



HAL
open science

Adhésion, croissance et polarisation de neurones sur substrats micro-et nano-structurés

Ghislain Bugnicourt

► **To cite this version:**

Ghislain Bugnicourt. Adhésion, croissance et polarisation de neurones sur substrats micro-et nano-structurés. Physique [physics]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENY054 . tel-00665074

HAL Id: tel-00665074

<https://theses.hal.science/tel-00665074>

Submitted on 14 Feb 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

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

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Ghislain BUGNICOURT

Thèse dirigée par **Catherine VILLARD** et
codirigée par **Jacques BROCARD**

préparée au sein de l'**Institut Néel**, du **CRETA** (Consortium de
Recherche pour l'Emergence des Techniques Avancées) et du
GIN (Grenoble Institut des Neurosciences),
dans l'**École Doctorale de Physique de Grenoble**

Adhésion, croissance et polarisation de neurones sur substrats micro- et nano-structurés

Thèse soutenue publiquement le **21/12/2011**,
devant le jury composé de :

Antoine TRILLER

D.R., Paris, Président

Serge PICAUD

D.R., Paris, Rapporteur

Pascal SILBERZAN

D.R., Paris, Rapporteur

Franz BRUCKERT

Professeur, Grenoble, Examineur

Catherine VILLARD

D.R., Grenoble, Directrice de thèse



Table des matières

I	Introduction	11
I	État de l'art	13
I.1	Le Neurone, une cellule du système nerveux	15
I.1.1	Le Neurone en réseau	15
I.1.2	Le Neurone : morphologie et fonction	16
I.1.3	Signaux neuronaux	18
I.1.4	Les cellules gliales	19
I.2	La structure interne du neurone	19
I.2.1	La structure générale d'une cellule eucaryote animale	19
I.2.2	Les filaments d'actine	20
I.2.3	Les microtubules	21
I.2.4	Les filaments intermédiaires	22
I.2.5	Structure de l'axone et des dendrites	22
I.3	Le développement du neurone	25
I.3.1	L'adhésion cellulaire et les cultures <i>in vitro</i>	25
I.3.2	Le développement des neurones en culture <i>in vitro</i>	25
I.3.3	Cône de croissance	27
I.3.4	Vagues	29
I.4	L'axone	31
I.4.1	La mécanique de l'axone	36
I.4.2	Le guidage de l'axone <i>in vitro</i>	41
II	Matériel et Méthodes	49
II.1	Nos substrats	51
II.1.1	Traitement de surface : la silanisation	51
II.1.2	Photolithographie	52
II.1.3	Rugosités	54
II.1.4	Tranchées	54
II.2	Culture de neurones et techniques biologiques	55
II.2.1	Culture de neurones d'hippocampe de souris	55

II.2.2	Les marquages sur cellules fixées	57
II.3	Observations des cellules	59
II.3.1	Acquisition	59
II.3.2	Vidéo-microscopie	59
II.4	Méthodes statistiques	61
II.4.1	Comparer un pourcentage observé à un pourcentage théorique	61
II.4.2	Trouver l'intervalle de confiance à 95% d'un pourcentage observé	62
II.4.3	Comparer deux pourcentages observés	62
II.4.4	Comparer des pourcentages observés au sein d'une même population	62
II.4.5	Comparaison de séries de mesures	63
II.5	Analyse d'images	64
II.5.1	Mesures de longueurs neuritiques	64
II.6	Analyse des vidéos	65
II.6.1	Images	65
II.6.2	Traitement des données issues des vidéos	65
II	Développement neuronal sur motifs d'adhésion : de la compétition neuritique à la polarisation axonale	71
III	Etude de la croissance de neurones sur géométries bipolaires	73
III.1	Croissance de neurones sur lignes	75
III.1.1	Mouvement oscillatoire sur lignes de $2\mu m$	75
III.1.2	Mouvements du noyau et du centrosome	76
III.1.3	Développement et polarisation sur lignes de $2\mu m$	79
III.1.4	Mouvement oscillatoire sur lignes de $4\mu m$	80
III.2	Croissance de neurones bipolaires sur plots	81
III.3	Discussion	84
III.3.1	Aspects mécaniques de la croissance neuritique	84
III.3.2	Importance des vagues dans la compétition neuritique	86
III.3.3	Génération et propagation des vagues	87
III.3.4	Développement neuritique et polarisation	89
III.3.5	Perspectives	90
III.3.6	Résultats post-rédaction	91
IV	Vers la maîtrise de la polarisation axonale	95
IV.1	Le contrôle de la polarisation axonale par des motifs cellulaires	97
IV.1.1	Influencer la polarisation grâce à la répartition des neurites autour du soma	98
IV.1.2	Lignes ondulées : inhiber localement la différenciation axonale	98

IV.1.3	Motif boomerang : diriger la polarisation axonale par la forme imposée au soma	99
IV.2	Du contrôle à l'étude de la polarisation axonale	102
IV.2.1	Géométrie locale et équilibre des forces	103
IV.2.2	Tension et dynamique neuritique sur ondulations	104
IV.2.3	Mécanismes d'inhibition axonale par les ondulations	108
IV.3	Étude des mécanismes d'inhibition sur ondulations	111
IV.3.1	Polarisation sur des gammes de courbures	111
IV.3.2	Un motif à contraste de courbures	116
IV.3.3	Différenciation des neurites dans des tranchées	117
IV.3.4	Enseignements d'un motif asymétrique	119
IV.3.5	Conclusion	121
IV.4	Vers une modélisation phénoménologique de la compétition neuritique sur motifs géométriques	122
IV.4.1	Modèle statique : l'hypothèse d'un taux de refus constant	122
IV.4.2	Modèle dynamique : compétition neuritique par essais-erreurs	123
IV.4.3	Modèle dynamique : évaluation du taux de redistribution	126
IV.4.4	Modèle dynamique : validation	127
IV.4.5	Modèle dynamique : confrontation de deux courbures	128
IV.4.6	Modèle dynamique : application à un motif à lignes triangulaires	129
IV.4.7	Modèle dynamique : influence du boomerang	130
IV.5	Interprétation du modèle d'essais-erreurs	130
IV.5.1	Vagues et taux de redistribution	131
IV.5.2	Signification du rapport d'acceptation	131
IV.5.3	Durée caractéristique de polarisation	132
IV.5.4	Défauts du modèle	134
IV.6	Discussion	136
IV.6.1	Trois effets géométriques peuvent participer au contrôle de la polarisation	136
IV.6.2	Structure et dynamique des étirements neuritiques	137
IV.6.3	Absorption des vagues par les étirements	140
IV.6.4	L'importance des ruptures de membrane	141

III Couplage neurones - silicium : structuration de surface et puces électroniques 147

V	Adhésion, croissance et morphologie de neurones fakir <i>in vitro</i> . 149
V.1	Introduction 151
V.1.1	Pourquoi des neurones sur Silicium rugueux ? 151
V.1.2	Préparation d'états de surface complexes sur silicium 152

V.2	Résultats	154
V.2.1	Croissance et morphologie	154
V.2.2	Polarisation	159
V.2.3	Etude géométrique de l'interaction neurite-substrat	163
V.3	Discussion	171
V.3.1	Adhésion	171
V.3.2	Croissance globale et croissance des neurites	172
V.3.3	Interférence de signaux stimulant la croissance	173
V.3.4	Nombre de neurites	175
V.3.5	Mécanismes de polarisation	176
V.3.6	Frontières et polarisation	178
V.3.7	Interaction neurite-substrat	180
V.3.8	Conclusion	182
VI	Neurones sur nanotransistors : aspects cellulaires	185
VI.1	Description du projet NeuroFETs	187
VI.1.1	Contexte	187
VI.1.2	Transistors	189
VI.1.3	Objectifs	190
VI.2	Présentation de la puce NeuroFETs	192
VI.2.1	Principe de la mesure	192
VI.2.2	La puce NeuroFETs	192
VI.3	Aspects d'intégration cellulaire du projet NeuroFETs	195
VI.3.1	Réseaux à géométries contrôlées	195
VI.3.2	Adaptation réciproque des réseaux et des capteurs	195
VI.4	La problématique du placement cellulaire	198
VI.4.1	Pourquoi faut-il placer les cellules ?	198
VI.4.2	Techniques de placement	198
VI.4.3	Placement magnétique	199
VI.4.4	Résultats de placement magnétique	202
VI.5	Conclusion et perspectives	206
VI.5.1	Tri magnétique des cellules	206
VI.5.2	Vers un contrôle micro-fluidique de l'ensemencement	206
VI.5.3	Nocivité des champs magnétiques	207
VI.5.4	Choix des particules	208

Résumé

Cette thèse s'intéresse au développement neuronal *in vitro* dans le but ultime d'enregistrer l'activité de réseaux de neurones à géométrie et connectivité contrôlées. Le développement neuronal est régi par un ensemble de régulations, intrinsèques mais également sous contrôle de facteurs extérieurs, qui permettent à la cellule d'adhérer à un substrat, de croître, et de se polariser. Une partie de ce travail de thèse explore deux types de contraintes physiques de l'environnement que sont la géométrie d'adhésion et la rugosité de surface. La première révèle l'implication des forces dans les stades précoces de développement neuronal régis par un phénomène de compétition neuritique, et permet in fine de contrôler la direction d'émission de l'axone. La seconde montre que la distribution des points d'adhésion peut accélérer la croissance jusqu'à favoriser la polarisation axonale. L'autre partie de ce travail s'attache à résoudre le problème technologique majeur qu'est le remplissage des sites d'adhésion par le biais d'une attraction magnétique, et démontre la possibilité de faire croître des réseaux neuronaux modèles sur nanotransistors.

Abstract

This thesis focuses on *in vitro* neuronal development, with the long-term goal of building controlled neuron networks that would allow the recording of their electric activity. A collection of intrinsic regulations are involved in neuronal adhesion, growth and polarization, in such a way that the cell can adapt to changes in its environment. Nevertheless, this environment can affect the behavior of the cell through mechanisms that rely on biophysical signals or even physical properties of this environment.

The work presented in this thesis is based on the modification of two main aspects of the physical environment : geometry of adhesion and surface roughness. On the one hand, the geometry is controlled by patterns of adhesions, giving the ability to design bipolar motifs that highlight the importance of mechanical forces in neuronal growth, and also more complex motifs that allow the control of neuronal polarization. On the other hand, a roughness below the microscale creates a distribution of adhesion points that results in an increase in neuronal growth rate and even influences axonal polarization. The final part of this thesis focuses on the development of an innovative method for placing cells at precise locations on a substrate, by the help of magnetic traps. This method is the final step required for growing model neuron networks on our nanotransistors.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier très chaleureusement ma directrice de thèse, Catherine Villard, pour l'environnement de travail à la fois stimulant et humain dans lequel j'ai réalisé cette thèse. Catherine a toujours su prendre en compte mes opinions tout en apportant des idées pertinentes pour enrichir mes expériences, et m'a laissé une liberté de travail appréciable tout en contrôlant régulièrement l'étendue des sujets que je traitais. Elle m'a beaucoup aidé et a fait preuve de beaucoup de patience lors de la rédaction de ce manuscrit, puis lors de la préparation de la soutenance. Je la remercie enfin pour m'avoir immergé, sans jamais rien imposer, dans les divers aspects de la vie d'une équipe de recherche, de la défense d'un projet à la rédaction d'articles, en passant par les nombreuses discussions scientifiques passionnantes au sein de l'équipe ainsi que par les multiples interactions enrichissantes qui peuvent se créer lors de conférences auxquelles elle m'a encouragé à participer.

Je remercie en second lieu Jacques Brocard, qui a co-dirigé cette thèse pour couvrir les aspects biologiques de mon travail. Jacques m'a lui aussi laissé une grande liberté de travail, tout en se montrant très disponible lorsque je le sollicitais. La compatibilité de nos tempéraments a été très appréciable, et a mené à des discussions scientifiques très stimulantes, qui font que je regrette la situation qui a réduit la fréquence de nos interactions dans la dernière année.

Je remercie ensuite l'ensemble des collègues directs qui ont participé à la réussite de mon travail, d'une part dans l'équipe de Catherine avec Sophie Roth qui m'a transféré ses connaissances et m'a montré l'exemple d'une thèse réussie, Matthieu Petit qui m'a prouvé les bienfaits de la persévérance, Cécile Delacour qui a rejoint Catherine au moment idéal pour former les fondations d'une équipe qui va prendre un essor certain, et Carolina Tomba qui me succède en tant que doctorante de l'équipe et qui j'en suis convaincu poursuivra brillamment ce travail ; d'autre part au GIN avec Sylvie Gory-Fauré qui a débuté la collaboration avec Catherine, Nora Collomb qui a participé à toutes nos cultures de neurones dans la bonne humeur, Yasmina Saoudi qui m'a beaucoup aidé pour la réalisation de vidéo-microscopies et a montré beaucoup d'intérêt pour nos expériences, Mariano Bisbal qui a apporté un souffle nouveau à l'aspect biologique de ma thèse et qui est un affectueux "boludo".

Je remercie aussi, pour des coups de main occasionnels mais généreux, l'ensemble de l'équipe 1 du GIN et Annie Andrieux qui la dirige, mais aussi l'équipe TPS de l'Institut Néel dirigée par Olivier Bourgeois. De nombreux collaborateurs extérieurs m'ont prêté main forte, à commencer par Nora Dempsey, Frédéric Dumas-Bouchiat et Dominique Givord pour la concrétisation de l'idée de placement magnétique, mais aussi les collaborateurs du projet NeuroFETs, avec Paul Salin, Pierre-Olivier Amblard et Guillaume Becq, et un ensemble de personnes dont Alice Nicolas, Marc Block, Mireille Albrieux, Christophe Arnoult, Jean-Claude Vial, Marianne Renner, Marco Canepari, Robert Peyroux, Olivier Fruchart et Laeticia Marty pour de nombreux services souvent déterminants.

Je suis reconnaissant envers l'ensemble du CRETA pour les conditions de travail chaleureuses dont j'ai pu profiter, et pour l'aide que les techniciens m'ont apportée à chacune de mes demandes. Je souhaite aussi souligner la forte implication des pôles de l'institut Néel dans mon travail, avec d'abord NanoFab', où Thierry Fournier et toute l'équipe m'ont donné d'innombrables conseils avisés et de nombreux services généreux ; mais aussi le pôle électronique, avec notamment Jean-Luc Mocellin qui a beaucoup participé au montage d'une station de vidéo-microscopie aux fonctions personnalisées ; le personnel de l'atelier de l'institut Néel pour leurs pièces toujours parfaites ; et enfin le pôle Capteurs, qui ont été prompts à nous aider lorsque nous en avons besoin.

Je souhaite remercier les membres de mon jury de thèse, pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse, pour la lecture en profondeur de mon manuscrit qui s'est révélée dans les rapports ainsi que dans les questions lors de la soutenance, et pour la discussion scientifique très stimulante qui s'est mise en place lors de ces questions, qui a révélé la richesse pluridisciplinaire de ce rassemblement.

Je remercie tout mon entourage, des chers amis avec lesquels j'ai partagé les déboires et passé les moments les plus conviviaux de ces trois années entre deux expériences, à l'ensemble de ma famille que j'ai toujours pris plaisir à retrouver, qui a su me soutenir malgré la distance lorsque j'en ai éprouvé le besoin, et qui a exprimé à ma soutenance une fierté qui m'honore.

Et enfin, je te remercie Christelle, toi qui m'as accompagné dans ces trois années et qui connais mieux que personne le détail de mon aventure. Je te remercie ma belle, pour le courage que tu as su m'insuffler, pour la patience dont tu as fait preuve et pour la foi en moi que tu as révélé. Je te remercie enfin parce que tu transformes l'achèvement de cette thèse en une délivrance, un commencement longtemps espéré : celui de notre vie à deux.

Introduction générale

Sous maints aspects, le neurone peut être comparé à une œuvre d'art. Cette cellule du système nerveux étonne au premier regard, puis éblouit à chaque nouvelle observation. L'ensemble de ses fonctions reposent sur un savant mélange de mécanismes élémentaires qui aboutissent à une harmonieuse mais encore mystérieuse complexité. Chaque observateur porte un regard différent sur son fonctionnement, et cela participe à la richesse de sa description.

Dans cette thèse, nous abordons les questions du développement et de la polarisation neuronale ainsi que de l'élaboration de réseaux neuronaux *in vitro* avec le regard du biophysicien. Ce point de vue englobe l'étude des réponses des cellules aux contraintes physiques de leur environnement, ainsi que l'implication de leurs propriétés mécaniques dans leur développement. Il intègre également le couplage des neurones avec un environnement électronique capable de recueillir ou de stimuler leur activité.

Un neurone en culture *in vitro* adhère sur une surface à deux dimensions et émet de fins prolongements, ou neurites, à partir de son corps cellulaire. En quelques jours, les neurites croissent et explorent leur environnement, puis se spécialisent en formant l'axone, le pôle émetteur du neurone, et enfin les dendrites, l'arborescence réceptrice. Tous ces prolongements ont pour fonction d'établir des connexions avec d'autres neurones pour former un réseau spécialisé dans la transmission et le traitement de l'information.

Un des éléments essentiels de la croissance neuronale que nous étudierons dans cette thèse est la sensibilité de neurones d'hippocampe de souris aux caractéristiques de leur environnement physique, parmi lesquels l'étendue, la géométrie et la topologie de la surface disponible pour l'adhésion.

La réponse cellulaire au cœur de notre travail est l'acquisition de la polarité, une étape cruciale pour la cellule et le réseau auquel elle participe. Bien qu'il existe un biais cellulaire, qui tend à influencer le choix du neurite qui deviendra l'axone, un mécanisme de compétition neuritique peut remettre en cause ce biais initial selon diverses propriétés de l'environnement. Nous explorerons en quoi les caractéristiques physiques de l'environnement peuvent influencer ce mécanisme fondamental de compétition. En particulier, au cours de la croissance des neurones d'hippocampe, des structures dynamiques et génératrices de forces parcourent les neurites et induisent des sursauts de croissance. Ces structures sont relativement peu étudiées, mais pourraient jouer un rôle important dans le développement de ces cellules. Nous verrons comment apporter des informations sur le

rôle de ces structures grâce à la possibilité de contrôler la géométrie d'adhésion pour former des neurones bipolaires, mais aussi en imposant des courbures à la pousse neuritique. Ces dernières géométries nous conduiront à nous interroger sur les mécanismes physiques d'inhibition de la différenciation axonale pour réaliser in fine un contrôle de la position de l'axone dans des réseaux en culture.

Par ailleurs, cette thèse s'intègre dans un projet pluridisciplinaire, NeuroFETs, dont l'objectif est l'étude au niveau sub-cellulaire de l'activité électrique de réseaux neuronaux. Face au problème de l'intégration cellulaire sur les puces électroniques, nous avons développé des solutions techniques originales pour participer à l'avancée de ce projet. En particulier, nous montrerons comment l'utilisation de la force magnétique basée sur l'interaction entre des micro-aimants et des particules magnétiques fixées aux neurones peut permettre d'optimiser le remplissage de sites d'adhésion cellulaire.

Ainsi, dans la première partie de ce manuscrit, nous introduirons le contexte général des études que nous avons réalisées, ainsi que les méthodes que nous avons employées. Dans une seconde partie, nous étudierons l'influence de la géométrie d'adhésion sur la compétition neuritique et sur la polarisation axonale, à travers une géométrie cellulaire minimale à deux neurites, puis à l'aide de motifs imposant des courbures neuritiques. Un modèle phénoménologique intégrant la notion de compétition neuritique dépendant de la contrainte géométrique fera suite à ces résultats expérimentaux. Enfin, nous présenterons dans la troisième partie une étude de la croissance neuronale sur silicium rugueux, puis nous montrerons, dans le cadre du projet NeuroFETs, une preuve de concept d'attraction cellulaire basée sur l'interaction magnétique. La thèse que l'environnement physique est un paramètre critique qui participe à la régulation du développement neuritique et de la polarisation axonale sera le fil conducteur de ce manuscrit.

Première partie

Introduction

Chapitre I

État de l'art

Sommaire

I.1	Le Neurone, une cellule du système nerveux	15
I.1.1	Le Neurone en réseau	15
I.1.2	Le Neurone : morphologie et fonction	16
I.1.3	Signaux neuronaux	18
I.1.4	Les cellules gliales	19
I.2	La structure interne du neurone	19
I.2.1	La structure générale d'une cellule eucaryote animale	19
I.2.2	Les filaments d'actine	20
I.2.3	Les microtubules	21
I.2.4	Les filaments intermédiaires	22
I.2.5	Structure de l'axone et des dendrites	22
I.3	Le développement du neurone	25
I.3.1	L'adhésion cellulaire et les cultures <i>in vitro</i>	25
I.3.2	Le développement des neurones en culture <i>in vitro</i>	25
I.3.3	Cône de croissance	27
I.3.4	Vagues	29
I.4	L'axone	31
I.4.1	La mécanique de l'axone	36
I.4.2	Le guidage de l'axone <i>in vitro</i>	41

I.1 Le Neurone, une cellule du système nerveux

Le rôle du système nerveux est d'assurer un contrôle et une coordination de tous les éléments composant un organisme. Entre l'acquisition de signaux sensoriels et la production d'une réponse motrice, le traitement de l'information peut devenir extrêmement complexe afin de préserver l'homéostasie de cet organisme. De ce point de vue, la conscience elle-même peut être considérée comme un phénomène émergent d'un système de traitement de l'information très évolué.

Du fait de ce rôle central, le traitement de l'information est la fonction principale des cellules qui composent ce système. Les neurones sont les cellules essentielles dans cette tâche car leurs caractéristiques fonctionnelles assurent le support de cette information, tandis que leur morphologie ainsi que leur organisation en réseau assurent la complexité du traitement.

I.1.1 Le Neurone en réseau

Le cerveau humain est composé de plus de 100 milliards de neurones, divisés en plus de 200 variétés. Ces neurones forment un réseau complexe organisé en systèmes et sous-systèmes imbriqués. Il peut être découpé en différentes aires fonctionnelles, chacune ayant des tâches différenciées. On peut retrouver chez les différents animaux des similitudes dans l'organisation de leur cerveau et de leurs zones fonctionnelles (voir figure I.1). Ces zones seront plus ou moins développées selon le besoin de l'espèce. Le bulbe olfactif, par exemple, responsable du traitement des messages odorants, est beaucoup plus développé chez le rat que chez l'homme.

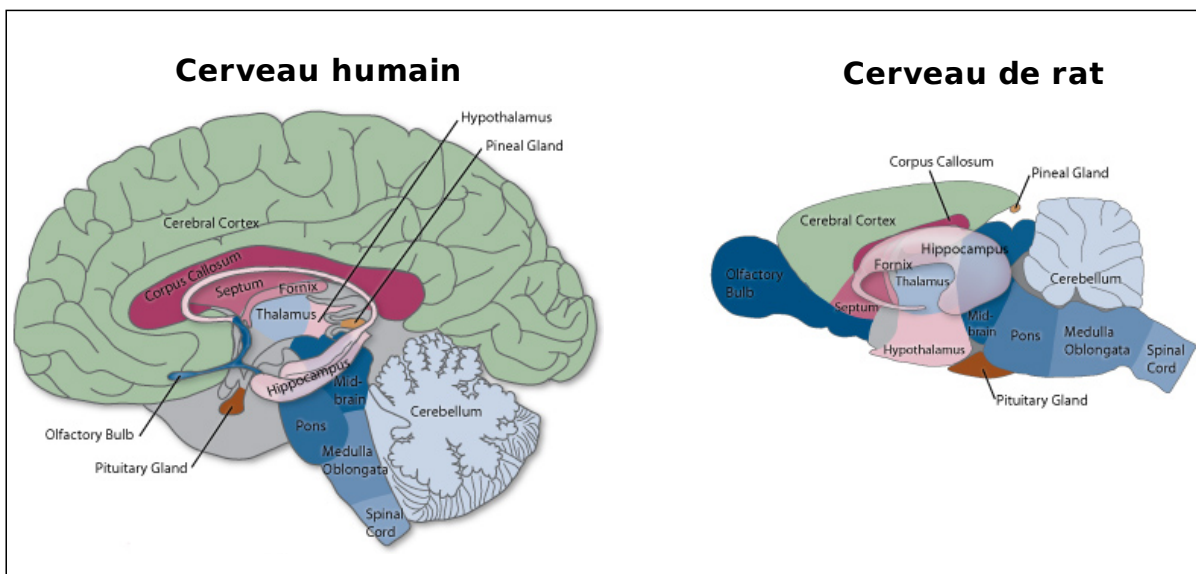


FIGURE I.1 – Exemple de découpage par zones fonctionnelles du cerveau humain à gauche et de rat à droite. Bien que ces deux cerveaux diffèrent en terme de masse totale (de l'ordre de $2kg$ chez l'humain contre $2g$ chez le rat), ils possèdent de fortes similitudes fonctionnelles, avec cependant des zones plus ou moins développées selon les besoins et les caractéristiques de l'espèce.

Chacune de ces zones possède une architecture bien particulière qui est reliée à sa fonction biologique. Ainsi, les systèmes sensoriels tels que la cochlée (système auditif) ont une architecture en parallèle. L'hippocampe, qui participe entre autres à la mémoire associative, est lui constitué de trois masses de neurones connectées uni-directionnellement, lui donnant une architecture en "boucle" triangulaire. Comprendre comment chaque organisation particulière des différentes zones du cerveau permet d'effectuer des tâches différentes est actuellement encore un défi.

Une des caractéristiques des réseaux de neurones est la plasticité, c'est-à-dire le fait qu'ils évoluent constamment en fonction même de leur activité. Les connexions entre neurones peuvent se renforcer, ou au contraire disparaître, et de nouvelles connexions peuvent également être créées. C'est notamment grâce à cela que l'apprentissage et la mémoire sont possibles.

I.1.2 Le Neurone : morphologie et fonction

Lors de la genèse du cerveau, des neuroblastes (cellules souches du système nerveux) prolifèrent et migrent en direction de zones précises, et une partie d'entre eux donnera naissance à des neurones qui seront dès lors incapables de se diviser. Le terme de neurone a été proposé pour la première fois par Gottfried von Waldeyer-Hartz en 1891 sur la base des travaux de Ramón Y Cajal qui fondera les neurosciences modernes par ses observations et analyses des structures neuronales (voir figure I.2). Autour du corps cellulaire de ces cellules, des prolongements plus ou moins longs s'étendent, leur permettant de se connecter avec leurs plus proches voisins comme avec des cellules très éloignées (jusqu'à des distances de l'ordre du mètre chez l'homme). Ainsi, chaque neurone sera unique de part la place, le rôle qu'il occupe dans le système nerveux, et les connexions qu'il a établi.

La caractéristique principale des neurones du point de vue de la fonction de traitement d'information est que ce sont des cellules hautement polarisées : deux types de prolongements accomplissent des rôles biologiques différents, les dendrites et l'axone. Les dendrites ainsi que le corps cellulaire sont le pôle récepteur (pôle somato-dendritique) du neurone, qui reçoit et intègre les signaux provenant des neurones en amont dans le réseau considéré. L'axone est au contraire le pôle émetteur du neurone, qui transmet ces signaux à travers son arborisation vers les neurones suivants. La communication entre neurones s'effectue via des synapses, jonctions cellulaires où le signal passe le plus souvent par voie chimique. Le neurone reçoit et transmet ainsi l'information à travers environ 10^4 connexions (moyenne pour un neurone du cortex).

Ces particularités se traduisent au niveau morphologique par des différences dans l'organisation des prolongements. La géométrie de l'axone et des dendrites peut être radicalement différente selon le type de neurones (voir figure I.3). Il existe par exemple des neurones bipolaires qui ont un axone et une dendrite de longueurs équivalentes, des multipolaires qui ont un long axone et plusieurs dendrites ou encore des pseudo-unipolaires qui ont un unique prolongement qui se subdivise en deux ⁽¹⁾.

1. Cet unique prolongement assure donc à la fois la fonction de réception de l'information (prolongement afférent) et de transmission de l'information (prolongement efférent).

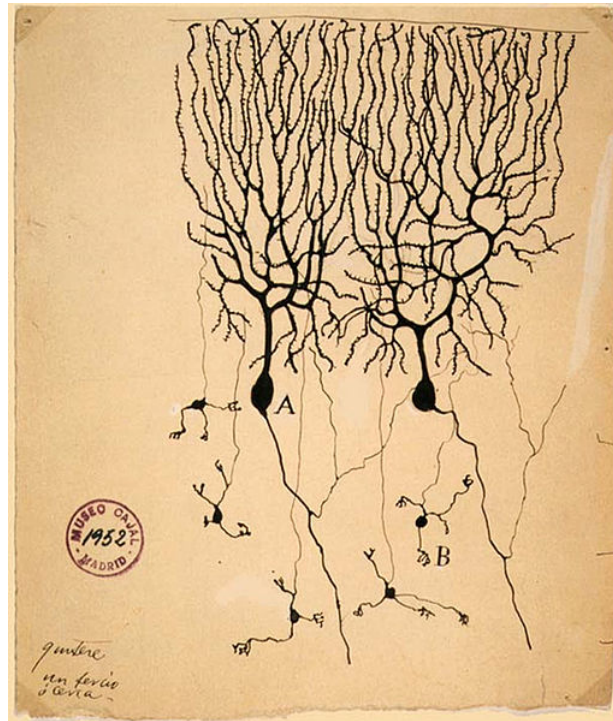


FIGURE I.2 – Dessin de Cajal montrant une cellule du cervelet (cellule de Purkinje).

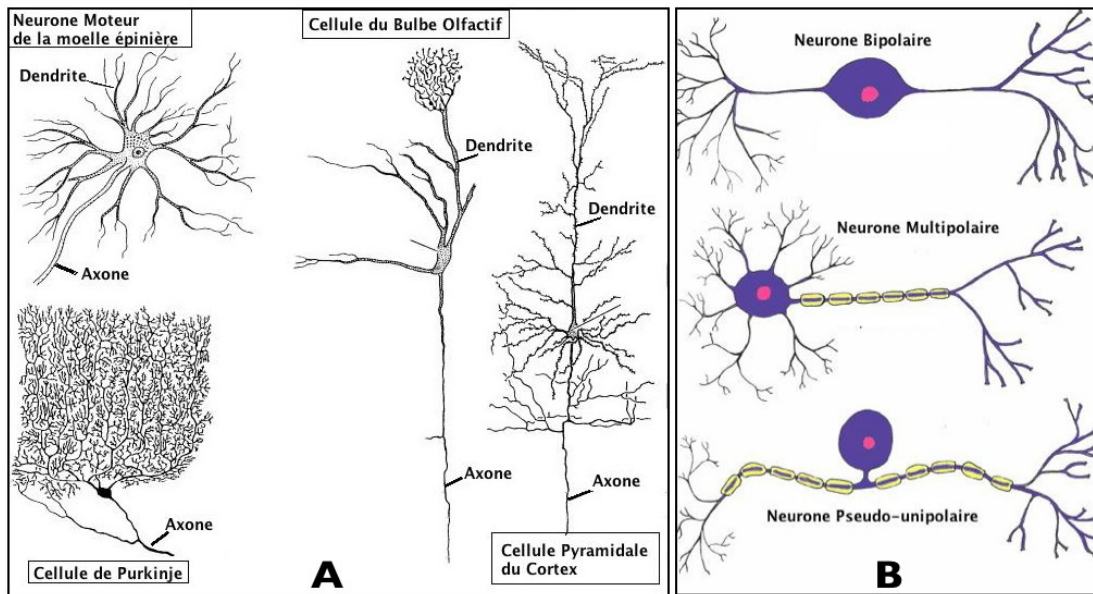


FIGURE I.3 – Exemples de différentes morphologies neuronales. A/ Exemple de cellules de différentes régions du cerveau. La morphologie peut influencer la fonction du neurone dans le traitement de l'information. B/ Exemple de classement morphologique des neurones.

I.1.3 Signaux neuronaux

Le neurone est une cellule excitable, c'est-à-dire capable d'émettre des potentiels d'action grâce à la présence de canaux ioniques voltage-dépendants. Comme toute cellule son cytoplasme possède un potentiel de repos d'environ -70mV par rapport au potentiel extra-cellulaire, établi et maintenu par des protéines trans-membranaires appelées pompes ioniques qui induisent des différences de concentration de part et d'autre de la membrane par des flux d'ions sodium (Na^+) et potassium (K^+) notamment. Mais ce potentiel peut varier sous l'effet de multiples facteurs (récepteurs spécifiques aux différents neurotransmetteurs, ouverture spontanée de canaux ioniques, ...), et un phénomène de dépolarisation brutal peut intervenir si le potentiel membranaire dépasse un seuil d'environ -55mV . L'ouverture simultanée des canaux voltage-dépendants, notamment sodiques (Na^+), entraîne une variation rapide du potentiel intracellulaire local de l'ordre de 100mV , suivie d'un retour progressif à l'équilibre initial en quelques millisecondes, par l'action des pompes ioniques.

Cette variation brutale du potentiel membranaire local se propage alors de proche en proche le long de la membrane cellulaire, simplement parce que la dépolarisation en un point donné entraîne le dépassement du seuil et donc l'ouverture des canaux à proximité. Notons que la phase de retour à l'équilibre s'accompagne d'une inhibition de l'émission d'un nouveau signal, nommée période réfractaire. Ainsi dans un "tube" membranaire (axone), le signal se propage linéairement depuis le point d'initiation sans revenir en arrière, à une vitesse d'environ 1m.s^{-1} . Cette directionnalité dans l'axone s'accompagne cependant d'un autre phénomène mis en évidence beaucoup plus récemment, celui d'une rétro-propagation du potentiel d'action dans l'arbre dendritique pouvant servir de lien associatif entre pôle récepteur et émetteur nécessaire pour certaines formes de plasticité synaptique [1].

L'arrivée du potentiel d'action à l'extrémité d'une branche de l'axone provoque la libération de neurotransmetteurs au niveau de la connexion au neurone suivant, la synapse, zone de communication chimique d'environ 30nm d'épaisseur et de dimensions latérales atteignant $250\text{-}300\text{nm}$. Ces neurotransmetteurs sont captés par les récepteurs spécifiques exprimés par le neurone suivant. Selon le type de neurotransmetteurs, la quantité sécrétée et le nombre de récepteurs disponibles, cela créera au niveau du neurone suivant une hyperpolarisation ou une dépolarisation transitoire plus ou moins importante de la membrane. On appelle ces signaux de faible amplitude (quelques mV environ) potentiels post-synaptiques excitateurs ou inhibiteurs. Ils seront à leur tour intégrés par l'arborisation dendritique et le soma du neurone post-synaptique pour déclencher ou non un potentiel d'action dans le segment initial de son axone.

Si le support de l'information est ce signal propagatif nommé potentiel d'action, son codage ne réside pas dans l'amplitude du signal, qui est relativement constant, mais plutôt dans l'aspect fréquentiel de la succession de potentiels d'action et dans les variations de nombre et l'efficacité des synapses formées sur les dendrites et l'axone de ce neurone.

I.1.4 Les cellules gliales

Des cellules appelées cellules gliales, environ 25 fois plus nombreuses que les neurones, font également partie intégrante du système nerveux. Contrairement aux neurones, ces cellules peuvent se diviser. Elles leur procurent entre autre un support mécanique et maintiennent un environnement adéquat pour la transmission des signaux nerveux. On peut distinguer trois types principaux de glies, de géométrie et rôles très différents : les oligodendrocytes, la microglie, et les astrocytes.

