even the blood flow might also favour the aggregation of the nanoparticles. Another potential concern is the becoming of the particles inside the brain. In this

regard, given proper coating, SPIONS show good biocompatibility and half-life when delivered to the brain via the intra-venous route [196,247,248].

Future research involving this technique will surely have to take the aforementioned points into consideration. Animal studies involving in vivo use of SPION and induced epileptic focus are among the next steps that could contribute in the development of this potential technique.

CHAPITRE 6 ARTICLE 3: INFLUENCE OF NEURONAL ACTIVITY ON SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES STABILITY

Auteurs: Pierre-Olivier Champagne, Nathalie Sanon, Lionel Carmant, Dang Nguyen, Sylvain Deschênes, Philippe Pouliot, Alain Bouthillier, Mohamad Sawan

Revue: Scientific Reports

6.1 Abstract

Precise detection of brain regions harbouring heightened electrical activity plays a central role in the understanding and treatment of diseases such as epilepsy. Recently, the study of the brain's magnetic fields opened new avenues in the understanding of its electrical behaviour. However, distant detection of magnetic fields can be arduous, because of the very weak fields that diminish with distance and can potentially cancel each other. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) can react to magnetic fields by aggregating and represent interesting candidates as new sensors for neuronal magnetic activity. We hypothesized that SPIONs in aqueous solution in close vicinity to active brain tissue would aggregate proportionally to the neuronal electrical activity. We tested this hypothesis using an *in vitro* model of rat brain slice maintained alive in artificial cerebrospinal fluid. After exposure of SPIONs to different levels of slice activity, aggregation was assessed with dynamic light scattering and magnetic resonance imaging. We found that increasing brain slice activity was associated with higher levels of aggregation as measured by dynamic light scattering, suggesting that the magnetic fields generated by neuronal tissue could induce aggregation in nearby SPIONs in solution. We further found that the aggregation-related changes in SPIONs solutions can change the MRI signal (T_2 relaxation time), allowing distant aggregation detection combined to the spatial resolution and imaging capabilities of MRI. This work confirms the potential of SPIONs to serve as a sensor of brain activity. MRI signal change induced by SPIONs aggregation can serve as a powerful tool for detection of brain electrical activity using SPIONs.

6.2 Introduction

In-depth knowledge of the brain's electrical activity is necessary to understand and treat epilepsy, a condition ranked among the most prevalent and invalidating neurological disorders [34]. The recurrent seizures that define epilepsy consist of the synchronous and excessive electrical firing of a network of neurons within the brain [33]. In many instances, such as when contemplating surgery to treat epilepsy, precise localisation of the source of epileptic activity is necessary. This so-called epileptic focus is defined as the network of neurons responsible for the abnormal electric activity that must be removed in order to stop the recurrent seizures [42]. Much effort is currently being deployed to achieve better means of detection of the epileptic focus.

The recent study of the brain's magnetic signature using devices such as magnetoencephalography offers an interesting new insight on the study of brain activity (Fig. 6.1a). The magnetic fields emitted by the neuron's electric signaling offer the advantage of being minimally distorted while passing through structures such as the skull and scalp [223]. However, distant detection of the brain's magnetic fields comes with its challenges. For instance, those fields are very weak and lose strength with distance, being in the order of the femtoTesla (10^{-15} T) when reaching the sensor. This can make source localisation arduous and less precise [6]. Distant detection of the brain's magnetic fields also allows certain regions to be "silent" because of local cancellation of fields that go in opposite directions [14]. Thus, closing the distance between the sensor and the source of the fields could help to overcome these hurdles while retaining sensitivity to this undistorted signal.

In the idea of bringing the sensor closer to the source, superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) represent interesting candidates for epilepsy localisation. Superparamagnetism refers to the property of these particles to be strongly magnetized in the presence of a magnetic field while retaining no net magnetisation once the field is removed. Magnetic fields have the potential to destabilise SPIONs in solution by favouring their aggregation [249]. When a magnetic field is applied, the dipoles (north and south) of SPIONs align with it, giving rise to attractive dipole-dipole interactions (Fig. 6.1b) that promote irreversible SPIONs aggregation [83]. Since epileptic seizures generate stronger and more sustained magnetic fields [117-120], aggregation of SPIONs could be more important near the epileptic focus, making the aggregation pattern on SPIONs a potential

indicator of epileptic activity. Preliminary data from a pilot study lead by our group showed SPIONs macro-aggregates formation occurring in the presence of neuronal activity [214], confirming their possible use in epilepsy detection.

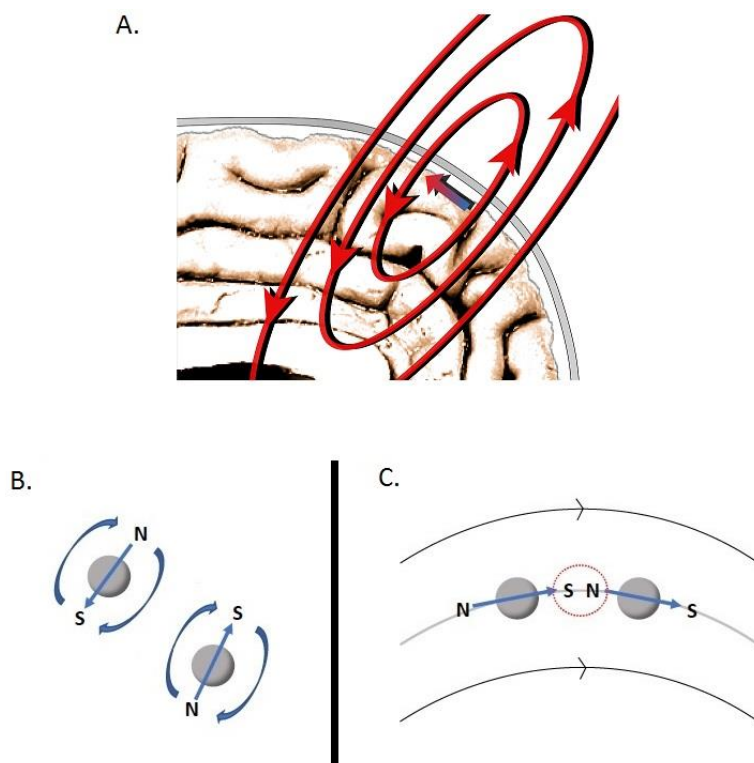


Figure 6.1: Depiction of the underlying rationale of the current study.

Magnetic fields from the brain electrical activity causing aggregation of nearby SPIONs. A. Representation of the brain's electrical current giving rise to a magnetic field. B. SPIONs with freely moving dipoles (N: North and S: South) before the application of an external field. C. Alignment of the dipoles with the external magnetic field leading to dipole-dipole interaction (red circle) between North and South poles of SPIONs, favouring their aggregation.

6.2.1 Objective

This study explores a new concept of using SPIONs to locate epileptic activity in an in vitro model using rat brain tissue. The aim of this work is to objectify and quantify aggregation of SPIONs in regard of neural tissue activity.

6.3 Methods

Experiments consisted of 2 steps: exposure of SPIONs to brain tissue followed by analysis for aggregation. Two methods were used to assess aggregation: dynamic light scattering (DLS) and magnetic resonance imaging (MRI). DLS is based on the analysis of fluctuations of Rayleigh light scattering due to Brownian motion of particles in suspension. DLS measurements can approximate the size distribution profile of particles in solution. DLS is used to assess aggregation by measuring augmentation in mean particle size [250]. MRI signal can also be influenced by the aggregation status of SPIONs. Because of their intrinsic property to dipphase nearby protons with their magnetic field, SPIONs are known to shorten the transverse relaxation times T_2 and T_2^* .

Both the T_2 and T_2^* relaxation times of an aqueous suspension of SPIONs can change with aggregation. T_2 relaxation time, or transverse relaxation time, corresponds to the time taken for the transverse component of magnetization to fall to approximately to 37% ($1/e$) of its initial value after the initial radiofrequency pulse of the MRI. Similarly, T_2^* relaxation time, or T_2^* decay, corresponds to the time constant at which signal strength in the transverse component decays after the initial radiofrequency pulse but is also influenced by magnetic fields inhomogeneities. SPIONs size and aggregation status have been proven to induce a change in both T_2 and T_2^* relaxation times [149,152]. The possibility to assess aggregation with MRI offers the advantage of distant analysis of the SPIONs coupled with the well-known imaging capabilities of this technique.

6.3.1 Nanoparticles preparation

Commercial uncoated spherical SPIONs (magnetite) of 50 nanometers (nm) diameter were acquired (fluidMAG-UC/A, Chemicell GmbH, Berlin, Germany). Those SPIONs possess an anionic charge at their surface to prevent spontaneous aggregation. SPIONs were diluted in ultrapure water (Milli-Q, MilliporeSigma, Oakville, Canada) to obtain suspensions of 0.1 mg/cc (high concentration) and of 0.025 mg/cc (low concentration). 800 microliters (μl) of solution were transferred into a small container made of 2 layers of 4 cm^2 of rigid polyvinyl chloride (PVC)

plastic film (Clear-Lay®, Grafix, Maple Heights, USA) (Fig. 6.2). These plastic watertight containers (capsules) ensured that no direct contact could occur between the nanoparticles and brain tissue later on. Isolation of SPIONs from the tissue serves to prevent other destabilising hazards such as the presence of ions in solution to influence aggregation. At each step before contact with the solution, every container was extensively rinsed with ultrapure water to avoid contamination by impurities.

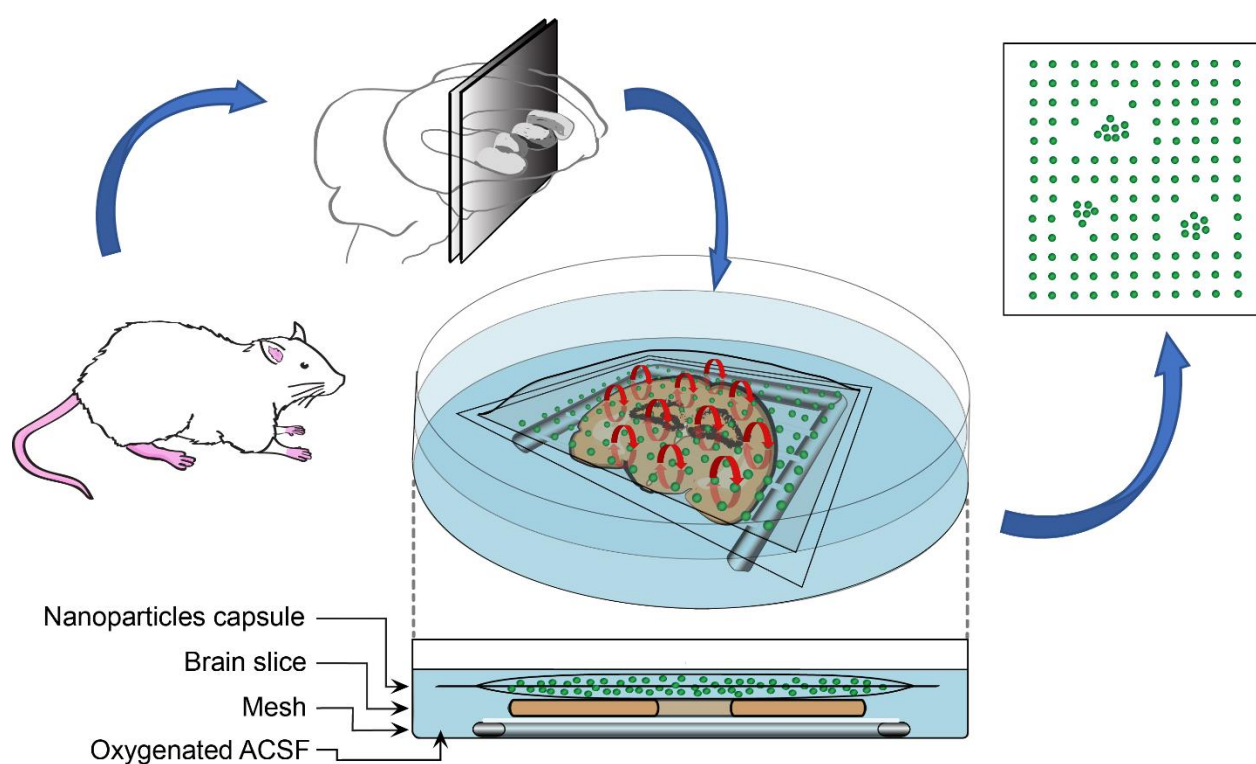


Figure 6.2: Artist rendering of the experimental setup.

After extraction of a rat's brain, 350 μm thickness slices centered around the hippocampus were made and kept in oxygenated artificial cerebrospinal fluid (ACSF). A platinum mesh helped to hold the slices in place. Slices of various electrical activity were brought in contact with a plastic capsule containing an aqueous solution of SPIONs. Magnetic fields generated by the slice and causing SPIONs aggregation are represented.

6.3.2 Brain slice preparation and electrophysiology recording

Research protocols using animals were approved and conducted according to the Institutional policy and guidelines of the CHU Ste-Justine Research Ethics Committee (Comité Institutionnel de bonnes pratiques animales: CIBPAR #699), which follows the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCAC). Brain slices were prepared as previously described by Sanon *et al.* [251]. In line with CCAC policies and in an effort to reduce the number of used animals, Sprague Dawley rats (Charles River, QC, Canada), usually destined to sacrifice, aged between 21 and 50 days from both sexes indistinctly were used as we solely needed sane brains with electrical activity. Rats were anaesthetized with isoflurane (Fresenius Kabi, ON, Canada) and rapidly decapitated. The brain was extracted and immersed in cold (4°C) and oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) artificial cerebro-spinal fluid (ACSF) containing (in mM): 126 NaCl, 3 KCl, 2 CaCl₂, 25 NaHCO₃, 1 NaH₂PO₄, 2 MgSO₄, 14 D-glucose (pH 7.3-7.4; 300-310 mOsm). Transverse whole brain slices (350 µm thickness) centered around the hippocampal region were cut using a vibratome (VT1000S, Leica Microsystems Inc., NY, USA) and placed in oxygenated ACSF at room temperature. Slices electrical activity was adjusted for 3 levels: no activity, basal and epileptic. For the model with no activity, neuron death was achieved by transferring the slices into ultrapure unoxygenated water for 30 minutes. For the basal model of activity, slices were left in ACSF. For epileptic slices, the drug bicuculline methiodide (BIC, 1µM) (MiliporeSigma, Oakville, Canada) was added to ACSF. Bicuculline is a gamma-aminobutyric acid (GABA)_A receptor antagonist known to generate epileptic activity in neurons [252,253].

Neuron viability and slice electrical activity were assessed for each condition. Slices recovered a minimum of one hour before individual slices were transferred in a submerged recording chamber with ACSF flowing at a rate of 2-3ml/min. Recorded slices were visually identified using an upright microscope (BX50WI, Olympus Canada, Markham, ON, Canada) equipped with differential interference contrast and infrared (DIC-IR) CCD video camera (XC-E150, Sony, Japan). Extracellular field recordings were made by implanting a concentric, bipolar, tungsten stimulating microelectrode (World Precision Instruments, Sarasota, USA) in the Radiatum layer activating Schaffer collaterals. Current pulses (0.2ms, 0.03 Hz, 0-0.5mA in 0.05mA increments; Pulsemaster

A300, WPI) were delivered via a stimulus isolation unit (A360, WPI). We recorded field population spikes (fPS) by implanting a 1mm (outer diameter) borosilicate patch pipette (WPI, FL, USA) filled with NaCl (2mM) on the dorsal side of the Pyramidal hippocampal CA1 region cell layer (Fig.6.3a). The signals were acquired using an Axopatch 200B amplifier (low-pass filtering at 1 kHz). Data acquisition, at a sampling rate of 20 kHz was performed using a Digidata 1440A analog-digital converter (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and pClamp10 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

6.3.3 Dynamic light scattering measurements

Plastic capsules housing SPIONs solution of 0.1mg/cc (high concentration) were placed over brain slices in oxygenized preservation solution for 2 hours. The same procedure was repeated on the following 2 days for a total of 6 hours of exposure to brain tissue. Figure 6.2 represents the experimental setup of SPIONs exposure to brain slices. Each capsule was exposed to the same type of slice electrical condition over the 3 sessions. An additional capsule not exposed to any tissue served as a reference (control). The choice to separate exposure in 3 sessions rests in those 2 reasons: 1) because of the limited viability of the slice model and of the potential toxicity of long-term exposure to bicuculline, 2 hours were arbitrary chosen as the limit of consecutive exposure, 2) because of the variability of the viability of the slices in the model, exposure to slices coming from different rats would augment the chances of the SPIONs being exposed to the activity they were supposed to.

After the 3 sessions, SPIONs solution were transferred into folded capillary cells for DLS analysis (Zetasizer ZEN5600, Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom). Each SPIONs sample was analysed for mean hydrodynamic particle diameter (D_H) using a multiangle detection protocol (173° backscatter and 12.8° forward-scatter angles) at 25°C . Size distribution parameters such as the aggregation index (AI) and polydispersity index (PdI) were also gathered. The AI is calculated from the size measurement difference at 12.8° (sensitive to higher size values) and 173° (sensitive to lower size values). It is defined as 1 minus the ratio of the diameter at 12.8° to the diameter at 173° . The polydispersity index is a 2-parameter fit to the correlation data that reflects size distribution, with lower values representing a more monodispersed sample. It is defined as the ratio

of the square of the standard deviation to the square of the mean diameter. Measurements were performed at least in triplicate for each sample.

6.3.4 Magnetic resonance imaging relaxivity measurements

SPIONs exposure to brain tissue was done in the same fashion as for DLS measurements. For MRI analysis, the low-concentration SPIONs solution (0.025 mg/ml) was used instead of the high concentration (0.1 mg/ml) since it produced a less artefacted signal allowing for a better analysis of T_2 relaxation time on preliminary experiments (data not shown). After exposure, plastic capsules containing SPIONs solutions were stacked together in a precise order and then scanned using a 7T horizontal MRI scanner (Agilent Technologies, Santa Clara, United States) with 30 cm bore and 600 mT/m gradients. T_2 relaxation time was obtained using a Spin-Echo Multi Slice (SEMS) sequence, designed to capture a broad range of possible T_2 values, with the choice of 6 different echo times (10, 25, 63, 160, 400 and 1000 ms). Other parameters included: 5.02 s repetition time, SGLsinc pulses of 4.0 and 3.2 s durations, 64 x 64 matrix and 50 kHz spectral width. Similarly, T_2^* relaxation time was obtained using a Gradient Echo Multi Slice (GEMS) sequence repeated with 6 different echo times (1.1, 2.5, 5.3, 11, 24, 50 ms), and with 4.0 s repetition time, 90° flip angle, Gaussian pulses of 1 s duration, 32 x 32 matrix and 50 kHz spectral width. For both sequences, 5 slices of 2 mm thickness with 0.6 mm gap were imaged with a field of view of 32 x 12 mm. Data obtained from MRI were analysed using Matlab 2017b (The Mathworks, MA) code developed in-house. For each sample, a region of interest (ROI) in a single image slice (the midslice, 3/5) was drawn to encompass the largest uniform volume while avoiding susceptibility artefacts and border zones (partial volume effects). The T_2 and T_2^* of each sample was calculated voxel-by-voxel using the Matlab function `nlinfit` to fit a simple exponential decay, and the median values were reported.

6.3.5 Statistical analysis

Data obtained from DLS and MRI measurements was entered into an analysis of variance (one-way ANOVA) statistic model to compare indicators of aggregation between the different levels of brain activity. A Tukey post-hoc test was used to compare groups individually and a Welch test

was used when Levene's statistic shown unequal variances. A p value $< 5\%$ was considered significant. All statistical analysis was conducted using the SPSS software Version 24.0 (IBM Corp. Armonk, USA).

6.4 Results

6.4.1 Neuron viability and electrophysiology recording (Fig. 6.3)

In order to determine the level of electrical activity of the underlying slices with which the SPIONs-containing capsules are in contact, we proceeded to record the extracellular activity by measuring the field population spikes (fPS) evoked by stimulation of the presynaptic afferences. Slices from the whole brain were used to induce nanoparticles aggregation, but only hippocampal slices were used for recordings, taking advantage of its layered cell disposition. Following afferent fiber stimulation at various intensities, we obtained responses with one fPS (Fig. 6.3b) in basal conditions or multiple fPS (Fig. 6.3c) in epileptic conditions, a hallmark of slice hyperexcitability [254]. However, when recording a dead slice, as visible from the numerous swollen dead cells in photomicrograph (Fig. 6.3d), no fPS was recorded despite a clear preceding stimulation artifact. The 3 slice conditions tested exert distinct fPS amplitudes (Fig. 6.3e). This does not represent slice electrical activity as shown in (Fig. 6.3f) where fPS remain between 1 and 1.5mV amplitude. At the beginning, the slice is in a basal condition and a single fPS is seen, while after 2h of BIC exposure a second fPS, suggesting hyperexcitability, appears while the fPS amplitude has not changed. This suggests that during the entire time they are in contact with the capsules, the slices remain healthy and yielding electrical activity, except in the case of dead slices.

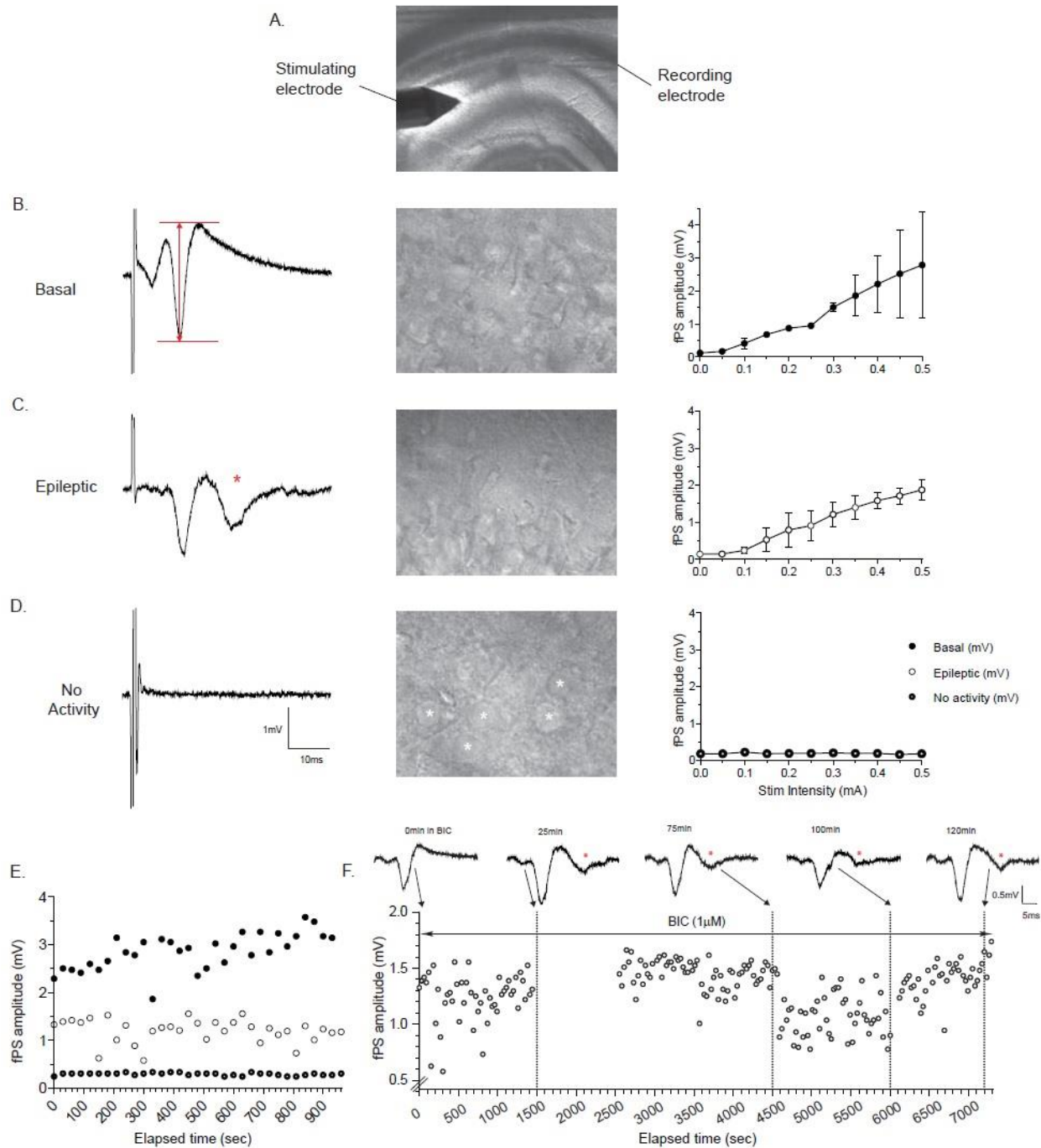


Figure 6.3: Electrical excitability of underlying brain slices.

A. Photomicrograph (objective 4X) of a CA1 hippocampal slice showing the location of stimulating electrode, in Schaffer Collateral afferences, and recording electrode in the Pyramidal cell layer. B. Field population spike (fPS) trace induced by electrical stimulation and recording as seen in A., in presence of Artificial Cerebrospinal Fluid (ACSF). In this basal condition, only one

large amplitude negative spike is present. This activity comes from a slice where cells are alive and well with usual pyramidal shaped cells as seen in 60X photomicrograph. As the stimulation intensity increases from 0mA to 0.5mA, the fPS responses increase reaching close to 3mV from peak to peak (n=2) (red arrows). C. fPS trace recorded in presence of Bicuculline (BIC 1mM) in which condition, the fPS changes and a second fPS appears (red *) being a hallmark of slice hyperexcitability due to GABAA disinhibition. Slice in photomicrograph (60X) shows healthy pyramidal cells. Here again, fPS responses increase with stimulation intensity (n=3). D.

However, recording from a slice without activity shows no fPS at all stimulation intensities, although a clear stimulation artifact is present (n=1). Slice photomicrograph (60X) shows swollen dead pyramidal cells (white *). E. Comparing fPS in all 3 conditions over 15 min, shows that fPS amplitudes are quite distinct among the 3 types of electrical activity. F. The slices remain alive and hyperexcitable in the long term as seen by the apparition of a second fPS (red *) and typical epileptic fPS amplitudes even after over 2 hours in BIC. Therefore, the nanoparticles are in contact with no, basal or hyperexcitable activity slices for the whole wait period.

6.4.2 DLS measurements (Fig. 6.4)

Thirty (30) rats were used for DLS measurements. DLS analysis was performed on 40 capsules, 10 times for each condition: control, no activity, basal and epileptic. Regarding particle size, there was a statistically significant difference between groups as determined by one-way ANOVA ($F = 17.64$, $p < 0.001$). The Tukey post hoc test revealed that the SPIONs size was statistically significantly higher in the epileptic condition (117.8 nm) compared to the basal (99.4 nm, $p = 0.018$), no activity (88.4 nm, $p < 0.001$) and control (76.5 nm, $p < 0.001$) conditions. There was a statistically significant difference between the basal condition and the control ($p = 0.002$) but not with the no activity condition ($p = 0.262$). There was no statistically significant difference between the control and no activity conditions ($p = 0.202$). Figure 6.4a summarizes the findings regarding DLS measurements after exposure to each condition.

Regarding secondary measures of size dispersion, there was no statistically significant difference in the aggregation index between groups as determined by one-way ANOVA ($F = 1.82$, $p = 0.161$). There was however a difference of the polydispersity index between groups using one-way ANOVA ($F = 11.53$, $p < 0.001$). The post hoc Tukey test revealed that the SPIONs polydispersity index was statistically significantly higher in the control condition (0.240) compared to the no activity (0.182, $p = 0.003$), basal (0.162, $p < 0.001$) and epileptic (0.163, $p < 0.001$) conditions. There was no statistically significant difference when comparing the epileptic condition with the basal ($p = 1.00$) or no activity ($p = 0.634$) conditions. There was no statistically significant difference between the basal and no activity conditions ($p = 0.573$).

6.4.3 MRI relaxivity measurements (Fig. 6.4)

Eighteen (18) rats were used for MRI measurements. MRI analysis was performed on 24 capsules, 6 times for each condition: control, no activity, basal and epileptic. Regarding T_2 relaxation time, there was a statistically significant difference between groups as determined by one-way ANOVA ($F = 40.49$, $p < 0.001$). The post hoc Tukey test revealed that the T_2 relaxation time was statistically significantly higher in the epileptic condition (69.02 milliseconds (ms)) compared to the basal (42.95 ms, $p = 0.002$), no activity (20.73 ms, $p < 0.001$) and control (6.69 ms, $p < 0.001$) conditions. T_2 relaxation time in the basal condition was statistically significantly higher than in the no activity ($p = 0.008$) and control ($p < 0.001$) conditions. There was no statistically significant difference in the T_2 relaxation time between the no activity condition and the control one ($p = 0.127$).

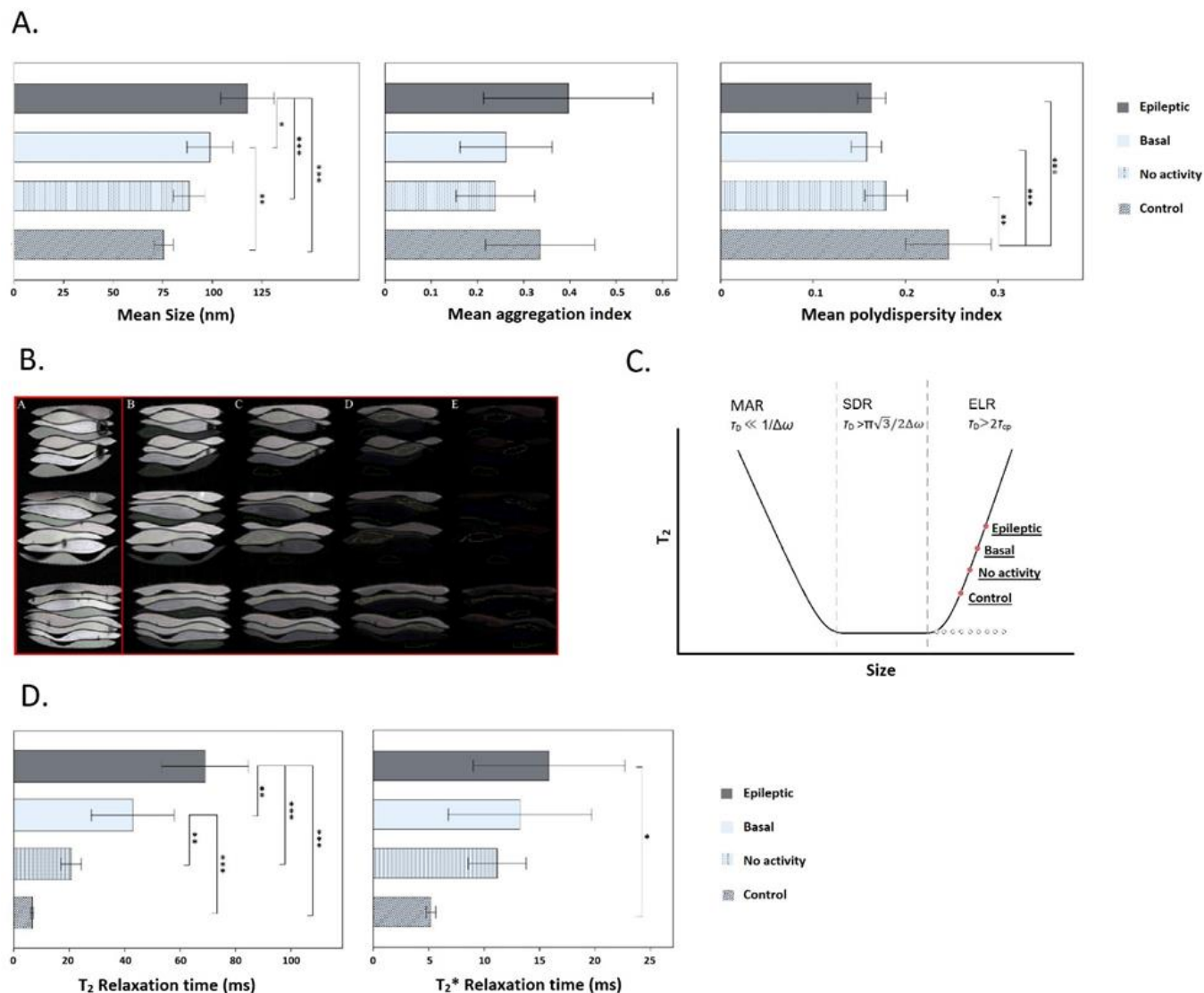


Figure 6.4: Results of the aggregation analysis with DLS and MRI.