- Les oligodendrocytes produisent une gaine de myéline qui accélère la conduction nerveuse.
- La microglie protège les neurones contre des corps étrangers en cas de lésions par exemple.
- Les astrocytes ont pour première fonction connue de maintenir un environnement chimique adéquat pour la production de signaux nerveux. Ils ont en effet un rôle actif dans le métabolisme et l'alimentation en glucose des neurones. De récentes études montrent que les astrocytes jouent également un rôle dans la transmission de l'influx nerveux. A travers le réseau astrocytaire se propagent des vagues d'ions calcium dont l'effet régulateur se fait sentir dans un grand nombre de synapses en même temps. Les prolongements astrocytaires qui entourent les synapses pourraient ainsi exercer un contrôle plus global sur la concentration ionique et le volume aqueux dans les fentes synaptiques. Le réseau astrocytaire constituerait donc un système de transmission non-synaptique qui se superposerait au système neuronal pour jouer un rôle majeur de modulation de son activité [2].

I.2 La structure interne du neurone

Les cellules eucaryotes animales, dont les neurones font partie, possèdent une structure de base commune. Nous verrons dans cette section les composants essentiels de ces cellules puis l'organisation particulière des prolongements des neurones, dendrites ou axones.

I.2.1 La structure générale d'une cellule eucaryote animale

La cellule eucaryote, de taille typique comprise entre 10 et 100 μm , est délimitée par une membrane plasmique (voir figure I.4). C'est une bicouche lipidique de 5 à 10 nm d'épaisseur traversée par des protéines ayant le rôle, entre autre, de canaux ou de récepteurs vis à vis de molécules extérieures. Ces protéines, qui représentent 50% de la masse de la membrane plasmique, permettent de faire le lien entre l'espace extérieur et intérieur de la cellule, appelé le cytoplasme. Celui-ci est composé d'un milieu, le cytosol, dans lequel baignent le noyau portant le matériel génétique de la cellule, et de différents organites cellulaires permettant par exemple de produire de l'énergie (mitochondries) ou de synthétiser des protéines (ribosomes, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi).

Le cytoplasme renferme également des protéines filamentaires organisées en réseau, le cytosquelette, qui confèrent à la cellule sa forme, ses propriétés mécaniques et son organisation interne [3]. Ces filaments sont de trois types : microtubules, actine et filaments intermédiaires. Ils

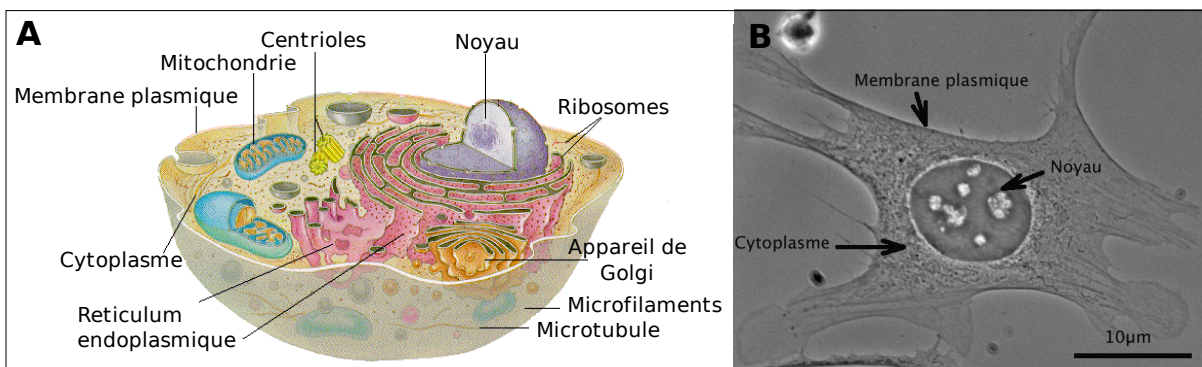


FIGURE I.4 – **Organisation d'une cellule eucaryote.** **A**/ Schéma d'une cellule eucaryote animale avec ses composants essentiels. **B**/ Fibroblaste en contraste de phase. On peut distinguer le noyau la membrane et le cytoplasme.

différent notamment par leur taille, leur rigidité, et l'ensemble des protéines qui leur sont associées. C'est grâce aux propriétés dynamiques du cytosquelette que la cellule peut explorer son environnement, migrer, et acquérir une polarité dans un environnement complexe. Il intervient dans la génération des forces internes et la transduction des signaux mécaniques externes.

I.2.2 Les filaments d'actine

Les filaments d'actine (également nommés actine-F ou filamenteuse) de diamètre avoisinant les 7nm et de longueur de persistance $17\mu m$ ⁽²⁾, sont des filaments polarisés et assez flexibles. Ce sont des structures dynamiques formées de monomères d'actine, l'actine-G, arrangés en double hélice (voir figure I.5). Il y a un assemblage majoritaire des monomères à une extrémité nommée bout + des filaments, et un désassemblage majoritaire à l'extrémité opposée, le bout -.

Des protéines associées à l'actine permettent de rendre les filaments plus ou moins stables et de les organiser spatialement. Ceux-ci peuvent se présenter sous la forme de faisceaux parallèles, anti-parallèles (également appelés contractiles), ou en réseaux formant des mailles [4]. Dans la cellule, ces organisations d'actine se retrouvent dans les protrusions membranaires qui lui permettent d'explorer son environnement : les filopodes et les lamellipodes. Les premiers sont fins et longs ($\approx 5\mu m$) et composés de faisceaux d'actine parallèles, dont l'assemblage orienté vers la périphérie de la cellule permet de pousser la membrane plasmique pour former un tube exploratoire. Quant aux lamellipodes, ce sont des structures planes constituées d'un réseau moins rigide de fibres d'actine, avec de nombreuses interconnexions formant des angles à 70° . On retrouve enfin ce type de réseau d'actine branchée sous la forme d'une couche interne parallèle à la membrane plasmique, le "cortex" d'actine.

Ces faisceaux anti-parallèles permettent d'exercer des tensions dans la cellule grâce à la myo-

2. Longueur de corrélation de l'orientation d'un monomère. Ce paramètre moléculaire traduit donc la rigidité d'un polymère : plus la longueur de persistance est grande, plus le polymère est rigide.

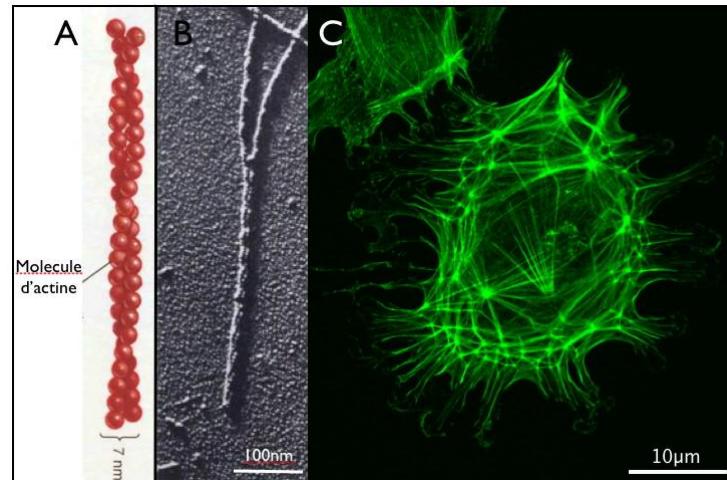


FIGURE I.5 – **Filaments d'actine.** **A/** Schéma de l'organisation en double hélice des monomères d'actine **G. B/** Microscopie électronique d'un microfilament d'actine. **C/** Microfilaments d'actine (en vert) dans une cellule en culture *in vitro* (Source : <http://scienceblogs.com/transcript/upload/2007/01>)

sine, moteur moléculaire qui permet de faire glisser les différents filaments antiparallèles.

I.2.3 Les microtubules

Les microtubules ont un diamètre de 22nm et une longueur de persistance intrinsèque de 5mm. Ces polymères sont les filaments les plus rigides du cytosquelette du fait de leur structure tubulaire, dont les parois sont constituées de plusieurs protofilaments de tubuline, eux-même formés de dimères de tubuline α et β organisés longitudinalement. Comme les microfilaments d'actine, ce sont des filaments polarisés, avec un assemblage constant au bout +, et désassemblage au bout - (voir figure I.6).

Les microtubules sont nucléés à partir d'un centre organisateur, le centrosome, composé de deux centrioles [5]. Le réseau de microtubules joue de nombreux rôles dans la cellule. Il sert notamment de rails pour le transport de vésicules et organites grâce à des moteurs moléculaires associés aux microtubules qui les transportent vers le bout + (kinésine) ou le bout - (dynéine) du microtubule [6]. De plus, lors de la division cellulaire (mitose), le réseau de microtubules se réorganise à partir des deux centrioles positionnés à l'intérieur des deux futures cellules filles pour former le fuseau mitotique, qui permettra de séparer les chromosomes dupliqués.

Les microtubules jouent également un rôle dans le maintien de la structure tridimensionnelle cellulaire. Afin d'assurer leurs fonctions, ils sont finement régulés par des protéines associées (MAPs, *Microtubule Associated Proteins*), qui les stabilisent, les organisent, et coopèrent avec les autres éléments du cytosquelette.

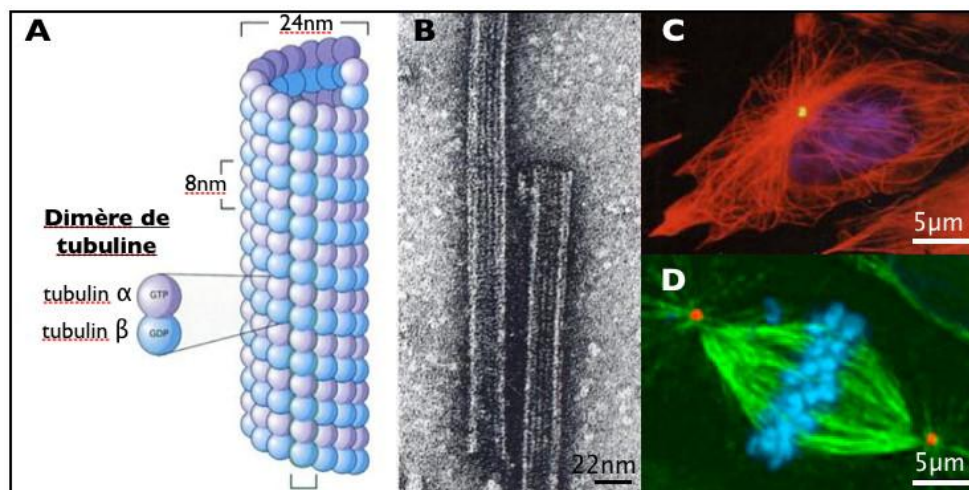


FIGURE I.6 – **Les Microtubules.** **A/** Schéma de l'organisation des microtubules. **B/** Microscopie électronique d'un microtubule. **C-D/** Visualisation de l'organisation des microtubules dans des cellules. Cellule en culture (**C**) (microtubules en rouge, centrosome en jaune). Cellule en mitose (**D**) (microtubules en vert, chromosomes en bleu et centrosomes en rouge) Source : <http://www.vibrallife.fr/ln/design/images>

I.2.4 Les filaments intermédiaires

Enfin, les filaments intermédiaires ont un diamètre de l'ordre de 10nm. Ces structures sont moins dynamiques que les microtubules et les filaments d'actine. Bien que leur structure moléculaire dépende du type cellulaire, ils sont formés de dimères de protéines organisés en protofilaments eux-mêmes associés en hélice, généralement de 8 protofilaments (voir figure I.7). Ce sont des polymères stables qui contribuent entre autre au maintien de la forme cellulaire et à l'ancrage des organites cellulaires. Chez les neurones, les filaments intermédiaires sont nommés neurofilaments.

I.2.5 Structure de l'axone et des dendrites

L'axone et les dendrites, regroupés sous le terme générique "neurites", sont des protrusions membranaires cylindriques dont la structure se compose essentiellement d'un faisceau de microtubules axial, d'une faible proportion de neurofilaments, et d'un cortex d'actine périphérique. Dans les dendrites, pôles récepteurs du neurone, les microtubules peuvent avoir des polarités inversées (voir figure I.8), c'est-à-dire avoir leur bout + ou bout - dirigés vers le corps cellulaire. Des observations montrent que des ribosomes sont transportés vers la périphérie par les microtubules ayant leur extrémité + du côté somatique, suggérant la possibilité de synthèse protéique dans les dendrites, principalement des protéines du cytosquelette [7] qui participent à la formation de petites boursouffures nommées épines dendritiques où sont localisées les synapses [8]. On retrouve d'ailleurs également des spots de Golgi dans la zone proximale des dendrites [7].

L'axone, pôle émetteur du neurone, se différencie morphologiquement des dendrites par son aspect lisse et son diamètre constant plus fin que celui des dendrites. Sa longueur peut être très

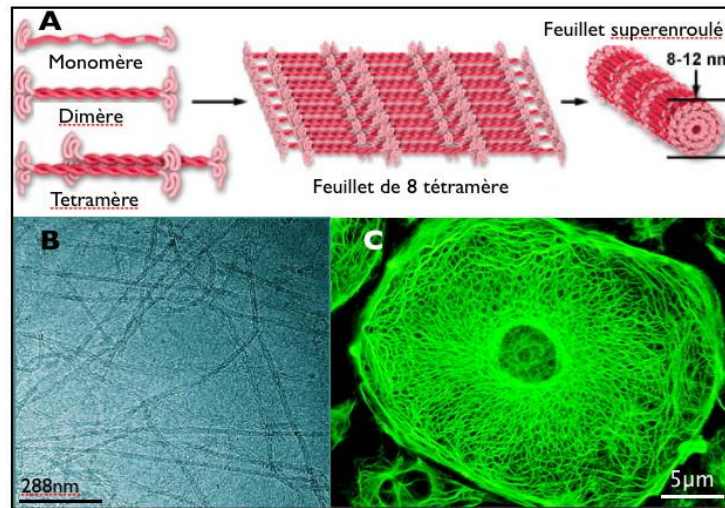


FIGURE I.7 – Les Filaments intermédiaires. **A/** Schéma de l’organisation des filaments intermédiaires. **B/** Microscopie électronique de filaments intermédiaires. **C/** Visualisation de l’organisation des filaments intermédiaires dans une cellule épithéliale de rat.

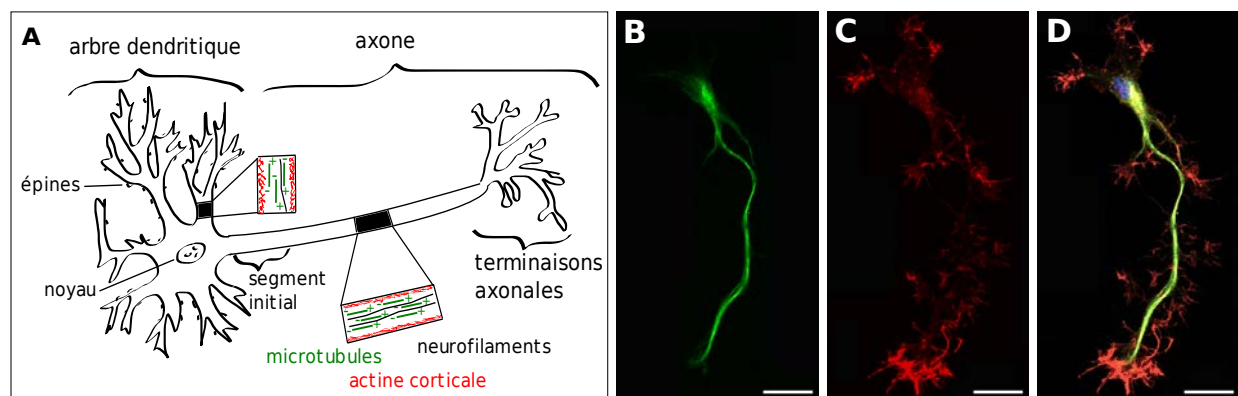


FIGURE I.8 – Organisation du cytosquelette neuronal. **A/** Schéma de la structure d’un neurone. Les microtubules s’orientent dans la même direction dans l’axone : le bout +, site de polymérisation plus active, est tourné vers la partie distale du neurone. **B-C-D/** Cytosquelette d’un neurone d’hippocampe de souris : **B/** Microtubules acétylés, c’est-à-dire stabilisés **C/** Microfilaments d’actine **D/** Microtubules en vert, Microfilaments d’actine en rouge, Noyau en bleu. | Barre : 20µm.

variable selon le type de neurones : de la centaine de microns à quelques mètres chez les plus grands animaux. Contrairement aux dendrites, les microtubules y sont tous orientés avec leur bout + vers l’extrémité de l’axone [9]. Dans la région proximale de l’axone se trouve le segment initial. Dans cette zone, une densité importante de canaux ioniques réunit les conditions nécessaires pour initier le potentiel d’action [10]. La partie terminale est en général arborisée et chaque branche se termine en une région spécialisée que l’on appelle bouton synaptique. Il s’agit de la zone pré-synaptique de la synapse. Elle contient un réseau d’actine auquel sont ancrés principalement les vésicules de

neurotransmetteurs, et des mitochondries pour fournir de l'énergie. L'axone peut représenter un volume cytoplasmique bien plus important que le reste de la cellule, cependant il est incapable de synthétiser les protéines nécessaires au renouvellement de ses macromolécules constitutives [11]. Des transports axonaux (kinésines) permettent le transfert directionnel des molécules du soma aux terminaisons axonales. Des vésicules de transport amènent par exemple le long des microtubules le matériel nécessaire au renouvellement de la membrane.

I.3 Le développement du neurone

Dans cette section, nous aborderons l'importance de l'adhésion dans le développement d'une cellule, et notamment *in vitro*. Les particularités de la croissance des neurones en culture sera ensuite exposée.

I.3.1 L'adhésion cellulaire et les cultures *in vitro*

L'adhésion est nécessaire pour la survie de la plupart des cellules. L'adhésion doit s'établir soit avec d'autres cellules, soit avec la matrice extra-cellulaire qui les entoure. Cette interaction avec le milieu extérieur génère des signaux essentiels à de multiples fonctions cellulaires telles que la migration, prolifération, différenciation ou mort programmée (apoptose).

Les récepteurs d'adhésion permettent de traduire les informations spatiales, mécaniques et protéiques du milieu extérieur de la cellule. Ce sont des protéines trans-membranaires qui mettent en relation le milieu extra-cellulaire avec le cytosquelette, afin de permettre à la cellule de réagir en fonction de son environnement. Celle-ci peut par exemple moduler ses sites d'adhésion pour migrer vers un emplacement plus propice à son activité ou rester à son emplacement et renforcer ses points d'ancrage. Il y a donc des relations très importantes entre les récepteurs d'adhésion et le cytosquelette de la cellule.

Afin de simplifier le cadre de travail de nombreuses études, les cellules sont souvent cultivées *in vitro*. Il s'agit de les placer sur un substrat plan adapté à leur adhésion, dans un milieu et des conditions adéquats pour leur survie. La rigidité du substrat et les molécules d'adhésion utilisés peuvent alors modifier le développement des cellules (voir p. 172 et chapitre 5).

Pour le cas des neurones, les cultures sont primaires, c'est à dire que les cellules proviennent directement du tissu cérébral. Il est donc nécessaire de les prélever à chaque culture directement dans le tissu vivant. Souvent, les neurones proviennent d'embryons ou de nouveaux-nés de souris ou de rat.

I.3.2 Le développement des neurones en culture *in vitro*

Les neurones prélevés pour les cultures primaires sont des cellules déjà différenciées, provenant d'un tissu que l'on a dissocié chimiquement et mécaniquement. Le processus de dissociation supprime les prolongements que les neurones avaient éventuellement commencé à émettre. Après dissociation, les cellules se présentent donc sous la forme de sphères d'un diamètre moyen de $6\mu\text{m}$. L'étape de l'ensemencement consiste alors à laisser ces cellules se déposer par sédimentation sur un substrat dont la chimie de surface permet l'adhésion cellulaire. On observe après quelques minutes le développement spontané de structures d'exploration puis de nouveaux prolongements et la formation de connexions donnant lieu à la formation d'un réseau. L'établissement de ces connexions dans les premiers jours et semaines de culture est nécessaire à leur survie [12].

Les différentes molécules d'adhésion et leur influence sur la croissance neuronale

Différentes molécules d'adhésion sont utilisées *in vitro*. On peut distinguer deux grandes catégories : les molécules d'adhésion spécifiques, telles que la Laminine, Fibronectine ou L1 par exemple, qui se lient à un récepteur particulier de la membrane du neurone ; et les molécules d'adhésion non spécifiques, telles que la Poly-Lysine ou Poly-Ornithine. Le mécanisme par lequel le neurone peut adhérer sur ce deuxième type de molécule est lié à leur charge électrique positive, mais il n'est pas encore complètement élucidé. L'interaction pourrait se réaliser avec la membrane cellulaire, de charge globale négative, et/ou de manière non spécifique avec des domaines de charge négative de protéines membranaires telles que les intégrines.

Le choix de ces molécules d'adhésion influence non seulement la force de l'interaction avec le substrat mais aussi la façon dont les neurites se développent. La vitesse de croissance et la fasciculation (tendance pour un neurite à croître le long d'autres neurites) peuvent par exemple être modifiées selon le mode d'adhésion [13] [14]. Les vitesses de pousse peuvent être jusqu'à plus de dix fois plus élevées sur certaines molécules d'adhésion.

Dans le cadre de nombreuses études, la Poly-L-Lysine (PLL, voir figure II.6), ou son énantiomère la Poly-D-Lysine, est utilisée comme référence du mode de croissance en comparaison à l'effet d'autres molécules d'adhésion, du fait de sa non-spécificité. Nous réalisons donc la plupart de nos expériences avec la PLL. De plus, une étude de l'équipe de P. Fromherz [15] indique que la distance entre la membrane et la surface d'adhésion est considérablement réduite dans le cas de la PLL en comparaison à la Laminine par exemple. De ce fait, les mesures de variations de potentiel membranaire sur des électrodes ou des transistors (voir p. 197) devraient être plus résolues sur PLL.

Les étapes du développement d'un neurone en culture

Les différentes étapes du développement d'un neurone en culture ont été bien caractérisées, notamment sur des cultures de neurones d'hippocampe de rat (voir figure I.9) [16]. Peu de temps après l'ensemencement, des lamellipodes se développent autour du corps cellulaire (stade 1). Quelques heures plus tard, des prolongements appelés neurites se forment (stade 2) et ont une activité de croissance alternée. S'ensuit l'élongation plus rapide d'un des neurites. La cellule est alors nettement polarisée : c'est la polarisation axonale. Ce plus long prolongement deviendra l'axone⁽³⁾ (stade 3 de développement). Quelques jours plus tard, les autres neurites se différencient en dendrites. Le réseau de neurones ne sera mature, c'est à dire avec des connexions fonctionnelles qu'au bout de 10 à 12 jours (stade 5).

Chacune des étapes de ce développement est complexe. Le passage du premier stade de développement au deuxième, notamment, fait intervenir un resserrement des lamellipodes en quelques neurites répartis sur le périmètre. Lors de ce "resserrement", le réseau d'actine très

3. On parle de polarisation axonale car la cellule acquiert une polarité au sens morphologique. Si l'on s'intéresse aux neurites, on parlera de différenciation ou spécialisation axonale ou dendritique.

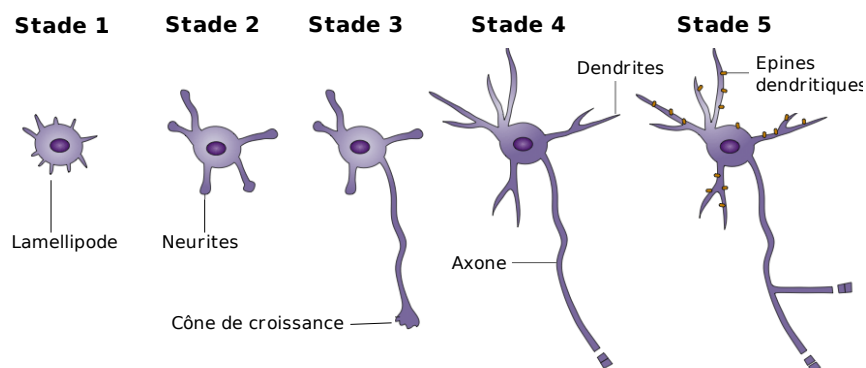


FIGURE I.9 – Développement d'un neurone en culture *in vitro*. [17]

branchée qui forme la structure du lamellipode subit des effondrements locaux tandis que les microtubules convergent vers la zone d'actine consolidée [18]. Ces points qui résistent à l'effondrement deviennent alors les cônes de croissance des neurites tout juste formés, où les microtubules sont activement regroupés en faisceaux. Par la suite, aucun nouveau lamellipode ne s'étendra, par inhibition suite à la formation réussie des neurites ou simplement parce que les éléments requis à la formation des lamellipodes se concentrent dans les cônes de croissance déjà formés.

Le passage du deuxième stade de développement au troisième constitue l'étape clé de polarisation de la cellule et fera spécifiquement l'objet de la section I.4 de ce chapitre.

I.3.3 Cône de croissance

Lors de la croissance du neurone, des structures appelées cônes de croissance sont visibles à l'extrémité des neurites en développement. Ce sont ces structures qui explorent l'environnement et génèrent les forces nécessaires à la progression des neurites. Une plus grande activité des cônes de croissance s'accompagne généralement d'une croissance du neurite plus rapide.

Le cône de croissance est hautement dynamique et très sensible à l'environnement extracellulaire. C'est notamment grâce à sa sensibilité à des facteurs attractants ou répulsifs que l'axone est guidé vers sa cible adéquate [19]. La relation entre les récepteurs membranaires, l'adhésion et le cytosquelette est donc très importante dans cette région, et très étudiée.

La description actuelle du cône de croissance le découpe en trois zones [20] : la zone centrale où l'on retrouve les microtubules, une zone périphérique constituée de lamellipodes et de filopodes et entre elles une zone de transition (voir figure I.10). Dans la zone périphérique se trouve un assemblage de filaments d'actine au niveau des lamellipodes et filopodes couplé à un flux rétrograde d'actine venant s'opposer à l'avancée constante des microtubules dans la zone centrale. C'est dans la zone de transition que les microtubules et le flux rétrograde d'actine entrent en contact. Il a été récemment montré que la myosine II se trouvait en quantité importante dans cette zone et formerait un arc contractile avec l'actine [20]. De plus, la myosine permettrait de garder les microtubules

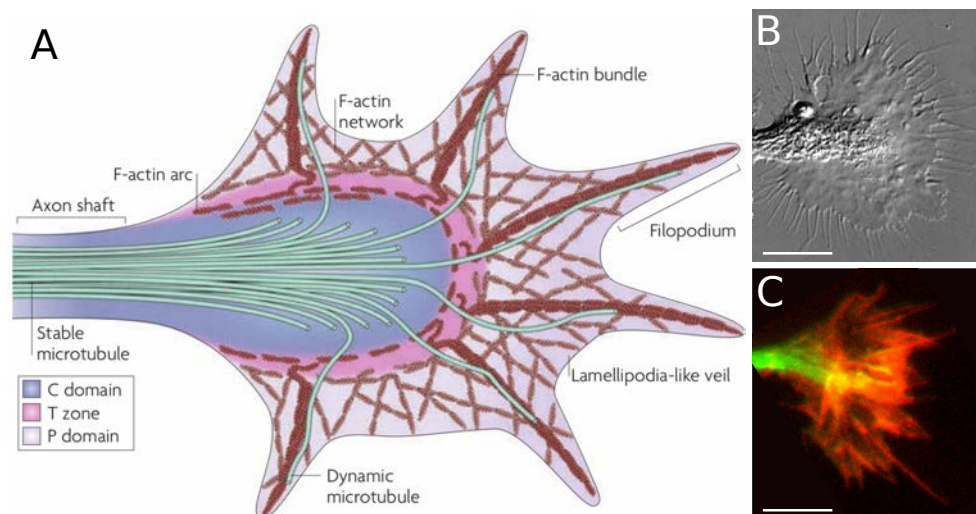


FIGURE I.10 – **Le cône de croissance, structure dynamique d'exploration de l'environnement.** **A/** Schéma des différentes zones du cône de croissance [20]. La zone P (périphérique) est composée de filopodes qui émergent d'un lamellipode, la zone C (centrale) est composée du faisceau de microtubules, et la zone T (de transition) est composée d'un arc d'actine qui peut se contracter sous l'effet de la myosine II et contient la majorité des microtubules en empêchant leur pénétration dans la zone P. **B/** Cône de croissance en contraste interférentiel différentiel (DIC) (Source : cellbio.emory.edu). **C/** Immuno-fluorescence d'un autre cône de croissance. Marquages : microtubules (YL1/2, vert), actine-F (phalloïdine, rouge) | Barres : $5\mu m$

maintenus en faisceaux afin qu'ils puissent s'opposer sans se courber au flux rétrograde d'actine [21]. C'est ce nœud qui permettrait de transmettre les forces développées par le cône de croissance au neurite.

Les forces développées par les filopodes d'un cône de croissance ont été mesurées par déplacement d'une bille anti-adhésive dans une pince optique [22], et dans une autre étude par déformation d'un gel contenant des billes fluorescentes [23]. Ces études montrent qu'un filopode peut exercer une force de poussée d'environ $3pN$ lorsqu'il croît, et peut exercer une force opposée de l'ordre de $100pN$ lorsqu'il adhère à un substrat. Il semble donc que les filopodes génèrent de faibles forces afin d'explorer l'environnement, puis que lorsque des adhésions sont formées une contraction du réseau d'actine génère des forces plus importantes. Notons que ces forces restent relativement faibles par rapport à d'autres types cellulaires, notamment à cause de l'absence de plaques d'adhésion robustes nommées adhésions focales. En effet, les propriétés mécaniques du cône de croissance mesurées récemment montrent que celui-ci possède une très faible rigidité (de l'ordre de $100Pa$) et exerce des forces particulièrement faibles par rapport à celles générées par les autres types cellulaires ($30pN \cdot \mu m^{-2}$, soit 1 à 2 ordres de grandeur inférieurs aux forces mesurées dans les fibroblastes ou les cellules épithéliales). Il induit enfin une tension de l'ordre de $0.6nN$ dans les neurites [24].

Ces forces pourraient être liées au flux rétrograde que l'on observe systématiquement dans les filopodes et les lamellipodes. Une des hypothèses concernant la modulation du flux rétrograde d'actine fait en effet intervenir l'adhésion au substrat. Quand le cône de croissance rencontre

un substrat attracteur, les récepteurs membranaires du cône de croissance se lient au substrat, et semblent former des liens fonctionnels avec le cytosquelette d'actine, le stabilisant. Le flux rétrograde d'actine serait alors atténué entraînant une élévation de l'axone vers la direction attractive (voir figure I.11) [25].

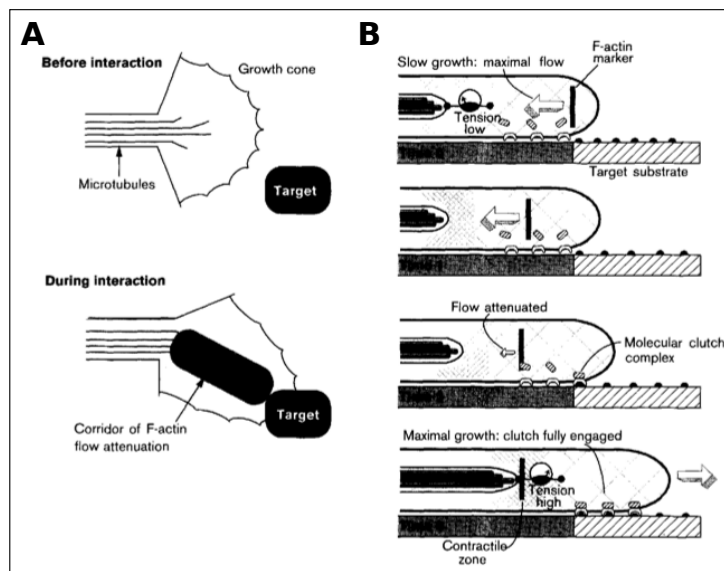


FIGURE I.11 – Réarrangement du cytosquelette lors de l'interaction entre le cône de croissance et une zone attractive. **A/** Réorientation des microtubules vers une cible attractive après contact préalable avec un filopode ou lamellipode. L'extension des microtubules se réalise en effet dans un couloir où le flux rétrograde d'actine est atténué. **B/** Mécanisme possible de l'avancée du cône de croissance par un couplage entre le cytosquelette et le substrat [25]. Un complexe moléculaire se forme, permettant de faire le lien entre le substrat et le cytosquelette d'actine. A la manière d'un embrayage (clutch), l'ensemble des complexes d'adhésion forme un frottement qui ralentit le flux rétrograde d'actine de manière plus efficace dans une direction donnée. Ce ralentissement définit une zone dans laquelle les microtubules peuvent alors s'engager.

I.3.4 Vagues

Des structures semblables à des cônes de croissance ont été observées dans des cultures *in vitro* d'hippocampes de rat, parcourant à une vitesse d'environ $3\mu\text{m}/\text{min}^{-1}$ les différents neurites de façon antérograde lors de leur développement, à l'image de 'vagues' [26] (voir figure II.10). Ce type de vagues a également été occasionnellement observé avec un mouvement rétrograde (moins de 5% des vagues présentent un tel mouvement vers le soma). Ces vagues sont similaires au cône de croissance dans leur dynamique, leur structure et leur composition [27].

L'arrivée d'une vague au bout d'un neurite est systématiquement corrélée à une rétraction puis à une élévation plus importante de ce neurite, ainsi qu'à une augmentation de la dynamique du cône de croissance [28]. C'est pourquoi elles sont supposées apporter le matériel nécessaire à la pousse des neurites. Les vagues contribuent également à la pousse axonale et à la création

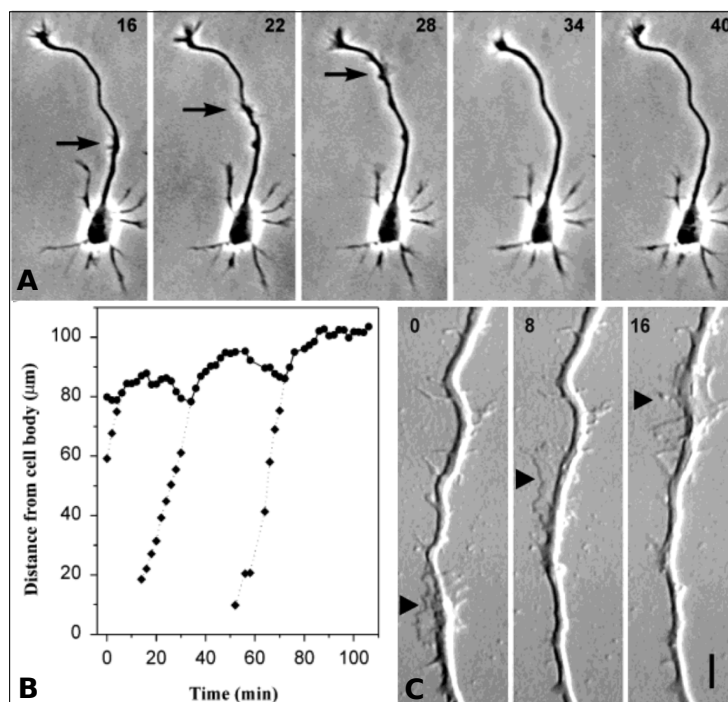


FIGURE I.12 – Les vagues : structures propagatives semblables au cône de croissance. **A/** Propagation d'une vague le long d'un axone (indiquée par une flèche) dans une succession d'images d'un neurone d'hippocampe de rat à 30h de culture. Le nombre en haut à droite de chaque photo indique les minutes écoulées [28]. **B/** Diagramme de la longueur de l'axone (ronds) et de la position de la vague (losanges) en fonction du temps. L'axone se rétracte légèrement avant l'arrivée de la vague puis s'allonge brusquement lors de son arrivée [28]. **C/** Propagation d'une vague à plus fort grossissement d'un neurone d'hippocampe de rat après 24h de culture. Le nombre en haut à droite de chaque photo indique les minutes écoulées [28]. | Barre : $5\mu m$

de nouveaux embranchements [27]. Elles sont en effet plus fréquentes dans l'axone lors de son développement (environ 2 fois plus de vagues dans l'axone en développement que dans les autres neurites). De plus, elles ont été observées dans des tranches d'hippocampes, ce qui confirme qu'elles ne sont pas des artefacts de croissance apparaissant *in vitro* [27]. Parmi les questions qui restent ouvertes, les plus importantes sont de savoir par quel mécanisme ces vagues se propagent, et si elles interviennent dans le processus de la polarisation axonale.