A. Results of the DLS analysis. Graphs illustrating the difference in mean size, polydispersity index and aggregation index under each condition. Statistically significant differences are shown in brackets. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test). B. Mosaic of the 24 SPIONs capsules imaged during MRI sessions. Eight samples were imaged per session. Epileptic, basal, no activity and control samples were always stacked in that order from top to bottom. Labeling samples from 1 to 24 from the top, epileptic slices correspond to samples 1, 5, 9, etc. The readout direction was horizontal. Column A: scout images with ROIs chosen to avoid susceptibility artifacts. Spin echo images at TE = 10, 25, 63 and 160 ms (B to E). C. Depiction of the 3 relaxation regimes and corresponding T_2 behaviour. The place

of this study results into these regimes is represented. Dotted line represents the behaviour of T_2^* in the ELR. D. Results of the MRI analysis. Graphs illustrating the difference in T_2 and T_2^* relaxation time under each condition. Statistically significant differences are shown in brackets. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test). Error bars represent confidence intervals at 95% for each condition ($n = 10$ for each group in DLS results and $n = 6$ for each group in MRI results)

Regarding T_2^* relaxation time, there was a statistically significant difference between groups as determined by one-way ANOVA ($F = 3.44$, $p = 0.037$). The post hoc Tukey test revealed that the T_2^* relaxation time was statistically significantly higher in the epileptic condition (15.84 ms) compared to the control condition (5.20 ms, $p = 0.028$). There was no statistically significant difference in T_2^* relaxation time of the epileptic condition when compared to basal (13.23 ms, $p = 0.874$) and no activity (11.18 ms, $p = 0.543$) conditions. There was no statistically significant difference in T_2^* relaxation time between the basal condition and the no activity ($p = 0.932$) and control conditions ($p = 0.126$), neither there was between the no activity and control ones ($p = 0.336$). Figure 6.4d summarizes the findings regarding MRI measurements after exposure to each condition. Figure 6.4b demonstrates the visible changes in MRI signal in SPIONs solutions exposed to the different conditions.

6.5 Discussion

We investigated the effect of brain activity on the aggregation status of nearby SPIONs. Using an adjustable *in vitro* model of electrically active brain slices, we assessed the aggregation of SPIONs using DLS size measurements and relaxivity studies with MRI. Based on previous theoretical [128] and experimental [214] observations, we hypothesized that heightened neuronal activity could promote SPIONs aggregation in a detectable fashion.

6.5.1 DLS measurements

The mean diameter of SPIONs for each condition follows an augmentation proportional to slice activity: 88.4 nm (no activity), 99.4 nm (basal) and 117.8 nm (epileptic). The statistically significant difference in mean diameter between the epileptic condition and all the others is compatible with our hypothesis, showing more aggregated SPIONs with increasing brain slice activity. Regarding the basal condition, although its mean size was higher than the no activity and control conditions, only its relationship with the control one was statistically significant. This could be explained by a lack of statistical power, with the effect on aggregation of the slices with basal activity being less than those with epileptic activity. Although not statistically significant, the mean diameter of the no activity condition was higher than the control condition, suggesting that exposure of the plastic capsules to oxygenated preservation solution and brain slice with no activity could promote SPIONs aggregation. In spite of the fact that some remnant electrical activity could be present on the brain slices with “no activity”, contact between the capsules and the preservation solution could also by itself favour aggregation. PVC, the plastic composing the capsules, shows some permeability to oxygen [255], which can promote aggregation through mechanisms still not entirely understood [256,257]. However, even if such an effect of oxygen was present, it does not seem important enough to hide the effect of the brain slices activity.

The mean size of SPIONs in the control condition (76.5 nm) is higher than the size reported by the manufacturer (50 nm). This could be explained by the fact that DLS tends to overestimate the size of nanoparticles since the hydrodynamic diameter measured refers to both the nanoparticle's core and to the layer of solvent that moves with it [258]. DLS is also more sensitive to larger nanoparticles [259]. Additionally, some degree of aggregation might be present even before exposure of the SPIONs to the brain slices.

The effect of brain slice activity on size dispersion measurements (PDI and AI) were less consistent, with the only statistically significant association being the control condition harbouring a higher polydispersity index than the other three (Fig. 6.4). Aggregation is usually expected to have the opposite effect on dispersion, with aggregates disrupting the size uniformity of the samples. Interestingly, SPIONs exposed to slices either had no significant change in size dispersion

or seemed more homogenous in size following exposure. A possible explanation is that aggregation could have affected the whole sample in a relatively uniform manner, changing minimally the size variability of the samples. We report mean PDI measurements ranging from 0.16 to 0.24. In literature, samples with PDI below 0.20 to 0.30 are considered to have an acceptable monodispersity [260-263].

6.5.2 MRI relaxivity measurements

MRI measurement of T_2 relaxation time followed slice activity closely, in a similar fashion than DLS size measurements (Fig. 6.4). This change in signal responding to slice activity can be appreciated with the naked eye (Fig. 6.4b). This is again consistent with our hypothesis, with aggregated SPIONs changing MRI signal proportionally to their level of aggregation. The influence of SPIONs size on the T_2 relaxation time has been theorized into 3 models of relaxivity (regimes) [145]. For smaller particles, the motional averaging regime (MAR) dominates and dictates a decline of T_2 with augmenting size [146-148]. In the MAR, proton diffusion between particles is the main factor of signal decay. To fall in this regime, the time τ_D has to be smaller than $1/\Delta\omega$ ($\tau_D \ll 1/\Delta\omega$), in which τ_D is the time for a water molecule to diffuse the distance of the radius of a nanoparticle and $\Delta\omega$ is the spread of Larmor frequencies at the surface of the SPIONs which is dependent on the magnetic moment per unit volume of the particles.

When τ_D gets above $\pi\sqrt{3}/2\Delta\omega$, the static dephasing regime (SDR) takes over, setting a minimal value for T_2 [147,149-151]. Within this regime, T_2 is not dependent on particles size since signal decay becomes independent of proton diffusion because of the strong induced perturbing fields. With further increase in SPIONs size, the time τ_D surpasses the time interval at which the refocusing 180° pulses of spin echo sequences are applied ($2\tau_{cp}$). At that point, the system enters the third regime, named the echo limited regime (ELR) [146]. In the ELR, sometime called the slow-motion regime (SMR), T_2 is expected to rise with SPIONs size. Figure 6.4c summarizes the behaviour of T_2 in the different regimes. Both in the MAR and SDR, T_2 and T_2^* relaxation times are expected to be approximately equivalent. This is not the case in the ELR. Since $\tau_D > 2\tau_{cp}$, the effect of the refocusing 180° pulse becomes significant and T_2 elongates with increasing SPIONs

size while T_2^* remains at the minimal value set by the SDR [145,146]. According to theoretical simulations, SPIONs aggregates are expected to follow the same behaviour than single nanoparticles, with aggregates augmenting in size going through the 3 regimes [147,153]. Other factors such as the aggregates compactness due to the presence of coating or the individual SPIONs size could also affect their effect on relaxivity [147,264].

The current reported T_2 values would fit in the ELR theoretical regime (Fig. 6.4c), showing a discernable increase of the T_2 with slice activity and hence aggregation of the SPIONs. This is in line with modeling experiments that showed a transition of SPIONs clusters into the ELR with aggregates diameters in the range of 30 nm [147]. Since the SPIONs we used were of 50 nm, it then comes to no surprise that further aggregation could fall into the ELR. Again, no statistically relevant difference was seen between no activity and control conditions, but the no activity condition had a slightly longer T_2 relaxation time than the control one. This is also in agreement with DLS findings, suggesting that exposure to the oxygenated solution could promote aggregation.

Measurements of T_2^* relaxation time show the same trend as those of the T_2 relaxation time but with a weaker effect and much less statistical significance (Fig. 6.4d). The only statistically significant difference between all 4 conditions exists between the epileptic and no activity conditions. This difference between T_2 and T_2^* measurements corroborates partially with the predicted ELR regime. According to the ELR, T_2^* is expected to be different and consistently smaller than T_2 , which is the case in our experiments. However, as previously explained, T_2^* is not supposed to vary much with aggregation once it reached its minimal value set by the SDR. Here T_2^* shows a slight and barely statistically significant augmentation with aggregation. We believe that this effect could be due to the susceptibility artefacts caused by the aggregates, since the same regions of interests (ROI) were used for both T_2 and T_2^* and T_2^* sequences are much more affected by those artefacts.

A worrisome aspect of the use of MRI to detect aggregation of magnetic nanoparticles is the effect that MRI itself, a very strong magnet, could have on the aggregation of SPIONs. Although static

magnetic fields such as those of MRI will favour aggregation, the aggregating process can span over minutes [99] and is more likely to affect already aggregated SPIONs [83]. In the light of the favorable results we obtained using MRI, we speculated that MRI would favour aggregation equally in all conditions, preserving the differences between them. To confirm this hypothesis, we conducted a single experiment in which SPIONs in each condition were analysed for size measurement with DLS before and after MRI analysis using a 3T MRI (Magnetom Skyra, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Germany). The results of this experiment, shown in Fig. 6.5, are in agreement with our hypothesis, with a very similar augmentation in size in every condition, preserving the size differences between them.

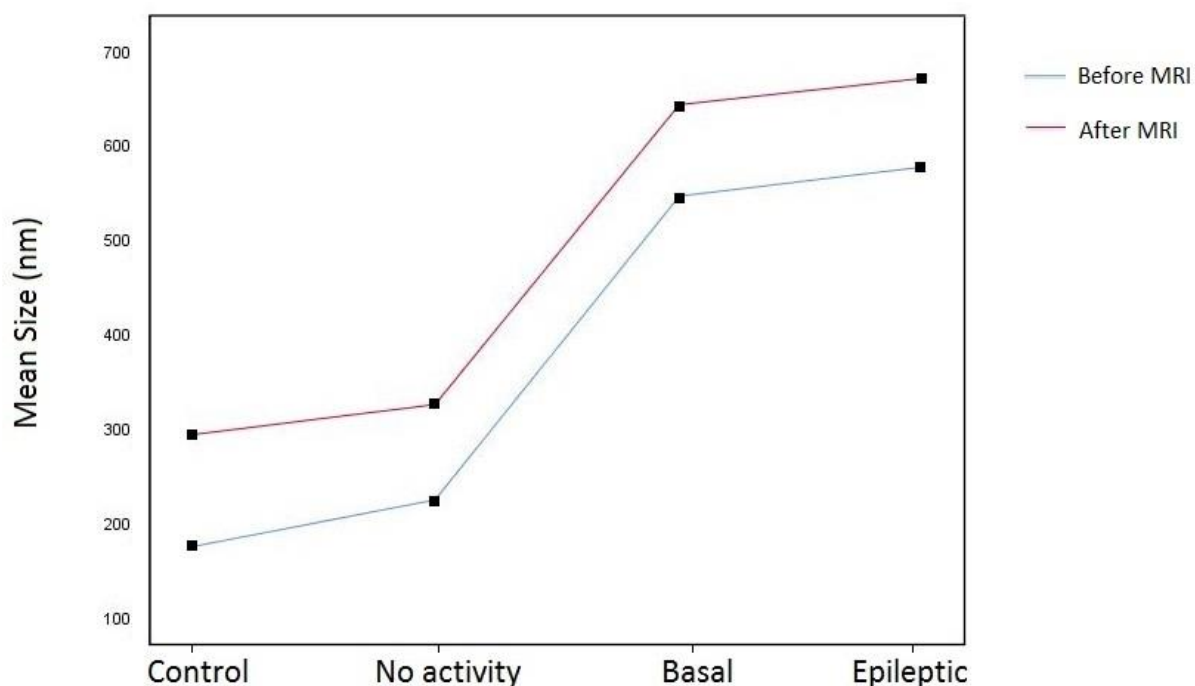


Figure 6.5: Effect of MRI of SPIONs aggregates formation.

Graph representing the mean size of SPIONs solutions assessed with DLS in each of the 4-studied condition both before and after MRI analysis.

6.5.3 Limitations of the *in vitro* slice model

The slice model used to generate brain activity presents some limitations. Since slices were cut from the rat's brain, the outermost layers contain mostly dead cells damaged by the process. Thus, the tissue closest to the capsules would also be the least active one. Cutting the brain into slices also causes the interruption of all neuronal networks exiting the thickness of the slice. As mentioned in the methods section, a weakness of the slice model is its variability, with some slices being less healthy and containing more dead cells, diminishing their electrical activity. However, the consequence of these limitations would be to underestimate the observed effect of brain activity on SPIONs stability.

We explore a new method of epilepsy detection using magnetic nanoparticles. Research so far in magnetic nanoparticles for epilepsy detection is limited to binding SPIONs to metabolic or inflammatory markers for the detection of the heightened metabolic activity coupled with epilepsy [71,74]. Taking advantage of SPIONs instability under magnetic fields, we demonstrate that SPIONs can react to magnetic fields generated by epileptic activity of a brain slice model, creating a discernible signal on MRI. This new method of epilepsy detection presents the advantage of being sensitive to the unaltered magnetic signal of the epileptic focus coupled with detection using MRI, which presents high spatial resolution. Being close to the source of magnetic fields ensure that SPIONs will react to the strongest signal possible and will not be subjected to field cancellation that occurs with distance.

A potential limitation of this new method of detection is the need to physically isolate SPIONs from brain tissue. Direct contact between SPIONs and living tissue highly promotes aggregation [249], justifying the use of coating agents to stabilize SPIONs. Protecting against aggregation caused by the tissue would most probably also prevent aggregation due to epileptic activity. Also, direct delivery of SPIONs to the brain raises concerns about the delivery method (since passage through the blood-brain barrier can be arduous) as well as iron toxicity [249]. For these reasons, the envisioned use of SPIONs for epilepsy detection would be one of a surgically implantable

device similar to the capsules used in the current experiments laid directly on the brain. Current transition into an *in vivo* model using these capsules in a similar fashion that would be in humans is being made.

6.6 Conclusion

Precise mapping of the epileptic focus is a continuous endeavour using data from multiple localisation methods. Using an *in vitro* model of epilepsy, we demonstrated the potency of SPIONs to aggregate in the presence of magnetic fields coming from epileptic activity using DLS and MRI measurements. Such a method of epilepsy detection could offer a high-resolution mapping of epileptic cortex, helping to delineate precisely the epileptic focus. Future validation of these *in vitro* findings in animal models of epilepsy will be necessary to confirm the potential of this new indicator of brain activity.

CHAPITRE 7 ARTICLE 4: FEASIBILITY OF IMPLANTABLE IRON OXIDE NANOPARTICLES IN DETECTING BRAIN ACTIVITY – INITIAL EXPERIENCE IN A RAT MODEL

Auteurs: Pierre-Olivier Champagne, Nathalie Sanon, Lionel Carmant, Philippe Pouliot, Alain Bouthillier, Mohamad Sawan

Revue: Epilepsy Research

7.1 Abstract

7.1.1 Background

Precise detection of zones of increased brain activity is a crucial aspect in the delineation of the cortical region responsible for epilepsy (epileptic focus). When possible, removal of this area can lead to improved control of epilepsy or even its cure. This study explores a new method of detection of electrical brain activity based on the surgical implantation of iron oxide superparamagnetic nanoparticles (SPIONs). By their magnetic nature, SPIONs tend to aggregate in the presence of magnetic fields. This study aims to demonstrate if brain's magnetic fields could change the aggregation status of SPIONs in a rat model.

7.1.2 Methods

Plastic containers (capsules) containing SPIONs in aqueous suspension were implanted over the cortex of either rats rendered epileptic or sane rats (sham). Capsules not implanted in rats served as control. Using magnetic resonance imaging (MRI), the aggregation status of SPIONs contained in the capsules was assessed via measurement of the T_2 relaxivity time of the solutions.

7.1.3 Results

8 Rats were used for the experiments, with 4 rats in each group (epileptic and sham). 1 Rat in the sham group died immediately after surgery and 3 rats failed to demonstrate the expected behaviour

after intervention (2 rats in epileptic group with limited observable seizures and 1 rat in the sham group having repeated seizures). T_2 of the control capsules were significantly lower than those implanted in rats (146 ms VS 7.6 ms, $p < 0.001$), suggesting a higher degree of SPIONs aggregation in the implanted capsules. No significant difference in T_2 could be demonstrated between epileptic and sham rats.

7.1.4 Conclusions

SPIONs implanted over the cortex of active brain showed an increased aggregation status, confirming their potential as a new marker for brain activity. One of the main advantages of SPIONs is that their aggregation status can be measured at a distance with MRI, taking advantage of its high spatial resolution and imaging capacities. The current model was suboptimal to confirm if epileptic activity can be differentiated from normal brain activity using SPIONs.

7.2 Introduction

Epilepsy is the most prevalent serious neurological disorder worldwide [34]. Around 30-40% of epileptic become drug-resistant [37,265] severely impacting their quality of life [266]. For such cases, surgery aiming at improving seizure control can be considered. When possible, resection of the brain region responsible for the abnormal neuronal activity giving rise to seizures (epileptic focus) can offer a chance to cure the disease [42]. The success of resection surgeries lies in the precise identification of the epileptic focus.

Although various methods are currently available to help delineate the epileptic focus, each comes with its own shortcomings and precise detection of the epileptic focus remains an important challenge in epilepsy surgery [267]. Our group recently explored a new method to aid in the detection of neuronal electrical activity based on magnetic nanoparticles. Using superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) in aqueous solution, we were able to demonstrate that SPIONs tend to aggregate proportionally to the magnetic fields generated by neuronal electrical activity in an *in vitro* model [214].

SPIONs aggregation can be detected using magnetic resonance imaging (MRI), since aggregated nanoparticles in solution change the T_2 relaxation time of the solution [149,152]. The envisioned use of SPIONs to detect epileptic activity would resemble that of electrocorticography, involving surgical implantation of the SPIONs solution contained in a thin plastic membrane over the cortex and identification of the epileptic focus using MRI after a certain period of seizure activity. The potential advantages of this detection method reside in the high spatial resolution provided by MRI coupled with the high sensitivity of SPIONs to magnetic fields, a signal that is unaffected when passing through surrounding anatomical structures [223].

This study aims to explore the utility of SPIONs to react to brain activity by aggregating in a rat model, thus validating the *in vitro* findings. This proof of concept would serve to establish the potential of this new method in detecting brain activity.

7.3 Methods

7.3.1 Study design

This is a prospective *in vivo* animal study conducted on a model of epileptic rats. This study was approved by our institution ethics committee (CIBPBAR #699), which follows the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCAC). Both epileptic and non-epileptic (sham) rats were implanted with a SPIONs-containing capsule on the cortex. Capsules not implanted in rats served as control. The day following surgery, the rat's head were scanned using MRI to determine the mean T_2 relaxation time of each capsule content.

7.3.2 Nanoparticles preparation

Commercial uncoated spherical SPIONs (magnetite) of 50 nanometers (nm) diameter were acquired (fluidMAG-UC/A, Chemicell GmbH, Berlin, Germany). Those SPIONs possess an

anionic charge at their surface to prevent spontaneous aggregation. SPIONs were diluted in ultrapure water (Milli-Q, MilliporeSigma, Oakville, Canada) to obtain suspensions of 0.025 mg/cc.

20 microliters (μl) of solution were transferred into a small container made of 2 layers of rigid polyvinyl chloride (PVC) plastic film (Clear-Lay®, Grafix, Maple Heights, USA). These plastic watertight containers (capsules) ensured that no direct contact could occur between the nanoparticles and brain tissue later on. Isolation of SPIONs from the tissue serves to prevent other destabilising hazards such as the presence of ions in solution that influence aggregation. At each step before contact with the solution, every container was extensively rinsed with ultrapure water to avoid contamination by impurities.

7.3.3 SPIONs capsule implantation (figure 7.1)

Male Sprague Dawley rats (Charles River, QC, Canada) between 28 and 42 days of age were randomly assigned to either a sham surgery (sham rats) or an epilepsy-causing surgery (epileptic rats). In the epilepsy-causing procedure, rats were anesthetized with isoflurane 4% (Fresenius Kabi, ON, Canada) administered in a closed circuit and subcutaneous buprenorphine at 0.05 mg/kg. With the head fixed in a stereotaxic apparatus, a midline scalp incision was made after local shaving. A unilateral right-sided square-shaped bone flap spanning from the coronal suture anteriorly to the lambdoid suture posteriorly was removed using an electric drill, exposing the right cerebral hemisphere. Penicillin G (Sigma, Canada) dissolved in 0.9% saline at concentration 400 UI/ μl was injected intracerebrally using a 10 μl Hamilton syringe according to previously described protocols [268,269]. Penicillin G was administered in the sensorimotor area (1mm posterior and 3 mm lateral to the bregma) at depth of 1 mm at a rate of 0.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ for a total dose of 2.8 μl . The syringe was left in place for 5 minutes after injection prior to removal.

Thereafter, a 5 mm x 8 mm capsule containing 20 μl of SPIONs in water (0.025 mg/ml) was apposed on the exposed hemisphere. Closure of the bony defect was performed using the bone flap and dental cement to keep the capsule in place. Skin closure was performed using 4-0 prolene sutures. For the sham rats, the same procedure was performed except for the penicillin G injection,

which was omitted. Rats were monitored between 4-10 hours after procedure for the occurrence of seizures and imaged using MRI the day after. Rats were anaesthetized with isoflurane (Fresenius Kabi, ON, Canada) following MRI.

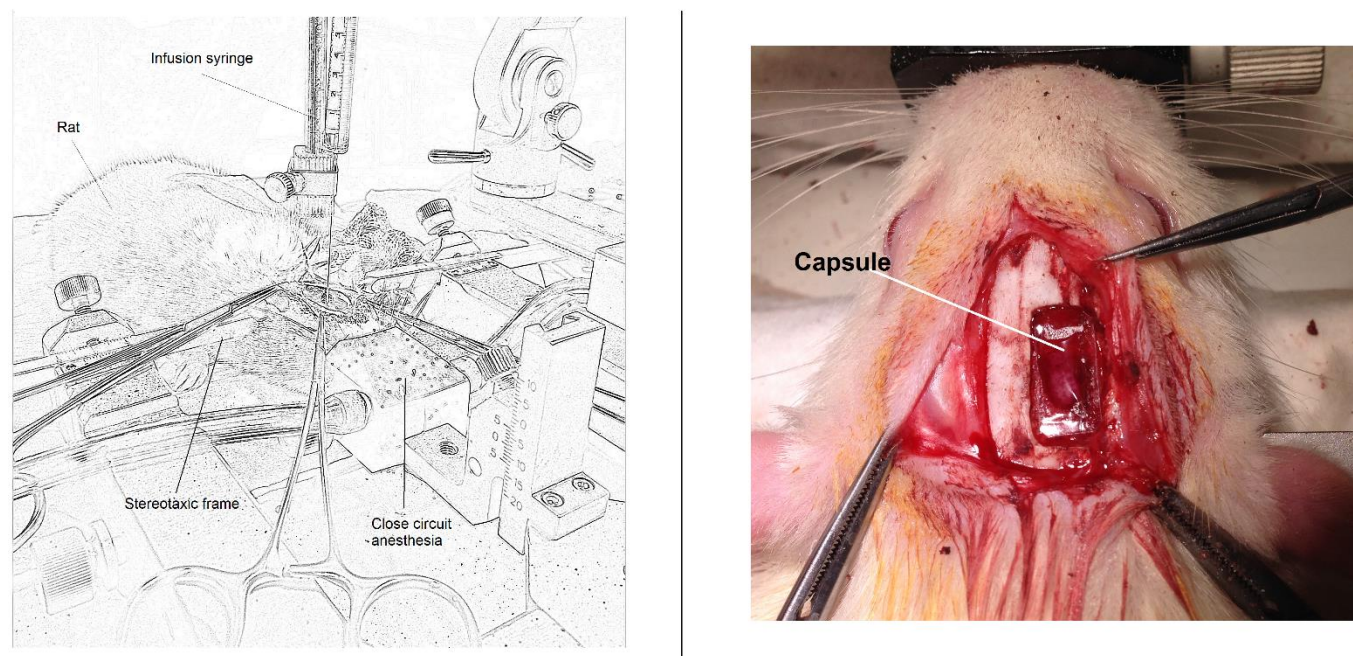


Figure 7.1: Experimental surgical setup.

Left panel: sketch rendition of the setup during intracortical penicillin infusion. Right panel: picture of the implanted SPIONs-containing capsule over the cortex into the cranial defect.

7.3.4 Magnetic resonance imaging relaxivity measurements

MRI was performed using a 7T MRI scanner with rats in prone position, with a custom-built quadrature transmit/receive birdcage head coil with an internal diameter of 46 mm. Control SPIONs capsules positioned above the heads outside the rats were imaged at the same time. Anesthesia was maintained with 1.5-2.5% isoflurane in pure oxygen and body temperature was

maintained at 37.0°C using a warm air fan (SA Instruments, Stony Brook, NY). Respiration and heart rate (target=60 BPM) were monitored, the latter with a pulse oximeter. Animals breathed freely through an open face mask, held in place by a bite bar.

For precise anatomical imaging, a fast spin echo (FSEMS) sequence was used, with TR = 3.0 s, TE = 10 ms, echo-train length = 8, effective TE = 40 ms, matrix size = 256 x 192, 100 kHz spectral width, SGLsinc pulses of 2.0 ms for 90° and 1.6 ms for 180° pulses, and 2 averages. 9 slices were imaged with 1 mm thickness, 0.2 mm gap, and 40 mm x 40 mm field-of-view. With the same slice plan, field of view (FOV) and matrix size, a spin echo sequence (SEMS) was used for the measurement of T₂ relaxation time within the SPIONs capsules. It was designed to ensure observing a difference between very low and moderate values of T₂, by the choice of the 6 different echo times (4, 8, 16, 32, 64, and 128 ms). Other parameters were: 5.0 s repetition time, SGLsinc pulses of 1.25 and 1.0 s durations, and 147 kHz spectral width. For each sample, a volume of interest using all relevant slices was drawn to encompass the largest uniform volume while avoiding susceptibility artefacts and border zones (partial volume effects). The median T₂ of each sample was calculated from a voxel-by-voxel non-linear fit.

7.3.5 Statistical analysis

A 2-tailed Student's t-test was used for comparison of means of continuous variables. A p value < 5% was considered significant. All statistical analysis was conducted using the SPSS software Version 24.0 (IBM Corp. Armonk, USA).

7.4 Results

Sample size calculation was performed using the online tool of the Clinical & Translational Science Institute of University of California – San Francisco (UCSF) (<http://www.sample-size.net/sample-size-means/>). Using a Cohen coefficient stemming from our *in vitro* results (1.9), a normal estimation using the Z statistic for an alpha error of 5% and a beta error of 20% favoured a sample

of 8, with 4 subjects in each group. Following this calculation, 8 rats were used for the experiment, with 4 rats in each group.

7.4.1 Surgical procedures

8 Rats underwent surgical procedure according to the aforementioned protocol. Of the 4 rats in the epileptic group, 2 had to be excluded due to limited clinical seizure activity (less than 3 brief ictal episodes only within the first 10 minutes for the whole observation period). Of the 4 rats in the sham group, 1 died from blood loss due to venous sinus injury immediately after surgery and one other was excluded due to post-operative sustained seizures. This left 4 rats for MRI analysis.

The remaining 2 rats in the epileptic group started having generalized seizures within 10 minutes of awakening from anesthesia. Recurrent ictal episodes (both focal and generalized) were observed for the whole observation period in both rats. The remaining 2 rats in the sham group recovered well from surgery and showed no sign of focal or generalized seizures for the whole observation period. All imaged rats were alive at the moment of MRI.

7.4.2 MRI relaxivity (figure 7.2)

MRI anatomical FSEMS sequences revealed the presence of a hematoma between the capsule and the cortex in both epileptic rats (Figure 7.2). There were no such complications in the sham rats. Calculations of the T_2 relaxation time within the capsules revealed a T_2 of 113 and 111 ms for the epileptic rats and 176 and 186 ms for the sham rats. 4 control capsules were imaged, with T_2 of 7.0, 7.0, 7.3 and 9.2 ms. There was a significant difference between the T_2 of all the implanted capsules when compared to the mean T_2 of the control capsules (mean T_2 7.6 ms VS 146 ms for implanted capsules, $p < 0.001$).

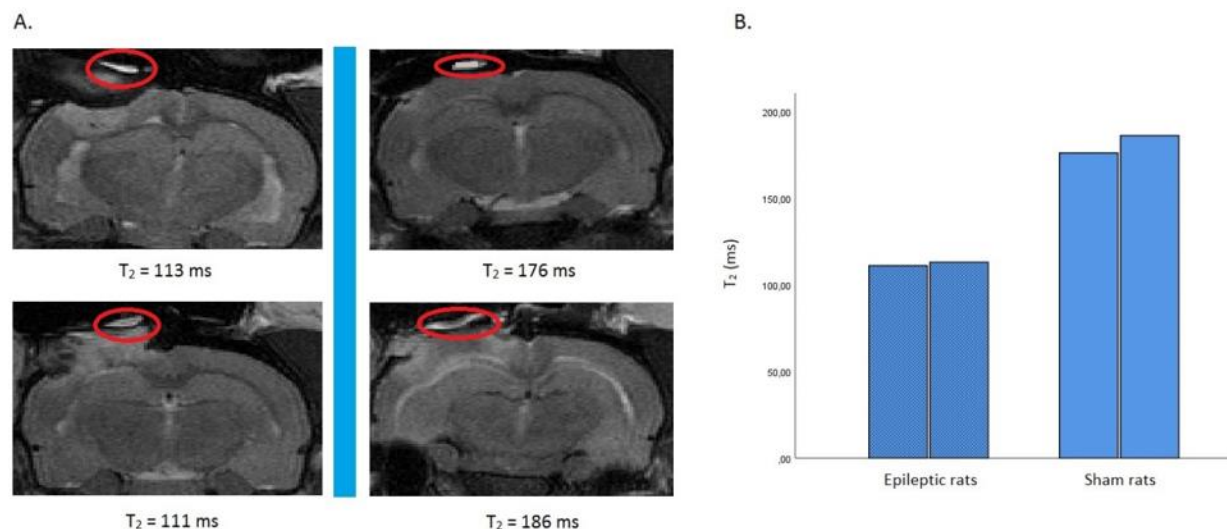


Figure 7.2: Results of the relaxivity of the 4 rats kept for analysis.

A. MRI Fast Spin Echo sequences (FSEMS) in the coronal plane of the 4 rats showing the apposition of the SPIONs capsule (circled red) and corresponding T_2 relaxation times. Left panel: epileptic rats, right panel: sham rats Remark the hematomas distancing the capsules from the cortex in the left panel. B. Graph showing the difference in T_2 between the 4 rats.

7.5 Discussion

We investigated the effect of brain proximity on the aggregation status of nearby SPIONs using an in vivo model of epileptic rats comparing them to a control group (sham) and to SPIONs not in contact with any tissues (control). MRI was used to assess the aggregation status of SPIONs in solution contained inside the capsules. T_2 relaxation time, or transverse relaxation time, was chosen as the indicator of aggregation of SPIONS in solution. T_2 corresponds to the time constant taken for the transverse component of magnetization to fall at 37% ($1/e$) from its initial value after the radiofrequency pulse of the MRI. It was shown to increase with aggregation for SPIONs above 50 nm diameter [145-149,152,153]. MRI makes an ideal tool for the measurement of SPIONs aggregation since it offers the advantage of distant sensing coupled with high spatial resolution imaging. A worrisome aspect of MRI resides in the fact that the powerful magnet of MRI could

affect SPIONs stability. That aspect was investigated previously and although undergoing MRI does increase aggregation of SPIONs, it does not prevent detection of the initial aggregation status of different SPIONs solutions [83,99].

Results of T_2 relaxation between implanted capsules and control capsules are in favour of increased, detectable aggregation within the implanted capsules (longer T_2). These findings align with previous results, supporting that brain electrical activity can favour aggregation of nearby SPIONs in solution. Since the SPIONs were completely isolated from tissue, other pro-aggregating factors aside from the brain's magnetic fields such as the presence of electrolytes or other molecules could not have played a role in the observed aggregation of implanted SPIONs capsules [249]. Preserving SPIONs from the interference of ions on aggregation is the main reason why SPIONs were implanted in this fashion rather than injected intravenously or directly into the cortex. Regarding T_2 relaxation between epileptic and control rats, results differed from the expected behaviour. Although statistical analysis was not performed due to the low number of rats, capsules within control rats had a longer T_2 , involving that SPIONs exposed to normal brain activity were more aggregated than those exposed to epileptic brain activity.