I.4 L'axone

Lors de la polarisation axonale, un des neurites acquiert les caractéristiques fonctionnelles qui le feront devenir un axone. *In vivo*, la détermination de ce neurite est influencée par un ensemble de facteurs liés à l'anisotropie du milieu en termes géométriques, par la position de la cellule dans son environnement, mais aussi en termes biochimiques, par l'expression de signaux attractifs spécifiques dans certaines directions.

Cependant, dans le cas de cultures *in vitro*, il n'existe généralement pas d'anisotropie géométrique ou biochimique dans l'environnement plan de la cellule. On peut alors se demander comment le choix de ce neurite est effectué. Est-il prédéterminé, ou au contraire la cellule est-elle sensible à de faibles signaux comme par exemple la présence d'une cellule à une distance de l'ordre de $100\mu m$? Existe-t-il des signes, aux premiers stades de développement qui vont nous indiquer quel neurite deviendra l'axone? Est-il enfin possible de contrôler cette différenciation? Ces questions sont d'un enjeu crucial pour la recherche, autant pour créer des circuits neuronaux *in vitro* (où contrôler le sens de l'information pourrait s'avérer de première nécessité) que dans un souci thérapeutique, pour la régénération neuronale *in vivo*.

Pour tenter de comprendre les mécanismes de la différenciation axonale, de nombreuses études sur l'apparition de la polarité neuronale ainsi que sur les propriétés physiologiques de l'axone ont été menées *in vitro*. Nous découvrirons dans cette partie les caractéristiques d'un axone, à partir des premiers signes connus de sa différenciation. Nous verrons également l'état des connaissances actuelles sur le contrôle de la différenciation axonale.

Compétition neuritique

Durant le stade 2, plusieurs études de vidéo-microscopie (voir figure I.13) [16] [11] [29] mettent en évidence une véritable compétition neuritique en montrant que la croissance des neurites pendant cette période est alternée, c'est-à-dire que les cônes de croissance présentent des périodes d'activité plus intense à tour de rôle. Au stade critique où un neurite se spécialise en axone, sa croissance s'accélère et devient plus régulière tandis que la croissance des autres neurites s'interrompt pendant environ 1 jour. On peut interpréter cet arrêt comme une inhibition temporaire de leur croissance. Cette inhibition pourrait être la conséquence de la cascade de signalisation associée à la polarisation axonale, ou pourrait simplement résulter de la focalisation des matériaux et de l'énergie dans le nouvel axone. Par la suite, la croissance de l'axone se maintient tandis que les autres neurites vont à leur tour croître et se spécialiser en dendrites.

Les premiers signes fonctionnels

Nous avons vu dans la description de la structure des axones et dendrites que ces deux prolongements possèdent des différences physiologiques et morphologiques. Ainsi, l'axone et les dendrites possèdent des protéines différentes, notamment dans leur membrane, leur permettant d'assurer leur

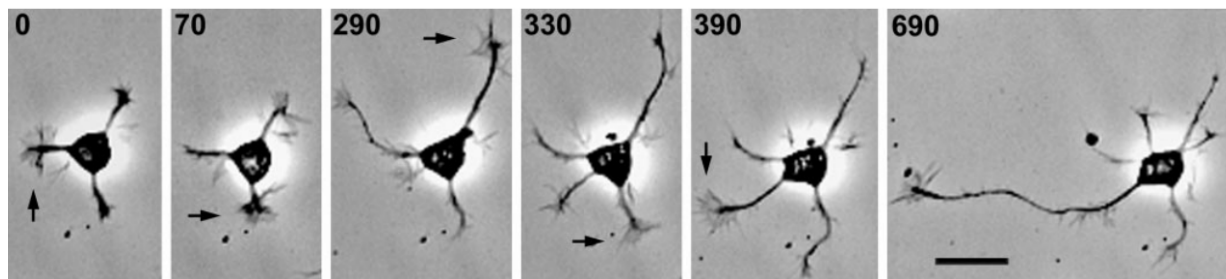


FIGURE I.13 – **La compétition neuritique entre les stades 2 et 3 de développement.** Les cônes de croissance des différents neurites suivent à tour de rôle des augmentations de taille et d'activité exploratoire (flèches), qui donnent lieu à une augmentation de la croissance. Entre les phases d'activité, les neurites peuvent se rétracter sur plus de dix microns. Au moment de la polarisation, l'un des neurites croît plus longtemps, conserve un cône à activité importante, et acquiert progressivement les caractéristiques fonctionnelles de l'axone.

Temps relatif en minutes, début à 8h de culture. | Barre : $20\mu\text{m}$ [29].

rôle de pôle émetteur ou récepteur de la cellule. Mais comment ces spécialisations se mettent-elles en place ?

La plupart des neurones au stade 3 ont un trafic cytoplasmique polarisé dans leur plus long prolongement (voir figure I.14) [30]. Les auteurs ont également remarqué qu'une sous population de neurones au stade 2 possédaient déjà un trafic polarisé dans un ou deux de leur prolongements. Entre autres, des vésicules, mitochondries, ribosomes et protéines membranaires qui seront exclusivement localisées dans les axones des neurones matures se retrouvent concentrés dans ces prolongements. Ainsi, avant même l'élongation rapide d'un des prolongements qui deviendra l'axone, on peut retrouver un trafic polarisé dans un ou deux des neurites.

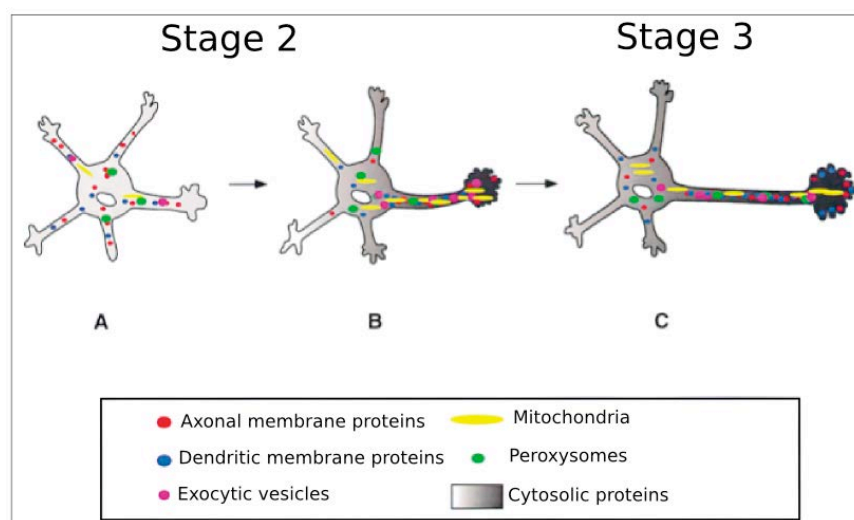


FIGURE I.14 – **Trafic cytoplasmique polarisé durant la différenciation axonale.** [30].

Notons par ailleurs que lors de l'élongation du prolongement qui deviendra l'axone, on retrouve

des protéines qui ne seront présentes par la suite que dans les dendrites matures et non dans l'axone. Ainsi, dans ce futur axone un mécanisme de tri sélectif doit se mettre en place progressivement, après qu'il a commencé à croître de façon importante. L'ankyrine, que nous utilisons pour marquer spécifiquement le segment proximal de l'axone, est notamment une des protéines qui participe à ce tri sélectif [31].

Les microtubules jouent un rôle actif dans la polarisation axonale. En effet, les microtubules du prolongement qui deviendra l'axone d'un neurone au stade 2 sont plus stables. Une stabilisation des microtubules est d'ailleurs suffisante pour induire la formation de l'axone de neurones d'hippocampes non polarisés (voir figure I.15) [32]. Cette stabilisation des microtubules dans un des prolongements pourrait entraîner un transport sélectif vers ce neurite, renforçant ainsi la pousse axonale. En effet, certains moteurs moléculaires, comme la kinésine, montrent plus d'affinités pour les microtubules stables [33]. D'ailleurs, la kinésine, qui transporte des vésicules vers le bout + des microtubules, est sur-exprimée dans l'axone [34].

La dynamique de l'actine joue elle aussi un rôle important dans le cône de croissance, la formation des neurites et leur élongation. Une des distinctions du cône de croissance du futur axone est la diminution de la stabilité de ses microfilaments d'actine. Cette instabilité pourrait réduire la force s'opposant à l'avancée des microtubules et donc à l'élongation. Il a d'ailleurs été remarqué qu'une dépolymérisation locale des microfilaments d'actine dans un des cônes de croissances des neurites au stade 2 suffit à entraîner sa différenciation en axone [35]. La taille du cône de croissance axonal est également plus importante [30]. Cependant, de façon surprenante, l'application d'une drogue qui inhibe la polymérisation de l'actine, la cytochalasine E, n'empêche pas la différenciation axonale des neurones d'hippocampe de rat [29]. Il semble donc que l'actine joue avant tout un rôle important dans l'exploration de l'environnement et la modulation de la croissance, tandis que les microtubules interviennent surtout dans le mécanisme de polarisation axonale.

Les organites cellulaires et leur rôle dans la différenciation

Nous venons de voir que la dynamique des microtubules joue un rôle prépondérant dans la polarisation axonale. Il est donc légitime de se demander si leur centre organisateur, le centrosome, y joue également un rôle important. Il a été montré dans les neurones d'hippocampe de rat que le centrosome se positionne, dans les premiers stades de développement du neurone, en face du neurite qui deviendra l'axone (voir figure I.16) [36]. Dans les cellules granulaires du cervelet, le centrosome ainsi que l'appareil de Golgi se retrouvent également à la base de l'axone au moment de son émergence [37]. Cette position de l'appareil de Golgi et du centrosome en face de l'axone émergent pourrait faciliter la délivrance des microtubules ainsi que des vésicules contenant les protéines nécessaires à son élongation. Cependant, les auteurs précisent que le centrosome et l'appareil de Golgi ne se trouvent pas à la base de l'axone pour tous les types de neurones.

Une des questions que l'on se pose alors est de savoir si la position du centrosome implique la position de l'axone ou si la position du centrosome en face de l'axone est la conséquence d'un

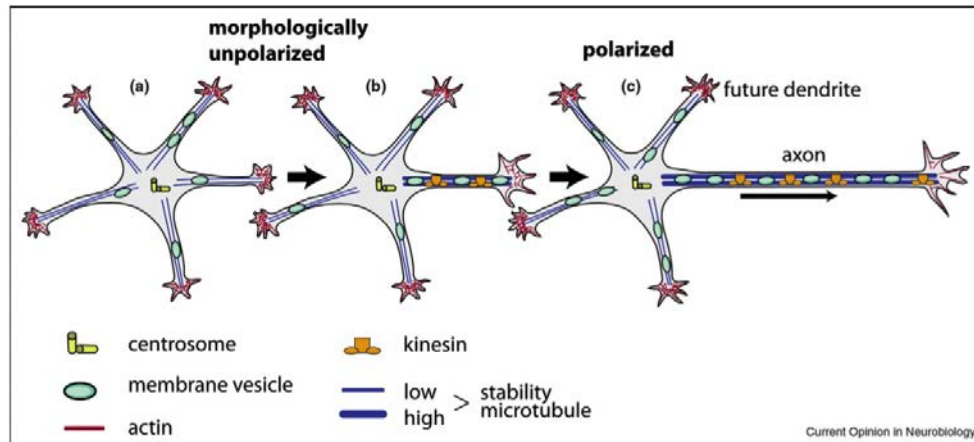


FIGURE I.15 – Réorganisation du cytosquelette lors de l'apparition de la polarité. Une diminution de la stabilité des microfilaments d'actine dans le cône de croissance et une stabilisation des microtubules sont observées. [32]

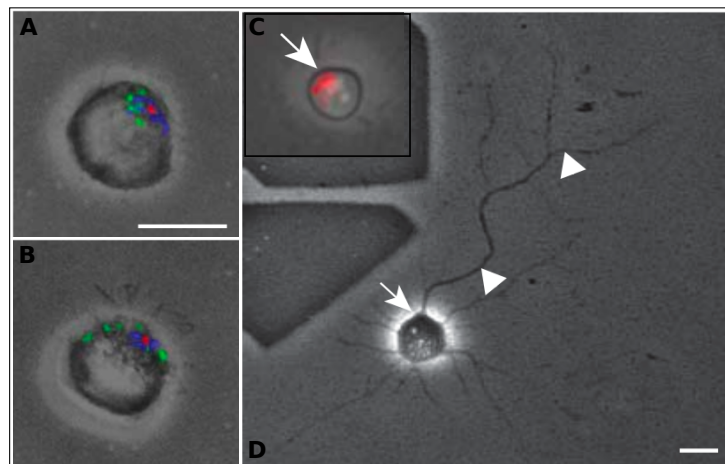


FIGURE I.16 – Le centrosome se positionne, dans les premiers stades du développement du neurone, en face du neurite qui deviendra l'axone [36]. A-B/ Le centrosome (rouge), l'appareil de Golgi (bleu) et les endosomes (vert) sont polarisés dans les cellules lors de l'ensemencement (A), et à la base de l'émergence du premier lamellipode (B). La barre d'échelle représente $10\mu\text{m}$. C-D/ Appareil de Golgi (rouge, C) avant et après polarisation du neurone. Celui-ci est positionné avant polarisation à l'endroit où émerge l'axone. La flèche indique la position de l'appareil de Golgi avant polarisation. | Barre : $10\mu\text{m}$

autre biais. Dans les cellules granulaires du cervelet, le centrosome ainsi que l'appareil de Golgi se retrouvent à la base du premier axone puis se déplacent vers le second axone après son émergence [37]. Comme cette réorientation apparaît après que le second axone a émergé, elle pourrait donc être une conséquence de l'apparition du nouvel axone. Les auteurs suggèrent d'ailleurs que les forces générées par le cône de croissance pourraient indirectement affecter la localisation du centrosome et de l'appareil de Golgi. Toujours dans ces cellules granulaires, l'initiation du second axone peut être empêchée par la dépolymérisation des microfilaments d'actine, qui résulte en une position

aléatoire du centrosome. Cependant, si le prolongement a déjà commencé à s'allonger, il continue son élongation même sans centrosome à sa base. Les auteurs en déduisent que le positionnement du centrosome à la base de l'axone est requis seulement à l'intérieur d'une fenêtre temporelle spécifique.

Il est également instructif de regarder le mouvement du centrosome dans les neurones bipolaires en migration lors de l'émergence de chacun des neurites [38]. Lorsque ces neurones rencontrent une source de molécules répulsives, ils se réorientent en rétractant leur prolongement se trouvant face à la source (prolongement leader) et étendent un autre prolongement dans la direction opposée. Le centrosome se réoriente en face du nouveau prolongement seulement une fois que celui-ci a commencé à émerger. Cela suggère que la position du centrosome ne détermine pas la position du prolongement émergent. Cependant, cette réorientation du centrosome pourrait être impliquée dans la stabilisation de ce nouveau prolongement. En effet, lorsque l'on bloque la réorientation du centrosome, le nouveau prolongement émergent n'est pas stable, et les neurones échouent dans leur réorientation. Notons que les microtubules du prolongement leader sont tous orientés, comme dans l'axone, avec leur bout + dirigés vers l'extrémité de celui-ci [39].

Ainsi, le centrosome semble jouer un rôle lors de l'élongation et de la stabilisation d'un prolongement leader de neurone migrant. Cela pourrait expliquer pourquoi il se trouve à la base de l'axone, nécessitant un apport de matière conséquent pour sa rapide élongation. Cependant, cette position ne semble pas être nécessaire pendant toute la durée du développement de ce prolongement.

Une polarisation réversible *in vitro*

Des études sur les neurones d'hippocampe ou corticaux au stade 3 ont révélé leur capacité à changer un futur dendrite en un axone si l'on coupe l'axone près du corps cellulaire [40]. Cela indique que tous les neurites ont la capacité de devenir des axones. Cette capacité est encore présente même si le neurone est mature et a créé des contacts synaptiques [41], car un dendrite mature peut encore se transformer en axone. Il existe une longueur critique d'environ $35\mu m$ aussi bien pour les neurones au stade 3 qu'au stade 5 (matures) au delà de laquelle l'axone reprend sa croissance dans le même neurite en cas de coupure, comme si le prolongement avait gardé une forme de signature axonale. Les auteurs suggèrent que ce repère pourrait être les microtubules stabilisés que l'on retrouve dans la partie distale de l'axone. S'ils sont encore présents après la coupure, ils enclenchent la repousse de l'axone. Ces microtubules stables pourraient être le signal pour que les kinésines spécifiques de l'axone transportent le matériel nécessaire. Au contraire, si l'on coupe trop près du corps cellulaire, la compétition entre les différents prolongements pour devenir l'axone recommence, et souvent, un autre neurite devient l'axone. Cette perte de l'information de la position de l'axone pourrait entre autres être liée à la désorganisation de la barrière qui réalise le tri-sélectif dans le segment proximal de l'axone (voir p. 33). En effet le signal de l'ankyrine, spécifique du segment initial de l'axone, est justement concentré sur un segment de l'axone qui s'étend à moins de $50\mu m$ du soma. Enfin, pour confirmer ces observations, la stabilisation des microtubules

induite pharmacologiquement peut provoquer la re-spécialisation de dendrites matures en axones [41].

I.4.1 La mécanique de l'axone

La tension dans les neurites et son rôle dans la différenciation axonale

Le rôle de la tension dans l'élongation et la rétractation des neurites est étudié depuis plus d'une trentaine d'années. Il a été montré de manière indirecte que les neurites des neurones en culture sont sous tension induite par les cônes de croissance en observant par exemple leur géométrie (voir figure I.17) [42] [43]. Il a été en effet remarqué que les géométries des prolongements des neurones correspondaient à celles d'un réseau de cordes mises sous tension à ses extrémités libres ⁽⁴⁾.

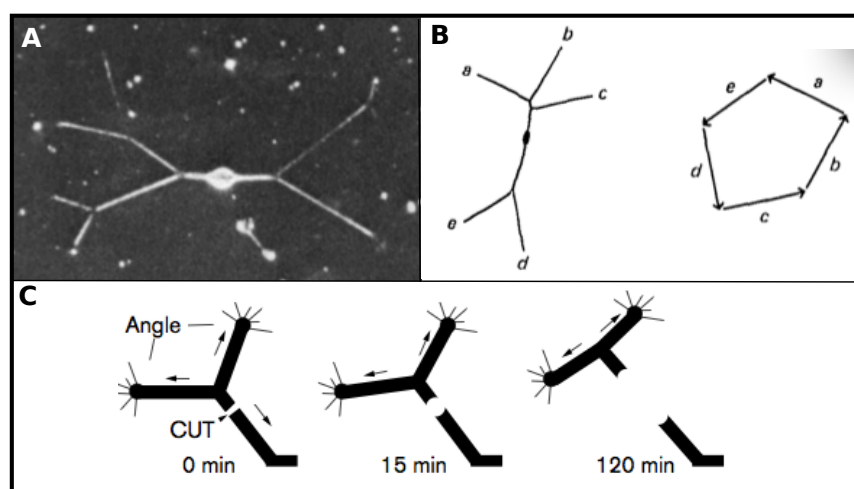


FIGURE I.17 – Tension des neurites mise en évidence par l'analyse de la géométrie des prolongements des neurones. A/ Neurone sensoriel en microscopie électronique (X210). B/ Squelette d'un neurone (à gauche) et polygone des forces (à droite) construit en prenant un vecteur unité pour chaque extrémité de prolongement, avec l'orientation de chacun d'eux [42]. C/ Schéma d'un neurone avec ses trois branchements. La géométrie change conformément à l'existence de tensions exercées aux extrémités par les cônes de croissance lors du sectionnement de l'un deux [43].

La mesure effective de la tension de neurites a été directement effectuée sur des cellules PC12 ⁽⁵⁾, en appliquant une force perpendiculaire à chaque neurite (voir figure I.18) [44]. Les auteurs trouvent une relation linéaire entre la tension mesurée et le changement de longueur du neurite lors de la mesure. Ils assimilent donc le neurite à un ressort et déterminent sa constante de raideur

4. Dans une publication de 1979 [42], l'auteur analyse les géométries de différents neurones et assimile le neurite à une corde sur laquelle est exercée une force de tension au niveau de son extrémité libre. Il montre alors que la plupart des neurones sont à l'équilibre mécanique et peuvent transiter d'un état d'équilibre à un autre. Si l'on coupe une des neurites, s'ensuit la création de branchements qui permettent de rétablir l'équilibre.

5. Lignée cellulaire dérivée de phéochromocytome (cancer à l'interface du système hormonal et du système nerveux) de la médulla surrénale (partie interne de la glande surrénale) d'un rat. Les cellules PC12 cessent de se diviser et se différencient lorsqu'elles sont traitées avec du facteur de croissance neural (NGF). Elles sont très utilisées en tant que modèles pour la différenciation neuronale ou pour l'étude de la mécanique des neurites.

ainsi que sa tension avant déformation. La plupart des neurites sont sous une tension comprise entre 200 et 400 pN mais ces valeurs peuvent varier entre 0 et 10 000pN.

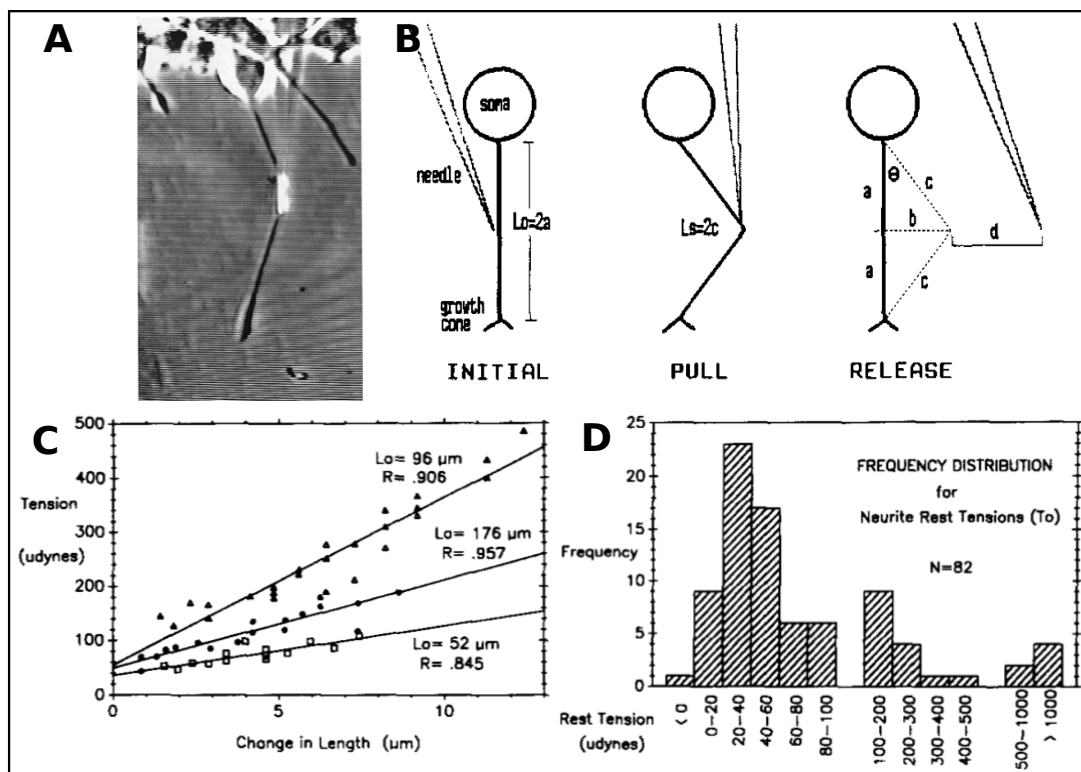


FIGURE I.18 – Mesure effective de la tension des neurites par déplacement latéral. **A/** Application d'une force perpendiculaire sur un neurite de cellule PC12. **B/** Méthode de mesure de la tension. L_0 : longueur au repos, b : déplacement latéral de la neurite, d : déflexion de la micropipette, proportionnelle à la force appliquée sur le neurite. **C/** Diagramme de la tension mesurée en fonction du changement de longueur du neurite pour trois neurites différents. Pour chaque courbe, la pente représente la constante du ressort et l'intersection avec les ordonnées la tension du neurite au repos, T_0 . **D/** Distribution des tensions des neurites au repos [44]. | $1\mu\text{dynes} = 10^{-5}\text{N}$

Plus récemment, il a été montré qu'il était possible d'induire une différenciation axonale par l'application d'une tension extérieure, indiquant que le dépassement d'un seuil de tension serait suffisant à induire une différenciation axonale. En effet, Lamoureux et al. ont appliqué une tension extérieure comprise entre 200 et 1000 pN à des neurites au stade 2 et au stade 3 de développement (voir figure I.19)[45]. Ces neurites s'allongent alors avec une vitesse pouvant atteindre $140\mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ et se différencient en axone (dans le cas d'un neurone au stade 3, le neurite sous tension forme un second axone). Chaque neurite montre une réponse linéaire de la vitesse d'élongation en fonction de la tension extérieure appliquée. Notons que cette tension extérieure appliquée est de l'ordre de grandeur de la force développée par un cône de croissance de surface $100\mu\text{m}^2$ [24].

Une seconde équipe s'est attachée à connaître la tension seuil à partir de laquelle un neurite s'initie à l'aide de microbilles magnétiques, ayant une meilleure précision que les micropipettes

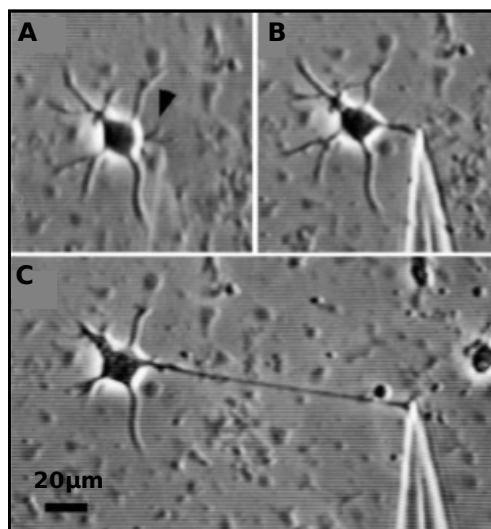


FIGURE I.19 – Élongation d'un neurite induite par l'application d'une tension extérieure sur un neurone de stade 2. **A/** Neurone avant l'application de la pipette. **B/** Neurone 30 min après, au début de l'application de la tension extérieure. **C/** Neurone 5h40 après l'image B, à la fin de l'application de la tension extérieure. [45].

[46]. La probabilité d'initier un neurite augmente nettement pour des forces variants de 100 à 450 pN, avec un optimum pour 450pN. Il serait intéressant d'utiliser cette technologie pour trouver le seuil de tension à partir duquel un neurite se différencie en axone.

La génération de forces dans l'axone : un point de vue biologique

Comment le futur axone arrive-t-il concrètement à exercer des forces pour s'allonger ou se rétracter ? Deux grandes opinions sur la génération de forces dans l'axone s'affrontent. La première, et plus ancienne propose que les avancées et rétractations de l'axone impliquent une polymérisation et dépolymérisation du cytosquelette seul. Une autre piste implique quant à elle le rôle des moteurs moléculaires dans la génération de forces sur le cytosquelette qui affecteraient alors sa configuration [47].

Des études ont en effet impliqué le rôle de moteurs moléculaires dans l'élongation et la rétraction de l'axone. La dynéine par exemple a été impliquée dans le transport antérograde de microtubules dans l'axone. Cette étude suggère que le domaine cargo de la dynéine s'associe avec l'actine corticale, laissant le domaine moteur libre pour déplacer les microtubules. Ainsi, les microfilaments d'actine et les microtubules seraient liés par des forces induites par la dynéine. D'ailleurs, l'inhibition de la dynéine empêche le transport des microtubules et la pousse axonale. Aucune dépolymérisation notable des microtubules n' a été remarquée lors de cette inhibition mais les microtubules glissent de façon rétrograde sous le flux rétrograde d'actine dans le cône de croissance. [48]. Des études ont également montré que l'axone peut se développer même lorsque la dynamique d'assemblage est réduite par application d'une faible concentration de Nocodazole [32]

La myosine II a également été impliquée comme lien entre les forces développées dans le cône de croissance et le corps du neurite, comme mentionné dans la partie I.3.3 en p. 28. Il semble donc que les moteurs moléculaires puissent faire le lien entre l'actine et les microtubules afin de générer des forces dans les neurites en réorganisant le cytosquelette.

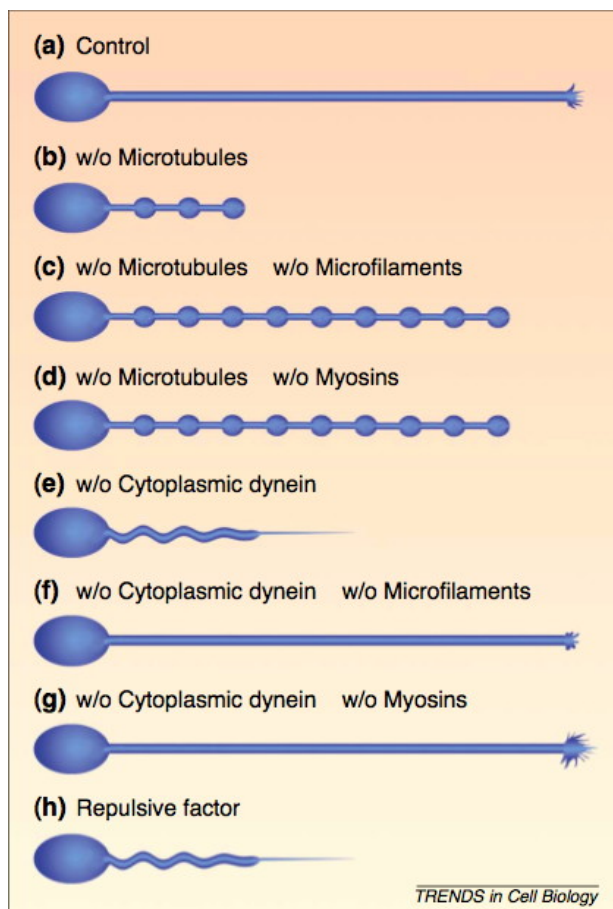


FIGURE I.20 – Schéma de la réponse de l'axone à la dépolymérisation des éléments du cytosquelette, ou à l'inhibition de certains moteurs moléculaires ('w/o'='sans') [47].

Des études pharmacologiques vont également dans ce sens (voir figure I.20) [47]. Lorsque les microtubules sont pharmacologiquement dépolymérisés, l'axone se rétracte, devient plus fin et des renflements en forme de bille se développent (voir figure I.20/b). Ces renflements sont des zones peu riches en microtubules. Il semble donc que les microtubules supportent une certaine tension puisqu'en l'absence de ceux-ci, une rétraction se produit. La question est alors de savoir quels effecteurs exercent cette tension. Une dépolymérisation de l'actine en supplément n'entraîne aucune rétraction mais l'axone prend le même aspect fin et renflé (voir figure I.20/c). Cela indiquerait alors que la tension des microtubules serait induite par l'intermédiaire de l'actine. Une étude supplémentaire va également dans le sens d'une tension exercée par le réseau d'actine puisque la stimulation de la polymérisation et la stabilisation des filaments d'actine par l'injection de

phalloïdine provoque la rétraction des neurites [44].

Les moteurs moléculaires sont-ils impliqués dans cette génération de contractibilité ? L'inhibition de la myosine II ajoutée à la dépolymérisation des microtubules provoque le même effet qu'une dépolymérisation de l'actine (voir figure I.20/d). Son inhibition découplerait donc les forces exercées entre les microfilaments d'actine et les microtubules. La compression serait donc due à une contractilité des complexes d'acto-myosine. Dans un autre cas, si la dynéine est inhibée l'axone se rétracte mais ne devient pas plus fin ni ne présente des renflements en forme de bille (voir figure I.20/e). Il adopte plutôt une forme sinusoïdale, laissant lors de sa rétractation une traînée derrière lui. Ainsi, l'inhibition de la dynéine enlèverait la capacité du réseau microtubulaire à résister à la compression du réseau d'acto-myosine. Ce résultat est cohérent avec le fait que l'inhibition de la dynéine entraîne le glissement rétrograde des microtubules sous le flux rétrograde d'actine au niveau du cône de croissance. En contrôle, l'ajout d'une dépolymérisation des microfilaments n'entraîne aucune rétraction, confirmant que le réseau d'actine servirait de support mécanique à la dynéine (voir figure I.20/f). Enfin, une inhibition de la myosine parallèlement à la dynéine produit le même effet, conformément à ce qui est attendu (voir figure I.20/g). Ainsi, la dynéine et la myosine II semblent être impliquées dans les générations de force sur le cytosquelette, en interaction avec l'actine d'un côté et les microtubules de l'autre.

La génération de forces dans l'axone : des mesures et des modèles physiques

L'un des modèles mécaniques les plus courants pour caractériser les relations entre les différents éléments du cytosquelette se base sur la tenségrité, c'est-à-dire la faculté d'un système à se stabiliser par le jeu de forces de tension et de compression qui s'y répartissent et s'y équilibrent. Selon ce point de vue, le réseau de microfilaments d'actine serait sous tension structurale pendant que les microtubules supportent cette tension et seraient donc sous compression [44]. Ce point de vue est en accord avec les observations sur les cellules développant des adhésions focales, entre lesquelles s'établissent des fibres d'actine sous tension nommées fibres de stress, ainsi que dans le cas des cellules PC12, modèles neuronaux, qui établissent aussi des adhésions focales et adhèrent de point en point.

Cependant, la situation est plus complexe dans le cas des neurones d'hippocampe, où l'adhésion se réalise tout au long du neurite et où aucune fibre de stress n'est observée. La description du cône de croissance exposée précédemment, en particulier, illustre la complexité des interactions entre microtubules et actine : à la fois le réseau d'acto-myosine exerce une pression sur l'extrémité des microtubules pour contrôler la directionnalité de croissance, à la fois ce réseau participe au resserrement des microtubules dans le "tronc" du cône et à la transmission des forces développées par le cône pour croître.

Pour étudier le comportement mécanique des neurites, des études sur leurs propriétés mécaniques ont été menées en appliquant des forces extérieures sur ceux-ci [49] [50] [51]. Il a ainsi été montré qu'un neurite a un comportement visco-élastique, c'est à dire qu'il se comporte à la fois comme un fluide visqueux (montrant une résistance caractéristique au mouvement, la viscosité, qui

résulte en une perte d'énergie par friction se dissipant dans le fluide) et comme un solide élastique (sous l'application d'une force, sa déformation est instantanée, constante, et totalement réversible, comme un ressort par exemple.). La différence entre ces réponses dépend du temps d'observation. Des déformations rapides durant des périodes de l'ordre de la seconde à la minute mènent à un comportement élastique. Mais quand les neurites sont tirées suffisamment lentement (pendant des heures voire des jours), ils peuvent s'allonger avec un comportement visqueux sur plusieurs millimètres sans rompre ni s'amincir. Le fait que l'allongement se réalise sans amincissement montre qu'il y a apport de matière. L'élongation du neurite en réponse à une force appliquée peut en résumé être découpée en trois phases typiques. Après un étirement élastique, il y a une période de repos, puis une élongation à taux constant.

De nombreux modèles physiques modélisent cette élongation et ce comportement visco-élastique, notamment en utilisant des éléments classiques de comportement élastiques (les ressorts) avec des éléments de comportements visqueux (les amortisseurs) dont les propriétés peuvent dépendre du temps [50]. Ces modèles physiques ont pour avantage de pouvoir déterminer quelles propriétés mécaniques simples peuvent expliquer le comportement des neurites observé *in vitro*.

Ainsi, le modèle de Bernal et al. par exemple, tient compte non seulement des propriétés visco-élastiques de l'axone mais également de sa capacité à générer des forces de tension contractiles grâce à ses moteurs moléculaires [49]. Plus récemment, le modèle de O'Toole introduit le fait que le neurite puisse adhérer, en disposant des points d'adhésions le long du neurite (voir figure I.21) [51]. La force des adhésions et leur interaction avec le cytosquelette d'actine a dans ce cas un impact important sur la propagation de la force et la déformation qui en résulte tout au long du neurite. Les résultats de ce modèle sont parfaitement en accord avec le déplacement relatif des mitochondries dans le neurite, qui servent de repères de l'allongement neuritique en fonction de la distance au point d'application de la force.

I.4.2 Le guidage de l'axone *in vitro*

Cette dernière partie sur l'axone s'attache à décrire l'état actuel des connaissances mises en œuvre pour pouvoir guider l'axone dans une culture *in vitro* ainsi que leur limites. Nous verrons dans un premier temps que des molécules attractives ou répulsives pour l'axone *in vivo* peuvent être utilisées *in vitro* pour guider l'axone. Un second paragraphe abordera les expériences reposant sur des différences d'adhésion. Enfin, une dernière partie décrira les techniques physiques récemment utilisées pour guider l'axone.

Des molécules attractives et répulsives

Lors du développement du cerveau, les précurseurs neuronaux migrent vers leur destination finale. Cette migration neuronale n'est pas réduite aux embryons car on la retrouve également dans les cerveaux de nouveaux nés et d'adultes. Une fois à leur emplacement, les neurones vont également se connecter de manière adéquate pour former les architectures fonctionnelles qui permettront de

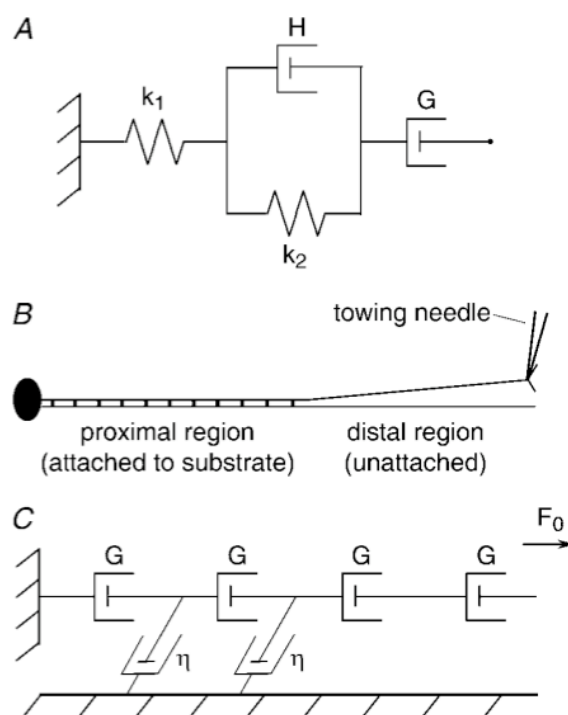


FIGURE I.21 – **Modèle prenant en compte l'adhésion du neurite : modélisation d'un neurite sous exercice d'une tension extérieure comme une série d'éléments de Burger [51].** **A/** Schéma d'un élément de Burger, composé de deux ressorts et de deux amortisseurs en série et en parallèle. **B/** Schéma d'un neurite durant l'exercice d'une tension extérieure à son extrémité. La partie distale n'est pas adhésive. Dans la région proximale, de nombreux points d'adhésions lient le neurite au substrat. **C/** Modélisation du neurite sous application d'une force extérieure F_0 . Sous application de tension constante, les éléments de Burger se comportent comme leur amortisseur libre. Les points d'adhésion au substrat sont modélisés par des amortisseurs de constante η . La tension est donc constante dans la partie distale mais est dissipée progressivement dans la partie proximale de l'axone.

traiter correctement l'information. Dans la migration neuronale comme dans la guidance de l'axone vers les zones cibles, des molécules attractives et répulsives sont impliquées. Certaines molécules peuvent même être attractives dans certaines zones du cerveau et répulsives dans d'autres. Ces dernières années, de gros progrès ont été réalisés dans la connaissance de ces molécules en les plaçant dans des cultures *in vitro* et en observant le comportement des neurones à leur contact [52] [17]. La protéine Slit, par exemple, est répulsive alors que la Netrin peut être soit attractive soit répulsive pour les axones. Des molécules de la famille des semaphorines ont été également impliquées dans ces phénomènes de guidance. La semaphorine 3A est répulsive pour l'axone mais est une molécule attractive pour les dendrites des neurones corticaux. Ces molécules sont captées par les récepteurs membranaires des cellules et s'ensuit une cascade de signaux intracellulaires qui pourraient soit réorganiser le cytosquelette, soit organiser la délivrance de vésicules dans un des neurites. La connaissance de ces molécules peut être utilisée pour guider les axones *in vitro*.

Cependant, le potentiel d'une telle technique reste limité. En effet, le largage de la molécule à l'endroit désiré peut influencer plusieurs neurones à la fois et il est impossible de limiter sa diffusion dans tout le milieu. Ainsi, elle ne peut être utilisée que pour un contrôle global de la direction de pousse des axones de neurones en culture *in vitro*.

Un contraste de molécules d'adhésion

Un contrôle de la différenciation axonale peut également être réalisé en jouant sur des adhésions différentes. Il a en effet été montré avec des neurones d'hippocampe de rat qu'il était possible de contrôler la pousse axonale *in vitro* en utilisant des molécules connues pour promouvoir la pousse axonale *in vivo*, la Laminine ou NgCAM. L'équipe de Banker a en effet montré qu'en cultivant des neurones sur des bandes de molécules d'adhésion différentes, PLL (Poly-L-Lysine) et Laminine ou PLL et NgCAM, le premier neurite rencontrant la zone d'adhésion favorable à la croissance se différencie en axone [53].

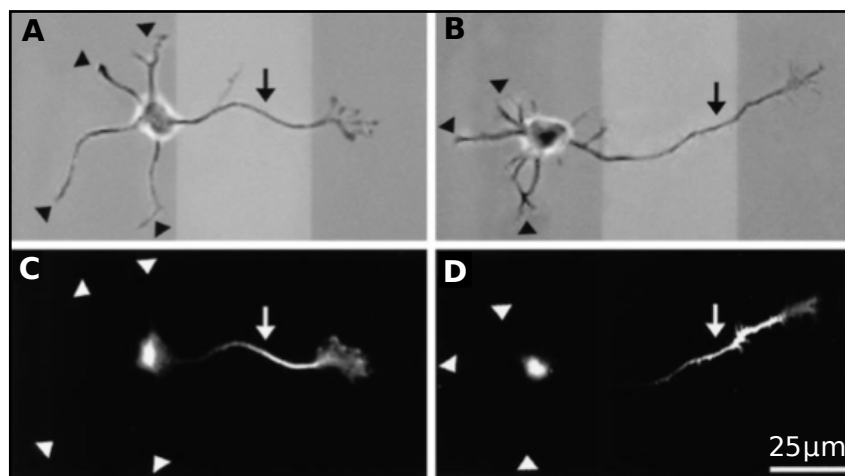


FIGURE I.22 – Contrôle de la polarisation axonale par une modification locale de molécule d'adhésion[53]. (A-B) Neurones d'hippocampe de rat 24h après l'ensemencement cultivés sur des bandes de PLL et Laminine (Laminine en clair). (C-D) Marquage de ces neurones avec un marqueur axonal Tau-1. Le marqueur est concentré dans l'axone en développement (flèche) et absent des autres neurites.

De même, il est possible d'orienter la pousse axonale en créant des gradients de Laminine. L'axone s'oriente alors vers la densité de surface de Laminine la plus élevée [54]. Ainsi, un changement local d'adhésion peut entraîner une différenciation axonale. Etant donné que l'adhésion est intimement liée au cytosquelette, on peut alors se demander si ces changements d'adhésion ne seraient pas reliés à des changements locaux de tension, induite par une réorganisation du cytosquelette.

Des champs de forces

Plusieurs techniques physiques ont été mises en œuvre pour tenter d'orienter l'axone mais pour l'instant, elles apportent plus de questions que de réponses. Le cône de croissance de l'axone peut

être par exemple guidé par de faibles forces optiques [55]. En effet, lorsque l'on focalise un laser à proximité d'un cône de croissance, celui-ci oriente sa croissance vers le point lumineux (voir figure I.23). Les auteurs ont éliminé l'hypothèse de l'augmentation locale de température, mais n'ont pas d'idée plus précise du mécanisme qui pourrait être impliqué.

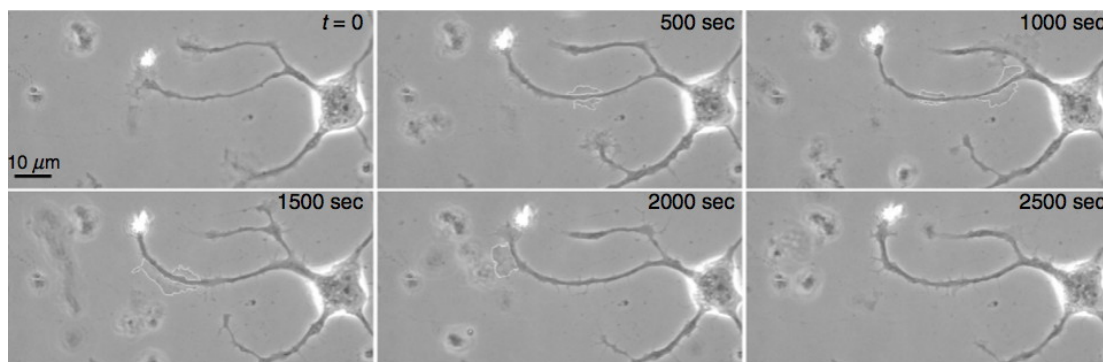


FIGURE I.23 – Série d'images chronologiques du guidage par des forces optiques d'un cône de croissance de neurone cortical. Cette série chronologique montre l'extension du neurite par l'application d'un laser de 90mW [55].

Il a été également montré que l'application de champs électriques constants et alternatifs de l'ordre de 10 à 100 $\text{mV}\cdot\text{mm}^{-1}$ peuvent orienter la pousse neuritique (voir figure I.24) [56]. En effet les cônes de croissance peuvent être soit attirés soit repoussés par la cathode, selon le type de neurone, de substrat (adhésion et charge) et le type de prolongement (axone ou dendrite). Avec des champs électrique constants notamment, les cônes de croissance changent leur direction de migration en fonction de l'adhésion au substrat et de sa charge. Des différences de comportement peuvent toutefois être constatées, car les neurones sensitifs ne tournent pas vers la cathode contrairement aux moto-neurones. Chez des neurones d'hippocampe de rat, les dendrites sont attirées vers la cathode, alors que les axones ne tournent pas en direction de celle-ci. Les neurites de cellules PC12 peuvent être orientés par un champs magnétique statique ou pulsé [57]. Les neurites s'orientent alors perpendiculairement au champ. Cependant, il n'a pas été remarqué de différences entre le comportement de l'axone et des dendrites.

Le lien entre l'application de champ électrique ou de force optique et la réorganisation du cytosquelette ou la cascade de signaux intracellulaires menant à un changement de direction n'est pas encore élucidé. Cependant, on commence à connaître, grâce à des études pharmacologiques, quelques protéines sans l'action desquelles la cellule est moins sensible au champ électrique (voir figure I.24/C).

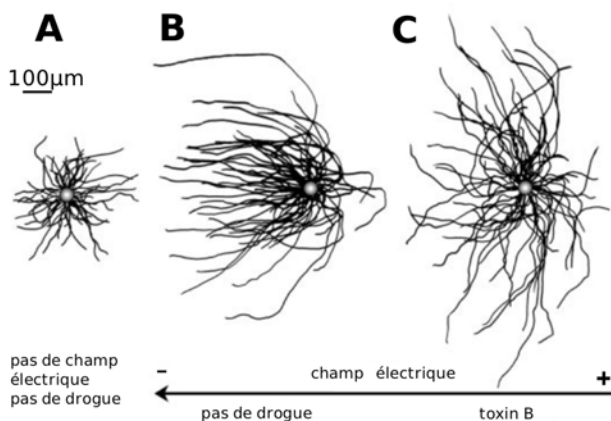


FIGURE I.24 – **Neurones de Xénope exposés à un champ électrique continu.** **A/** Cellule en l'absence de champ électrique et de drogue. Les neurites poussent aléatoirement dans toutes les directions. **B/** Cellule en présence d'un champ électrique de 150 mV/mm. Les neurites poussent vers la cathode. La vitesse de pousse est plus rapide vers la cathode. **C/** Inhibition des protéines de la familles Rho avec la toxine B. Les neurites poussent alors aléatoirement dans toutes les directions, en présence du même champ électrique [56].

Bibliographie

- [1] G. Stuart, N. Spruston, B. Sakmann, and M. Häusser. Action potential initiation and back-propagation in neurons of the mammalian cns. *Trends in Neurosciences*, 20(3) :125–131, 1997. **18**
- [2] PR Laming, H. Kimelberg, S. Robinson, A. Salm, N. Hawrylak, C. Müller, B. Roots, and K. Ng. Neuronal-glia interactions and behaviour. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24(3) :295–340, 2000. **19**
- [3] A Nicolas. L'adhésion cellulaire : une sonde de l'environnement mécanique dans les tissus. *Images de la physique 2007*, 2007. **19**
- [4] B.M. Jockusch. Patterns of microfilament organization in animal cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 29(1) :1, 1983. **20**
- [5] T. Mitchison and M. Kirschner. Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature*, 312 :232–237, 1984. **21**
- [6] S.F. Hamm-Alvarez. Molecular motors and their role in membrane traffic. *Advanced drug delivery reviews*, 29(3) :229–242, 1998. **21**
- [7] M.D. Ehlers. Secrets of the secretory pathway in dendrite growth. *Neuron*, 55(5) :686–689, 2007. **22**
- [8] J.C. Fiala, J. Spacek, and K.M. Harris. Dendritic spine pathology : cause or consequence of neurological disorders? *Brain research reviews*, 39(1) :29–54, 2002. **22**
- [9] P.W. Baas, J.S. Deitch, M.M. Black, and G.A. Banker. Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons : uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(21) :8335, 1988. **23**
- [10] Z.M. Lasiacka, C.C. Yap, M. Vakulenko, and B. Winckler. Compartmentalizing the neuronal plasma membrane : From axon initial segments to synapses, 2008. **23**

- [11] A.M. Craig, M. Jareb, and G. Banker. Neuronal polarity. *Current Opinion in Neurobiology*, 2(5) :602–606, 1992. 24, 31
- [12] Y. Ikegaya, Y. Itsukaichi-Nishida, M. Ishihara, D. Tanaka, and N. Matsuki. Distance of target search of isolated rat hippocampal neuron is about 150 [μ] m. *Neuroscience*, 97(2) :215–217, 2000. 25
- [13] V. Lemmon, S.M. Burden, H.R. Payne, G.J. Elmslie, and ML Hlavin. Neurite growth on different substrates : permissive versus instructive influences and the role of adhesive strength. *The Journal of neuroscience*, 12(3) :818, 1992. 26
- [14] S. Chang, V.I. Rodionov, G.G. Borisy, and S.V. Popov. Transport and turnover of microtubules in frog neurons depend on the pattern of axonal growth. *The Journal of neuroscience*, 18(3) :821, 1998. 26
- [15] D. Braun and P. Fromherz. Fluorescence interferometry of neuronal cell adhesion on microstructured silicon. *Physical review letters*, 81(23) :5241–5244, 1998. 26
- [16] C.G. Dotti, C.A. Sullivan, and G.A. Banker. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of neuroscience*, 8(4) :1454, 1988. 26, 31
- [17] N. Arimura and K. Kaibuchi. Neuronal polarity : from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(3) :194–205, 2007. 27, 42
- [18] L. Dehmelt and S. Halpain. Actin and microtubules in neurite initiation : Are maps the missing link? *Journal of neurobiology*, 58(1) :18–33, 2004. 27
- [19] C. Bouzigues, D. Holcman, and M. Dahan. A mechanism for the polarity formation of chemoreceptors at the growth cone membrane for gradient amplification during directional sensing. *PloS one*, 5(2) :e9243, 2010. 27
- [20] L.A. Lowery and D. Van Vactor. The trip of the tip : understanding the growth cone machinery. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(5) :332, 2009. 27, 28
- [21] D.T. Burnette, L. Ji, A.W. Schaefer, N.A. Medeiros, G. Danuser, and P. Forscher. Myosin ii activity facilitates microtubule bundling in the neuronal growth cone neck. *Developmental cell*, 15(1) :163–169, 2008. 28
- [22] D. Cojoc, F. Difato, E. Ferrari, R.B. Shahapure, J. Laishram, M. Righi, E.M. Di Fabrizio, and V. Torre. Properties of the force exerted by filopodia and lamellipodia and the involvement of cytoskeletal components. *PLoS One*, 2(10) :e1072, 2007. 28
- [23] C.E. Chan and D.J. Odde. Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science*, 322(5908) :1687, 2008. 28
- [24] T. Betz, D. Koch, Y.B. Lu, K. Franze, and J.A. Käs. Growth cones as soft and weak force generators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(33) :13420–13425, 2011. 28, 37
- [25] D.M. Suter and P. Forscher. An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. *Current opinion in neurobiology*, 8(1) :106–116, 1998. 29
- [26] Banker G Ruthel G. Actin-dependent anterograde movement of growth-cone-like structures along growing hippocampal axons : A novel form of axonal transport? *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 40 :160–173, 1998. 29
- [27] K.C. Flynn, C.W. Pak, A.E. Shaw, F. Bradke, and J.R. Bamberg. Growth cone-like waves transport actin and promote axonogenesis and neurite branching. *Developmental neurobiology*, 69(12) :761–779, 2009. 29, 30

- [28] G. Ruthel and G. Banker. Role of moving growth cone-like "wave" structures in the outgrowth of cultured hippocampal axons and dendrites. *Journal of neurobiology*, 39(1) :97–106, 1999. 29, 30
- [29] G. Ruthel and P.J. Hollenbeck. Growth cones are not required for initial establishment of polarity or differential axon branch growth in cultured hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*, 20(6) :2266, 2000. 31, 32, 33
- [30] F. Bradke and C.G. Dotti. Neuronal polarity : vectorial cytoplasmic flow precedes axon formation. *Neuron*, 19(6) :1175–1186, 1997. 32, 33
- [31] A. Song, D. Wang, G. Chen, Y. Li, J. Luo, S. Duan, and M. Poo. A selective filter for cytoplasmic transport at the axon initial segment. *Cell*, 136(6) :1148–1160, 2009. 33
- [32] H. Witte, D. Neukirchen, and F. Bradke. Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *The Journal of cell biology*, 180(3) :619, 2008. 33, 34, 38
- [33] N.A. Reed, D. Cai, T.L. Blasius, G.T. Jih, E. Meyhofer, J. Gaertig, and K.J. Verhey. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Current biology*, 16(21) :2166–2172, 2006. 33
- [34] C. Jacobson, B. Schnapp, and G.A. Banker. A change in the selective translocation of the kinesin-1 motor domain marks the initial specification of the axon. *Neuron*, 49(6) :797–804, 2006. 33
- [35] F. Bradke and C.G. Dotti. The role of local actin instability in axon formation. *Science*, 283(5409) :1931, 1999. 33
- [36] F.C. De Anda, G. Pollarolo, J.S. Da Silva, P.G. Camoletto, F. Feiguin, and C.G. Dotti. Centrosome localization determines neuronal polarity. *NATURE-LONDON-*, 7051 :704, 2005. 33, 34
- [37] J.F. Zmuda and R.J. Rivas. The golgi apparatus and the centrosome are localized to the sites of newly emerging axons in cerebellar granule neurons in vitro. *Cell motility and the cytoskeleton*, 41(1) :18–38, 1998. 33, 34
- [38] H.R. Higginbotham and J.G. Gleeson. The centrosome in neuronal development. *Trends in neurosciences*, 30(6) :276–283, 2007. 35
- [39] R.B. Vallee, G.E. Seale, and J.W. Tsai. Emerging roles for myosin ii and cytoplasmic dynein in migrating neurons and growth cones. *Trends in cell biology*, 19(7) :347–355, 2009. 35
- [40] F. Bradke and C.G. Dotti. Differentiated neurons retain the capacity to generate axons from dendrites. *Current Biology*, 10(22) :1467–1470, 2000. 35
- [41] S. Gomis-Ruth, C.J. Wierenga, and F. Bradke. Plasticity of polarization : changing dendrites into axons in neurons integrated in neuronal circuits. *Current Biology*, 18(13) :992–1000, 2008. 35, 36
- [42] D. Bray. Mechanical tension produced by nerve cells in tissue culture. *Journal of cell science*, 37(1) :391, 1979. 36
- [43] B.G. Condrón and K. Zinn. Regulated neurite tension as a mechanism for determination of neuronal arbor geometries in vivo. *Current Biology*, 7(10) :813–816, 1997. 36
- [44] TJ Dennerll, HC Joshi, VL Steel, RE Buxbaum, and SR Heidemann. Tension and compression in the cytoskeleton of pc-12 neurites. ii : Quantitative measurements. *The Journal of cell biology*, 107(2) :665, 1988. 36, 37, 40

- [45] P. Lamoureux, G. Ruthel, R.E. Buxbaum, and S.R. Heidemann. Mechanical tension can specify axonal fate in hippocampal neurons. *The Journal of cell biology*, 159(3) :499, 2002. [37](#), [38](#)
- [46] J.N. Fass and D.J. Odde. Tensile force-dependent neurite elicitation via anti-[beta] 1 integrin antibody-coated magnetic beads. *Biophysical journal*, 85(1) :623–636, 2003. [38](#)
- [47] P.W. Baas and F.J. Ahmad. Force generation by cytoskeletal motor proteins as a regulator of axonal elongation and retraction. *Trends in Cell Biology*, 11(6) :244–249, 2001. [38](#), [39](#)
- [48] P.W. Grabham, G.E. Seale, M. Bennefib, D.J. Goldberg, and R.B. Vallee. Cytoplasmic dynein and *lisl* are required for microtubule advance during growth cone remodeling and fast axonal outgrowth. *The Journal of neuroscience*, 27(21) :5823, 2007. [38](#)
- [49] R. Bernal, P.A. Pullarkat, and F. Melo. Mechanical properties of axons. *Physical review letters*, 99(1) :18301, 2007. [40](#), [41](#)
- [50] T.J. Dennerll, P. Lamoureux, R.E. Buxbaum, and S.R. Heidemann. The cytomechanics of axonal elongation and retraction. *The Journal of cell biology*, 109(6) :3073, 1989. [40](#), [41](#)
- [51] M. O’Toole, P. Lamoureux, and K.E. Miller. A physical model of axonal elongation : force, viscosity, and adhesions govern the mode of outgrowth. *Biophysical journal*, 94(7) :2610–2620, 2008. [40](#), [41](#), [42](#)
- [52] H.T. Park, J. Wu, and Y. Rao. Molecular control of neuronal migration. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 24(9) :821, 2002. [42](#)
- [53] T. Esch, V. Lemmon, and G. Banker. Local presentation of substrate molecules directs axon specification by cultured hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience*, 19(15) :6417, 1999. [43](#)
- [54] S.K.W. Dertinger, X. Jiang, Z. Li, V.N. Murthy, and G.M. Whitesides. Gradients of substrate-bound laminin orient axonal specification of neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20) :12542, 2002. [43](#)
- [55] A. Ehrlicher, T. Betz, B. Stuhrmann, M. Gogler, D. Koch, K. Franze, Y. Lu, and J. Kas. Optical neuronal guidance, 2007. [44](#)
- [56] C.D. McCaig, A.M. Rajnicek, B. Song, and M. Zhao. Controlling cell behavior electrically : current views and future potential. *Physiological reviews*, 85(3) :943, 2005. [44](#), [45](#)
- [57] S. Kim, W.S. Im, L. Kang, S.T. Lee, K. Chu, and B.I. Kim. The application of magnets directs the orientation of neurite outgrowth in cultured human neuronal cells. *Journal of neuroscience methods*, 174(1) :91–96, 2008. [44](#)

Chapitre II

Matériel et Méthodes

Sommaire

II.1 Nos substrats	51
II.1.1 Traitement de surface : la silanisation	51
II.1.2 Photolithographie	52
II.1.3 Rugosités	54
II.1.4 Tranchées	54
II.2 Culture de neurones et techniques biologiques	55
II.2.1 Culture de neurones d'hippocampe de souris	55
II.2.2 Les marquages sur cellules fixées	57
II.3 Observations des cellules	59
II.3.1 Acquisition	59
II.3.2 Vidéo-microscopie	59
II.4 Méthodes statistiques	61
II.4.1 Comparer un pourcentage observé à un pourcentage théorique	61
II.4.2 Trouver l'intervalle de confiance à 95% d'un pourcentage observé	62
II.4.3 Comparer deux pourcentages observés	62
II.4.4 Comparer des pourcentages observés au sein d'une même population	62
II.4.5 Comparaison de séries de mesures	63
II.5 Analyse d'images	64
II.5.1 Mesures de longueurs neuritiques	64
II.6 Analyse des vidéos	65
II.6.1 Images	65
II.6.2 Traitement des données issues des vidéos	65

II.1 Nos substrats

Pour les expériences autres que les rugosités ou les premiers tests de croissance sur NeuroFETs, nos substrats sont des lamelles de verre (prov. Weiss-Gläser) de forme carrée de 18mm de côté ou circulaire de diamètre 25mm pour la vidéo-microscopie. La première étape de leur préparation pour la culture, détaillée dans le premier paragraphe, consiste à rendre le substrat hydrophobe. La seconde étape permet de définir la géométrie des patterns d'adhésion cellulaire grâce à un procédé de photolithographie.

II.1.1 Traitement de surface : la silanisation

La silanisation est une réaction permettant de fonctionnaliser une surface en la rendant hydrophobe. Elle consiste à former une monocouche de molécules amphiphiles (*i.e.* à contraste hydrophile/hydrophobe) appelées silanes, de formule générique $R-(CH_2)_n-Si(X)_3$. R est un groupe fonctionnel hydrophobe tel qu'amino, methacryloxy ou epoxy par exemple. X est un groupement hydrolysable. La longueur de leur chaîne carbonée, n, peut varier, rendant le silane plus ou moins hydrophobe.

Le silane utilisé

Nous avons choisi d'utiliser le 3GPS (3-glycidoxypropyl-triméthoxysilane), de formule chimique $C_9H_{20}O_5Si$ car son utilisation pour créer des zones non adhérentes pour les neurones a été démontrée dans un article de l'équipe de B. Wheeler [1]. Les étapes du greffage de ce silane sur le verre sont indiquées en figure II.1. Ce silane présente une hydrophobicité réalisant un bon compromis entre le blocage de la surface empêchant l'adhésion des neurones, et la possibilité d'étaler la résine lors de l'étape de photolithographie présentée dans le paragraphe suivant.

Protocole de silanisation

La silanisation nécessite de travailler en atmosphère à hygrométrie contrôlée car les silanes comme toute molécule amphiphile forment des micelles en présence d'eau. Nous travaillons donc dans une boîte à gants sous atmosphère d'azote, en présence de silica gel. Le taux d'humidité est également contrôlé par un hygromètre pour être inférieur à 3%.

Les lamelles de verre à silaniser sont passées au plasma O_2 pendant 2min afin de les nettoyer de toute impureté. Elles sont ensuite disposées dans des boîtes de pétri, de sorte qu'elles ne se recouvrent pas. La silanisation consiste en un rinçage dans le solvant (toluène anhydre à 98%, Sigma-aldrich, ref : 244511) puis à l'exposition aux silanes (3-GPS, Sigma-aldrich, ref : 244511)

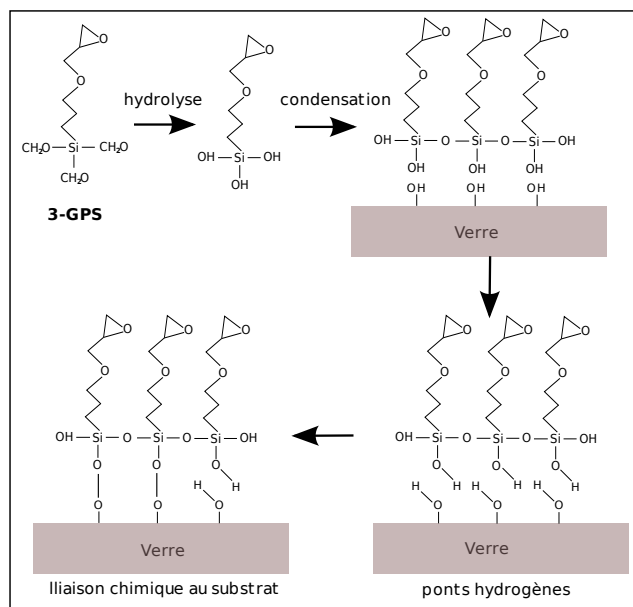


FIGURE II.1 – Schéma des étapes du greffage du methoxysilane 3GPS sur la surface de verre

à 1% (1mL de silanes pour 100mL de toluène) pendant 20min. Après trois rinçages, les lamelles sont séchées à l'azote une à une en salle blanche et stockées.

Vérification

Afin de déterminer si la silanisation s'est déroulée correctement, une mesure de l'angle de contact avant et après silanisation est possible (voir figure II.2.A). La mesure d'angle de contact rend compte de la mouillabilité d'une surface. La méthode consiste à mesurer l'angle entre la tangente du profil d'une goutte déposée sur le substrat et la surface du substrat. Plus l'angle de contact est important, plus la surface est hydrophobe. Avant l'étape de silanisation, l'angle de contact est nul puisque la goutte s'étale complètement sur la surface de verre très hydrophile du fait du plasma oxygène. Après silanisation, l'angle de contact mesure typiquement 60° (voir figure II.2.B).

II.1.2 Photolithographie

Le principe de la photolithographie consiste à réaliser un pochoir à l'aide d'une résine pour déposer une substance d'intérêt selon une géométrie particulière. Dans notre cas, le but est de contrôler la surface d'adhésion des neurones en ne déposant la molécule d'adhésion (Poly-L-Lysine) que sur la surface où on veut leur permettre l'adhésion.

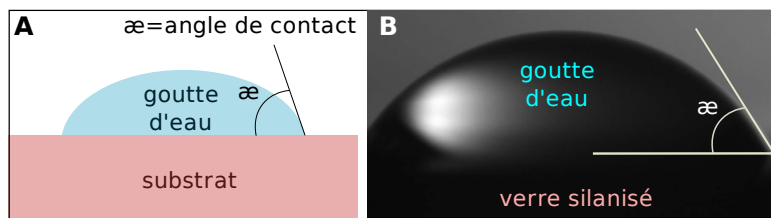


FIGURE II.2 – Mesure de l'angle de contact. A/ Principe de la mesure de l'angle de contact. B/ Goutte d'eau déposée sur un substrat de verre silanisé avec du 3-GPS.

Principe

Pour cela, une couche de résine photosensible est étalée sur le substrat à l'aide d'une tournette. Celle-ci permet d'étaler la résine tout en assurant le contrôle de l'épaisseur par la vitesse de rotation, selon la viscosité de la résine. Après une étape de recuit, le masque est placé au contact de la couche de résine dans un aligneur UV. Après une insolation de durée définie par la résine et son épaisseur, l'échantillon est exposé à une solution aqueuse basique permettant de dissoudre les zones insolées (résine positive) ou non (résine négative) : c'est l'étape de développement. Le substrat présente alors deux types de surface : avec ou sans résine.

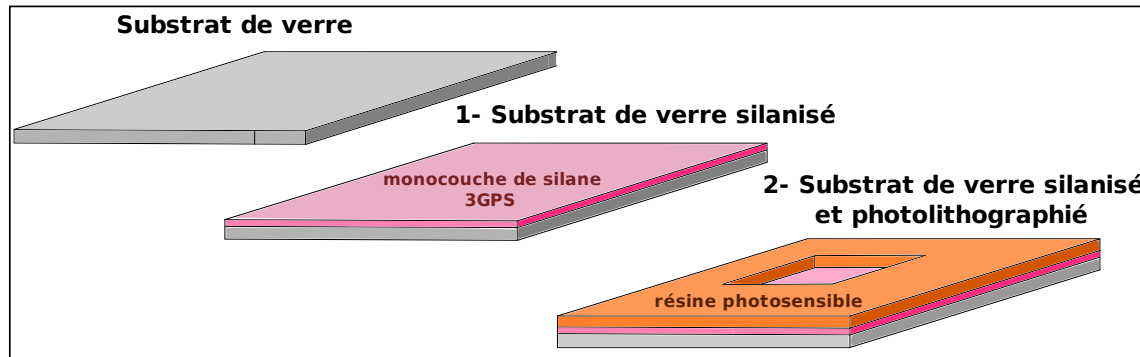


FIGURE II.3 – Schéma des deux étapes de préparation du substrat avant dépôt de la molécule adhésive. 1-Première étape : traitement de surface, pour rendre le substrat hydrophobe. 2-Seconde étape : dépôt et ouverture localisée par photolithographie d'une résine photosensible. Les zones recouvertes par la résine seront les zones non adhésives du pattern.