However, both capsules in the epileptic rats were distanced significantly from the cortex by hematomas (Figure 7.2). Since magnetic fields diminish with distance [223], we believe that the capsules in both epileptic rats were actually exposed to less activity than the well-apposed ones of the sham rats, explaining the lower level of aggregation observed.

The main weakness of this exploratory study is the number of excluded rats. 1 Rat died immediately after surgery and 3 others were excluded from analysis because they failed to exhibit the expected behavior of their respective group (seizures in the control group and absence of seizures in the epileptic group). Observed seizures in the control rat could be explained by cortical damages secondary to the procedure. Interventions in both groups were relatively extensive, involving exposing half of the cerebrum and bleeding from venous plexuses and small cortical contusions were frequent. The invasiveness of the procedure also provides an explanation for the observed hematomas in the epileptic group.

The 3 excluded rats underwent MRI study nonetheless with T_2 of 166 ms and 194 ms for the epileptic rats that failed to have seizures and T_2 of 298 ms for the control rat that had seizures. Interestingly, the only rat with no hematoma distancing the capsule and cortex and sustained epileptic activity also had the highest T_2 , (298 ms), suggesting higher aggregation of SPIONs. Although due to these limitations no solid conclusion can be drawn regarding the differences between epileptic rats and control rats, data from the excluded rats reinforces that implanted capsules had significantly higher T_2 by being exposed to brain activity.

We do not believe adding more rats to the current experiment would be of value for two reasons. The first one being that the primary goal of this exploratory study has been achieved: a significant increase in T_2 of implanted capsules was shown, demonstrating a reactivity of the implanted SPIONs to brain proximity. The second reason lies in the model itself: we do not believe this current model to be ideal to prove a difference between epileptic rats and control rats. This is shown by the high degree of brain injury and hematomas observed, death of one rat and failure to observe epileptic behaviour in 2 rats. In this context it was judged unethical to subjugate more rats to such an invasive procedure with uncertain outcomes regarding seizure activity. To refine our experiment, another model involving a bigger animal able to withstand the procedure better is currently envisioned.

7.6 Conclusion

Using an in vivo rat model, we demonstrate the potency of implanted SPIONs to aggregate when brought in contact with living brain tissues. This aggregation is discernable using MRI techniques and is most likely due to the influence of brain's magnetic fields. The current model was suboptimal to show a difference in aggregation of SPIONs in regard of epileptic brain activity against normal brain activity.

CHAPITRE 8 DISCUSSION GÉNÉRALE

Les travaux de recherche actuels explorent une nouvelle méthode de détection de l'activité cérébrale se basant sur la réactivité de NPSOF aux champs magnétiques cérébraux. Une telle méthode pourrait être utilisée pour détecter avec précision les zones responsables d'activité épileptique en vue d'une chirurgie visant la résection de ces zones. Une approche par quatre articles, impliquant un article de revue et trois articles expérimentaux, a été réalisée.

La revue de littérature initiale, impliquant l'article de revue (article 1), a permis de mieux cerner la problématique et le potentiel de faisabilité de cette méthode avant de lancer la phase expérimentale. Les trois articles expérimentaux ont pu permettre d'établir la réactivité de NPSOF aux champs magnétiques cérébraux. La séquence des expériences a été réalisée de façon progressive, en débutant par une preuve de concept demandant un matériel simple (article 2) puis en évoluant vers une méthodologie plus éprouvée qui a pu démontrer que l'IRM est en mesure de détecter l'agrégation de NPSOF causée par l'activité cérébrale (article 3 [270]). Finalement, le concept a pu être mis en place chez le vivant dans une étude de faisabilité (article 4 [271]).

8.1 Interprétation générale des résultats des articles expérimentaux

Les résultats des articles expérimentaux sont généralement positifs, avec une augmentation quantifiable de l'agrégation qui est proportionnelle à celle de l'activité cérébrale. Les résultats les plus forts sur la grandeur d'effet et la signification statistique se retrouvent dans les mesures par IRM du modèle *in vitro* de l'article 3. Ceci supporte que non seulement l'agrégation des NPSOF suit l'activité cérébrale, mais aussi que l'IRM est en mesure de détecter ces changements. Ces deux principes sont essentiels pour l'application envisagée des NPSOF pour détecter les zones épileptiques.

Hélas les résultats de l'article *in vivo* (article 4) n'ont pas été aussi distincts que ceux l'article *in vivo* (article 3) par rapport à la différenciation entre activité cérébrale normale et épileptique. Tel que démontré dans la discussion de l'article, ceci pourrait être largement dû au modèle animal lui-même et aux difficultés d'ordre technique qu'il engendre. De cette manière il est difficile de déterminer aussi précisément que dans l'article 3 si les capsules implantées chez les rats épileptiques ont bel et bien été exposées à une activité cérébrale plus importante. Néanmoins l'article 4 a pu démontrer la faisabilité du concept général chez le vivant et l'agrégation de NPSOF implantées directement sur le cortex de rats vivants.

8.2 Limitations

Une des limitations des travaux vient du fait que les champs magnétiques cérébraux ne sont jamais directement mesurés lors des phases expérimentales. Cette limitation est principalement d'ordre technique puisque la technologie nécessaire pour mesurer les champs magnétiques de l'ordre de ceux faits par une tranche de cerveau de rat est peu accessible, très dispendieuse et demande un entretien particulier et un soutien technique très avancé. Pour ces raisons la mesure directe des champs magnétiques des modèles utilisés a été remplacée par la mesure de l'activité électrique des tranches dans l'article 3.

Une autre limitation des travaux présentés réside dans le fait que la sédimentation (« settling ») des plus gros agrégats n'a pas été mesurée. À partir d'une certaine grosseur (près de l'ordre du micromètre) les mouvements Browniens ne sont plus suffisants pour maintenir les particules en suspension et ces dernières sédimentent en suivant la gravité. N'étant plus en solution, ces agrégats ne sont pas mesurés par le DLS ou l'IRM. La prise en compte de ces très gros agrégats pouvant sédimenter n'a pas été planifiée dans les phases expérimentales majoritairement car un tel niveau d'agrégation n'a pas été anticipé à la lumière de la revue de la littérature.

De cette manière les expériences ont été planifiées pour maximiser l'agrégation que pourraient induire les champs magnétiques cérébraux. Certaines données (notamment la diminution de l'index de polydispersité vu au DLS) pourraient indiquer qu'un certain niveau de sédimentation se soit produit lors des expériences menées dans les articles 3 et 4. Cependant, l'effet de la sédimentation aurait été de sous-estimer l'ampleur du phénomène d'agrégation observé, qui reste néanmoins significatif. La sédimentation des plus gros agrégats devra être prise en compte dans les expériences futures.

CHAPITRE 9 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

9.1 Contribution à l'avancement des connaissances

Nous avons été en mesure de démontrer pour une première fois l'agrégation proportionnelle de NPSOF en présence d'activité cérébrale croissante. Ceci établit leur potentiel comme nouvelle méthode de détection de l'activité cérébrale et de foyers épileptiques et ouvre la voie à de futures recherches en ce domaine, dans l'objectif mieux comprendre le fonctionnement général du cerveau et de l'activité épileptique. La figure 9.1 donne un aperçu de l'utilisation envisagée des NPSOF en détection de l'épilepsie. D'une manière plus générale, nos travaux sur l'impact des champs magnétiques cérébraux sur la stabilité colloïdale des NPSOF pourront également servir dans le domaine appliqué de l'utilisation de nanoparticules magnétiques dans le système nerveux central.

Un autre aspect novateur de ces travaux réside dans l'utilisation de l'IRM pour détecter l'agrégation. À notre connaissance, pour la première fois de façon expérimentale on a pu démontrer en parallèle l'agrégation par DLS et la corréler avec des résultats d'IRM. Ces nouvelles données supportent le concept de l'IRM comme outil de détection de l'agrégation de NPSOF.

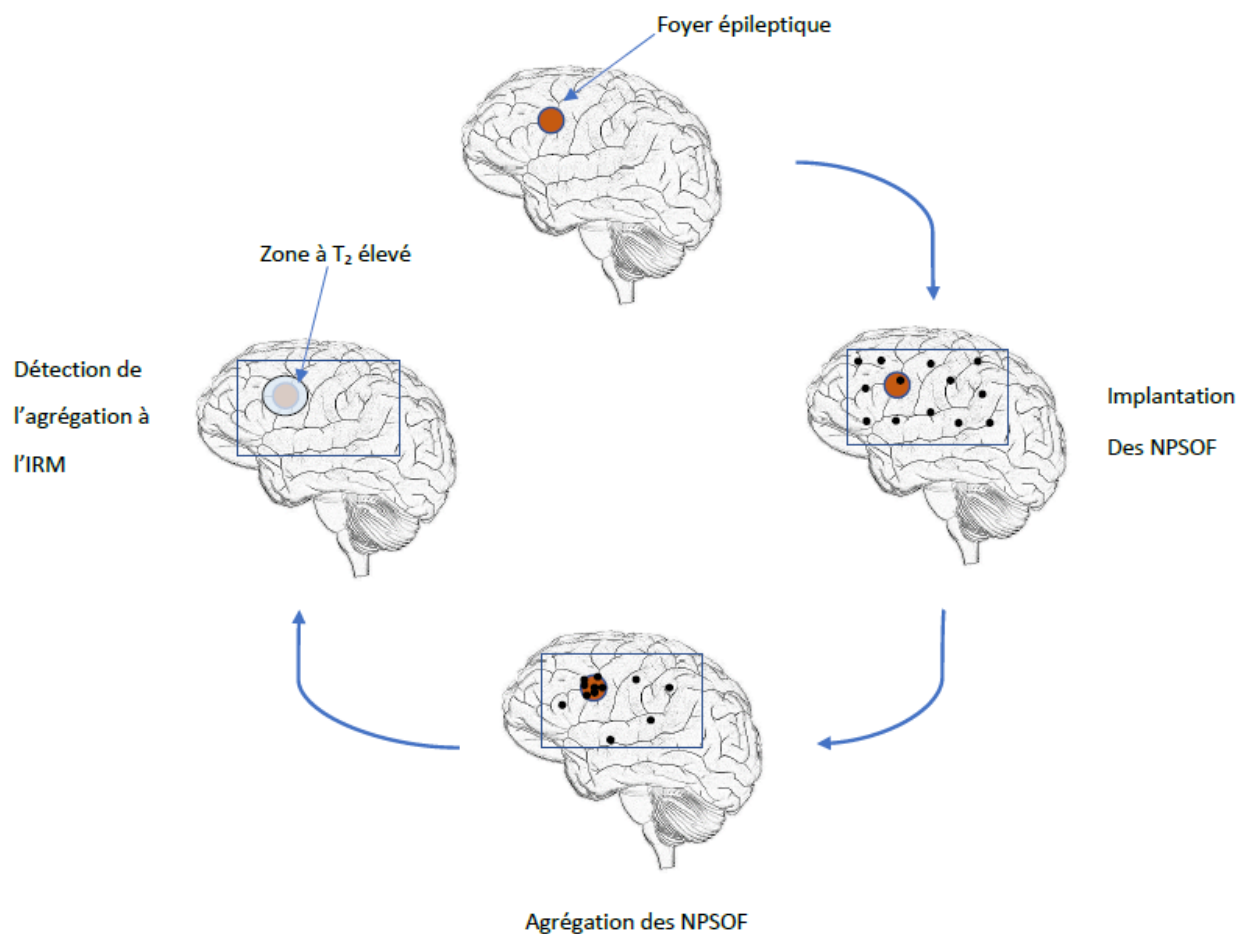


Figure 9.1: Utilisation envisagée des NPSOF pour la détection d'un foyer épileptique.

Des NPSOF en solution aqueuse contenues dans une membrane plastique similaire aux capsules utilisées dans les articles 3 et 4 sont implantées chirurgicalement directement sur le cortex dans une zone d'intérêt. L'agrégation des NPSOF est détectée à l'aide de l'IRM. Les NPSOF pourront être retirées au moment d'une seconde intervention au cours de laquelle la résection du foyer épileptique pourra être accomplie.

9.2 Limitations

En plus des différentes limitations méthodologiques discutées dans les différents articles ainsi que dans la discussion générale (chapitre 8), la détection de l'activité cérébrale par les NPSOF telle qu'envisagée (figure 9.1) présente également quelques limitations. Premièrement, les NPSOF

doivent être physiquement isolées du vivant pour prévenir l'interférence d'autres sources d'agrégation. Ceci contraint à devoir délivrer les NPSOF chirurgicalement directement sur le cortex. En plus des contraintes inhérentes à une intervention chirurgicale (complications potentielles, convalescence, etc.), l'implantation des NPSOF contraint à devoir choisir une zone d'intérêt ou les implanter. Aussi, cet outil ne donnera pas d'informations quant à la temporalité de l'activité cérébrale et la propagation des crises épileptiques. Il donnera plutôt une « carte » des endroits avec une activité augmentée lors de la période d'étude. Une limitation envisagée est aussi en lien avec la sédimentation potentielle des NPSOF et leur mouvement libre à l'intérieur de la capsule implantée. Pour éviter cette « contamination » avoisinante le modèle final prévoit de séparer la capsule en petits compartiments ressemblant à des alvéoles.

9.3 Recommandations et nouvelles voies de recherche

À partir des résultats présentés et de leur analyse, nous sommes à même de faire les recommandations suivantes en vue de recherche future :

- Ces travaux établissent le potentiel des NPSOF pour la détection de l'activité cérébrale. Davantage de validation sur modèle *in vivo* seront nécessaires afin de faire évoluer ces trouvailles vers une application clinique.
- Nous avons pu démontrer que dans un contexte d'utilisation de NPSOF à proximité du cerveau, les champs magnétiques cérébraux sont à même de contribuer à leur agrégation et doivent être pris en compte.
- L'IRM est à même de pouvoir détecter l'agrégation de NPSOF en solution et son utilisation en ce sens est prometteuse et doit être étudiée davantage.

- La sédimentation des plus gros agrégats devra être investiguée dans les recherches futures et prise en compte dans la potentielle application de NPSOF pour détecter l'activité cérébrale.
- Un modèle animal en mesure de tolérer une chirurgie d'implantation de capsules de NPSOF devra être utilisé pour démontrer si l'activité épileptique d'un foyer connu peut entraîner une agrégation préférentielle. Dans un tel modèle, l'hémisphère cérébral controlatéral au foyer épileptique pourra servir pour implanter les capsules exposées à une activité cérébrale normale.

BIBLIOGRAPHIE

1. Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall W *et al.* *Neurosciences* (De Boeck Supérieur, 2015).
2. Hodgkin AL, Katz B. The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *The Journal of physiology*, 108(1), 37-77 (1949).
3. Keynes RD. The ionic movements during nervous activity. *The Journal of physiology*, 114(1-2), 119-150 (1951).
4. Hodgkin AL, Rushton WA. The electrical constants of a crustacean nerve fibre. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 134(873), 444-479 (1946).
5. Hall JE. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology E-Book* (Elsevier Health Sciences, 2015).
6. Kharkar S, Knowlton R. Magnetoencephalography in the presurgical evaluation of epilepsy. *Epilepsy & behavior : E&B*, 46, 19-26 (2015).
7. Blagoev KB, Mihaila B, Travis BJ *et al.* Modelling the magnetic signature of neuronal tissue. *NeuroImage*, 37(1), 137-148 (2007).
8. Bedard C, Destexhe A. Generalized cable formalism to calculate the magnetic field of single neurons and neuronal populations. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*, 90(4), 042723 (2014).
9. Duan H, Wearne SL, Morrison JH, Hof PR. Quantitative analysis of the dendritic morphology of corticocortical projection neurons in the macaque monkey association cortex. *Neuroscience*, 114(2), 349-359 (2002).
10. Travis BJ. A computational model of one pathway in the cat subcortical auditory system. *Mathematics and Computers in Simulation*, 40(1), 81-99 (1995).
11. Okada YC, Wu J, Kyuhou S. Genesis of MEG signals in a mammalian CNS structure. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 103(4), 474-485 (1997).
12. Murakami S, Zhang T, Hirose A, Okada YC. Physiological origins of evoked magnetic fields and extracellular field potentials produced by guinea-pig CA3 hippocampal slices. *The Journal of physiology*, 544(Pt 1), 237-251 (2002).
13. Cohen D. Magnetoencephalography: evidence of magnetic fields produced by alpha-rhythm currents. *Science (New York, N.Y.)*, 161(3843), 784-786 (1968).
14. Hämäläinen M, Hari R, Ilmoniemi RJ, Knuutila J, Lounasmaa OV. Magnetoencephalography---theory, instrumentation, and applications to noninvasive studies of the working human brain. *Reviews of Modern Physics*, 65(2), 413-497 (1993).
15. Schomer DL, Silva FHLd. *Niedermeyer's Electroencephalography Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields* (Oxford University Press, 2017).
16. Kirschstein T, Kohling R. What is the source of the EEG? *Clinical EEG and neuroscience*, 40(3), 146-149 (2009).