Les masques utilisés

Les masques utilisés sont des masques en quartz, de résolution $1\mu\text{m}$. Les géométries sont dessinées sur ordinateur grâce au logiciel libre Klayout. Les lignes de croissance des neurites mesurent au minimum $2\mu\text{m}$ en largeur du fait de la résolution optique de cette technique. L'espacement

entre deux plots cellulaires est le plus souvent de $150\mu\text{m}$ pour définir une distance raisonnable entre cellules [2].

Protocole

Les lamelles silanisées sont recouvertes de $0,5\ \mu\text{m}$ de résine S1805 (résine positive, Shipley). Cette étape est réalisée sur une tournette à 4000tr.min^{-1} pendant 30s. La lamelle est ensuite recuite sur une plaque chauffante à 115°C pendant 1min. Elle est ensuite placée dans un aligneur UV (Karlüss KG München-Garching, équipé d'une lampe mercure, de puissance comprise entre 1 et 5mW.cm^{-3}). Après avoir placé le masque au contact de l'échantillon, la résine est insolée pendant quelques secondes⁽¹⁾. La lamelle insolée est ensuite immergée dans un développeur (Microposittm Developer concentrate, Rohm Haas / Electronic Materials) pendant 1min puis rincée dans de l'eau désionisée. Pour éviter tout résidu de résine dans les zones ouvertes, la lamelle est enfin exposée à un plasma O_2 pendant 15s.

II.1.3 Rugosités

La formation de bandes rugueuses de 1mm de large repose sur une photolithographie de ces bandes suivie d'une gravure plasma. Cette gravure de puissance 50W met en jeu les gaz SF_6 (64% du volume) et O_2 (36%). Le plasma à base de SF_6 grave le silicium, mais aussi l'oxyde de silicium SiO_2 à une vitesse moins élevée, tandis que le plasma à base de dioxygène O_2 forme de l'oxyde de silicium en surface du Si nu. La combinaison de ces deux effets donne lieu à une compétition entre gravure et protection. Ce phénomène complexe définit une périodicité spatiale d'apparition de zones de SiO_2 de dimensions nanométriques, à une échelle sub-micrométrique. Nous obtenons ainsi des pics très fins de hauteur variable suivant le temps de gravure et séparés par des distances inférieures au micromètre.

II.1.4 Tranchées

Pour obtenir des tranchées, la méthode des bandes rugueuses ci-dessus a été appliquée à l'identique. Notons cependant que la faible largeur des lignes de gravure dans le cas particulier des masques utilisés (lignes de $2\mu\text{m}$ pour le guidage des neurites) a réduit la taille et le diamètre des pics formant les rugosités en fond de tranchées.

1. Le temps d'exposition est défini par la résine : la dose UV nécessaire pour la S1805 est de 15mJ.cm^{-2} . Il convient de mesurer la puissance de la lampe à mercure avant insolation et de déterminer le temps nécessaire par une règle de trois.

II.2 Culture de neurones et techniques biologiques

II.2.1 Culture de neurones d'hippocampe de souris

Les cultures de neurones sont menées selon le protocole de Banker et Goslin [3], à partir d'hippocampes (voir figure II.4) d'embryons de souris au dix-huitième jour de gestation. Cette zone du cerveau nous fournit une population de neurones relativement homogène avec peu de cellules gliales ⁽²⁾ Les neurones pyramidaux, dont le nom provient de la forme particulière de leur soma, sont des neurones excitateurs qui forment la majeure partie des neurones de l'hippocampe (plus de 80% de la population totale).

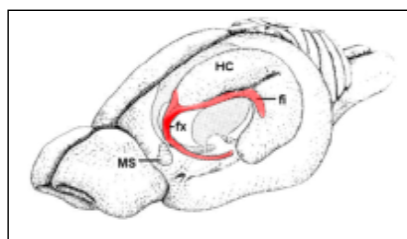


FIGURE II.4 – Schéma d'un cerveau de souris. L'hippocampe est indiqué en rouge.

Préparation des échantillons

Nos substrats photolithographiés sortis de salle blanche sont placés dans des boîtes de culture de 35mm de diamètre et recouverts de polylysine (Poly-L-lysine, Iodobromide ; Sigma) diluée à 1mg.ml^{-1} dans du tampon borate 0,1M, pH8,5. Après une nuit d'incubation à température ambiante, les boîtes sont rincées à l'eau stérile pendant une heure. Les substrats sont placés dans un récipient en verre rempli d'éthanol pur, puis soumis à des ultrasons pendant 2 min pour l'étape dite de "lift-off" (voir figure II.5). Après quatre rinçages à l'eau nos substrats reçoivent le milieu de culture DMEM (Invitrogen, +10% SVF) et sont placées dans l'étuve à 37°C en atmosphère humide, contenant 5% de CO₂ pour contrôler le pH du milieu par le tampon assuré par une concentration de 15mM de bicarbonate.

Dans le cas particulier des cultures sur Laminine, une étape supplémentaire est intercalée après le dépôt de Poly-L-Lysine car la Laminine ne se dépose pas directement sur le verre. La Laminine est diluée à $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans le DMEM sans sérum et déposée pour la nuit à 37°C puis lavée deux fois 5 minutes à l'eau avant de reprendre le protocole normal.

2. Une prolifération des cellules gliales n'est pas souhaitée dans nos patterns. Ces cellules sont insensibles aux patterns car elles parviennent à adhérer sur les silanes. Les neurones peuvent à leur tour se développer à leur surface, ce qui nous fait perdre le contrôle de leur adhésion.

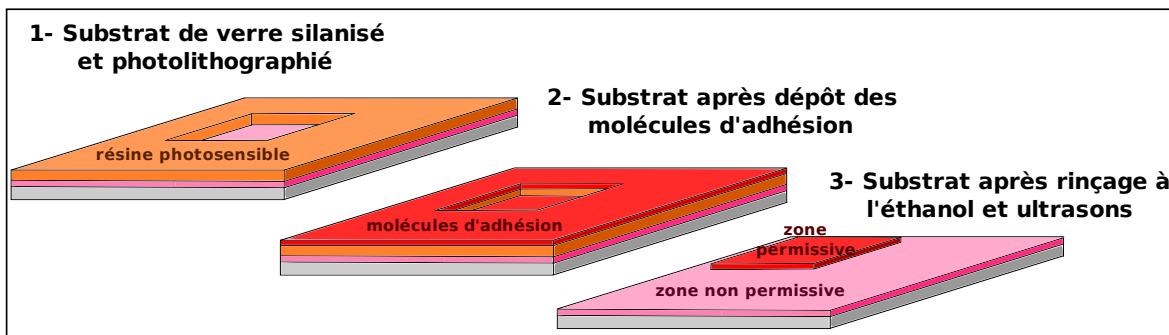


FIGURE II.5 – Préparation des substrats avant culture : lift-off de la molécule d'adhésion. 1-Substrat à la fin de l'étape de photolithographie 2-Substrat après incubation de la Poly-L-Lysine toute la nuit. 3-Substrat après passage à l'éthanol et aux ultrasons, prêt à être ensemencé.

Le même procédé est utilisé pour déposer d'autres substances que la PLL, comme notamment les pistes métalliques du projet NeuroFETs, ou encore les plots magnétiques du positionnement cellulaire.

Nous avons pu mesurer par AFM l'épaisseur d'une couche de PLL après séchage grâce à une étape de photolithographie permettant de localiser le dépôt de PLL le long d'une ligne de $3\mu\text{m}$ de largeur. La valeur mesurée de 5nm est compatible avec la structure attendue de la PLL, indiquant que nous travaillons sur une couche très fine, voire une monocouche, de cette molécule (voir figure II.6).

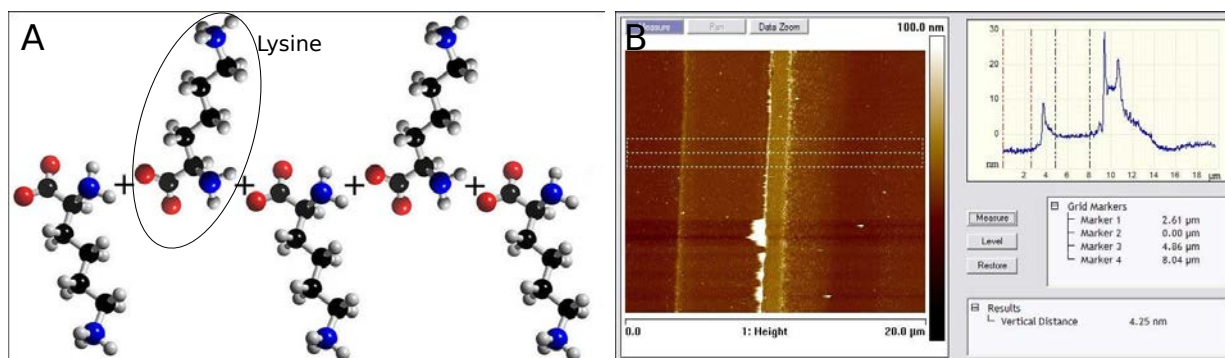


FIGURE II.6 – La Poly-L-Lysine. A/ Schéma de la structure du polymère. Les domaines amines en bout de chaîne se repoussent mutuellement car ils sont chargés positivement (NH_3^+) dans les conditions de PH utilisé en culture (pH 7,4). B/ Image d'AFM d'une ligne de PLL de $3\mu\text{m}$ de large obtenue par le procédé habituel de lift-off sur un substrat de Silicium plan. Des résidus de résine sont visibles des deux côtés de la bande, mais la différence de hauteur moyenne entre le centre de la bande et la surface de Si est d'environ 5nm .

Culture

Les hippocampes d'embryons de souris sont isolés sous une loupe binoculaire à l'aide de pinces fines et ciseaux, puis déposés dans 4,5 ml de milieu HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Invitrogen). Les cellules subissent une dissociation chimique par la trypsine (trypsine 0,05% / EDTA 0,53mM) à 37°C pendant 15min suivie d'une dissociation mécanique par pipettages successifs.

La suspension cellulaire est ensuite déposée dans les boîtes de culture préalablement conditionnées, avec une densité cellulaire typique de 15 cellules par millimètre carré, soit 1500 cellules par centimètre carré. Une heure plus tard, le DMEM / SVF 10% est remplacé par du milieu Neurobasal / B-27 2% / Glutamax (Invitrogen). La culture est maintenue dans l'étuve à 37°C en atmosphère humide contenant 5% CO₂ et complétée une fois par semaine avec du milieu frais contenant de l'Ara-C (Cytosine Arabinoside, 10μM). Cet agent antimétabolique bloque la prolifération des cellules gliales.

II.2.2 Les marquages sur cellules fixées

Les marquages sur cellules fixées consistent à marquer en fluorescence des protéines d'intérêt. Ceci est réalisé grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques à la protéine d'intérêt appelés anticorps primaires. Dans certains cas, l'anticorps primaire peut être couplé au fluorochrome. Le plus souvent cependant, un anticorps secondaire spécifique de l'IgG de l'anticorps primaire et couplé à une molécule fluorescente est utilisé, ce qui donne un plus large choix de composition des couleurs et des antigènes ciblés.

Les fixations

La méthode de fixation peut différer selon les antigènes à marquer car certains antigènes ne sont pas assez exposés pour être reconnus par l'anticorps.

Quatre types de protocoles de fixation ont été utilisés :

- le méthanol : les lamelles sont incubées 7 minutes dans du méthanol anhydre à -20°C. Ce solvant organique dissout les lipides, déshydrate les cellules et précipite les protéines en respectant l'architecture cellulaire.
- le paraformaldéhyde : les lamelles sont incubées à 37°C pendant 20 minutes avec une solution de PFA/Sucrose (paraformaldéhyde 4%, saccharose 120mM, PBS). Après 2 lavages dans du PBS, les cellules sont perméabilisées 5 minutes dans du PBS / Triton X-100 0,2%. Le Triton est ensuite éliminé par 2 lavages successifs avec du PBS. La PFA forme des ponts intermoléculaires et préserve mieux les structures membranaires que le méthanol.

- protocole pour l'utilisation de la γ tubuline, protéine marquant le centrosome. Les lamelles sont incubées à température ambiante pendant 30 minutes avec une solution de PFA/GA/triton (paraformaldéhyde 4%, glutaraldéhyde 0,5%, Triton-X100 0,1% dilué dans du PBS). Après trois lavages rapides dans deux grands bacs remplis de PBS, une solution de PBS+NaBH₄ (1mg/mL) est déposée sur les lamelles pendant 10 min pour bloquer la fluorescence du glutaraldéhyde. Cette solution est ensuite éliminée par deux lavages successifs au PBS puis un lavage au PBS Triton 0,1%
- dans le cas particulier de l'imagerie au microscope électronique à balayage, le protocole précédent est adapté afin de ne pas perméabiliser les membranes (donc sans Triton). L'échantillon est ensuite déshydraté par trempages successifs de 5min dans 50% puis 100% d'acétone, puis 50% et 100% de HMDS (HexaMethylDiSilazane). Nous laissons ensuite l'échantillon sécher sous hotte de chimie : le HMDS est un solvant volatil dont la tension superficielle est particulièrement faible, ce qui permet de laisser sécher les cellules en altérant au minimum leur structure.

Immuno-fluorescence

Pour les fixations méthanol et paraformaldéhyde, nous utilisons le protocole suivant. Après réhydratation des cellules dans du PBS - Tween 20 0,1% (PBS-T), les lamelles sont recouvertes d'une solution de PBS-T contenant les anticorps primaires pendant une heure à température ambiante. Les lamelles sont ensuite lavées dans du PBS-T puis sont incubées 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité avec l'anticorps secondaire (dilué dans du PBS-T). L'ADN des cellules est ensuite coloré avec un agent intercalant, l'Hoescht 33258 (1 μ g/ml) pendant cinq minutes. Les lamelles sont déshydratées dans de l'éthanol et montées sur des lames de verre à l'aide du liquide de montage FluorSave™ (Calbiochem).

Dans le cas particulier de l'utilisation de la γ tubuline, le protocole diffère légèrement. La dilution des anticorps ainsi que les lavages intermédiaires s'effectuent dans du PBS-Triton 0,1% au lieu du PBS-Tween 0,1%. A la fin de l'immunofluorescence, les lamelles sont trempées dans de l'eau bi-distillée assez rapidement puis sont séchées à l'air libre sur du papier. Elles sont ensuite montées sur lames de verre avec du liquide de montage Dako. Notre interprétation de cette recette empirique est que le séchage aplanit les cellules, ce qui facilite la visualisation du centrosome dans un plan unique.

Les anticorps utilisés

La liste des anticorps primaires utilisés est indiquée dans la table ci-dessous.

Nom de l'anticorps	Fournisseur	Protéine marquée et localisation	Espèce	Dilution
Ankyrine G	Santa Cruz	Ankyrine G : protéine concentrée au niveau du segment initial de l'axone	souris	1/100
YL 1/2	produit au laboratoire	Tubuline tyrosinée	rat	1/10 000
Tau-1	Millipore	Tau : molécule associée aux microtubules (MAP) spécifique de l'axone	souris	1/1000
γ -tubuline	don de Michel Bornens	γ -tub, concentrée au niveau du centrosome	lapin	1/100

Les anticorps secondaires de chèvre dirigés contre les IgG de lapin, de rat ou de souris sont dilués au dilution au 1/1000^e et couplés à la Cyanine 3 (Molecular Probes), à la Cyanine 5 (Molecular Probes), ou à l'Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)

Pour le marquage de l'actine, nous utilisons de la phalloïdine-Texas-Red ou phalloïdine-A546, utilisée au 1/200^e en même temps que les anticorps secondaires. Pour le marquage du noyau, nous utilisons du hoechst à la fin de l'immuofluorescence, pour sa propriété d'intercalant de l'ADN.

II.3 Observations des cellules

II.3.1 Acquisition

Les cellules sont observées au microscope (Zeiss Axioscope ou Olympus BX51) et les acquisitions d'images en fluorescence sont effectuées à l'aide d'une caméra CCD (CoolSnap ES, Roper Scientific ou F-ViewII, Cool Snap) pilotée par un logiciel d'acquisition (Metavue, Universal Imaging Corporation ou un programme développé sous Labview, National Instruments).

Sur motifs géométriques, il est nécessaire de définir une règle en ce qui concerne le choix des cellules préalablement à leur comptage : une très grande proportion de cellules ne sont en effet pas positionnées sur le plot cellulaire, ou pas parfaitement. Le critère de choix que nous avons systématiquement respecté est qu'au moins la moitié du noyau doit être présente sur le plot cellulaire.

II.3.2 Vidéo-microscopie

Des vidéo-microscopies de neurones en contraste de phase ou en fluorescence ont été réalisées grâce à une station équipée d'un microscope Zeiss Axovert 200M, d'une lampe Excite et d'une caméra Cool Snap HQ photometrics. Une chambre d'incubation équipée de contrôleurs de température et de CO₂ permet de maintenir une température constante de 37°C et un pourcentage de 5% de CO₂ dans un air saturé en humidité. Le multi-positionnement ainsi que l'acquisition de

multiples plans à hauteur variable peuvent être réalisés grâce à une platine motorisée (maxhauser) ainsi qu'un piezo (E662 Amplifier. servo LVPZT) pilotés par le logiciel Metamorph.

Le délai typique entre deux acquisitions pour l'observation de cellule entière est de $1min$ afin de suivre avec une résolution temporelle adaptée la dynamique du cône de croissance ou des structures dynamiques se propageant sur les neurites à des vitesses de $3\mu m.min^{-1}$ environ. Pour obtenir une meilleure survie et selon la période d'observation visée, les cellules sont en général filmées après une phase de $4h$ à $24h$ dans un incubateur classique.

II.4 Méthodes statistiques

Les outils statistiques que nous utilisons s’appliquent aux grands échantillons, ce qui signifie que les populations les plus faibles rencontrées doivent être supérieures ou égales à 5.

Notations :

- N : nombre total d’échantillons (en général il s’agit du nombre de cellules)
- p : probabilité observée
- α : seuil de confiance ou “risque”, conventionnellement fixé à 5%.

II.4.1 Comparer un pourcentage observé à un pourcentage théorique

Pour déterminer si un pourcentage p observé sur N échantillons est significativement différent d’un pourcentage théorique p_0 , nous utilisons la formule II.1 qui permet de calculer ε , l’écart réduit. La valeur du seuil de confiance α détermine alors, grâce à la table de la figure II.7, la valeur que ε doit dépasser pour que la différence entre p et p_0 soit considérée comme significative avec $\alpha\%$ d’erreur. La valeur de α fixe donc le degré de signification au travers de la valeur du ε limite.

$$\varepsilon = \frac{|p_0 - p|}{\sqrt{\frac{p_0(1 - p_0)}{N}}} \tag{II.1}$$

α	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,00	α	2,576	2,326	2,170	2,054	1,960	1,881	1,812	1,751	1,695
0,10	1,645	1,598	1,555	1,514	1,476	1,440	1,405	1,372	1,341	1,311
0,20	1,282	1,254	1,227	1,200	1,175	1,150	1,126	1,103	1,080	1,058
0,30	1,036	1,015	0,994	0,974	0,954	0,935	0,915	0,896	0,878	0,860
0,40	0,842	0,824	0,806	0,789	0,772	0,755	0,739	0,722	0,706	0,690
0,50	0,674	0,659	0,643	0,628	0,613	0,598	0,583	0,568	0,553	0,539
0,60	0,524	0,510	0,496	0,482	0,468	0,454	0,440	0,426	0,412	0,399
0,70	0,385	0,372	0,358	0,345	0,332	0,319	0,305	0,292	0,279	0,266
0,80	0,253	0,240	0,228	0,215	0,202	0,189	0,176	0,164	0,151	0,138
0,90	0,126	0,113	0,100	0,088	0,075	0,063	0,050	0,038	0,025	0,013

La probabilité α s’obtient par addition des nombres inscrits en marge

Exemple : Pour $\varepsilon = 1,960$ la probabilité $\alpha = 0,00 + 0,05 = 0,05$

Table pour les petites valeurs de la probabilité

α	0,001	0,000 1	0,000 01	0,000 001	0,000 000 1	0,000 000 01	0,000 000 001
ε	3,290 53	3,890 59	4,417 17	4,891 64	5,326 72	5,730 73	6,109 41

FIGURE II.7 – Table de correspondance entre l’écart réduit ε et le risque α .

D’après le seuil conventionnel des 5%, si $\varepsilon < 1,96$, la différence n’est pas significative, si

$\varepsilon > 1,96$, la différence est significative, avec pour risque $\alpha = 0,05$. Si ε est nettement supérieur à 1,96, la table de correspondance permet de déterminer la marge d'erreur correspondante en cherchant la plus grande valeur de la table inférieure à ε .

II.4.2 Trouver l'intervalle de confiance à 95% d'un pourcentage observé

En adaptant le raisonnement précédent, nous pouvons calculer les bornes p_{inf} et p_{sup} qui définissent l'intervalle dans lequel nous avons 95% de chance que la valeur réelle de ce pourcentage se situe. La formule II.2 montre que la taille de cet intervalle se réduit proportionnellement à $\frac{1}{\sqrt{N}}$.

$$[p_{inf}; p_{sup}] = p \pm 1,96 \sqrt{\frac{p \cdot (1 - p)}{N}} \quad (\text{II.2})$$

Cette formule est donnée pour une marge d'erreur $\alpha = 5\%$ (car $95\% = 100\% - 5\%$), mais s'adapte naturellement en modifiant la valeur de l'écart réduit (ici 1,96).

II.4.3 Comparer deux pourcentages observés

Pour déterminer si deux pourcentages observés p_1 et p_2 sur respectivement N_1 et N_2 échantillons sont significativement différents, nous calculons d'abord le pourcentage évalué sur les deux populations, p_0 :

$$p_0 = \frac{p_1 \cdot N_1 + p_2 \cdot N_2}{N_1 + N_2}$$

Ensuite, l'écart réduit se calcule par la formule II.4. De même que pour le paragraphe précédent, si $\varepsilon > 1,96$, la différence est significative avec un risque de 5%. De même également, l'écart réduit ε nous permet de déterminer le risque α , fixant le degré de signification.

$$\varepsilon = \frac{|p_1 - p_2|}{\sqrt{\frac{p_0(1 - p_0)}{N_1} + \frac{p_0(1 - p_0)}{N_2}}} \quad (\text{II.3})$$

II.4.4 Comparer des pourcentages observés au sein d'une même population

Lorsque l'on veut savoir si un ensemble de n pourcentages non indépendants notés $p_1, \dots, p_i, \dots, p_n$ (avec $\sum_{i=1}^n p_i = 1$) sur N échantillons sont significativement différents, la procédure est différente. A titre d'exemple, il pourrait s'agir des pourcentages de neurones dont l'axone est à droite ou à gauche sur un substrat présentant une certaine asymétrie (dans ce cas on aurait $n = 2$). L'idée n'est pas de comparer les pourcentages entre eux, car ils ne sont pas indépendants, mais de com-

parer la distribution à une distribution théorique $(p_{1théo}, \dots, p_{ithéo}, \dots, p_{nthéo})$. Dans notre exemple la distribution théorique pourrait être 50% des axones à gauche et 50% à droite. Le principe du calcul est d'évaluer la somme des différences des carrés des nombres d'événements expérimentaux et théoriques :

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(N \cdot p_i - N \cdot p_{ithéo})^2}{N \cdot p_{ithéo}} \quad (\text{II.4})$$

Ensuite, cette valeur de χ^2 sera comparée à la valeur limite déterminée à la fois par le nombre de degrés de liberté (DDL) (ici DDL = $n - 1$) et par le risque α . La table II.1 référence les valeurs de cette limite dans les cas les plus courants, c'est-à-dire à faible nombre de degrés de libertés et aux risques classiques de 5%, 1% et 0,1%.

DDL	$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,001$
1	3,84	6,64	10,83
2	5,99	9,21	13,82
3	7,82	11,35	16,27
4	9,49	13,28	18,47
⋮			

TABLE II.1 – Valeurs limites de χ^2 les plus fréquemment rencontrées. Le risque α pour un nombre de degrés de libertés donné détermine la valeur de χ^2 à dépasser pour pouvoir considérer qu'une différence entre les distributions théorique et expérimentale est significative.

II.4.5 Comparaison de séries de mesures

Afin de comparer deux à deux les séries de mesures quantitatives que nous avons effectuées (par exemple la longueur des neurites sur zone plane ou rugueuse), nous vérifions d'abord la normalité des distributions des données de chaque série par le test de Kolmogorov-Smirnov. Dans le cas où la distribution n'est pas normale mais plutôt semblable à une loi de poisson, nous calculons le logarithme népérien et la racine des valeurs pour sélectionner la meilleure représentation du point de vue du résultat au test de Kolmogorov-Smirnov. Ensuite, le test de Student bilatéral pour échantillons à variance égale est appliqué, ce qui donne la valeur p couramment nommée p -value du test de Student. La différence est considérée comme significative avec une marge d'erreur α si $p < \alpha$ (*i.e.* $p < 0.05$ pour une marge d'erreur à 5%).

II.5 Analyse d'images

II.5.1 Mesures de longueurs neuritiques

Les mesures automatiques des longueurs des neurones réalisées dans le cadre des rugosités (voir Chap1) sont effectués sur le logiciel libre ImageJ [4] par un *plugin* que nous avons programmé. Le principe consiste à seuiller l'image des microtubules en fluorescence puis à squelettiser le signal par la méthode de Zhang et Suen [5] pour que les neurites et les somas se résument à des lignes d'épaisseur constante. La mesure de la longueur totale sur l'image s'effectue alors simplement à partir de la surface totale du signal sur l'image, divisée par la largeur des lignes obtenues (3 pixels). Notons que cette méthode est plus précise qu'une squelettisation donnant des lignes de 1 pixel de large car elle réalise moins d'erreurs dans l'évaluation de la longueur des neurites dans l'axe diagonal des pixels (remarque théorique confirmée par comparaison à une mesure manuelle). Le nombre de cellules sur l'image est déterminé par un comptage manuel. Enfin, le rapport de la longueur totale sur le nombre de cellules donne la moyenne de longueur des cellules sur l'image. Notons que nombre de cellules ont des neurites qui sortent de l'image, mais il y a statistiquement autant de neurites qui entrent dans l'image.

Outre les fonctions pratiques de manipulation de données, la partie de traitement de données de ce programme se résume à ces commandes ImageJ :

```
IJ.run("Median...", "radius=2");
IJ.run("Remove Outliers...", "radius=0 threshold=50 which=Dark");
IJ.run("Dilate");
IJ.run("Skeletonize");
IJ.run("Dilate");
IJ.run("Remove Outliers...", "radius=3 threshold=50 which=Dark");
IJ.run("Set Measurements...", "area mean standard modal min area_fraction redirect=None decimal=3");
IJ.run("Measure");
```

Pour toutes les autres applications, les mesures de longueurs et de surfaces sont réalisées manuellement par l'outil de lignes segmentées sur ImageJ. De même pour les angles.

Analyse des points d'adhésion des neurites sur rugosité

Pour caractériser l'interaction des neurones avec la rugosité, nous avons sélectionné des neurites comparables sur chaque échantillon. Le critère d'identification de cette population est notamment le diamètre du neurite qui influence fortement la possibilité de repérer ses contacts adhésifs avec les rugosités. Pour cela, la portion de neurite observée doit être à une distance inférieure à $100\mu\text{m}$ d'un cône de croissance pour que son diamètre ne soit pas trop grand. De plus, elle doit être dans l'axe horizontal de l'image du fait de l'inclinaison (*tilt*) de 30° du porte-échantillon du micro-

scope électronique à balayage pour que les longueurs à mesurer respectent l'échelle indiquée par le microscope.

II.6 Analyse des vidéos

II.6.1 Images

Analyse cellulaire globale

Un programme a été développé sous MATLAB dans l'équipe pour la reconnaissance automatique des divers éléments d'un neurone (soma, extrémités neuritiques), permettant par exemple l'évaluation des longueurs neuritiques. Les différentes étapes de ce programme sont décrites brièvement dans la figure II.8.

Une fois les neurites identifiés (voir figure II.9), un ajustement de leurs formes est effectué par une courbe de type "smooth" dont la longueur est ensuite calculée. Ce programme fonctionne bien pour des images sans trop d'objets parasites à la cellule. Dans le cas contraire, une analyse manuelle est effectuée. Nous avons par ailleurs vérifié que les deux types d'analyse menées sur une même vidéo donnaient des résultats très similaires.

Position des vagues

Ces structures étant très dynamiques, et donc de morphologie très changeante, nous nous sommes orientés ⁽³⁾, vers une reconnaissance manuelle de leur position dans les neurones à deux neurites que nous avons étudiés. Les vagues étant de plus des structures très étendues, leur pointage est intrinsèquement affecté d'une grande incertitude. Comme le montre la figure II.10, nous avons néanmoins donné comme critère de reconnaissance du centre de la vague la frontière entre une zone relativement dense et la structure de type lamellipode, plus transparente, située à l'avant de la vague. L'incertitude sur leur position latérale est estimée à $\pm 3\mu m$.

II.6.2 Traitement des données issues des vidéos

Les étapes précédentes permettent l'établissement d'un fichier numérique contenant en fonction du temps les données de position du soma, des extrémités des neurites, des vagues ainsi que les longueurs neuritiques des neurones à deux neurites étudiés. Lorsqu'une vague parcourt un neurite, droit ou gauche, ses coordonnées figurent dans ce fichier. Des zéros codent pour l'absence de vague et autoriseront ainsi une reconnaissance automatique de la survenue de ces structures grâce à un

3. Tout comme Ruthel et Banker, références du domaine

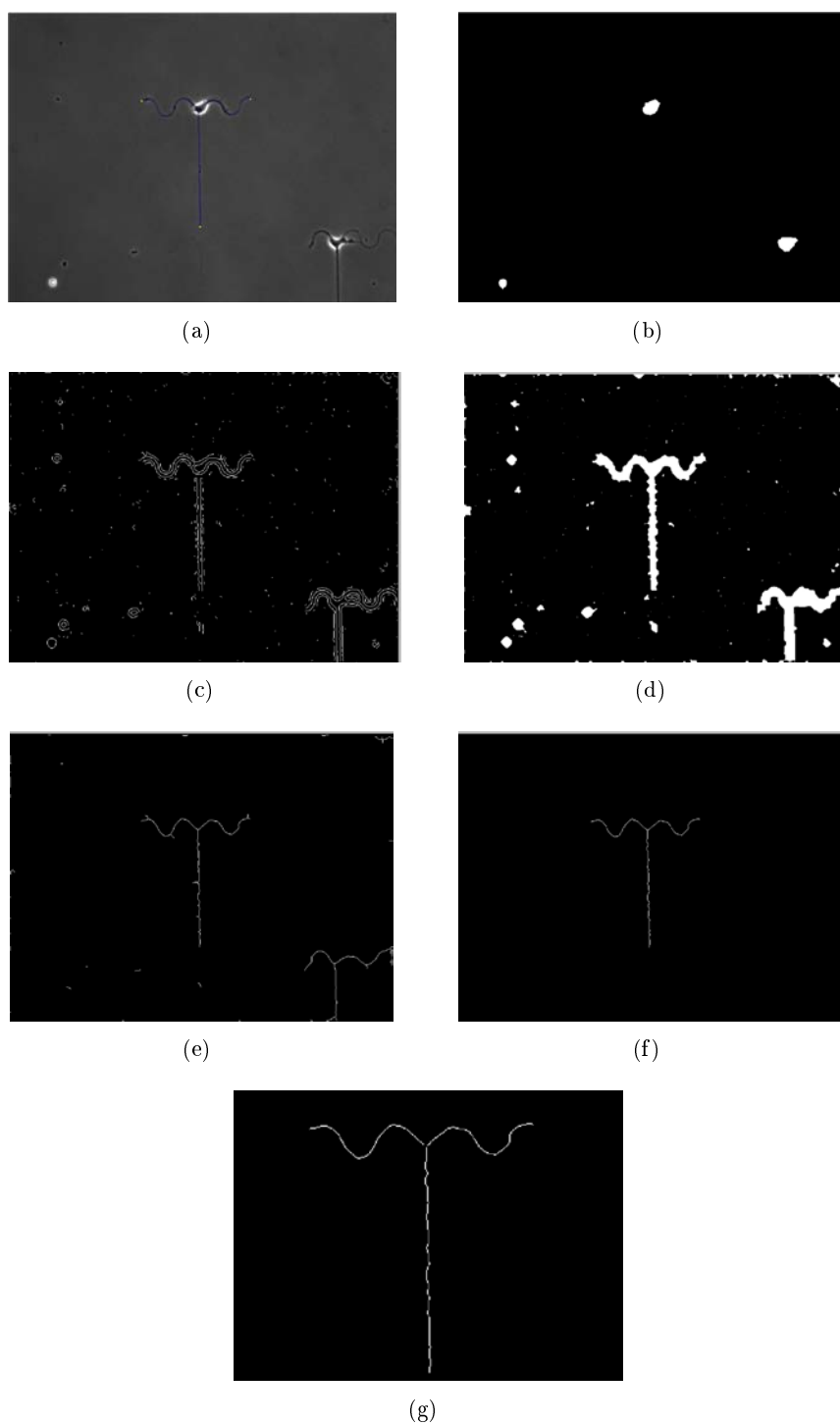


FIGURE II.8 – **Les différentes étapes du programme.** (a) Image initiale. (b) Repérage du soma du neurone d'intérêt. (c) Reconnaissance des bords de la cellule. (d) Dilatation et remplissage de l'objet précédent. (e) Squelettisation. (f) Nettoyage de l'image squelettisée. (g) Reconnaissance individuelle des neurites par recherche du point de croisement.

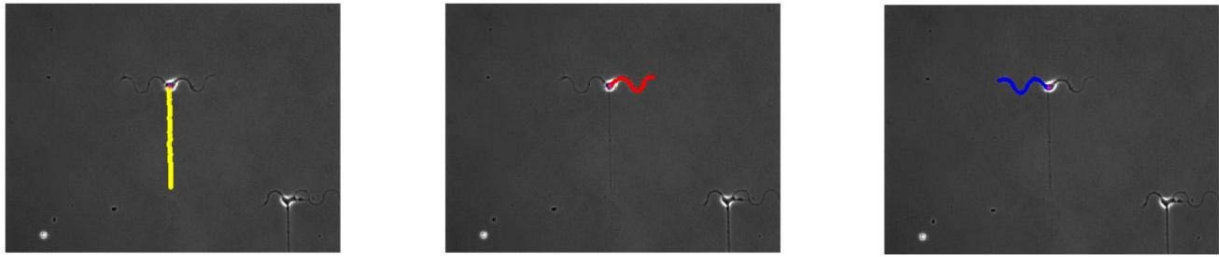


FIGURE II.9 – **Produit final du programme** : identification des neurites séparés du reste du corps cellulaire.

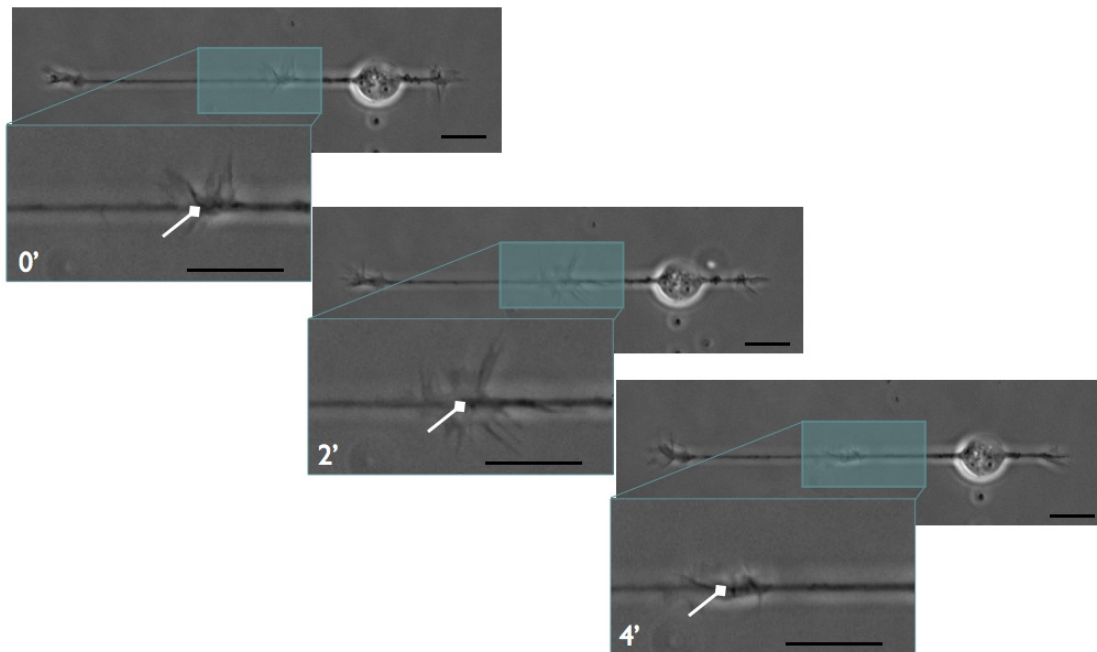


FIGURE II.10 – **Pointage de la position d'une vague**. Barres d'échelle : 14 μm .

ensemble de routines écrites sous le code Octave (clone de Matlab libre). Celles-ci permettent ensuite d'extraire automatiquement les informations suivantes :

- les numéros d'images de début et de fin de propagation d'une vague
- la vitesse des vagues
- la vitesse du soma
- l'amplitude de déplacement d'une vague
- l'amplitude de déplacement du soma
- les variations de positions des extrémités de neurites
- les variations de longueurs neuritiques
- l'ordre dans lequel apparaissent les vagues sur l'un ou l'autre des neurites

– les probabilités conditionnelles liées au routage gauche/droite des vagues

Des fichiers sont générés automatiquement pour la mise en forme de ces données. Un exemple de routine est présentée dans la figure II.11.

```

***** Analyse des caractéristiques du neurite gauche (NG)
L=load('Pos5H_Cal_data.txt'); %fichier contenant successivement les colonnes | Temps(min) | xsoma | xVAG | xVAD | x Gtip | x Rtip | LNG | LNR |
n=length(L);
i=1;
j=1;
while (i<=n)
if (L(i,3)==0)
i=i;
else
j=i;
str=num2str(j); % repérage du début d'une vague
filename=strcat("LAW", str, ".txt"); % Formation du nom du fichier contenant les coordonnées de cette vague
filenameresl=strcat("ResLAW", str, ".txt"); % Formation du nom du fichier contenant les données synthétiques des vagues successives
%
while (L(i,3)>0) % Reconnaissance et extraction des coordonnées d'une vague
fid=fopen(filename, "a+");
y=[L(i,1), L(i,2), L(i,3), L(i,4)]; % Ecriture de ces coordonnées
fprintf(fid, '%6.2f %6.2f %6.2f %6.2f\n', y)
fclose(fid);
i++;
endwhile
F=load(filename);
p=polyfit(F(:,1),F(:,3),1); % Calcul de la vitesse de la vague (ajustement linéaire)
q=polyfit(F(:,1),F(:,2),1); % Calcul de la vitesse du déplacement correspondant du soma (ajustement linéaire)
fid=fopen(filenameresl, "a+"); % Remplissage du fichier de synthèse
z=[j, i-1, L(j,2)-L(i-1,2), L(j,3)-L(i-1,3), abs(p(1)), abs(q(1)), L(j,5)-L(i-1,5), L(j,7)-L(i-1,7)];
% départ VAG | fin VAG | Δxsoma | ΔxVAG | vitesse VAG | vitesse Soma | Δx Gtip | ΔLNG |
fprintf(fid, '%6.2f %6.2f %6.2f %6.2f %6.2f %6.2f %6.2f %6.2f\n', z)
fclose(fid);
endif
i++;
endwhile

```

FIGURE II.11 – Routine sous Octave d'analyse des paramètres dynamique d'un neurite (neurite gauche).

Bibliographie

- [1] Y. Nam, D.W. Branch, and B.C. Wheeler. Epoxy-silane linking of biomolecules is simple and effective for patterning neuronal cultures. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(5) :589–597, 2006. 51
- [2] Y. Ikegaya, Y. Itsukaichi-Nishida, M. Ishihara, D. Tanaka, and N. Matsuki. Distance of target search of isolated rat hippocampal neuron is about 150 [μ] m. *Neuroscience*, 97(2) :215–217, 2000. 54
- [3] K. Goslin and G. Banker. Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of cell biology*, 108(4) :1507, 1989. 55
- [4] M.D. Abràmoff, P.J. Magalhães, and S.J. Ram. Image processing with imagej. *Biophotonics international*, 11(7) :36–42, 2004. 64
- [5] TY Zhang and C.Y. Suen. A fast parallel algorithm for thinning digital patterns. *Communications of the ACM*, 27(3) :236–239, 1984. 64

Deuxième partie

Développement neuronal sur motifs d'adhésion : de la compétition neuritique à la polarisation axonale

Chapitre III

Etude de la croissance de neurones sur géométries bipolaires

Sommaire

III.1 Croissance de neurones sur lignes	75
III.1.1 Mouvement oscillatoire sur lignes de $2\mu m$	75
III.1.2 Mouvements du noyau et du centrosome	76
III.1.3 Développement et polarisation sur lignes de $2\mu m$	79
III.1.4 Mouvement oscillatoire sur lignes de $4\mu m$	80
III.2 Croissance de neurones bipolaires sur plots	81
III.3 Discussion	84
III.3.1 Aspects mécaniques de la croissance neuritique	84
III.3.2 Importance des vagues dans la compétition neuritique	86
III.3.3 Génération et propagation des vagues	87
III.3.4 Développement neuritique et polarisation	89
III.3.5 Perspectives	90
III.3.6 Résultats post-rédaction	91

III.1 Croissance de neurones sur lignes

L'un des objectifs de cette thèse est l'étude de la polarisation axonale *in vitro*, dans une perspective originale grâce à l'utilisation des motifs d'adhésion. Une phase de croissance neuronale particulière est déterminante pour la polarisation axonale : la compétition neuritique. Comme nous l'avons vu en p.32, cette compétition consiste en une croissance alternée des neurites en vue de la sélection de la direction de l'axone. Dans le but d'étudier cette compétition dans un système minimal, nous avons construit des motifs d'adhésion à une dimension où chaque neurone possède au plus deux neurites. Ces expériences sont menées sur des neurones hippocampiques, pour lesquels les phases de croissance sont liées à des structures dynamiques et propagatives appelées vagues d'actine dans la littérature (voir p. 67). Sur la base de cette configuration originale de croissance neuritique, l'objet de ce chapitre est l'exploration du rôle des vagues dans la compétition neuritique.

III.1.1 Mouvement oscillatoire sur lignes de $2\mu m$

La plus forte contrainte de l'environnement cellulaire que nous avons réalisée est la réduction de la zone d'adhésion à une bande de largeur de $2\mu m$ de Poly-L-lysine (PLL). Dans de telles conditions, le développement des neurones au stade 2 suivi par vidéo-microscopie se caractérise par un phénomène oscillant du corps cellulaire, qui s'effectue en phase avec la croissance alternée des neurites. En effet, comme le montre la figure III.1, une séquence de croissance typique consiste en la succession de quatre phénomènes :

- Tout d'abord, une vague émerge du soma et se propage vers l'extrémité du neurite à une vitesse moyenne de $2,6\mu m.min^{-1}$.
- Lorsque la vague émerge du soma, celui-ci se met en mouvement et suit sa progression, à une vitesse toutefois moins importante : $0,63\mu m.min^{-1}$ en moyenne.
- La vague induit une rétraction du neurite en s'approchant de l'extrémité.
- Puis la vague fusionne avec le cône de croissance et entraîne une hausse de l'activité de croissance.

Il apparaît donc que les vagues génèrent des forces capables de tracter le corps cellulaire s'il dispose d'une faible surface d'adhésion, ce qui est le cas ici puisque seulement une fraction de la surface du soma repose sur une zone recouverte de PLL. Après une durée moyenne de $12min$ suivant l'émission de la vague (voir table III.1), une autre vague est générée, le plus souvent dans le neurite opposé.

Pour quantifier ce phénomène, nous avons eu recours au calcul des probabilités conditionnelles caractérisant le routage des vagues. Nous avons ainsi compté le nombre de couples de vagues

émises successivement dans le neurite droit $N(DD)$, gauche $N(GG)$ et alternativement dans les deux neurites ($N(GD)$ et $N(DG)$). Ces comptages s'effectuent de manière automatique à partir d'un fichier source contenant toutes les données de positions relatives à une vidéo : coordonnées des vagues, mais aussi du soma et des extrémités neuritiques (voir le chapitre Matériel et Méthodes p. 67). À partir de ces notations, la probabilité d'émission d'une vague sur le neurite gauche sachant que la précédente s'est également propagée sur ce neurite s'écrit :

$$P(G|G) = \frac{N(GG)}{N(GD) + N(GG)}$$

De même pour les trois autres possibilités :

$$P(D|G) = \frac{N(GD)}{N(GD) + N(GG)}$$

$$P(G|D) = \frac{N(DG)}{N(DG) + N(DD)}$$

$$P(D|D) = \frac{N(DD)}{N(DG) + N(DD)}$$

Pour prendre en compte le fait que le motif est symétrique, nous pouvons également condenser ces quatre probabilités conditionnelles en deux valeurs, qui expriment la probabilité d'avoir une vague émise dans le même sens que la précédente ou dans un sens opposé. Comme la somme de ces deux probabilités doit valoir 1, une seule de ces valeurs suffit à caractériser le mode d'émission des vagues. Dans le reste de ce chapitre, nous nous intéresserons donc au "taux de répétition", qui est la quantité $P(G|G + D|D)$ représentant la probabilité que deux vagues consécutives soient émises dans un même neurite.

$$P(G|G + D|D) = \frac{N(GG) + N(DD)}{N(Total)}$$

Ce taux est ici de 24%, significativement différent d'un taux aléatoire de 50% ($\varepsilon = 6,4$). Cela signifie que les vagues sont préférentiellement émises alternativement dans chaque direction. Cette alternance des vagues et la force qu'elles génèrent sont donc responsables d'un mouvement oscillant du soma, d'amplitude maximale de l'ordre de $30\mu m$.

III.1.2 Mouvements du noyau et du centrosome

Afin d'étudier ce mouvement caractéristique du soma, nous avons localisé la position du centrosome et du centre du noyau par rapport au centre du soma, pour les mettre en regard de la position des vagues, sur cellules fixées à $2DIV$ (voir figure III.2). Toutes les mesures sont prises depuis le centre du soma, et dans l'axe de la ligne d'adhésion car le noyau et le centrosome sont toujours

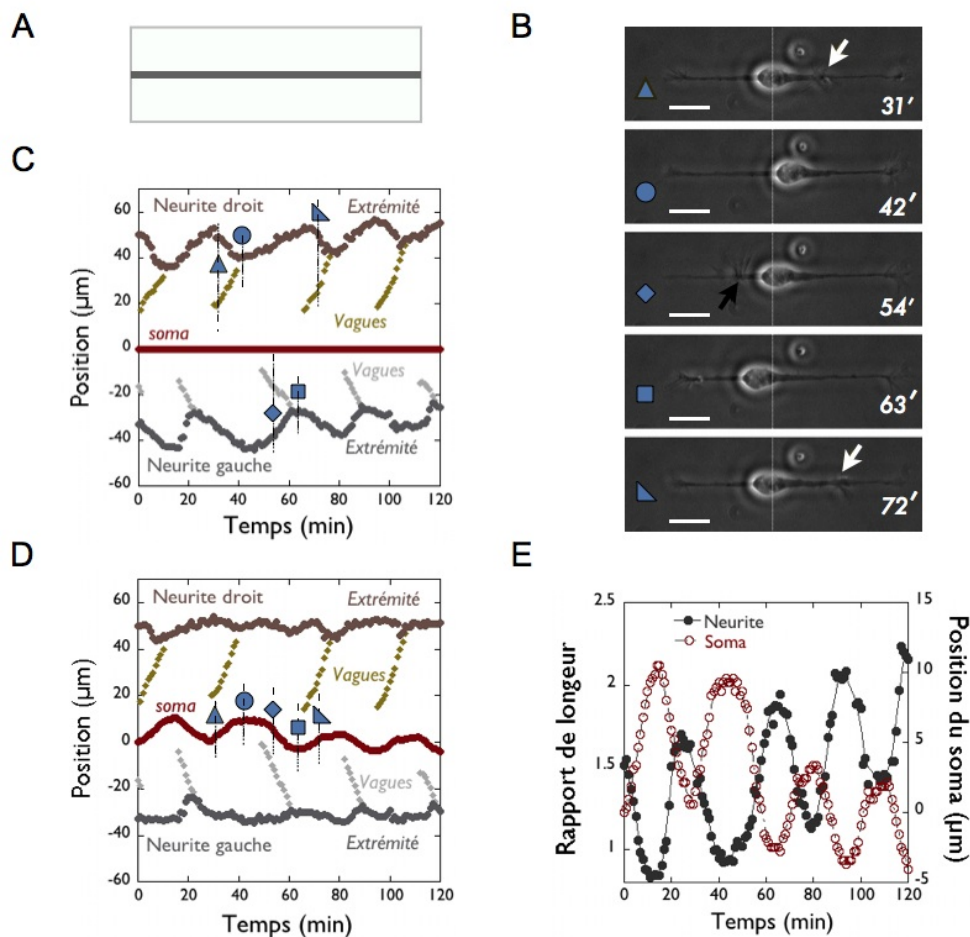


FIGURE III.1 – Les vagues induisent un mouvement oscillant du soma sur lignes de $2\mu\text{m}$. **A/** Le masque utilisé est constitué d’une simple ligne d’adhésion de $2\mu\text{m}$ de large. **B/** Séquence de vidéo-microscopie illustrant le mouvement oscillant du soma (barres : $10\mu\text{m}$). Notons que les neurites s’allongent ou rétrécissent mutuellement du fait de ce mouvement. Les formes géométriques se retrouvent dans les graphes suivants. **C/** Graphe temporel de la position des vagues et des extrémités neuritiques par rapport à un système de coordonnées attaché au centre du soma. Cette représentation illustre les variations de longueur des neurites sous l’effet des vagues. **C/** Variation du graphe précédent où les positions sont données par rapport à un référentiel fixe (substrat), la position initiale du soma fixant l’origine des coordonnées. Les extrémités neuritiques subissent presque systématiquement des phases de rétraction suivies d’un pic de croissance, qui s’ajoutent au rétrécissement ou à l’élongation dues au mouvement du soma. **(E)** Le rapport des longueurs des deux neurites suit des variations identiques à la position du soma, en opposition de phase (ou en phase selon le sens de ce rapport).

centrés sur cet axe. La question qui motive cette observation est de savoir comment ces organites se déplacent lorsque le soma est tiré par la vague. Nous avons accès à un scénario descriptif de ces mouvements grâce au fait que, sur un ensemble de cellules, nous trouvons des vagues à différentes positions le long des neurites. Ainsi, le tracé de la position d’un organite dans le corps cellulaire en fonction de la distance vague-soma peut être interprété comme une représentation temporelle

Période d'émission	Taux de répétition	Vitesse	Amplitude de mouvement du soma	Rétraction	Allongement
14min	22%	$2,46\mu m \cdot min^{-1}$	$4,13\mu m$	$3,1\mu m$	$3,6\mu m$

TABLE III.1 – **Caractéristiques des vagues sur lignes de $2\mu m$.** ($n = 151$ vagues, 3 cellules sur 2 cultures) La période d'émission concerne indistinctement les vagues parcourant les deux neurites. Le taux de répétition représente quant à lui une probabilité conditionnelle sur la direction d'émission des vagues : c'est la proportion de vagues émises dans la même direction que la vague qui les précédait. Dans le cas où les vagues seraient émises de façon aléatoire, le taux de répétition serait donc de 50%.

du mouvement de cet organite étant donné que les vagues s'éloignent progressivement du soma.

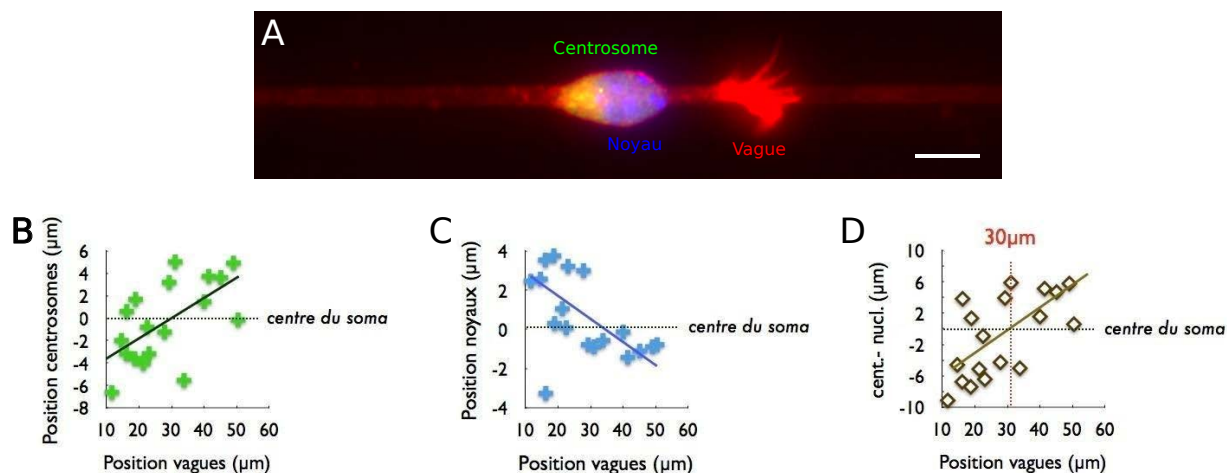


FIGURE III.2 – **Mouvement du centrosome et du noyau selon la distance parcourue par les vagues sur lignes de $2\mu m$.** **A/** Exemple d'un neurone à 2DIV sur lignes de $2\mu m$. Le noyau est décalé dans la direction de la vague la plus récente (la plus proche), et prend une forme de "cœur" qui indique la présence de contraintes importantes à l'entrée du neurite dans lequel la vague commence à progresser. Le centrosome (point vert) est le plus souvent du côté opposé au noyau lors de l'émission de la vague. **B/** Parmi les cellules qui n'ont qu'une vague visible, nous voyons que le centrosome est d'abord positionné à l'arrière du soma (du point de vue de la vague), puis il migre progressivement vers l'avant du corps cellulaire. Notons que dans les cas où la cellule possède deux vagues, la même tendance est observée pour les vagues "récentes", c'est-à-dire les plus proches du soma. **C/** La tendance est exactement inverse en ce qui concerne la position du centre du noyau. **D/** Cela se traduit par l'inversion progressive de la position relative centrosome-noyau en fonction de la distance parcourue par la vague. Lignes épaisses : ajustements linéaires.

Marquages fluorescents : actine-F (phalloïdine-TxRed, rouge); centrosome (γ -tubuline, vert); noyau (Hoechst, bleu). | Barre : $10\mu m$

Les mesures effectuées à partir de neurones ne possédant qu'une seule vague sur un de leurs neurites montrent que le noyau et le centrosome inversent presque systématiquement leurs positions respectives dans le soma, au fur et à mesure que la vague s'éloigne. En effet lorsque la vague vient d'être émise dans un neurite donné (c'est à dire lorsque nous l'observons proche du soma), le centrosome est positionné dans la moitié opposée du soma, tandis que le noyau est souvent déformé

et s'engage dans le neurite où la vague est émise, ce qui traduit des contraintes importantes subies par le noyau. Par la suite, le centrosome se décale progressivement vers l'entrée du neurite où se propage la vague, et le noyau se décale vers l'arrière. Les deux organites se croisent alors en franchissant le milieu du soma lorsque la vague a parcouru environ $30\mu m$. Ce mouvement relatif montre que ce n'est pas le noyau qui est tiré par la vague, mais plutôt le centrosome sur lequel s'attachent la majorité des microtubules à ce stade de développement. Ainsi la force qui tracte le soma est vraisemblablement transmise par les microtubules via le centrosome, ce qui témoigne d'une interaction importante entre les microtubules et l'actine au niveau de la vague. La transmission de la force par les microtubules pourrait d'ailleurs être la raison pour laquelle le noyau est déformé dans 71% des cas, comme pris dans un "filet" de microtubules reliant le centrosome au neurite où la vague progresse. Le noyau pourrait être libéré de cette étreinte des microtubules lorsque le centrosome le contourne.

Notons que cette description ne s'applique qu'à la vague la plus proche du soma : lorsqu'une seconde vague est émise par la cellule, le plus souvent à l'opposé de la première, alors les positions du centrosome et du noyau s'inversent. Cela indique que la force générée par la vague précédente, plus éloignée du soma, devient négligeable devant la force de la nouvelle vague. Ainsi la transmission de la force s'atténuerait tout au long du neurite.

III.1.3 Développement et polarisation sur lignes de $2\mu m$

Comme en témoigne la table III.2, malgré la contrainte sur la surface d'adhésion et malgré les oscillations du soma, les neurones parviennent à croître de façon importante et à se polariser sur ces lignes de $2\mu m$. Bien que le nombre de neurites soit limité à deux par cellule, la longueur totale des cellules n'est en effet pas significativement différente d'un contrôle réalisé sur un substrat sans contraste d'adhésion ($p = 0,12$). De ce fait, la longueur moyenne des neurites individuels est significativement supérieure sur lignes ($p = 6.10^{-17}$). En particulier, les neurites les plus longs (avec ou sans marquage axonal) sont plus développés sur lignes et représentent une plus grande proportion de la longueur totale de la cellule.

Nous avons aussi évalué le taux de polarisation dans ces deux conditions par le marqueur précoce de l'axone tau-1. Bien que ce taux soit plus faible sur lignes, il n'y a pas de différence significative et donc la dynamique de polarisation semble peu altérée par les contraintes imposées par les lignes.

	nombre de neurites	longueur totale	neurite le plus long	taux de polarisation
Lignes	2	188 μm	117 μm (65% du total)	40%
Contrôle	4,7	172 μm	88 μm (51% du total)	52%
Tests statistiques	-	n.s.	$p = 1.10^{-5}$	n.s.

TABLE III.2 – Comparaison du développement des neurones sur lignes de $2\mu m$ et dans le cas contrôle d'une surface sans contrainte d'adhésion. ($n=100$ cellules)

III.1.4 Mouvement oscillatoire sur lignes de $4\mu m$

Les phénomènes observés sur lignes de $2\mu m$ sont de toute évidence reliés à la limitation de la surface d'adhésion. Par conséquent, nous avons réalisé un masque très semblable mais où les lignes d'adhésion ont cette fois une largeur de $4\mu m$. Sur ces lignes le comportement des cellules est similaire mais, comme nous l'attendions, l'ajout de surface d'adhésion entraîne une réduction de l'amplitude des oscillations du soma (voir table III.3). De plus, nous constatons une plus faible rétraction neuritique avant l'arrivée de la vague à l'extrémité du neurite. Notons que la vitesse des vagues varie toutefois très peu, de même que leur taux de répétition. En revanche, la fréquence des vagues diminue. Ainsi, bien que les vagues soient plus espacées temporellement sur lignes de $4\mu m$, l'alternance de leur émission conserve la même régularité (car les taux de répétition sont similaires).

	Période d'émission	Taux de répétition	Vitesse	Mouvement du soma	Rétraction	Allongement
Lignes de $2\mu m$	14min	22%	2,46 $\mu m.min^{-1}$	4,13 μm	3,1 μm	3,6 μm
Lignes de $4\mu m$	25min	32%	2,43 $\mu m.min^{-1}$	4,12 μm	0,8 μm	1,1 μm
Test statistique	$p = 1,6.10^{-8}$	$\varepsilon = 1,968$	n.s.	$p = 1,7.10^{-7}$	$p = 8,0.10^{-5}$	$p = 9,6.10^{-6}$

TABLE III.3 – Comparaison des caractéristiques des vagues sur lignes de $2\mu m$ et $4\mu m$. ($n_{lignes4\mu m} = 61$ vagues)

Bien que nous n'ayons pas fait les mesures de développement et de polarisation sur lignes de $4\mu m$, ces observations indiquent qu'une augmentation de la surface d'adhésion, dans les mêmes conditions de contraintes neuritiques, induit des différences dans la réponse mécanique de la cellule. Nous avons notamment noté dans les vidéo-microscopies une nette différence de longueur des neurites, que nous n'avons pas encore quantifiée. Il est possible que l'augmentation de la surface d'adhésion entraîne un meilleur ancrage, qui serait responsable de la diminution de rétraction neuritique et du déplacement du soma observés. Mais il est aussi possible que les forces soient plus atténuées par dissipation tout au long du neurite car la surface d'interaction avec le substrat est plus importante.

III.2 Croissance de neurones bipolaires sur plots

Les observations précédentes montrent que la diminution de la largeur d'une ligne d'adhésion peut induire une motilité cellulaire relativement importante. Le déplacement du soma peut être dû à la diminution de la surface au niveau du soma lui-même, ou à une modification des propriétés mécaniques dans les vagues ou le long des neurites du fait de leur largeur fixée. Afin d'y voir plus clair parmi ces deux hypothèses, nous avons donc réalisé un masque dans lequel des plots de $20\mu m$ de diamètre ont été ajoutés à des lignes de $2\mu m$ pour accueillir les somas (voir figure III.3).

Sur ce type de motif (nommé "plots" par la suite en contraste aux "lignes"), nous constatons effectivement en vidéo-microscopie que les somas perdent quasiment toute motilité. Cela confirme que la surface d'adhésion au niveau du soma joue un rôle important dans son ancrage au substrat. Les résultats sont résumés dans la table III.4. Notons que la rétraction neuritique n'a pas été mesurée dans ces vidéos. Par ailleurs, nous constatons que la période d'émission est augmentée : les vagues sont deux fois moins fréquentes. Elles se propagent là encore à la même vitesse, mais la grande différence par rapport aux lignes vues précédemment est dans leur taux de répétition. Cette fois, les vagues consécutives sont en effet plus souvent émises dans la même direction (la différence est significative à la fois en comparant aux lignes de $2\mu m$ et en comparant au cas théorique aléatoire où le taux de répétition est de 50%).

	Période d'émission	Taux de répétition	Vitesse	Mouvement du soma
Lignes de $2\mu m$	$14min$	22%	$2,46\mu m.min^{-1}$	$4\mu m$
Plots de $20\mu m$	$24min$	59%	$2,8\mu m.min^{-1}$	$0,4\mu m$
Tests statistiques	$p = 1,2.10^{-15}$	$\varepsilon = 6,6$	n.s.	$p = 1,0.10^{-17}$

TABLE III.4 – Comparaison des caractéristiques des vagues sur lignes de $2\mu m$ et $4\mu m$. La région du soma qui apparaît volumineuse en contraste de phase pouvant se déplacer légèrement tout en restant dans les plots de $20\mu m$, la position de son centre a été pointée pour évaluer les mouvements du soma.

($n_{plots20\mu m} = 138$ vagues, 9 cellules, 2 cultures)

L'étude du positionnement du noyau et du centrosome dans le plot d'adhésion révèle elle aussi des différences de comportement importantes (voir figure III.3). Tout d'abord, le centrosome se situe au milieu de la cellule lorsque la vague est émise, et non à l'opposé. Il se déplace ensuite progressivement vers le neurite où la vague se propage, mais cette fois sans inversion avec le noyau. En effet ce dernier se tient généralement sur le côté du centrosome, et non sur l'axe des neurites. Son centre de gravité paraît toutefois se déplacer parallèlement au centrosome. Ainsi, dans cette configuration où le soma est ancré par une large surface d'adhésion, le noyau semble subir passivement les mouvements et contraintes du cytosquelette qui déplacent le centrosome.

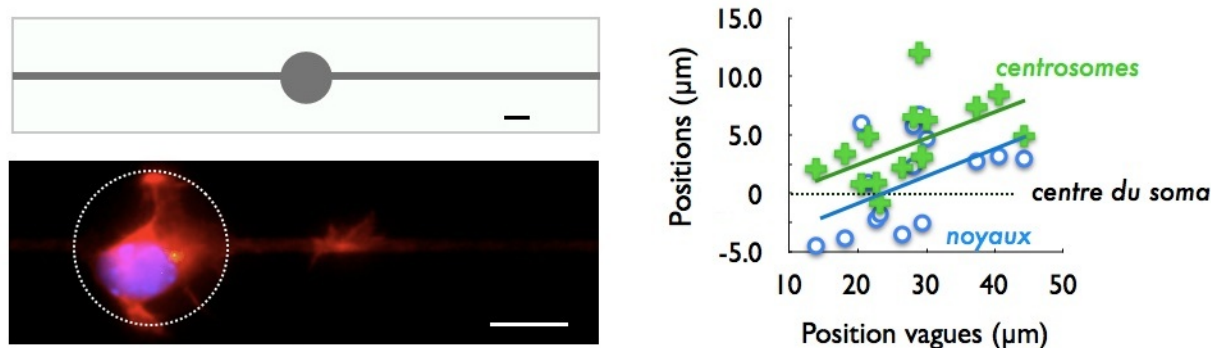


FIGURE III.3 – Ancre des cellules par l'ajout d'un plot cellulaire de $20\mu m$ aux lignes de $2\mu m$. **A/** Masque de ce motif. **B/** Exemple d'un neurone à 2DIV. **C/** Parmi les cellules qui n'ont qu'une ou deux vagues visibles sur le même neurite, ce graphique donnant la position du centrosome et du centre de gravité du noyau en fonction de la progression de la vague montre que le centrosome est d'abord positionné au centre du soma, puis qu'il migre progressivement vers l'avant du corps cellulaire, tandis que le noyau situé en retrait du centrosome bouge de manière coordonnée avec celui-ci. Notons de plus que le noyau est systématiquement décalé dans la direction perpendiculaire à l'axe des neurites, tandis que le centrosome reste sur l'axe (données non présentées). Lignes : ajustements linéaires. Marquages fluorescents : actine-F (phalloïdine-TxRed, rouge); centrosome (γ -tubuline, vert); noyau (Hoechst, bleu). | Barre : $10\mu m$

Le taux de répétition déduit des analyses en vidéo-microscopie privilégiant cette fois-ci les vagues successives le long d'un même neurite, comment ce phénomène affecte-t-il le développement neuritique ? La table III.5 montre que l'on obtient une grande asymétrie de développement des neurites sur les plots. Ainsi la présence des grandes surfaces d'adhésion pour le soma entraînerait la concentration des vagues dans un même neurite, dont le taux de croissance serait en conséquence augmenté au détriment de l'autre neurite. On peut se demander si cette asymétrie a une influence sur la polarisation axonale, car la croissance privilégiée d'un neurite est l'une des toutes premières manifestations de la polarisation. Or, nous constatons que le taux de polarisation n'est pas différent entre lignes et plots. Nous pouvons nuancer cette observation en ajoutant que les neurones sont moins développés sur plots, ce qui peut être lié à la plus faible fréquence de vagues, et donc qu'atteindre le même taux de polarisation pour une longueur totale inférieure nécessite un biais supplémentaire.

Pour étudier plus en détail l'effet de la surface d'adhésion au niveau du soma, nous avons réalisé un second motif sur le même principe, mais cette fois avec une surface de plot cellulaire diminuée de moitié (diamètre du plot : $14\mu m$). Des vidéo-microscopies sur ce motif montrent que le soma est beaucoup plus compact, et aussi plus sensible aux vagues que sur plots de $20\mu m$. En effet, bien qu'il reste globalement ancré au plot, des exceptions sont possibles, comme le montre

	Nombre de neurites	Longueur totale	Plus long neurite	Taux de polarisation
Lignes $2\mu m$	2	$192\mu m$	$128\mu m$ (66% du total)	40%
Plots $20\mu m$	2	$129\mu m$	$105\mu m$ (81% du total)	43%
Tests Statistiques	-	$p = 1,0.10^{-9}$	$p = 0,004$	n.s.

TABLE III.5 – Comparaison du développement des neurones sur lignes de $2\mu m$ avec ou sans plot cellulaire de $20\mu m$. ($n_{\text{lignes}2\mu m} = 100$ cellules, $n_{\text{plots}20\mu m} = 89$ cellules)

la figure III.4. Cela confirme que la surface d'adhésion au niveau du soma joue un rôle important dans son ancrage au substrat.

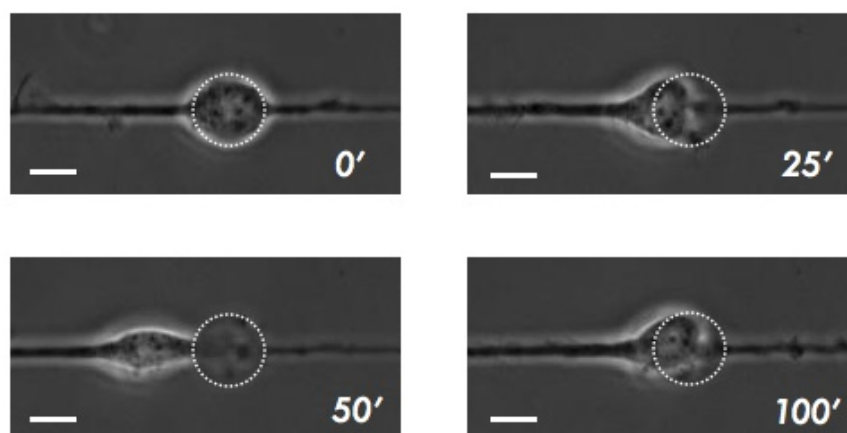


FIGURE III.4 – **Décrochement temporaire du soma sur un plot de $14\mu m$ consécutif à l'émission d'une vague sur le neurite gauche.** Cet exemple de décrochement du soma, qui intervient dans moins de 10% des vagues, indique que la valeur du diamètre de $14\mu m$ pour le plot cellulaire pourrait être une valeur limite au delà de laquelle le soma est correctement ancré au substrat. | Barre : $10\mu m$

Une nouvelle fois les vagues ont une vitesse de propagation inchangée, mais elles présentent sur ce motif un taux de répétition et une fréquence d'émission très proches du cas des lignes de $2\mu m$. Il y a donc une différence fondamentale de comportement sur les plots de $20\mu m$ et ceux de $14\mu m$. Cette différence pourrait être liée au fait que le noyau ne peut pas être confiné sur le côté du centrosome si la surface est trop faible et se retrouve donc aligné avec le centrosome sur l'axe des neurites (c'est à dire sur l'axe d'application des forces), comme dans la configuration des lignes. Néanmoins nous n'avons pas réalisé les marquages permettant de répondre à cette question. Une autre hypothèse serait que la surface du plot cellulaire n'aurait pas uniquement une influence sur l'ancrage du soma, mais aussi sur la génération des vagues elles-mêmes. En effet, dans les deux couples de motifs étudiés (lignes $2\mu m$ /lignes $4\mu m$; plots $14\mu m$ /plots $20\mu m$), le motif présentant la plus faible surface présente aussi la plus grande fréquence d'émission des vagues.