17. Enatsu R, Mikuni N. Invasive Evaluations for Epilepsy Surgery: A Review of the Literature. *Neurologia medico-chirurgica*, 56(5), 221-227 (2016).
18. Diehl B, Luders HO. Temporal lobe epilepsy: when are invasive recordings needed? *Epilepsia*, 41 Suppl 3, S61-74 (2000).
19. Ogawa S, Lee TM. Magnetic resonance imaging of blood vessels at high fields: in vivo and in vitro measurements and image simulation. *Magnetic resonance in medicine*, 16(1), 9-18 (1990).
20. Ogawa S, Lee TM, Nayak AS, Glynn P. Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields. *Magnetic resonance in medicine*, 14(1), 68-78 (1990).
21. Logothetis NK. What we can do and what we cannot do with fMRI. *Nature*, 453(7197), 869-878 (2008).
22. Douglas RJ, Koch C, Mahowald M, Martin KA, Suarez HH. Recurrent excitation in neocortical circuits. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5226), 981-985 (1995).
23. Brunel N, Wang XJ. Effects of neuromodulation in a cortical network model of object working memory dominated by recurrent inhibition. *Journal of computational neuroscience*, 11(1), 63-85 (2001).
24. la Fougere C, Rominger A, Forster S, Geisler J, Bartenstein P. PET and SPECT in epilepsy: a critical review. *Epilepsy & behavior : E&B*, 15(1), 50-55 (2009).
25. Catafau AM. Brain SPECT in clinical practice. Part I: perfusion. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 42(2), 259-271 (2001).
26. Cui X, Bray S, Bryant DM, Glover GH, Reiss AL. A quantitative comparison of NIRS and fMRI across multiple cognitive tasks. *NeuroImage*, 54(4), 2808-2821 (2011).
27. Berhouma M, Jacquesson T, Abouaf L, Vighetto A, Jouanneau E. Endoscopic endonasal optic nerve and orbital apex decompression for nontraumatic optic neuropathy: surgical nuances and review of the literature. *Neurosurgical focus*, 37(4), E19 (2014).
28. Obrig H. NIRS in clinical neurology - a 'promising' tool? *NeuroImage*, 85 Pt 1, 535-546 (2014).
29. Balish M, Sato S, Connaughton P, Kufta C. Localization of implanted dipoles by magnetoencephalography. *Neurology*, 41(7), 1072-1076 (1991).
30. Hillebrand A, Barnes GR. A quantitative assessment of the sensitivity of whole-head MEG to activity in the adult human cortex. *NeuroImage*, 16(3 Pt 1), 638-650 (2002).
31. Leahy RM, Mosher JC, Spencer ME, Huang MX, Lewine JD. A study of dipole localization accuracy for MEG and EEG using a human skull phantom. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 107(2), 159-173 (1998).
32. Shigeto H, Morioka T, Hisada K *et al.* Feasibility and limitations of magnetoencephalographic detection of epileptic discharges: simultaneous recording of magnetic fields and electrocorticography. *Neurological research*, 24(6), 531-536 (2002).
33. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A *et al.* ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475-482 (2014).

34. Kobau R, Zahran H, Grant D, Thurman DJ, Price PH, Zack MM. Prevalence of active epilepsy and health-related quality of life among adults with self-reported epilepsy in California: California Health Interview Survey, 2003. *Epilepsia*, 48(10), 1904-1913 (2007).
35. Bell GS, Neligan A, Sander JW. An unknown quantity--the worldwide prevalence of epilepsy. *Epilepsia*, 55(7), 958-962 (2014).
36. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT *et al.* Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, 51(6), 1069-1077 (2010).
37. Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *The New England journal of medicine*, 342(5), 314-319 (2000).
38. Picot MC, Baldy-Moulinier M, Daures JP, Dujols P, Crespel A. The prevalence of epilepsy and pharmaco-resistant epilepsy in adults: a population-based study in a Western European country. *Epilepsia*, 49(7), 1230-1238 (2008).
39. Laxer KD, Trinka E, Hirsch LJ *et al.* The consequences of refractory epilepsy and its treatment. *Epilepsy & behavior : E&B*, 37, 59-70 (2014).
40. Gaitatzis A, Johnson AL, Chadwick DW, Shorvon SD, Sander JW. Life expectancy in people with newly diagnosed epilepsy. *Brain : a journal of neurology*, 127(Pt 11), 2427-2432 (2004).
41. McCagh J, Fisk JE, Baker GA. Epilepsy, psychosocial and cognitive functioning. *Epilepsy research*, 86(1), 1-14 (2009).
42. Jobst BC, Cascino GD. Resective epilepsy surgery for drug-resistant focal epilepsy: a review. *Jama*, 313(3), 285-293 (2015).
43. Rosenow F, Luders H. Presurgical evaluation of epilepsy. *Brain : a journal of neurology*, 124(Pt 9), 1683-1700 (2001).
44. McIntosh AM, Kalnins RM, Mitchell LA, Fabinyi GC, Briellmann RS, Berkovic SF. Temporal lobectomy: long-term seizure outcome, late recurrence and risks for seizure recurrence. *Brain : a journal of neurology*, 127(Pt 9), 2018-2030 (2004).
45. Jeha LE, Najm IM, Bingaman WE *et al.* Predictors of outcome after temporal lobectomy for the treatment of intractable epilepsy. *Neurology*, 66(12), 1938-1940 (2006).
46. Carne RP, O'Brien TJ, Kilpatrick CJ *et al.* MRI-negative PET-positive temporal lobe epilepsy: a distinct surgically remediable syndrome. *Brain : a journal of neurology*, 127(Pt 10), 2276-2285 (2004).
47. Hong KS, Lee SK, Kim JY, Lee DS, Chung CK. Pre-surgical evaluation and surgical outcome of 41 patients with non-lesional neocortical epilepsy. *Seizure*, 11(3), 184-192 (2002).
48. Kutsy RL. Focal extratemporal epilepsy: clinical features, EEG patterns, and surgical approach. *Journal of the neurological sciences*, 166(1), 1-15 (1999).
49. De Ciantis A, Lemieux L. Localisation of epileptic foci using novel imaging modalities. *Current opinion in neurology*, 26(4), 368-373 (2013).

50. Fountas KN. Implanted subdural electrodes: safety issues and complication avoidance. *Neurosurgery clinics of North America*, 22(4), 519-531, vii (2011).
51. Engel J, Jr. Surgery for seizures. *The New England journal of medicine*, 334(10), 647-652 (1996).
52. Stefan H, Schneider S, Feistel H *et al.* Ictal and interictal activity in partial epilepsy recorded with multichannel magnetoencephalography: correlation of electroencephalography/electrocorticography, magnetic resonance imaging, single photon emission computed tomography, and positron emission tomography findings. *Epilepsia*, 33(5), 874-887 (1992).
53. Knowlton RC, Laxer KD, Aminoff MJ, Roberts TP, Wong ST, Rowley HA. Magnetoencephalography in partial epilepsy: clinical yield and localization accuracy. *Annals of neurology*, 42(4), 622-631 (1997).
54. Knowlton RC, Elgavish RA, Bartolucci A *et al.* Functional imaging: II. Prediction of epilepsy surgery outcome. *Annals of neurology*, 64(1), 35-41 (2008).
55. Berkovic SF, McIntosh AM, Kalnins RM *et al.* Preoperative MRI predicts outcome of temporal lobectomy: an actuarial analysis. *Neurology*, 45(7), 1358-1363 (1995).
56. Wieshmann UC, Larkin D, Varma T, Eldridge P. Predictors of outcome after temporal lobectomy for refractory temporal lobe epilepsy. *Acta neurologica Scandinavica*, 118(5), 306-312 (2008).
57. Stavem K, Bjornaes H, Langmoen IA. Predictors of seizure outcome after temporal lobectomy for intractable epilepsy. *Acta neurologica Scandinavica*, 109(4), 244-249 (2004).
58. Tellez-Zenteno JF, Hernandez Ronquillo L, Moien-Afshari F, Wiebe S. Surgical outcomes in lesional and non-lesional epilepsy: a systematic review and meta-analysis. *Epilepsy research*, 89(2-3), 310-318 (2010).
59. Maynard AD, Aitken RJ, Butz T *et al.* Safe handling of nanotechnology. *Nature*, 444(7117), 267-269 (2006).
60. Hartman KB, Wilson LJ, Rosenblum MG. Detecting and treating cancer with nanotechnology. *Molecular diagnosis & therapy*, 12(1), 1-14 (2008).
61. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18), 3995-4021 (2005).
62. Bowles J. Iron Oxides in the Laboratory. *Mineralogical Magazine*, 56, 281-282 (1992).
63. Sjogren CE, Briley-Saebo K, Hanson M, Johansson C. Magnetic characterization of iron oxides for magnetic resonance imaging. *Magnetic resonance in medicine*, 31(3), 268-272 (1994).
64. Rosensweig RE. *Ferrohydrodynamics* (Cambridge University Press, Cambridge; New York, 1985).
65. Feynman RP, Leighton RB, Sands ML. *The Feynman lectures on physics* (Addison-Wesley Pub. Co., Reading, Mass., 1963).

66. Teja A, Koh PY. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.*, 55, 22-45 (2009).
67. Neuberger T, Schöpf B, Hofmann H, Hofmann M, von Rechenberg B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293(1), 483-496 (2005).
68. Rosillo-de la Torre A, Luna-Barcenas G, Orozco-Suarez S *et al.* Pharmacoresistant epilepsy and nanotechnology. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 6, 329-340 (2014).
69. Leyva-Gomez G, Gonzalez-Trujano ME, Lopez-Ruiz E *et al.* Nanoparticle formulation improves the anticonvulsant effect of clonazepam on the pentylenetetrazole-induced seizures: behavior and electroencephalogram. *Journal of pharmaceutical sciences*, 103(8), 2509-2519 (2014).
70. Krol S, Macrez R, Docagne F *et al.* Therapeutic benefits from nanoparticles: the potential significance of nanoscience in diseases with compromise to the blood brain barrier. *Chem Rev*, 113(3), 1877-1903 (2013).
71. Akhtari M, Bragin A, Cohen M *et al.* Functionalized magnetonanoparticles for MRI diagnosis and localization in epilepsy. *Epilepsia*, 49(8), 1419-1430 (2008).
72. Akhtari M, Bragin A, Moats R, Frew A, Mandelkern M. Imaging brain neuronal activity using functionalized magnetonanoparticles and MRI. *Brain topography*, 25(4), 374-388 (2012).
73. London ED, Connolly RJ, Szikszay M, Wamsley JK, Dam M. Effects of nicotine on local cerebral glucose utilization in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 8(10), 3920-3928 (1988).
74. Fu T, Kong Q, Sheng H, Gao L. Value of Functionalized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in the Diagnosis and Treatment of Acute Temporal Lobe Epilepsy on MRI. *Neural plasticity*, 2016, 2412958 (2016).
75. Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36(13), R167-R181 (2003).
76. Einstein A. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik*, 322, 549 (1905).
77. Kalra V, Escobedo F, Joo YL. Effect of shear on nanoparticle dispersion in polymer melts: A coarse-grained molecular dynamics study. *The Journal of chemical physics*, 132(2), 024901 (2010).
78. He YT, Wan J, Tokunaga T. Kinetic stability of hematite nanoparticles: the effect of particle sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, 10, 321 (2008).
79. Hamaker HC. The London—van der Waals attraction between spherical particles. *Physica*, 4, 1058 (1937).
80. Wahajuddin, Arora S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *International journal of nanomedicine*, 7, 3445-3471 (2012).

81. Kallay N, Zalac S. Stability of nanodispersions: a model for kinetics of aggregation of nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, 253(1), 70-76 (2002).
82. Rosen MJ, Kunjappu JT. Surfactants and Interfacial Phenomena. (2012).
83. Holm C, Weis J-J. The structure of ferrofluids: A status report. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 10, (3), 133-140 (2005).
84. Taboada-Serrano P, Chin C-J, Yiacomou S, Tsouris C. Modeling aggregation of colloidal particles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10, 123-132 (2005).
85. David AE, Cole AJ, Chertok B, Park YS, Yang VC. A combined theoretical and in vitro modeling approach for predicting the magnetic capture and retention of magnetic nanoparticles in vivo. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 152(1), 67-75 (2011).
86. Pashley RM, Quirk JP. The effect of cation valency on DLVO and hydration forces between macroscopic sheets of muscovite mica in relation to clay swelling. *Colloids and Surfaces*, 9(1), 1-17 (1984).
87. Baalousha M, Prasad A, Lead JR. Quantitative measurement of the nanoparticle size and number concentration from liquid suspensions by atomic force microscopy. *Environmental science. Processes & impacts*, 16(6), 1338-1347 (2014).
88. Xu F. Review of analytical studies on TiO₂ nanoparticles and particle aggregation, coagulation, flocculation, sedimentation, stabilization. *Chemosphere*, 212, 662-677 (2018).
89. Oseghe Ekemena O, Ndungu Patrick G, Jonnalagadda Sreekanth B. Synthesis, Characterization, and Application of TiO₂ Nanoparticles – Effect of pH Adjusted Solvent. In: *Journal of Advanced Oxidation Technologies*. (Ed.^(Eds) (2015) 253.
90. Grzmil B, Gleń M, Kic B, Lubkowski K. Preparation and Characterization of Single-Modified TiO₂ for Pigmentary Applications. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50(11), 6535-6542 (2011).
91. Zhang H, Banfield JF. Structural Characteristics and Mechanical and Thermodynamic Properties of Nanocrystalline TiO₂. *Chemical Reviews*, 114(19), 9613-9644 (2014).
92. Sarathi P, Thilagavathi G. Synthesis and characterization of titanium dioxide nano-particles and their applications to textiles for microbe resistance. *Journal of Textile and Apparel, Technology and Management*, 6(2) (2009).
93. Babakhani P, Doong R-a, Bridge J. Significance of Early and Late Stages of Coupled Aggregation and Sedimentation in the Fate of Nanoparticles: Measurement and Modeling. *Environmental Science & Technology*, 52(15), 8419-8428 (2018).
94. Lim J, Yeap SP, Che HX, Low SC. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Res Lett*, 8(1), 381-381 (2013).
95. Babakhani P. The impact of nanoparticle aggregation on their size exclusion during transport in porous media: One- and three-dimensional modelling investigations. *Scientific Reports*, 9(1), 14071 (2019).

96. Garcia-Martinez HA, Llamas-Bueno M, Song S, Lopez-Valdivieso A. MAGNETIC FLOCCULATION OF MINERAL FINES IN AN EXTERNAL MAGNETIC FIELD. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review*, 25(2), 67-90 (2004).
97. Parker MR, Kleef R, Myron HW, Wyder P. Study of particle behaviour in high field magnetic flocculation. *Magnetics, IEEE Transactions on*, 18, 1647-1649 (1982).
98. Rosická D, Sembera J. Changes in the nanoparticle aggregation rate due to the additional effect of electrostatic and magnetic forces on mass transport coefficients. *Nanoscale Res Lett*, 8(1), 20-20 (2013).
99. Heinrich D, Goñi AR, Osán TM *et al.* Effects of magnetic field gradients on the aggregation dynamics of colloidal magnetic nanoparticles. *Soft Matter*, 11(38), 7606-7616 (2015).
100. Derjaguin B, Landau L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Progress in Surface Science*, 43(1), 30-59 (1993).
101. Butler JAV. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. *Nature*, 162(4113), 315-316 (1948).
102. Hogg R, Healy TW, Fuerstenau DW. Mutual coagulation of colloidal dispersions. *Transactions of the Faraday Society*, 62(0), 1638-1651 (1966).
103. Maldonado-Camargo L, Unni M, Rinaldi C. Magnetic Characterization of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Methods Mol Biol*, 1570, 47-71 (2017).
104. Hao T, Riman RE. Calculation of interparticle spacing in colloidal systems. *Journal of colloid and interface science*, 297(1), 374-377 (2006).
105. Kuhn SJ, Hallahan DE, Giorgio TD. Characterization of superparamagnetic nanoparticle interactions with extracellular matrix in an in vitro system. *Annals of biomedical engineering*, 34(1), 51-58 (2006).
106. Olmsted SS, Padgett JL, Yudin AI, Whaley KJ, Moench TR, Cone RA. Diffusion of macromolecules and virus-like particles in human cervical mucus. *Biophysical journal*, 81(4), 1930-1937 (2001).
107. Liu HL, Chen PY, Yang HW *et al.* In vivo MR quantification of superparamagnetic iron oxide nanoparticle leakage during low-frequency-ultrasound-induced blood-brain barrier opening in swine. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*, 34(6), 1313-1324 (2011).
108. Yim YS, Choi JS, Kim GT *et al.* A facile approach for the delivery of inorganic nanoparticles into the brain by passing through the blood-brain barrier (BBB). *Chemical communications (Cambridge, England)*, 48(1), 61-63 (2012).
109. Shirozu H, Iida K, Hashizume A *et al.* Gradient magnetic-field topography reflecting cortical activities of neocortical epilepsy spikes. *Epilepsy research*, 90(1-2), 121-131 (2010).
110. Prigiobbe V, Ko S, Huh C, Bryant SL. Measuring and modeling the magnetic settling of superparamagnetic nanoparticle dispersions. *Journal of colloid and interface science*, 447, 58-67 (2015).