	Période d'émission	Taux de répétition	Vitesse	Mouvement du soma
Plots de $20\mu m$	$24min$	59%	$2,8\mu m.min^{-1}$	$0,4\mu m$
Plots de $14\mu m$	$13min$	26%	$2,6\mu m.min^{-1}$	$0,9\mu m$
Tests statistiques	$p = 1,4.10^{-10}$	$\varepsilon = 5,2$	n.s.	n.s.

TABLE III.6 – Comparaison des caractéristiques des vagues sur lignes disposant de plots de $20\mu m$ et $14\mu m$. ($n_{plots20\mu m} = 138$ vagues, 9 cellules, 2 cultures ; $n_{plots14\mu m} = 118$ vagues, 3 cellules, 1 culture)

III.3 Discussion

La culture de neurones sur des motifs basés sur des lignes permet de réduire au maximum les variations du comportement des cellules, par rapport au nombre et à la forme des neurites développés. En effet, le caractère bipolaire est imposé à ces cellules, car deux neurites ne peuvent pas émerger d'une cellule dans la même direction, sans quoi ils fusionnent. La croissance est contrainte dans des directions rectilignes, ce qui simplifie au maximum les possibilités de croissance ainsi que toute représentation mécanique de la cellule.

III.3.1 Aspects mécaniques de la croissance neuritique

Lors de la croissance de neurones sur des lignes uniquement, le soma acquiert un comportement de migration oscillante. Ce comportement ne se retrouve pas avec les neurones hippocampiques cultivés sur une surface sans contraste d'adhésion, ni sur les motifs sur lesquels des plots sont rajoutés, mais a été observé sur un autre type de neurones, justement nommés neurones bipolaires [1]. Ainsi nos résultats ouvrent des perspectives quant aux conséquences de la différence d'adhésion du soma selon le type cellulaire et en particulier la morphologie des neurites.

De plus, ce système minimal *in vitro* n'est pas découplé de phénomènes *in vivo* relatifs à la migration cellulaire où des neurones de morphologie bipolaire migrent sur des prolongements de la glie radiaire (voir figure III.5) pour atteindre leur site de croissance. Notons qu'au moment de la culture les neurones d'hippocampe ont terminé leur migration et sont pleinement différenciés, même si leur croissance n'est pas terminée. Mais la contrainte imposée par les lignes est révélatrice de la dynamique des forces qui s'exercent toujours dans ces neurites en croissance et qui sont en général absorbées par l'adhésion du soma. Nous pensons donc que certains processus mécaniques, avec en premier lieu le mouvement du centrosome, forment un dénominateur commun aux phénomènes de migration cellulaire et de croissance neuritique.

Notre configuration expérimentale montre que la croissance neuritique est constituée d'une succession de phases d'augmentation de tension neuritique, qui sont mises en relief par le mouvement

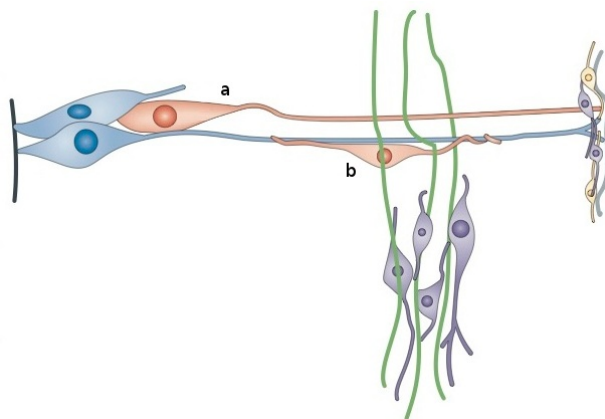


FIGURE III.5 – Dans le système nerveux central en formation, les neurones migrent radialement en utilisant soit la translocation du soma grâce à un long prolongement “leader” (a), soit en suivant les rails formés par la glie radiaire (en bleu) sans développer de long prolongement (b). D’autres neurones (en violet) migrent tangentiellement, indépendamment de la glie radiaire. [2]

du soma. Il est possible que cette tension neuritique, voire ses variations, joue un rôle notable dans la croissance elle-même. La simple notion de tension neuritique permet de révéler la complexité des interactions s’établissant dans le cytosquelette. D’un point de vue externe, un neurite tendu est un câble élastique aux extrémités duquel s’appliquent deux forces opposées dirigées vers l’extérieur : la tension participe à l’élongation de ce câble. Mais d’un point de vue interne, la résistance à la tension (c’est à dire la raideur du câble élastique) implique que le neurite doit générer des forces locales dans le sens d’une compression, sans quoi il se déformerait passivement et ne transmettrait pas la force d’une extrémité à l’autre. De plus, des études dynamiques montrent que le neurite s’allonge au temps longs (durée supérieure à une dizaine de minutes) sous l’effet d’une force constante. Le neurite est donc le siège de deux phénomènes mécaniques simultanés : une déformation visqueuse, généralement représentée d’un point de vue mécanique par des amortisseurs, et une résistance à la tension, modélisée par un ressort. Mais ces paramètres sont très dynamiques, et le coefficient de raideur du ressort peut notamment augmenter au point d’induire une contraction neuritique.

Quel peut être le support de la tension neuritique ? Parmi les éléments du cytosquelette, les microtubules sont de loin les candidats les plus adaptés à ce rôle. Ils possèdent une grande longueur de persistance, une grande rigidité et s’organisent en faisceaux dans les neurites, ce qui leur permet de transmettre des forces sur de longues distances. Ils possèdent en complément un taux de renouvellement important et la capacité de coulisser les uns contre les autres par l’action des moteurs moléculaires, ce qui constitue des caractères très adaptés pour rendre compte de l’aspect dynamique de la croissance neuritique.

III.3.2 Importance des vagues dans la compétition neuritique

Nous avons vu que les mouvements cellulaires (déplacement global du soma et déplacement relatif des organites) sont systématiquement corrélés à l'émission de vagues, dont le sens de propagation définit la direction du mouvement. Ces structures qui se déplacent à une vitesse stable dans toutes nos conditions semblent donc très importantes en terme de dynamique des forces subies par le soma. De plus, une rétraction intervient lorsque la vague s'approche de l'extrémité neuritique. La vague peut donc être perçue comme un nœud de génération de tension neuritique, ce qui implique qu'elle serait le site d'une zone compression des microtubules. Au delà, la description des mécanismes est très complexe car la relation entre l'actine et les microtubules dans les vagues fait intervenir un grand nombre de protéines associées, telles que la myosine (génération de forces dans le réseau d'actine), la dynéine (entre microtubules ou entre microtubules et actine), et la cofiline (régulation de la dynamique de l'actine et interaction avec les microtubules) par exemple [3] [4].

L'émission des vagues s'accompagne de réorganisations de la structure sub-cellulaire, avec notamment une grande mobilité du centrosome. Nous avons en effet montré que celui-ci est tiré vers l'entrée du neurite où la vague progresse, avec une force suffisante pour que la position du noyau et du centrosome s'inversent dans l'espace confiné du corps cellulaire sur lignes de $2\mu m$. Il faut toutefois noter que cette inversion ne peut pas se faire sous la simple action de la force transmise par les microtubules. En effet, une force doit s'opposer au déplacement du soma pour expliquer le déplacement relatif du centrosome par rapport au noyau. Il est possible que le cortex d'actine, en interaction avec les adhésions, exerce un frottement sur le noyau pendant le déplacement du soma, ce qui participerait à la notion d'ancrage du soma, même si l'ancrage est précaire car cette interaction est relativement faible sur ces lignes.

Par ailleurs, sur plots de $20\mu m$ le centrosome est presque toujours au centre de la cellule lorsqu'une vague est émise, ce qui contraste avec le cas des lignes où il part du côté opposé. Il y a donc intervention d'un processus actif qui repositionne le centrosome entre deux vagues. Le même type de positionnement a été étudié sur des cellules épithéliales (BS-C-1), et cette étude montre que la dépolymérisation locale des microtubules à une extrémité de la cellule induit un mouvement du centrosome vers l'autre côté de la cellule [5]. La conclusion des auteurs est que dans ces cellules les microtubules forment un réseau radial qui se lie aux parois cellulaires et est mis sous tension par l'intermédiaire de la dynéine. Étant donné cette description, nous pouvons postuler que le placement du centrosome au centre de la cellule est une conséquence de l'équilibrage des tensions supportées par ces microtubules. Le même type de raisonnement peut être avancé dans le cas des neurones, mais en prenant en compte le fait que les microtubules se resserrent et se coordonnent en s'engageant dans les neurites : des forces importantes peuvent être générées dans ces directions

particulières. Ainsi, le scénario que nous proposons sur plots de $20\mu m$ est que la vague induit une tension importante dans le neurite qui se transmet au soma et perturbe l'équilibre des forces sur le centrosome, ce qui le tire en direction de la vague. Lorsque la vague est plus éloignée du soma, la tension se dissipe le long du neurite et les forces sur le centrosome se rééquilibrent en le ramenant au centre du soma.

Pourquoi ce raisonnement ne s'applique-t-il pas sur les lignes de $2\mu m$? La différence essentielle entre ce cas et le cas des plots de $20\mu m$, ou celui des cellules épithéliales, est l'étalement cellulaire. Les somas sont beaucoup plus compacts sur lignes, induisant un alignement des positions du centre du noyau et du centrosome sur la direction des neurites. Cette réduction de surface empêche le positionnement du centrosome au centre de la cellule, semble-t-il à cause de l'encombrement du noyau.

Les vagues sont aussi un mode de transport d'une grande quantité de matériel qui, lorsqu'il arrive à l'extrémité du neurite, induit une hausse de l'activité exploratoire et de la croissance. En complément du transport vésiculaire, les vagues participent donc directement à la croissance individuelle des neurites. Nous avons vu en particulier qu'une grande asymétrie de croissance est observée sur les motifs avec plots de $20\mu m$, et cela pourrait être lié au taux de répétition des vagues dont nous avons vu qu'il est supérieur à 50% : les vagues se succèdent dans la même direction, et cela peut directement induire une croissance moyenne plus élevée de ce neurite.

III.3.3 Génération et propagation des vagues

La contribution des vagues à la tension et à la croissance neuritique est claire, mais comment ces structures sont-elles générées et comment se propagent-elles le long des neurites ? Un ensemble de travaux nous amènent à penser que le mécanisme impliqué est spontané et auto-entretenu.

La première description des vagues a été donnée par Ruthel et Banker en 1998. Ces auteurs montrent qu'elles sont composées de nombreuses protéines en commun avec les cônes de croissance, notamment des protéines impliquées dans la dynamique de l'actine [6]. Ils montrent de plus dans cette étude que la dépolymérisation de l'actine (par traitement à la cytochalasine B) entraîne une disparition de la vague, mais que cet arrêt est réversible car la vague reprend son activité au même endroit après lavage de la drogue. Dans une étude plus récente, cette équipe montre que l'inhibition du transport de vésicules ne perturbe pas la formation et propagation des vagues, tandis que la dépolymérisation par le nocodazole des microtubules non stabilisées les inhibent[3]. Cela implique que les vagues ne sont pas des effets indirects du déplacement d'un ensemble de vésicules contrôlé par des moteurs moléculaires parcourant les microtubules (kinésines), et que les microtubules participent à leur progression. Par ailleurs, une étude *ex-vivo* montre que le simple

mélange d'actine, myosine et fascine (agent réticulant de l'actine) en présence d'ATP forme un réseau qui présente des contractions spontanées qui peuvent se déplacer dans le réseau [7].

Ainsi, nous proposons que la génération des vagues dans les neurites de neurones hippocampiques peut être le produit d'une initiation spontanée, conditionnée par la réunion d'un ensemble de facteurs dans le soma au niveau de l'entrée d'un neurite. Par la suite, la propagation de la vague pourrait être la simple conséquence d'un mécanisme auto-entretenu, dont nous dressons le scénario suivant :

- la concentration de protéines favorisant la dynamique de l'actine, notamment la cofiline, entraîne la polymérisation d'un réseau d'actine à la périphérie et à l'avant de la vague,
- tout comme dans le cône de croissance, la polymérisation de l'actine contre la membrane cellulaire entraîne un flux rétrograde d'actine,
- à l'arrière et au centre de la vague, l'autre extrémité du réseau d'actine est le site d'une dépolymérisation continue,
- en interaction avec les microtubules, par le biais de protéines dont la doublecortine (DCX) est un candidat [8], le flux rétrograde est freiné ce qui entraîne l'avancée progressive du front de polymérisation,
- enfin, les monomères d'actine qui sont fortement concentrés à l'arrière de la vague diffusent majoritairement vers la zone de polymérisation où au contraire leur concentration est réduite.

Cette description présente l'avantage de décrire un mouvement auto-entretenu à partir du freinage du flux rétrograde et d'une simple diffusion des monomères. Notons que ce flux de monomères pourrait suffire à entraîner les protéines associées à l'actine (cofiline notamment) de sorte qu'elles restent à l'avant de la vague tout au long de sa progression, et continuent d'induire une grande activité de polymérisation dans cette zone. Cela résulterait en une caractéristique importante des vagues : le fait qu'elles ne rebrousse pas chemin.

De plus, cette vision schématique du déplacement de la vague peut rendre compte des forces que l'actine transmet aux microtubules. En effet, le frottement supposé du flux rétrograde d'actine sur les microtubules rend compte de la force exercée à l'avant de la vague. A l'arrière de la vague, un resserrement du réseau d'acto-myosine pourrait entraîner la transmission d'une tension tout comme cela s'opère dans le cône de croissance (voir p. 28).

Si l'on veut confronter ce schéma à nos expériences, les différences essentielles du comportement des vagues entre lignes et plots sont la fréquence et le taux de répétition des vagues. D'abord, sur plots de $20\mu m$ les vagues sont deux fois moins fréquentes que sur lignes de $2\mu m$. Dans le cadre de notre schéma, c'est la concentration de facteurs à l'entrée du neurite qui entraînerait le départ de la vague, et nous pouvons penser que l'augmentation de périmètre cellulaire sur plot de

$20\mu m$ entraîne une dilution de ces facteurs, et donc une diminution de la probabilité de réunir les conditions d'émission de vague. Notons que la fréquence des vagues rapportée dans la littérature est plus proche de la trentaine de minutes, ce qui va dans le sens de cette analyse postulant un lien entre surface d'adhésion et émission des vagues.

En ce qui concerne le taux de répétition des vagues, nous pouvons remarquer que les mouvements du centrosome pourraient avoir un lien avec les directions d'émission des vagues. Sur lignes de $2\mu m$, les vagues sont émises du côté opposé au centrosome, mais le tirent dans leur direction et inversent sa position à chaque fois. Sur plots de $20\mu m$, elles sont émises majoritairement dans la même direction, mais le centrosome est recentré entre chaque vague. Ainsi, le seul point commun entre ces deux conditions est que les vagues sont émises dans des zones que le centrosome a récemment quitté. Il pourrait donc exister un lien entre l'histoire de la position du centrosome et la direction d'émission des vagues, mais ce mécanisme reste obscur.

III.3.4 Développement neuritique et polarisation

Les motifs que nous avons étudiés révèlent l'adaptabilité des cellules aux contraintes géométriques de leur environnement. Tout d'abord, bien que possédant uniquement deux neurites, les neurones sur lignes de $2\mu m$ développent une longueur totale égale, voire légèrement supérieure aux neurones évoluant sur une surface non contrainte, alors que ces derniers possèdent plus de quatre neurites en moyenne. Les neurites individuels subissent donc l'influence de la croissance de l'ensemble de la cellule, et ne sont donc pas indépendants en terme de vitesse de croissance. On peut interpréter que la cellule distribue à chaque neurite une proportion de la quantité globale de matériel nécessaire à la croissance qu'elle produit. Néanmoins cette quantité globale n'est pas nécessairement fixe, comme en témoignent les plots de $20\mu m$ sur lesquels la croissance globale est significativement réduite.

Ensuite, le fait d'avoir pu disposer de neurites de $4\mu m$ de large relève d'un phénomène non trivial d'étalement cellulaire en fonction des dimensions de la surface d'adhésion. Cette observation a d'ailleurs conduit à une étude systématique de l'étalement neuritique en fonction de la largeur des lignes d'adhésion (étude en cours), dont les premiers résultats montrent que l'étalement latéral des neurites peut augmenter de près d'un ordre de grandeur par rapport au diamètre qu'adopte spontanément un neurite en culture sur une surface d'adhésion homogène.

Enfin, au-delà du développement neuronal, les géométries bipolaires que nous avons étudiées peuvent-elles nous informer sur les mécanismes de l'aboutissement de la compétition neuritique, c'est-à-dire la polarisation axonale ?

Le phénomène d'oscillation du soma pourrait perturber la polarisation axonale en induisant

de grandes variations de longueur des deux neurites. En effet, contrairement aux cas où le soma est ancré, sur lignes de $2\mu m$ le neurite le plus long ne le reste pas. Ainsi nous constatons que bien que les neurites les plus longs le soient significativement plus que dans l'expérience contrôle (avec une longueur totale similaire), le taux de neurones polarisés n'était pas plus important, et même légèrement plus faible.

Dans le cas des plots de $20\mu m$, au contraire, le développement total est significativement plus faible que dans le cas contrôle ($p = 0.0003$) et le neurite le plus long l'est à peine plus que dans le cas contrôle ($p = 0.05$) mais est significativement plus faible que sur lignes ($p = 0.004$). Or, nous constatons le même taux de neurones polarisés que sur lignes, non différent du contrôle. Ainsi, bien que la cellule se développe moins vite, elle parvient à se polariser dans les mêmes délais que sur lignes. Nous pensons que la répétition des vagues dans le neurite le plus long est le moyen grâce auquel ce handicap de développement est compensé : selon notre hypothèse, cette succession de vagues dans un neurite augmente sa tension interne, qui aurait pour effet d'accélérer le processus de différenciation relativement à sa longueur.

III.3.5 Perspectives

Les résultats surprenants sur les différences de comportement sur lignes de 2 et $4\mu m$ ont mené à la création d'un masque dans lequel des lignes présentent :

1. un gradient de largeur (de 2 à $8\mu m$ sur une longueur de $150\mu m$, voir figure III.6) dans le but d'étudier l'éventuelle migration des cellules dans ces conditions,
2. plusieurs lignes de largeurs différentes (jusqu'à $16\mu m$) et, dans le même esprit,
3. des plots de surfaces variables afin d'étudier plus en détail les aspects d'étalement cellulaire en fonction de la surface d'adhésion soulevés dans nos résultats.

Ces travaux sont en cours au sein de l'équipe.



FIGURE III.6 – Les résultats obtenus sur lignes de 2 et $4\mu m$ ont mené à une étude en cours sur l'éventuelle migration des cellules sur des bandes possédant un gradient de largeur. | Barre : $10\mu m$

Dans l'étude de la succession des vagues sur plot de $14\mu m$, nous avons constaté qu'il y avait une différence de comportement par rapport au plot de $20\mu m$, et avons fait l'hypothèse que cette

différence serait due au fait que le noyau ne peut se tenir sur le côté du centrosome à cause de la plus faible surface d'adhésion. L'alignement du noyau et du centrosome sur l'axe des neurites pourrait donc avoir une importance par rapport à la génération des vagues, et au repositionnement du centrosome. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions réaliser un masque de neurone bipolaire avec plots de $14\mu\text{m}$ mais où les directions neuritiques formeraient un angle droit. Nous prévoyons que le centrosome se tiendrait dans une zone proche des deux neurites, et que le noyau serait repoussé de l'autre côté du plot cellulaire.

III.3.6 Résultats post-rédaction

Les expériences sur la largeur des lignes d'adhésion ont été menées pendant et après la rédaction de ce manuscrit, et ont mené aux résultats présentés en figure III.7. Les neurites étant nettement plus longs sur lignes de $2\mu\text{m}$ que sur lignes de $6\mu\text{m}$, nous avons construit un motif asymétrique composé d'un plot d'adhésion et de deux lignes de croissance neuritique de 2 et $6\mu\text{m}$. L'asymétrie de croissance, visible en figure III.8, a été confirmée dans 99% des cas ($n=100$ cellules), et cela a mené à un taux d'axones émis dans la direction " $2\mu\text{m}$ " de 98% ($n=48$ cellules). Bien que ces données nécessitent d'être complétées par une seconde expérience, ce résultat constitue le plus fort contrôle de polarisation qui ait jamais été atteint.

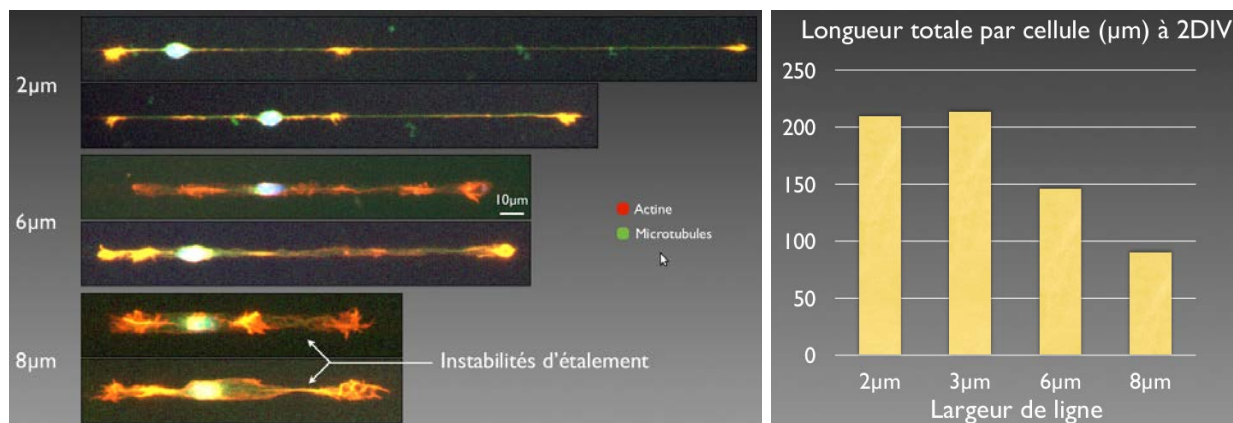


FIGURE III.7 – Étude de la longueur des cellules à 2DIV sur des lignes de différentes largeurs. Les neurites sont d'autant plus courts et étalés que les lignes sont larges, jusqu'à la largeur de $8\mu\text{m}$ où des instabilités de largeurs apparaissent, donnant lieu à des resserrements des neurites qui prennent alors la forme des neurites observés habituellement sur des substrats plans sans contraintes.

Marquages fluorescents : actine (phalloïdine-TexasRed, rouge) ; microtubules (YL1/2, vert) ; noyau (Hoechst, bleu).

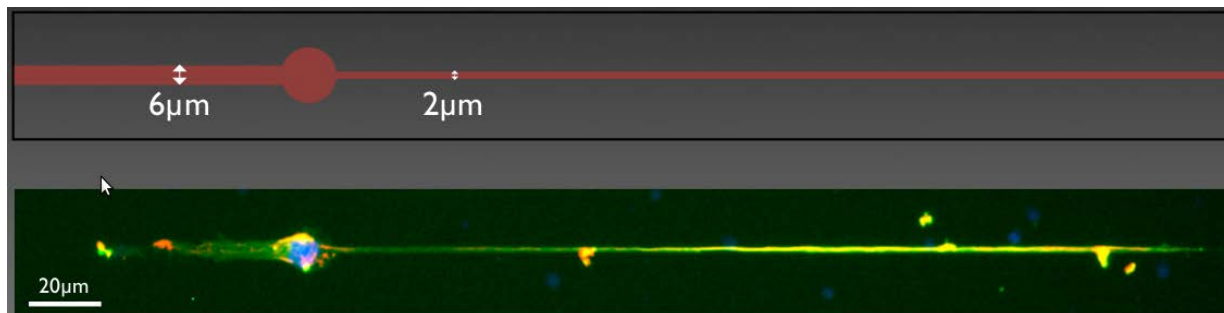


FIGURE III.8 – Les résultats de longueurs neuritiques obtenus sur lignes de 2, 4, 6 et $8\mu m$ ont mené à un masque présentant une asymétrie de largeur. Sur celui-ci, 98% des axones sont émis dans la direction de la ligne de $2\mu m$.

Marquages fluorescents : axone (tau, rouge) ; microtubules (YL1/2, vert) ; noyau (Hoechst, bleu).

Conclusion

La culture de neurones sur des motifs géométriques imposant une caractère bipolaire s'est montrée révélatrice des processus mécaniques sous-tendant la croissance des neurones hippocampiques. Nous avons démontré que les vagues génèrent des forces importantes, capables d'entraîner le soma derrière elles sur lignes, et même dans certains cas sur les plots de $14\mu m$. Cette tension générée par les vagues a des conséquences importantes sur la longueur neuritique, et nous avons montré qu'elle peut aussi être transmise jusqu'au soma, où elle entraîne des mouvements importants du centrosome.

Ces mouvements peuvent alors avoir deux conséquences. Il peut d'abord y avoir inversion de la position du noyau et du centrosome si le soma est très contraint par une faible surface d'adhésion. Mais dans le cas contraire, la cellule est suffisamment étendue pour qu'un processus actif repositionne le centrosome au centre du soma. Nous avons relié ce processus à un équilibre des forces de tension dans un réseau radial de microtubules tel que décrit dans d'autres types cellulaires.

C'est alors qu'une différence majeure de comportement cellulaire apparaît : si le centrosome s'est repositionné, la prochaine vague est plus favorablement émise dans la même direction ; si le centrosome est resté à l'entrée du neurite, la prochaine vague part dans une direction opposée. Cette description est intéressante car elle met en valeur un double mécanisme qui pourrait avoir une importance *in vivo* : d'une part, si la cellule est stable le repositionnement du centrosome induit une rétroaction positive qui émet les vagues dans la même direction ; d'autre part si la cellule perd ses adhésions et migre derrière la vague, la prochaine vague est émise à l'opposé, comme pour repositionner la cellule à sa position initiale.

D'autre part, les motifs bipolaires peuvent être utilisés comme un système modèle à une dimension pour étudier les interactions régissant le cytosquelette, par exemple à travers l'application de drogues. Les réponses des cellules telles que l'étalement neuritique, les fréquences d'émission des vagues, leur taux de répétition ou même leur vitesse, pourraient alors être mesurées de façon systématique et comparées plus aisément grâce à la réduction de la variabilité morphologique dans les géométries neuritiques.

Enfin, si les motifs géométriques permettent de contraindre les cellules pour étudier de façon systématique la polarisation axonale et notamment l'émission des vagues, ne pourrait-on pas tirer profit des possibilités offertes par la technique de lithographie optique pour contrôler la polarisation axonale ? La mise en pratique de cette idée est décrite dans le chapitre suivant.

Bibliographie

- [1] K. Hayashi, R. Kawai-Hirai, A. Harada, and K. Takata. Inhibitory neurons from fetal rat cerebral cortex exert delayed axon formation and active migration in vitro. *Journal of cell science*, 116(21) :4419, 2003. [84](#)
- [2] H.T. Ghashghaei, C. Lai, and ES Anton. Neuronal migration in the adult brain : are we there yet? *Nature Reviews Neuroscience*, 8(2) :141–151, 2007. [85](#)
- [3] K.C. Flynn, C.W. Pak, A.E. Shaw, F. Bradke, and J.R. Bamburg. Growth cone-like waves transport actin and promote axonogenesis and neurite branching. *Developmental neurobiology*, 69(12) :761–779, 2009. [86](#), [87](#)
- [4] T.M. Svitkina and G.G. Borisy. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *The Journal of cell biology*, 145(5) :1009, 1999. [86](#)
- [5] A. Burakov, E. Nadezhdina, B. Slepchenko, and V. Rodionov. Centrosome positioning in interphase cells. *The Journal of cell biology*, 162(6) :963, 2003. [86](#)
- [6] Banker G Ruthel G. Actin-dependent anterograde movement of growth-cone-like structures along growing hippocampal axons : A novel form of axonal transport? *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 40 :160–173, 1998. [87](#)
- [7] S. Köhler, V. Schaller, and A.R. Bausch. Collective dynamics of active cytoskeletal networks. *Arxiv preprint arXiv :1105.4475*, 2011. [88](#)
- [8] I. Tint, D. Jean, P.W. Baas, and M.M. Black. Doublecortin associates with microtubules preferentially in regions of the axon displaying actin-rich protrusive structures. *The Journal of Neuroscience*, 29(35) :10995, 2009. [88](#)

Chapitre IV

Vers la maîtrise de la polarisation axonale

Sommaire

IV.1 Le contrôle de la polarisation axonale par des motifs cellulaires . . .	97
IV.1.1 Influencer la polarisation grâce à la répartition des neurites autour du soma	98
IV.1.2 Lignes ondulées : inhiber localement la différenciation axonale	98
IV.1.3 Motif boomerang : diriger la polarisation axonale par la forme imposée au soma	99
IV.2 Du contrôle à l'étude de la polarisation axonale	102
IV.2.1 Géométrie locale et équilibre des forces	103
IV.2.2 Tension et dynamique neuritique sur ondulations	104
IV.2.3 Mécanismes d'inhibition axonale par les ondulations	108
IV.3 Étude des mécanismes d'inhibition sur ondulations	111
IV.3.1 Polarisation sur des gammes de courbures	111
IV.3.2 Un motif à contraste de courbures	116
IV.3.3 Différenciation des neurites dans des tranchées	117
IV.3.4 Enseignements d'un motif asymétrique	119
IV.3.5 Conclusion	121
IV.4 Vers une modélisation phénoménologique de la compétition neuritique sur motifs géométriques	122
IV.4.1 Modèle statique : l'hypothèse d'un taux de refus constant	122
IV.4.2 Modèle dynamique : compétition neuritique par essais-erreurs	123
IV.4.3 Modèle dynamique : évaluation du taux de redistribution	126
IV.4.4 Modèle dynamique : validation	127
IV.4.5 Modèle dynamique : confrontation de deux courbures	128
IV.4.6 Modèle dynamique : application à un motif à lignes triangulaires	129
IV.4.7 Modèle dynamique : influence du boomerang	130
IV.5 Interprétation du modèle d'essais-erreurs	130

IV.5.1 Vagues et taux de redistribution	131
IV.5.2 Signification du rapport d'acceptation	131
IV.5.3 Durée caractéristique de polarisation	132
IV.5.4 Défauts du modèle	134
IV.6 Discussion	136
IV.6.1 Trois effets géométriques peuvent participer au contrôle de la polarisation	136
IV.6.2 Structure et dynamique des étirements neuritiques	137
IV.6.3 Absorption des vagues par les étirements	140
IV.6.4 L'importance des ruptures de membrane	141

IV.1 Le contrôle de la polarisation axonale par des motifs cellulaires

La polarisation axonale est une étape essentielle du développement des neurones, qui a un impact majeur sur l'organisation des réseaux et la fonction qu'ils assureront en conséquence. Dans de nombreuses études *in vitro*, le contrôle de cette étape de polarisation serait un atout majeur. Il a été montré que la polarisation axonale peut être contrôlée *in vitro* par le contraste entre une molécule d'adhésion non spécifique et une molécule d'adhésion spécifique de la croissance axonale [1]. Mais jouer sur l'adhésion spécifique nécessite un protocole complexe et cette technique n'a pas encore été validée pour réaliser des réseaux de neurones modèles.

Afin de contrôler la position des axones au sein d'un réseau, comment pouvons-nous contraindre leur croissance dans des directions données à l'aide d'un protocole plus simple, à savoir une seule étape de photolithographie et donc une seule molécule d'adhésion ? La géométrie du motif pourrait-elle suffire à influencer la direction de polarisation axonale ?

La première partie de ce chapitre présente une série de motifs d'adhésion permettant un contrôle de la polarisation axonale uniquement par des contraintes géométriques imposées aux cellules. Nous développerons ensuite les expériences que nous avons réalisées pour étudier les mécanismes de polarisation mis en relief par ces motifs, puis nous présenterons un modèle dynamique du mécanisme de polarisation, que nous avons construit à partir de ces résultats.

Dans cette partie, nous présenterons les résultats qui ont été obtenus à l'aide de trois contraintes géométriques basées sur des principes différents. Les motifs présentés possèdent un plot cellulaire de surface suffisante pour bloquer la migration des cellules, et trois lignes de $2\mu\text{m}$ de large pour le développement neuritique. Le motif qui servira de contrôle du point de vue de la polarisation axonale est un motif à symétrie d'ordre 3 aux neurites rectilignes, dénommé DC ("Disc, Control", voir figure IV.1), qui donne un taux de polarisation dans chaque direction proche de 33% (voire table IV.1).

La direction dans laquelle l'axone est attendu sera nommée "D1" par convention, les autres directions étant logiquement nommées "D2", "D3" et éventuellement "D4" pour certains motifs, en tournant dans le sens horaire. Notons de plus que les neurones sont rigoureusement choisis en fonction du placement du soma sur le motif, selon la méthode présentée en p. 59.

Cette étude sur les motifs à trois branches a été menée en collaboration avec le GIN (marquages et comptages cellulaires effectués par Mariano Bisbal, post-doc au GIN). Le motif BmW dont le taux de polarisation selon D1 est le plus important a été dessiné dans le cadre de la thèse de Sophie Roth (2009 [2]).

IV.1.1 Influencer la polarisation grâce à la répartition des neurites autour du soma

Tout d'abord, la variation la plus simple que l'on peut appliquer au motif contrôle est de briser la symétrie d'ordre 3. Pour cela, nous avons dessiné le motif dénommé DS, dont la seule différence avec le motif DC est que les axes de deux neurites forment un angle de 90° au lieu de 120° (voir figure IV.1). Ainsi, la direction (D1) occupe une place privilégiée en suivant l'axe de symétrie du motif. Les résultats en table IV.1 démontrent que le taux de polarisation dans la direction D1 sur ce motif ($46\% \pm 7\%$) est significativement différent du cas aléatoire (33%). Ainsi le fait de rapprocher deux des trois neurites sur le motif suffit à briser la symétrie de polarisation.

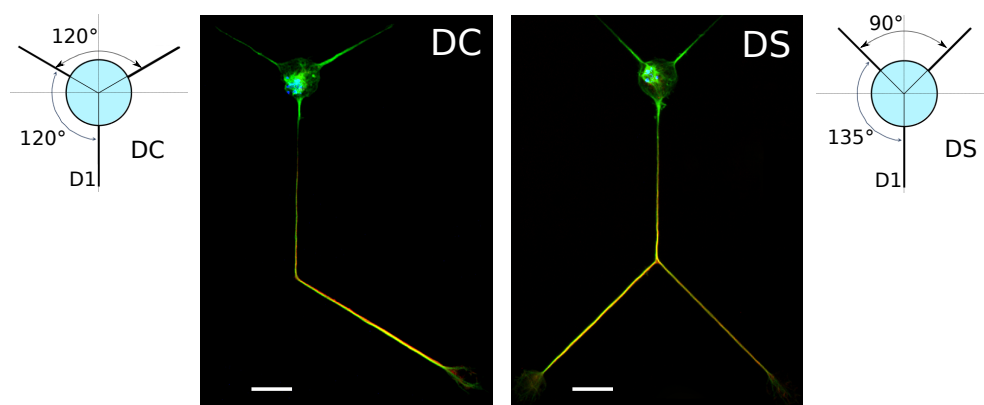


FIGURE IV.1 – **Présentation des motifs DC et DS.** Le resserrement angulaire induit une plus grande probabilité pour que l'axone soit émis dans la direction D1 sur le motif DS. On notera que les motifs permettent aux axones de réaliser un embranchement tous les $80\mu m$ (observation d'un embranchement axonal sur l'exemple du motif DS).