111. Moore LR, Zborowski M, Sun L, Chalmers JJ. Lymphocyte fractionation using immunomagnetic colloid and a dipole magnet flow cell sorter. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 37(1-2), 11-33 (1998).
112. Parker WC, Chakraborty N, Vrikkis R, Elliott G, Smith S, Moyer PJ. High-resolution intracellular viscosity measurement using time-dependent fluorescence anisotropy. *Optics express*, 18(16), 16607-16617 (2010).
113. Tsouris C, Scott TC. Flocculation of Paramagnetic Particles in a Magnetic Field. *Journal of colloid and interface science*, 171(2), 319-330 (1995).
114. Mendelev V, Ivanov A. Magnetic properties of ferrofluids: an influence of chain aggregates. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 289, 211-214 (2005).
115. Chin C-J, Yiaccoumi S, Tsouris C. Agglomeration of magnetic particles and breakup of magnetic chains in surfactant solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 204(1), 63-72 (2002).
116. Rotariu O, Strachan NJC. Magnetic-field-induced order in assemblies of superparamagnetic carrier particles. *Powder Technology*, 132(2), 226-232 (2003).
117. Pellegrino G, Hedrich T, Chowdhury R *et al.* Source localization of the seizure onset zone from ictal EEG/MEG data. *Human brain mapping*, 37(7), 2528-2546 (2016).
118. Badier JM, Benar CG, Woodman M *et al.* Ictal Magnetic Source Imaging in Presurgical Assessment. *Brain topography*, 29(1), 182-192 (2016).
119. Jeong W, Kim JS, Chung CK. Usefulness of multiple frequency band source localizations in ictal MEG. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 127(2), 1049-1056 (2016).
120. Fujiwara H, Greiner HM, Hemasilpin N *et al.* Ictal MEG onset source localization compared to intracranial EEG and outcome: improved epilepsy presurgical evaluation in pediatrics. *Epilepsy research*, 99(3), 214-224 (2012).
121. Rose DF, Fujiwara H, Holland-Bouley K, Greiner HM, Arthur T, Mangano FT. Focal Peak Activities in Spread of Interictal-Ictal Discharges in Epilepsy with Beamformer MEG: Evidence for an Epileptic Network? *Frontiers in neurology*, 4, 56 (2013).
122. Baalousha M. Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter. *The Science of the total environment*, 407(6), 2093-2101 (2009).
123. Birbilis T, Anninos P, Seimenis I, Adamopoulos A, Kotini A. MEG localization of spike sources in human patients with brain tumors. *Journal of integrative neuroscience*, 13(3), 519-528 (2014).
124. Rozendaal YJ, van Luijtelaar G, Ossenblok PP. Spatiotemporal mapping of interictal epileptiform discharges in human absence epilepsy: A MEG study. *Epilepsy research*, 119, 67-76 (2016).
125. Haueisen J, Funke M, Gullmar D, Eichardt R. Tangential and radial epileptic spike activity: different sensitivity in EEG and MEG. *Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society*, 29(4), 327-332 (2012).

126. Morup S, Hansen MF, Frandsen C. Magnetic interactions between nanoparticles. *Beilstein journal of nanotechnology*, 1, 182-190 (2010).
127. P Damodaran S, Philip J, Raj B. Influence of aggregation on thermal conductivity in stable and unstable nanofluids. *Applied Physics Letters*, 97, 153113-153113 (2010).
128. Pedram MZ, Shamloo A, Alasty A, Ghafar-Zadeh E. Toward Epileptic Brain Region Detection Based on Magnetic Nanoparticle Patterning. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 15(9), 24409-24427 (2015).
129. Glatzmaiers GA, Roberts PH. A three-dimensional self-consistent computer simulation of a geomagnetic field reversal. *Nature*, 377(6546), 203-209 (1995).
130. Thébault E, Finlay CC, Beggan CD *et al.* International Geomagnetic Reference Field: the 12th generation. *Earth, Planets and Space*, 67(1), 79 (2015).
131. Halse ME, Coy A, Dykstra R *et al.* A practical and flexible implementation of 3D MRI in the Earth's magnetic field. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)*, 182(1), 75-83 (2006).
132. Bottura V, Cappio Borlino M, Carta N, Cerise L, Imperial E. Urban exposure to ELF magnetic field due to high-, medium- and low-voltage electricity supply networks. *Radiation protection dosimetry*, 137(3-4), 214-217 (2009).
133. d'Amore G, Anglesio L, Tasso M, Benedetto A, Roletti S. Outdoor background ELF magnetic fields in an urban environment. *Radiation protection dosimetry*, 94(4), 375-380 (2001).
134. Heidari H, Nabaei V. *Magnetic Sensors for Biomedical Applications* (Wiley, 2019).
135. Habash RW, Brodsky LM, Leiss W, Krewski D, Repacholi M. Health risks of electromagnetic fields. Part I: Evaluation and assessment of electric and magnetic fields. *Critical reviews in biomedical engineering*, 31(3), 141-195 (2003).
136. Hart G. Biomagnetometry: imaging the heart's magnetic field. *Br Heart J*, 65(2), 61-62 (1991).
137. Fujiwara K, Oogane M, Kanno A *et al.* Magnetocardiography and magnetoencephalography measurements at room temperature using tunnel magneto-resistance sensors. *Applied Physics Express*, 11(2), 023001 (2018).
138. Peters MJ, Stinstra JG, Uzunbajakau S, Srinivasan N. Fetal Magnetocardiography. In: *Advances in Electromagnetic Fields in Living Systems*. Lin, JC (Ed. (Springer US, Boston, MA, 2005) 1-40.
139. Jensen K, Skarsfeldt MA, Stærkind H *et al.* Magnetocardiography on an isolated animal heart with a room-temperature optically pumped magnetometer. *Scientific Reports*, 8(1), 16218 (2018).
140. Radue EW, Weigel M, Wiest R, Urbach H. Introduction to Magnetic Resonance Imaging for Neurologists. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 22(5, Neuroimaging), 1379-1398 (2016).
141. Jung BA, Weigel M. Spin echo magnetic resonance imaging. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*, 37(4), 805-817 (2013).

142. Baidya NB, Tang CT, Ammirati M. Intradural endoscope-assisted anterior clinoidectomy: a cadaveric study. *Clinical neurology and neurosurgery*, 115(2), 170-174 (2013).
143. Markl M, Leupold J. Gradient echo imaging. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*, 35(6), 1274-1289 (2012).
144. Jun YW, Lee JH, Cheon J. Chemical design of nanoparticle probes for high-performance magnetic resonance imaging. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 47(28), 5122-5135 (2008).
145. Carroll MR, Woodward RC, House MJ *et al.* Experimental validation of proton transverse relaxivity models for superparamagnetic nanoparticle MRI contrast agents. *Nanotechnology*, 21(3), 035103 (2010).
146. Gillis P, Moyny F, Brooks RA. On T(2)-shortening by strongly magnetized spheres: a partial refocusing model. *Magnetic resonance in medicine*, 47(2), 257-263 (2002).
147. Matsumoto Y, Jasanoff A. T2 relaxation induced by clusters of superparamagnetic nanoparticles: Monte Carlo simulations. *Magnetic resonance imaging*, 26(7), 994-998 (2008).
148. Xie J, Chen K, Huang J *et al.* PET/NIRF/MRI triple functional iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 31(11), 3016-3022 (2010).
149. Huang J, Zhong X, Wang L, Yang L, Mao H. Improving the magnetic resonance imaging contrast and detection methods with engineered magnetic nanoparticles. *Theranostics*, 2(1), 86-102 (2012).
150. Yablonskiy DA, Haacke EM. Theory of NMR signal behavior in magnetically inhomogeneous tissues: the static dephasing regime. *Magnetic resonance in medicine*, 32(6), 749-763 (1994).
151. Atanasijevic T, Shusteff M, Fam P, Jasanoff A. Calcium-sensitive MRI contrast agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles and calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(40), 14707-14712 (2006).
152. Jun YW, Huh YM, Choi JS *et al.* Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilization for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging. *Journal of the American Chemical Society*, 127(16), 5732-5733 (2005).
153. Zhou Z, Tian R, Wang Z *et al.* Artificial local magnetic field inhomogeneity enhances T2 relaxivity. *Nature communications*, 8, 15468 (2017).
154. Jun YW, Seo JW, Cheon J. Nanoscaling laws of magnetic nanoparticles and their applicabilities in biomedical sciences. *Accounts of chemical research*, 41(2), 179-189 (2008).
155. Dennis CL, Jackson AJ, Borchers JA *et al.* Nearly complete regression of tumors via collective behavior of magnetic nanoparticles in hyperthermia. *Nanotechnology*, 20(39), 395103 (2009).
156. Kaluzova M, Bouras A, Machaidze R, Hadjipanayis CG. Targeted therapy of glioblastoma stem-like cells and tumor non-stem cells using cetuximab-conjugated iron-oxide nanoparticles. *Oncotarget*, 6(11), 8788-8806 (2015).

157. van Landeghem FK, Maier-Hauff K, Jordan A *et al.* Post-mortem studies in glioblastoma patients treated with thermotherapy using magnetic nanoparticles. *Biomaterials*, 30(1), 52-57 (2009).
158. Chen R, Romero G, Christiansen MG, Mohr A, Anikeeva P. Wireless magnetothermal deep brain stimulation. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6229), 1477-1480 (2015).
159. Dan M, Bae Y, Pittman TA, Yokel RA. Alternating magnetic field-induced hyperthermia increases iron oxide nanoparticle cell association/uptake and flux in blood-brain barrier models. *Pharmaceutical research*, 32(5), 1615-1625 (2015).
160. Iv M, Telischak N, Feng D, Holdsworth SJ, Yeom KW, Daldrup-Link HE. Clinical applications of iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging of brain tumors. *Nanomedicine (London, England)*, 10(6), 993-1018 (2015).
161. Kallay N, Žalac S. Introduction of the Surface Complexation model into the Theory of Colloid Stability. *Croatica Chemica Acta*, 74, 479-497 (2001).
162. Behrens SH, Borkovec M, Schurtenberger P. Aggregation in Charge-Stabilized Colloidal Suspensions Revisited. *Langmuir*, 14(8), 1951-1954 (1998).
163. Brown R. XXVII. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *The Philosophical Magazine*, 4(21), 161-173 (1828).
164. Majedi SM, Kelly BC, Lee HK. Combined effects of water temperature and chemistry on the environmental fate and behavior of nanosized zinc oxide. *The Science of the total environment*, 496, 585-593 (2014).
165. Zhang W, Crittenden J, Li K, Chen Y. Attachment Efficiency of Nanoparticle Aggregation in Aqueous Dispersions: Modeling and Experimental Validation. *Environmental Science & Technology*, 46(13), 7054-7062 (2012).
166. Betzer O, Shilo M, Opoichinsky R *et al.* The effect of nanoparticle size on the ability to cross the blood-brain barrier: an in vivo study. *Nanomedicine (London, England)*, 12(13), 1533-1546 (2017).
167. Dewhirst MW, Viglianti BL, Lora-Michiels M, Hanson M, Hoopes PJ. Basic principles of thermal dosimetry and thermal thresholds for tissue damage from hyperthermia. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*, 19(3), 267-294 (2003).
168. Kiyatkin EA. Brain hyperthermia as physiological and pathological phenomena. *Brain research. Brain research reviews*, 50(1), 27-56 (2005).
169. Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R *et al.* Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *Journal of neuro-oncology*, 81(1), 53-60 (2007).
170. Hnyluchová Z, Bjalončíková P, Karas P *et al.* A simple microviscometric approach based on Brownian motion tracking. *Review of Scientific Instruments*, 86(2), 023710 (2015).
171. Holyst R, Bielejewska A, Szymanski J *et al.* Scaling form of viscosity at all length-scales in poly(ethylene glycol) solutions studied by fluorescence correlation spectroscopy and

- capillary electrophoresis. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 11(40), 9025-9032 (2009).
172. Nicoud L, Lattuada M, Lazzari S, Morbidelli M. Viscosity scaling in concentrated dispersions and its impact on colloidal aggregation. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 17(37), 24392-24402 (2015).
 173. Grabinski C, Sharma M, Maurer E, Sulentic C, Mohan Sankaran R, Hussain S. The effect of shear flow on nanoparticle agglomeration and deposition in in vitro dynamic flow models. *Nanotoxicology*, 10(1), 74-83 (2016).
 174. Mairey E, Genovesio A, Donnadiou E *et al.* Cerebral microcirculation shear stress levels determine *Neisseria meningitidis* attachment sites along the blood-brain barrier. *The Journal of experimental medicine*, 203(8), 1939-1950 (2006).
 175. Friston KJ, Holmes AP, Poline JB *et al.* Analysis of fMRI time-series revisited. *NeuroImage*, 2(1), 45-53 (1995).
 176. Saqqur M, Sharma VK, Tsivgoulis G *et al.* Real-time hemodynamic assessment of downstream effects of intracranial stenoses in patients with orthostatic hypoperfusion syndrome. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*, 30(4), 355-361 (2010).
 177. Wankhede M, Bouras A, Kaluzova M, Hadjipanayis CG. Magnetic nanoparticles: an emerging technology for malignant brain tumor imaging and therapy. *Expert review of clinical pharmacology*, 5(2), 173-186 (2012).
 178. Corem-Salkmon E, Ram Z, Daniels D *et al.* Convection-enhanced delivery of methotrexate-loaded maghemite nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 6, 1595-1602 (2011).
 179. Nance E, Zhang C, Shih TY, Xu Q, Schuster BS, Hanes J. Brain-penetrating nanoparticles improve paclitaxel efficacy in malignant glioma following local administration. *ACS nano*, 8(10), 10655-10664 (2014).
 180. Israelachvili JN. 6 - Van der Waals Forces. In: *Intermolecular and Surface Forces (Third Edition)*. Israelachvili, JN (Ed. (Academic Press, San Diego, 2011) 107-132.
 181. Stumm W, Morgan JJ. *Aquatic chemistry : chemical equilibria and rates in natural waters* (Wiley, New York, 1996).
 182. Stern O. ZUR THEORIE DER ELEKTROLYTISCHEN DOPPELSCHICHT. *Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie*, 30(21-22), 508-516 (1924).
 183. Guo D, Xie G, Luo J. Mechanical properties of nanoparticles: basics and applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 47(1), 013001 (2013).
 184. Jiang J, Oberdörster G, Biswas P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(1), 77-89 (2009).
 185. Yokel R, Grulke E, MacPhail R. Metal-based nanoparticle interactions with the nervous system: the challenge of brain entry and the risk of retention in the organism. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 5(4), 346-373 (2013).
 186. Hall JE, Guyton AC. *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. (2011).

187. Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C *et al.* Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer cell international*, 13(1), 89 (2013).
188. Liu X, Chen Y, Li H *et al.* Enhanced retention and cellular uptake of nanoparticles in tumors by controlling their aggregation behavior. *ACS nano*, 7(7), 6244-6257 (2013).
189. Hamer I, Van Beersel G, Arnould T, Jadot M. Lipids and lysosomes. *Current drug metabolism*, 13(10), 1371-1387 (2012).
190. Hotze EM, Phenrat T, Lowry GV. Nanoparticle aggregation: challenges to understanding transport and reactivity in the environment. *Journal of environmental quality*, 39(6), 1909-1924 (2010).
191. Yoon R-H, Ravishankar SA. Application of Extended DLVO Theory: III. Effect of Octanol on the Long-Range Hydrophobic Forces between Dodecylamine-Coated Mica Surfaces. *Journal of colloid and interface science*, 166(1), 215-224 (1994).
192. Mahmoudi M, Hofmann H, Rothen-Rutishauser B, Petri-Fink A. Assessing the in vitro and in vivo toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chem Rev*, 112(4), 2323-2338 (2012).
193. Uthaman S, Lee SJ, Cherukula K, Cho CS, Park IK. Polysaccharide-Coated Magnetic Nanoparticles for Imaging and Gene Therapy. *BioMed research international*, 2015, 959175 (2015).
194. Lemarchand C, Gref R, Couvreur P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 58(2), 327-341 (2004).
195. Li Q, Tang G, Xue S *et al.* Silica-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles targeting of EPCs in ischemic brain injury. *Biomaterials*, 34(21), 4982-4992 (2013).
196. Cengelli F, Maysinger D, Tschudi-Monnet F *et al.* Interaction of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles with brain structures. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 318(1), 108-116 (2006).
197. Palma S, Marciello M, Carvalho A, Veintemillas-Verdaguer S, Morales MDP, Roque ACA. Effects of phase transfer ligands on monodisperse iron oxide magnetic nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, 437, 147-155 (2015).
198. Laurent S, Forge D, Port M *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev*, 108(6), 2064-2110 (2008).
199. Andrade JD, Hlady V, Jeon SI. Poly(ethylene oxide) and Protein Resistance. In: *Hydrophilic Polymers*. (American Chemical Society, 1996) 51-59.
200. Moore TL, Rodriguez-Lorenzo L, Hirsch V *et al.* Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chemical Society Reviews*, 44(17), 6287-6305 (2015).
201. Daou TJ, Grenèche JM, Pourroy G *et al.* Coupling Agent Effect on Magnetic Properties of Functionalized Magnetite-Based Nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 20(18), 5869-5875 (2008).

202. Goppert TM, Muller RH. Protein adsorption patterns on poloxamer- and poloxamine-stabilized solid lipid nanoparticles (SLN). *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 60(3), 361-372 (2005).
203. Vroman L, Adams AL, Fischer GC, Munoz PC. Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces. *Blood*, 55(1), 156-159 (1980).
204. Hirsch V, Kinnear C, Moniatte M, Rothen-Rutishauser B, Clift MJ, Fink A. Surface charge of polymer coated SPIONs influences the serum protein adsorption, colloidal stability and subsequent cell interaction in vitro. *Nanoscale*, 5(9), 3723-3732 (2013).
205. Lesniak A, Fenaroli F, Monopoli MP, Aberg C, Dawson KA, Salvati A. Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. *ACS nano*, 6(7), 5845-5857 (2012).
206. Chen ZP, Zhang Y, Zhang S *et al.* Preparation and characterization of water-soluble monodisperse magnetic iron oxide nanoparticles via surface double-exchange with DMSA. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 316(1), 210-216 (2008).
207. Karmali PP, Simberg D. Interactions of nanoparticles with plasma proteins: implication on clearance and toxicity of drug delivery systems. *Expert opinion on drug delivery*, 8(3), 343-357 (2011).
208. Ramos S, Campos-Teran J, Mas-Oliva J, Nylander T, Castillo R. Forces between hydrophilic surfaces adsorbed with apolipoprotein AII alpha helices. *Langmuir*, 24(16), 8568-8575 (2008).
209. Molina-Bolívar JA, Ortega-Vinuesa JL. How Proteins Stabilize Colloidal Particles by Means of Hydration Forces. *Langmuir*, 15(8), 2644-2653 (1999).
210. Dickinson E, S. Horne D, J. Pinfield V, A. M. Leermakers F. Self-consistent-field modelling of casein adsorption Comparison of results for α 1-casein and β -casein. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 93(3), 425-432 (1997).
211. Dobrovolskaia MA, Patri AK, Zheng J *et al.* Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 5(2), 106-117 (2009).
212. D'Arcy RC, Bardouille T, Newman AJ *et al.* Spatial MEG laterality maps for language: clinical applications in epilepsy. *Human brain mapping*, 34(8), 1749-1760 (2013).
213. Hong CY, Liu C-Y, Chen C *et al.* Field-dependent phase diagram of the structural pattern in a ferrofluid film under perpendicular magnetic field. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials - J MAGN MAGN MATER*, 226, 1881-1883 (2001).
214. Champagne PO, Dang N, Carmant L, Bouthillier A, Sanon NT, Sawan M. Behavior of superparamagnetic nanoparticles in regard of brain activity: a proof of concept. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference*, 2016, 4216-4219 (2016).

215. Bae JE, Huh MI, Ryu BK *et al.* The effect of static magnetic fields on the aggregation and cytotoxicity of magnetic nanoparticles. *Biomaterials*, 32(35), 9401-9414 (2011).
216. Shanehsazzadeh S, Lahooti A, Hajipour MJ, Ghavami M, Azhdarzadeh M. External magnetic fields affect the biological impacts of superparamagnetic iron nanoparticles. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 136, 1107-1112 (2015).
217. Sun JF, Liu X, Chen Y, Zhang Y, Gu N. Exploiting BSA to Inhibit the Fibrous Aggregation of Magnetic Nanoparticles under an Alternating Magnetic Field. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 5775-5783 (2013).
218. Besseling NAM. Theory of Hydration Forces between Surfaces. *Langmuir*, 13(7), 2113-2122 (1997).
219. Chen H, Cox JR, Ow H, Shi R, Panagiotopoulos AZ. Hydration Repulsion between Carbohydrate Surfaces Mediated by Temperature and Specific Ions. *Sci Rep*, 6, 28553 (2016).
220. Pensini E, Sleep B, Yip C, O'Carroll D. Forces of Interactions between Bare and Polymer-Coated Iron and Silica: Effect of pH, Ionic Strength, and Humic Acids. *Environmental science & technology*, 46 (2012).
221. Busquets MA, Espargaro A, Sabate R, Estelrich J. Magnetic Nanoparticles Cross the Blood-Brain Barrier: When Physics Rises to a Challenge. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 5(4), 2231-2248 (2015).
222. Martinez Vera NP, Schmidt R, Langer K *et al.* Tracking of magnetite labeled nanoparticles in the rat brain using MRI. *PloS one*, 9(3), e92068 (2014).
223. Singh D, McMillan JM, Kabanov AV, Sokolsky-Papkov M, Gendelman HE. Bench-to-bedside translation of magnetic nanoparticles. *Nanomedicine (London, England)*, 9(4), 501-516 (2014).
224. Tabatabaei SN, Girouard H, Carret AS, Martel S. Remote control of the permeability of the blood-brain barrier by magnetic heating of nanoparticles: A proof of concept for brain drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 206, 49-57 (2015).
225. Dan M, Cochran DB, Yokel RA, Dziubla TD. Binding, transcytosis and biodistribution of anti-PECAM-1 iron oxide nanoparticles for brain-targeted delivery. *PloS one*, 8(11), e81051 (2013).
226. Sousa F, Mandal S, Garrovo C *et al.* Functionalized gold nanoparticles: a detailed in vivo multimodal microscopic brain distribution study. *Nanoscale*, 2(12), 2826-2834 (2010).
227. Vilella A, Tosi G, Grabrucker AM *et al.* Insight on the fate of CNS-targeted nanoparticles. Part I: Rab5-dependent cell-specific uptake and distribution. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 174, 195-201 (2014).
228. Ali A, Zafar H, Zia M *et al.* Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology, science and applications*, 9, 49-67 (2016).
229. Kurokawa Y, Sone H, Win-Shwe TT *et al.* Aggregation is a critical cause of poor transfer into the brain tissue of intravenously administered cationic PAMAM dendrimer nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 12, 3967-3975 (2017).

230. Wu J, Ding T, Sun J. Neurotoxic potential of iron oxide nanoparticles in the rat brain striatum and hippocampus. *Neurotoxicology*, 34, 243-253 (2013).
231. Wang B, Feng WY, Wang M *et al.* Transport of intranasally instilled fine Fe₂O₃ particles into the brain: micro-distribution, chemical states, and histopathological observation. *Biological trace element research*, 118(3), 233-243 (2007).
232. Allard E, Passirani C, Benoit JP. Convection-enhanced delivery of nanocarriers for the treatment of brain tumors. *Biomaterials*, 30(12), 2302-2318 (2009).
233. Thorek DL, Tsourkas A. Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells. *Biomaterials*, 29(26), 3583-3590 (2008).
234. Harris TJ, von Maltzahn G, Derfus AM, Ruoslahti E, Bhatia SN. Proteolytic actuation of nanoparticle self-assembly. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 45(19), 3161-3165 (2006).
235. Jeon S, Hurley KR, Bischof JC, Haynes CL, Hogan CJ. Quantifying intra- and extracellular aggregation of iron oxide nanoparticles and its influence on specific absorption rate. *Nanoscale*, 8(35), 16053-16064 (2016).
236. Yarjanli Z, Ghaedi K, Esmaeili A, Rahgozar S, Zarrabi A. Iron oxide nanoparticles may damage to the neural tissue through iron accumulation, oxidative stress, and protein aggregation. *BMC neuroscience*, 18(1), 51 (2017).
237. Wydra RJ, Oliver CE, Anderson KW, Dziubla TD, Hilt JZ. Accelerated generation of free radicals by iron oxide nanoparticles in the presence of an alternating magnetic field. *RSC advances*, 5(24), 18888-18893 (2015).
238. Petters C, Irrsack E, Koch M, Dringen R. Uptake and metabolism of iron oxide nanoparticles in brain cells. *Neurochemical research*, 39(9), 1648-1660 (2014).
239. Lartigue L, Alloeyau D, Kolosnjaj-Tabi J *et al.* Biodegradation of iron oxide nanocubes: high-resolution in situ monitoring. *ACS nano*, 7(5), 3939-3952 (2013).
240. Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri AR, Zalutsky R. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology*, 68(5), 326-337 (2007).
241. Helmers SL, Thurman DJ, Durgin TL, Pai AK, Faught E. Descriptive epidemiology of epilepsy in the U.S. population: A different approach. *Epilepsia*, 56(6), 942-948 (2015).
242. Hari R, Salmelin R. Magnetoencephalography: From SQUIDS to neuroscience. Neuroimage 20th anniversary special edition. *NeuroImage*, 61(2), 386-396 (2012).
243. Bakhteeva I, Medvedeva I, Byzov I *et al.* Magnetic field-enhanced sedimentation of nanopowder magnetite in water flow. *Environmental technology*, 36(13-16), 1828-1836 (2015).
244. Park HM, Nakasato N, Iwasaki M, Shamoto H, Tominaga T, Yoshimoto T. Comparison of magnetoencephalographic spikes with and without concurrent electroencephalographic spikes in extratemporal epilepsy. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 203(3), 165-174 (2004).
245. Walkey CD, Chan WC. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem Soc Rev*, 41(7), 2780-2799 (2012).

246. Sadhukha T, Wiedmann TS, Panyam J. Enhancing therapeutic efficacy through designed aggregation of nanoparticles. *Biomaterials*, 35(27), 7860-7869 (2014).
247. Lodhia J, Mandarano G, Ferris N, Eu P, Cowell S. Development and use of iron oxide nanoparticles (Part 1): Synthesis of iron oxide nanoparticles for MRI. *Biomedical imaging and intervention journal*, 6(2), e12 (2010).
248. Kong SD, Lee J, Ramachandran S *et al.* Magnetic targeting of nanoparticles across the intact blood-brain barrier. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 164(1), 49-57 (2012).
249. Champagne PO, Westwick H, Bouthillier A, Sawan M. Colloidal stability of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the central nervous system: a review. *Nanomedicine (London, England)*, 13(11), 1385-1400 (2018).
250. Murphy RJ, Pristinski D, Migler K, Douglas JF, Prabhu VM. Dynamic light scattering investigations of nanoparticle aggregation following a light-induced pH jump. *The Journal of chemical physics*, 132(19), 194903 (2010).
251. Sanon NT, Pelletier JG, Carmant L, Lacaille JC. Interneuron subtype specific activation of mGluR1/5 during epileptiform activity in hippocampus. *Epilepsia*, 51(8), 1607-1618 (2010).
252. Eder HG, Jones DB, Fisher RS. Local perfusion of diazepam attenuates interictal and ictal events in the bicuculline model of epilepsy in rats. *Epilepsia*, 38(5), 516-521 (1997).
253. Levy RA, Anderson EG. The effect of the GABA antagonists bicuculline and picrotoxin on primary afferent terminal excitability. *Brain research*, 43(1), 171-180 (1972).
254. Perez Y, Ratte S, Sanon N, Lapointe V, Lacaille JC. Cell type-specific changes in spontaneous and minimally evoked excitatory synaptic activity in hippocampal CA1 interneurons of kainate-treated rats. *Epilepsy research*, 68(3), 241-254 (2006).
255. Massey LK, Plastics Design L. Permeability properties of plastics and elastomers : a guide to packaging and barrier materials. (2003).
256. Zou X, Li P, Lou J, Fu X, Zhang H. Stability of single dispersed silver nanoparticles in natural and synthetic freshwaters: Effects of dissolved oxygen. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 230, 674-682 (2017).
257. Zhang W, Yao Y, Li K, Huang Y, Chen Y. Influence of dissolved oxygen on aggregation kinetics of citrate-coated silver nanoparticles. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 159(12), 3757-3762 (2011).
258. Kadar E, Batalha IL, Fisher A, Roque AC. The interaction of polymer-coated magnetic nanoparticles with seawater. *The Science of the total environment*, 487, 771-777 (2014).
259. Domingos RF, Baalousha MA, Ju-Nam Y *et al.* Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: multimethod determination of particle sizes. *Environ Sci Technol*, 43(19), 7277-7284 (2009).
260. Ribeiro LNM, Couto VM, Fraceto LF, de Paula E. Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. *Sci Rep*, 8(1), 982 (2018).

261. Ribeiro LNM, Breitkreitz MC, Guilherme VA *et al.* Natural lipids-based NLC containing lidocaine: from pre-formulation to in vivo studies. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 106, 102-112 (2017).
262. Bender EA, Adorne MD, Colome LM, Abdalla DSP, Guterres SS, Pohlmann AR. Hemocompatibility of poly(varepsilon-caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. *International journal of pharmaceutics*, 426(1-2), 271-279 (2012).
263. Soliman GM, Zhang YL, Merle G, Cerruti M, Barralet J. Hydrocaffeic acid-chitosan nanoparticles with enhanced stability, mucoadhesion and permeation properties. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 88(3), 1026-1037 (2014).
264. Brown KA, Vassiliou CC, Issadore D, Berezovsky J, Cima MJ, Westervelt RM. Scaling of transverse nuclear magnetic relaxation due to magnetic nanoparticle aggregation. *J Magn Mater*, 322(20), 3122-3126 (2010).
265. Panayiotopoulos CP. Old versus new antiepileptic drugs: the SANAD study. *Lancet (London, England)*, 370(9584), 313-314; author reply 315-316 (2007).
266. Mula M, Cock HR. More than seizures: improving the lives of people with refractory epilepsy. *European journal of neurology*, 22(1), 24-30 (2015).
267. Martinkovic L, Hecimovic H, Sulc V, Marecek R, Marusic P. Modern techniques of epileptic focus localization. *International review of neurobiology*, 114, 245-278 (2014).
268. Kida H, Fujii M, Inoue T *et al.* Focal brain cooling terminates the faster frequency components of epileptic discharges induced by penicillin G in anesthetized rats. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 123(9), 1708-1713 (2012).
269. Zhang L, Liang S, Zhang G *et al.* Seizure control of current shunt on rats with temporal lobe epilepsy and neocortical epilepsy. *PloS one*, 9(1), e86477 (2014).
270. Champagne, PO, Sanon NT, Carmant L *et al.* Influence of neuronal activity on superparamagnetic iron oxide nanoparticles stability. *Soumis à: Scientific Reports*.
271. Champagne PO, Sanon NT, Carmant L *et al.* Feasibility of implantable iron oxide nanoparticles in detecting brain activity – initial experience in a rat model. *Soumis à Epilepsy Research*.