Marquages : axone (tau-1, rouge) ; microtubules (YL1/2, vert) ; noyau (Hoechst, bleu). | Barres : $20\mu m$

DC					DS				
Directions	D1	D2	D3	Total	Directions	D1	D2	D3	Total
Nombre d'axones	69	64	61	194	Nombre d'axones	120	67	77	264
% du total	35%	33%	31%	100%	% du total	46%	25%	29%	100%

TABLE IV.1 – **Position des axones sur les motifs DC et DS à 3DIV.** Le rapprochement angulaire des directions D2 et D3 sur le motif DS induit un positionnement préférentiel dans la direction D1.

IV.1.2 Lignes ondulées : inhiber localement la différenciation axonale

Un article de de Katz paru en 1985 montre que les axones ont une tendance naturelle à croître de façon rectiligne sur substrat non contraint [3]. Ainsi, plutôt que de favoriser la croissance de l'axone dans une direction donnée, pourrait-on à l'inverse inhiber la différenciation axonale dans

les autres directions grâce à des lignes courbées ? Cette idée a été développée sur le motif nommé DW (“*Disc, Wavy lines*”), voir figure IV.2. Les ondulations sont composées d’une succession de demi-cercles, donc la courbure imposée aux neurites est donnée par le rayon du cercle. Ce rayon a été fixé sur la base d’une taille cellulaire caractéristique, celle du diamètre d’un soma ($R = 10\mu m$). Les résultats d’orientation axonale sur DW, présentés en table IV.2, montrent que ces lignes ondulées permettent effectivement d’atteindre une orientation significative de 69% des axones dans la direction rectiligne D1 ($\varepsilon = 8,0$).

Nous pouvons noter que dans le cas de ce motif DW les points d’émergence des deux lignes ondulées présentent le même resserrement angulaire que sur le motif DS. En conséquence, nous avons mesuré l’angle que forment expérimentalement les segments proximaux de ces neurites l’un par rapport à l’autre : $\theta = 80 \pm 3^\circ$ sur des neurones au stade 2 (avant polarisation). Du fait de la largeur des lignes de PLL (Poly-L-Lysine), les chemins empruntés par les segments proximaux des neurites ne sont pas parallèles entre eux comme l’imposerait le motif. La conclusion de cette observation est que deux composantes s’ajoutent vraisemblablement dans le résultat de polarisation de ce motif : d’une part l’asymétrie des neurites, comme sur le motif DS, et d’autre part la présence d’ondulations qui induit un effet significatif par rapport au motif DS ($\varepsilon = 4,1$).

Directions	D1	D2	D3	Total
Nombre d’axones	76	17	17	110
% du total	69,1%	15,5%	15,5%	100%

TABLE IV.2 – Position des axones sur le motif DW à 3DIV. La présence des ondulations combinée à l’effet de resserrement angulaire induit un positionnement préférentiel dans la direction D1.

IV.1.3 Motif boomerang : diriger la polarisation axonale par la forme imposée au soma

Pour étendre la notion de brisure de symétrie vue avec le motif DS, une contrainte géométrique appliquée non pas aux angles que forment les neurites mais à la forme du corps cellulaire du neurone pourrait-elle influencer la polarisation axonale ? Deux résultats de la littérature ont amené l’équipe à suivre cette hypothèse (voir figure IV.3) :

1. Pendant la période de compétition neuritique, le centrosome est positionné face au neurite qui deviendra l’axone (voir p. 34) [4].
2. Sur des cellules HeLa (lignée cellulaire classique issue d’un cancer de l’utérus humain), une forme de “L” imposée au corps cellulaire entraîne le placement systématique du centrosome sur l’axe de symétrie de ce motif [5].

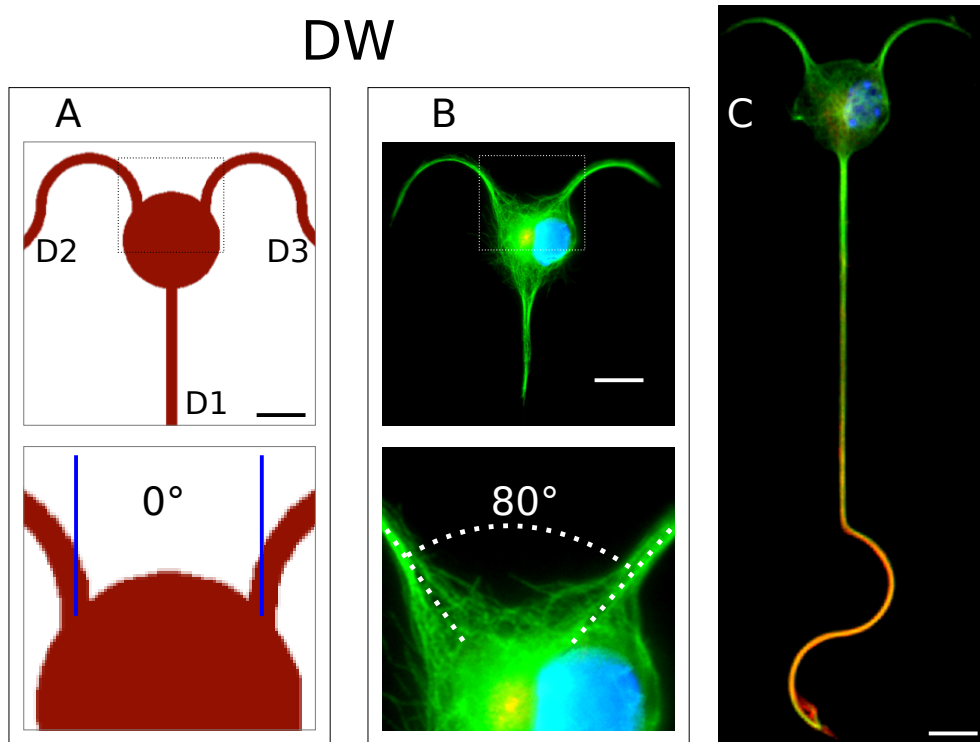


FIGURE IV.2 – **Présentation du motif DW.** **A/** Masque du motif DW présentant la première demi-période des ondulations et détail illustrant que l'émergence des lignes ondulées se fait théoriquement à la verticale : les tangentes des neurites seraient alors parallèles. **B/** Sur un neurone indifférencié à 1DIV, on constate que les segments initiaux des neurites forment un angle moyen de 80° du fait de l'adaptation de la cellule aux contraintes géométriques. Notons que le centrosome est positionné à la convergence des deux tangentes.

Marquages : centrosome (γ -tubuline, rouge) ; microtubules (YL1/2, vert) ; noyau (hoechst, bleu). | Barre : 10 μ m

C/ Neurone à 3DIV polarisé avec l'axone dans la direction D1.

Marquages : axone (tau-1, rouge) ; microtubules (YL1/2, vert) ; noyau (Hoechst, bleu). | Barre : 10 μ m

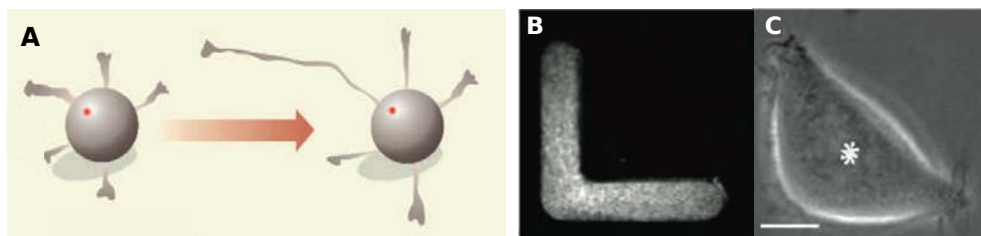


FIGURE IV.3 – La position du centrosome au stade 2 de développement désigne le neurite qui deviendra l'axone [4]. Or, cette position peut être contrôlée dans l'exemple des cellules HeLa par un motif géométrique en forme de "L" [5] | Barre : 10 μ m

Ainsi, en modifiant le motif en forme de “L” pour l’adapter à la croissance de neurones, ces deux résultats indiquent que le centrosome devrait se placer sur l’axe de symétrie du motif, et que l’axone devrait croître dans la ou les directions les plus proches du centrosome. C’est à partir de ces considérations qu’a été dessiné le motif nommé BmW (*Boomerang, Wavy lines*) présenté en figure IV.4, en remplaçant le plot cellulaire du motif DW par une adaptation du “L” constituée d’un arc de cercle de $5\mu\text{m}$ de largeur.

La cartographie des centrosomes avant polarisation présentée en figure IV.4 confirme bien le placement préférentiel des centrosomes à proximité de l’émergence du neurite en direction D1 avec le motif BmW . De plus, les résultats en termes de polarisation sont remarquables : 86% des axones sont orientés dans la direction rectiligne D1 (voir table IV.3). Ainsi la contrainte géométrique appliquée au soma permet de contrôler la localisation du centrosome et influencer significativement la polarisation axonale ($p < 0,001$ par rapport au motif DW).

En conclusion, ces résultats montrent que trois effets géométriques peuvent être mis à profit dans le but de diriger la polarisation axonale : la création d’un axe de symétrie par le rapprochement de deux neurites, la présence d’ondulations qui inhibent la différenciation des axones dans les directions non voulues, et enfin la forme du soma pour les aspects concernant la position du centrosome.

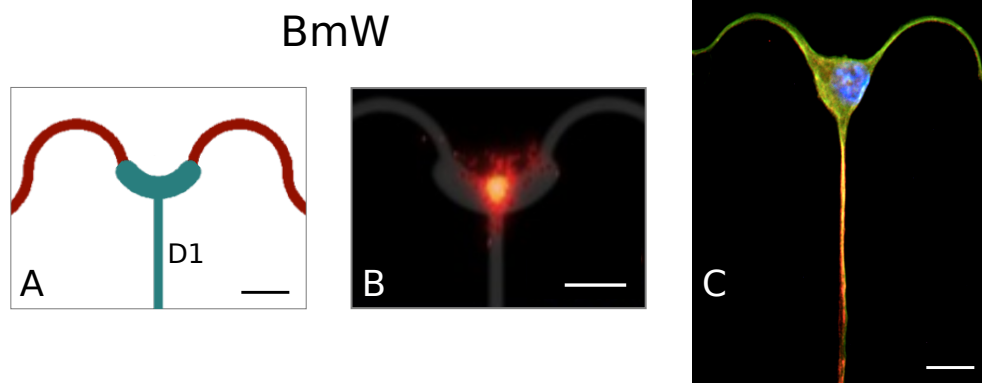


FIGURE IV.4 – **Présentation du motif BmW.** **A/** Masque de ce motif, où le disque du motif DW est remplacé par un boomerang (quart de cercle de $5\mu\text{m}$ de large). **B/** Cartographie de la position des centrosomes (marqués par la γ -tubuline) sur des neurones au stade 2 c’est-à-dire avant polarisation : le centrosome est placé sur l’axe de symétrie et à proximité de l’émergence du neurite en direction D1. **C/** Neurone à 3DIV, polarisé avec l’axone dans la direction voulue, D1.

Marquages : axone (tau-1, rouge); microtubules (YL1/2, vert); noyau (Hoechst, bleu). | Barres : $10\mu\text{m}$

Directions	D1	D2	D3	Total
Nombre d'axones	138	9	14	161
% du total	85,7%	5,6%	8,7%	100%

TABLE IV.3 – Position des axones sur le motif BmW à 3DIV. La réunion des trois contraintes géométriques induit une large domination du taux de polarisation dans la direction D1.

IV.2 Du contrôle à l'étude de la polarisation axonale

Si une contrainte neuritique ou somatique peut orienter la polarisation axonale, quels sont les mécanismes mis en jeu ? L'étude approfondie de ces contraintes peut-elle nous informer sur les étapes importantes de la polarisation axonale ? Notre hypothèse de travail est basée sur l'importance de la tension neuritique dans ces processus, nous commencerons donc par introduire cette notion dans le contexte de la polarisation axonale. Nous analyserons ensuite l'effet du resserrement angulaire observé sur le motif DS, puis focaliserons notre attention sur le mode d'inhibition des ondulations. L'étude du placement du centrosome fait elle-aussi l'objet d'une étude approfondie mais nous n'en rendrons pas compte ici (*Shaping Neurons : How Morphological Constraints Affect Axonal Polarity*, article soumis).

Tension et différenciation axonale

Nous avons vu au chapitre précédent qu'un ensemble de travaux mettaient en évidence l'importance des aspects de mécanique cellulaire dans la croissance neuritique et dans la différenciation axonale. Les neurites sont des objets sous tensions, et le support de cette tension est très probablement le faisceau de microtubules, le cortex d'actine réalisant le lien mécanique dynamique entre les adhésions et les microtubules.

Les variations de la tension neuritique peuvent-elles avoir des conséquences sur la polarisation axonale ? Plusieurs travaux [6][7] (voir le chapitre Introduction, paragraphe I.4.1) indiquent en effet un fort lien entre tension, croissance et différenciation axonale. Ces travaux nous ont amenés à faire l'hypothèse que la polarisation s'effectuerait par le dépassement d'un seuil de tension dans un neurite. Dans cette optique, la compétition neuritique pourrait consister en une sélection du neurite qui développe la plus grande tension.

Comment la tension peut-elle influencer la différenciation axonale ? Plusieurs mécanismes sous-jacents peuvent être proposés : il pourrait s'agir d'une réorganisation passive des organites cellulaires sous l'effet de la tension transmise par les microtubules, notamment le centrosome comme on l'a vu au chapitre précédent, mais il pourrait aussi s'agir d'une réorientation des microtubules

de sorte que leur polymérisation soit coordonnée dans la même direction⁽¹⁾, ou enfin la tension pourrait entraîner le coulisement des microtubules les uns par rapport aux autres, ce qui entraînerait une croissance plus rapide par déformation visqueuse couplée à l'ajout progressif de matière tout au long du neurite [8].

Dans ce cas, la tension neuritique pourrait-elle apporter une explication aux effets géométriques qui permettent le contrôle de la polarisation sur nos motifs ?

IV.2.1 Géométrie locale et équilibre des forces

Nous avons vu dans le cas du motif DS présenté en p. 98 que le resserrement angulaire des directions D2 et D3 pouvait induire une plus grande proportion d'axones dans la direction D1. Nous pouvons interpréter cet effet par l'équilibre des forces auxquelles est soumis le soma : en s'inspirant des travaux de Bray (voir p. 36) montrant que les angles des neurites et de leurs embranchements respectent une équilibre global des tensions neuritiques [9], nous pouvons faire l'hypothèse que les tensions neuritiques dans le motif DS s'équilibrent de sorte que la somme des forces subies par le soma est nulle (voir figure IV.5). Si nous appliquons ce raisonnement sur un motif présentant un angle de resserrement entre deux neurites θ , nous obtenons par symétrie dont l'axe est la direction D1 que $\|\vec{F}_2\| = \|\vec{F}_3\|$ et la projection des forces sur cet axe donne :

$$\|\vec{F}_1\| = 2 * \cos\left(\frac{\theta}{2}\right) \|\vec{F}_2\|$$

Ainsi la tension neuritique moyenne selon D1 devrait être supérieure aux tensions selon D2 et D3 dès lors que $\theta < 120^\circ$ pour que l'équilibre soit respecté. Dans le cas du motif DS où $\theta = 90^\circ$, nous obtenons en particulier $\|\vec{F}_1\| = \sqrt{2} * \|\vec{F}_2\|$.

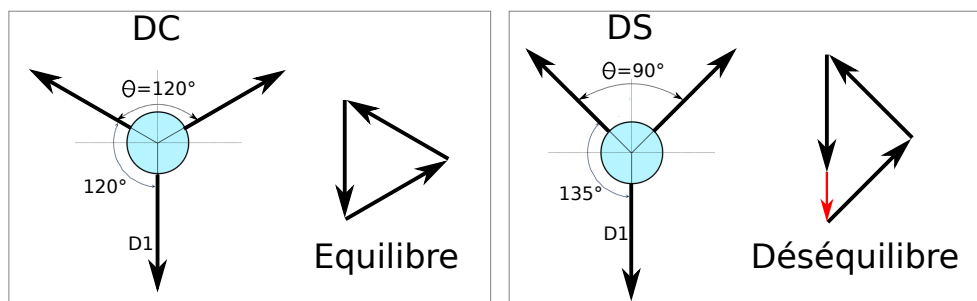


FIGURE IV.5 – L'équilibre des forces dépend des directions des neurites. Le resserrement angulaire dans le motif DS implique que la cellule doit développer une force supplémentaire dans la direction D1 pour rester sur le plot cellulaire.

1. la tension pourrait alors participer à l'orientation spécifique des microtubules dans l'axone

A présent, comment pouvons-nous relier cet équilibre des forces au taux de polarisation ? Si les neurites sous tension ont plus de chances de se polariser, l'hypothèse la plus simple consiste à supposer que la probabilité qu'un neurite se différencie en axone serait proportionnelle à la tension interne de ce neurite. Plus exactement, pour respecter le fait que la somme des probabilités dans tous les neurites doit valoir 1, nous pouvons normaliser par la force totale développée par la cellule⁽²⁾. Nous reformulons ainsi l'hypothèse : la probabilité qu'un neurite se différencie en axone pourrait être égale à la proportion de la force totale développée par la cellule dans cette direction. En définissant P_1 comme cette probabilité dans la direction 1 (ce qui équivaut au taux de polarisation selon D1) et $F_1, F_2 \dots F_n$ comme les forces dans chacun des n neurites, nous pouvons traduire cette hypothèse de la façon suivante :

$$P_1 = \frac{\|\vec{F}_1\|}{\sum_{i=1}^n \|\vec{F}_i\|}$$

En appliquant cette formule au motif DS, avec $\|\vec{F}_2\| = \|\vec{F}_3\|$ et $\|\vec{F}_1\| = 2 * \cos(\frac{\theta}{2})\|\vec{F}_2\|$ nous obtenons :

$$P_1 = \frac{\|\vec{F}_1\|}{\|\vec{F}_1\| + 2 * \|\vec{F}_2\|} = \frac{1}{1 + \frac{1}{\cos(\frac{\theta}{2})}} \quad (\text{IV.1})$$

L'application numérique pour $\theta = 90^\circ$ donne $P_1 = 41\%$, ce qui n'est pas significativement différent du taux de polarisation obtenu dans la direction 1 du motif DS (46%, $\varepsilon = 1,05$). Nous obtenons donc une assez bonne adéquation entre le taux de polarisation expérimental dans une direction et l'hypothèse d'une probabilité de différenciation égale à la part de la force totale dans cette direction. Cette analyse, pour être validée, devra bien entendu être testée à l'aide d'autres motifs d'adhésion.

Si l'on peut considérer que le rôle de la tension dans la polarisation axonale est mis en valeur dans le cadre du motif DS, la tension pourrait-elle aussi avoir une importance dans le cadre des motifs à ondulations ?

IV.2.2 Tension et dynamique neuritique sur ondulations

Étirements et séparations neuritiques

L'observation en vidéo-microscopie de neurones sur les motifs possédant des ondulations révèle clairement la présence de cette tension neuritique, et montre de plus que celle-ci induit des phénomènes très dynamiques : tout comme un élastique devient rectiligne si l'on tire à ses deux

2. Ce qui permet de plus de se dispenser de la valeur réelle de la force

extrémités, le neurite se déforme sur les ondulations pour suivre le plus court chemin (voir extraits de vidéo en figure IV.7). Comme l'illustre le marquage de l'actine et des microtubules en figure IV.6, trois cas de figure peuvent alors être observés :

1. Le neurite peut suivre parfaitement la ligne d'adhésion.
2. Dans un cas intermédiaire, le neurite s'étire vers l'intérieur de l'ondulation en formant une structure très fine semblable à un lamellipode, où l'activité de l'actine est très importante (voir figure IV.6 D à F). Nous désignerons cet état par l'expression "étirement neuritique".
3. En dernier lieu, le neurite peut se séparer en deux parties, l'une sur la ligne d'adhésion et l'autre suspendue au dessus de la zone non-adhésive, état que nous nommerons "séparation neuritique". Il ne s'agit pas à proprement parler d'un embranchement du neurite, car les deux parties se rejoignent à l'extrémité distale de la séparation, que nous nommerons "jonction neuritique" et reforment un unique neurite (voir figure IV.6 A à C)

Si les neurites peuvent rester dans un de ces trois états pendant plusieurs minutes, aucun de ces états n'est par essence définitif car il peut y avoir transition de l'un à l'autre. Le schéma le plus fréquent est illustré par la vidéo visible en figure IV.7 : sur une ondulation, un neurite suit parfaitement le motif, puis ce neurite se tend et s'étire, puis un point de rupture apparaît dans la membrane et la séparation se propage entre deux points relativement stables. Ensuite, une forte activité du cytosquelette d'actine provenant surtout du côté du corps cellulaire étire la membrane pour re-coloniser l'espace entre ces deux parties, en les rapprochant à la manière d'une fermeture éclair, jusqu'à reformer un neurite unique. Naturellement, les neurites ne présentent pas tous la même dynamique, certains suivant parfaitement les lignes ondulées pendant plusieurs heures et d'autres établissant un état de séparation permanente.

Vagues et tension neuritique

De plus, comme l'illustre la figure IV.8, les vagues ont une importance prépondérante dans ces manifestations d'augmentation de tension interne. Nous avons vu au chapitre précédent que l'émission périodique de ces structures semblables aux cônes de croissance s'accompagne d'une augmentation de la tension neuritique du fait que les somas pouvaient être tractés par ces vagues sur des distances de 20 à 30 μm . Sur les motifs avec ondulations, une surface d'adhésion suffisante est réservée aux somas pour bloquer leur migration. Mais le phénomène témoignant de l'implication des vagues dans les étirements ou les séparations neuritiques est qu'une vague est systématiquement visible à une distance inférieure à 50 μm lorsque de tels événements apparaissent. Plus précisément, la vague semble être l'élément central de la génération de tension car celle-ci se manifeste aussi bien à l'avant qu'à l'arrière de la vague (voir figure IV.8).

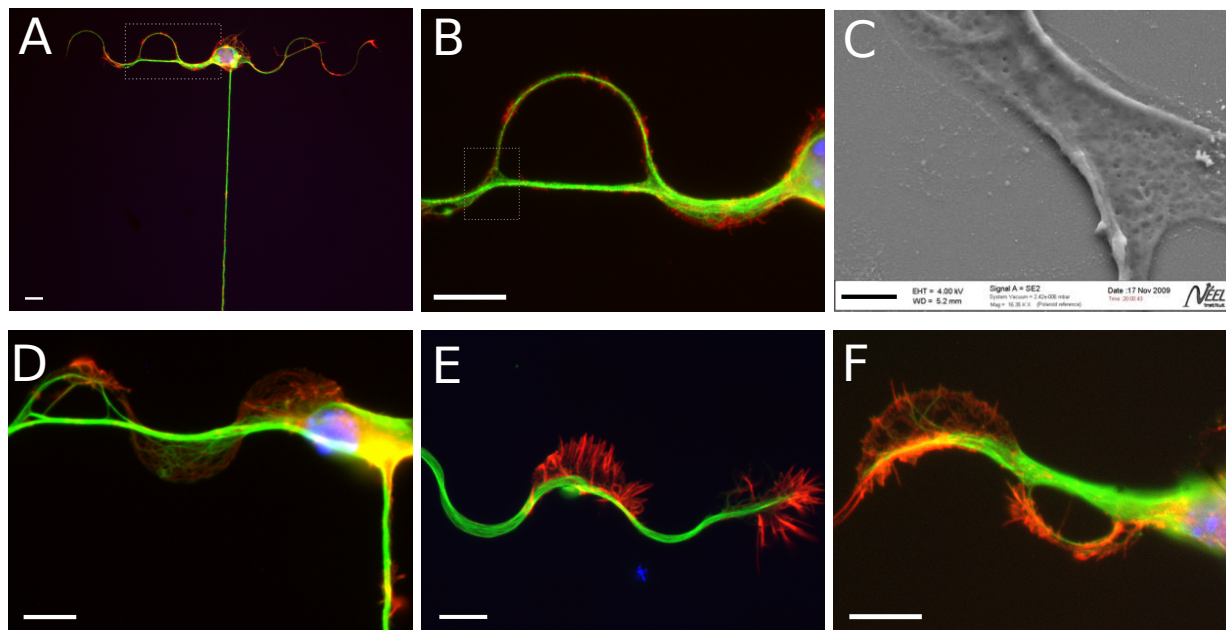


FIGURE IV.6 – **Étirements et séparations neuritiques.** **A/** Neurone à *3DIV* ayant développé deux séparations neuritiques. **B/** Détail du A montrant que la majorité des microtubules suivent le plus court chemin. **C/** Détail au microscope électronique à balayage (MEB) d’une jonction neuritique (partie distale des séparations) telle qu’encadrée en B. La structure étirée de la membrane confirme que les deux parties du neurite se rejoignent en ce point pour reformer un neurite unique. **D/** Structure typique d’un étirement neuritique qui se répète sur une période complète de l’ondulation. Les microtubules suivent le plus court chemin tandis que l’actine réalise le lien entre les adhésions et les microtubules. La trajectoire des microtubules est arrondie, contrairement à leur aspect rectiligne dans les séparations neuritiques : le réseau d’actine se contracte vraisemblablement pour rapprocher les microtubules de la ligne d’adhésion. **E/** A certaines occasions l’actine forme des filopodes, témoignant d’une activité exploratoire perpendiculaire à la ligne d’adhésion. **F/** Étape transitoire entre l’étirement et la séparation neuritique : une ou plusieurs zones de rupture peuvent apparaître dans le cortex d’actine et dans la membrane. Sous l’effet de la tension, ces ruptures peuvent se propager dans l’étirement jusqu’à former une séparation neuritique.

Marquages : actine (phalloïdine-TxRed, rouge) ; microtubules (YL1/2, vert) ; noyau (Hoechst, bleu). | Barres : fluorescence $10\mu\text{m}$ et MEB $1\mu\text{m}$ (tilt= 30°)

Le plus souvent, les microtubules semblent suivre le plus court chemin : ils suivent la trajectoire intérieure dans les étirements neuritiques, et ils sont concentrés dans la partie rectiligne dans les séparations neuritiques (voir figure IV.6). Ces observations confirment l’hypothèse que les microtubules seraient le support de la tension interne, tels des câbles dans des gaines déformables. Notons qu’il n’a jamais été observé de décrochement total car il reste toujours un “fantôme” de neurite sur la ligne ondulée montrant que la membrane, les adhésions, quelques microtubules et un cortex d’actine restent sur la ligne d’adhésion. On peut en conclure que dans de telles conditions les adhésions sont plus robustes que l’intégrité cylindrique du neurite.

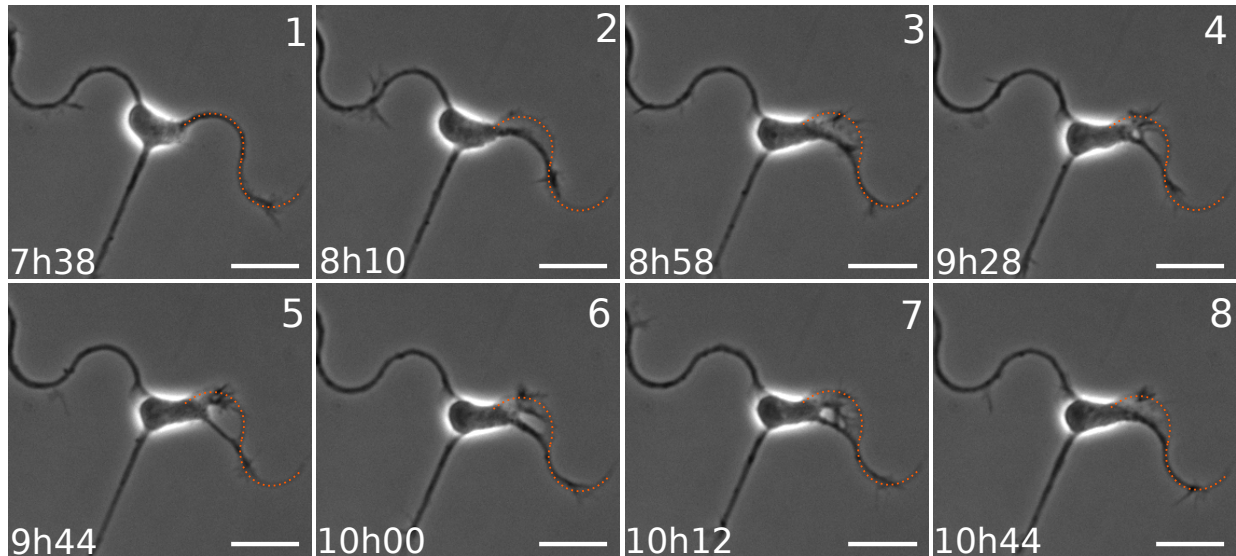


FIGURE IV.7 – Séquence typique de vidéo-microscopie en contraste de phase mettant en évidence les variations de tension interne des neurites. (1) D'abord, le neurite suit parfaitement les ondulations. (2 & 3) Par la suite, un étirement du neurite et la rétraction du cône de croissance sur une dizaine de microns témoignent de l'augmentation de la tension interne du neurite. (4 & 5) La structure étirée est rompue, puis se propage jusqu'à l'obtention d'un pseudo-équilibre mécanique. (6 à 8) Néanmoins la séparation neuritique ne se stabilise pas toujours et peut revenir à une position étirée. | Barres : $20\mu\text{m}$

Les étirements neuritiques : manifestation du piégeage des vagues ?

Si les vagues peuvent générer des étirements neuritiques sur les ondulations, ceux-ci peuvent en retour avoir une influence sur la propagation des vagues. En effet, dans certains cas la vague peut à la fois générer un étirement et se fondre dans sa structure, ce qui résulte en un net ralentissement de la progression de cette vague. La figure IV.9 illustre un tel piégeage d'une vague dans un étirement : alors que la vague parcourt d'abord le neurite à une vitesse de l'ordre de $3\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, sa progression est interrompue durant 30min lorsqu'elle atteint l'étirement (voir le graphe temporel). Parallèlement, l'activité du cytosquelette s'intensifie ce qui suggère que les éléments participant à la progression de la vague réorganisent leur activité dans cet environnement original.

En conclusion, sur ce type de motif les lignes ondulées créent une réelle compétition entre d'une part la tension interne accrue au niveau des vagues et supportée par les microtubules et d'autre part la cohésion du neurite assurée par l'actine et ses interactions avec la membrane et les adhésions. Mais comment ces observations peuvent-elles expliquer l'inhibition de différenciation axonale par les ondulations ?

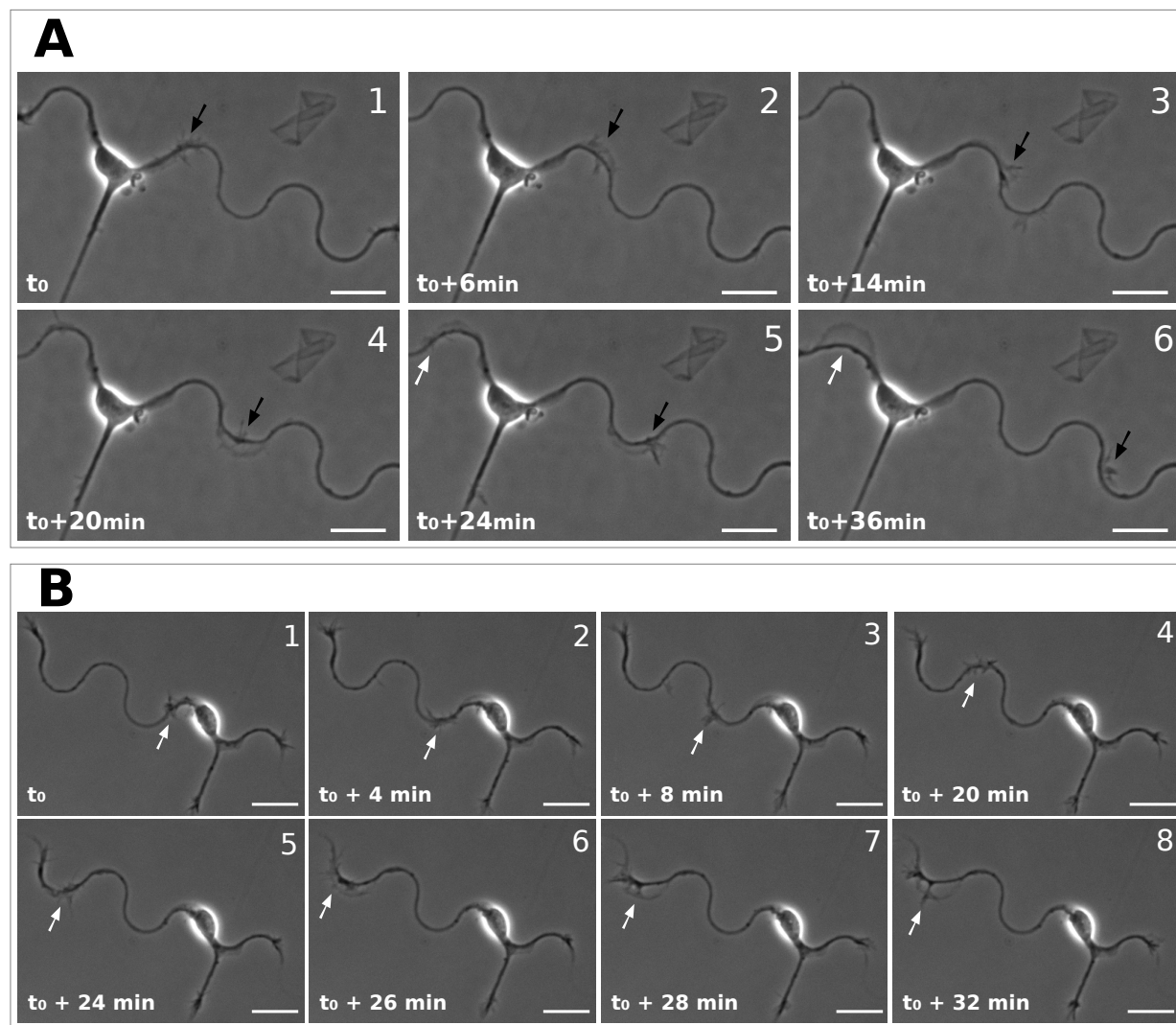


FIGURE IV.8 – **Importance des vagues dans les manifestations d'augmentation de la tension neuritique.** **A/** Les étirements neuritiques se produisent systématiquement lors du passage d'une vague (flèches noires) ou après son passage (flèches blanches). **B/** La rétraction du cône de croissance avant l'arrivée de la vague (flèches blanches) témoigne du fait que la tension est aussi exercée à l'avant de la vague. | Barres : $20\mu\text{m}$

IV.2.3 Mécanismes d'inhibition axonale par les ondulations

A partir des trois types de comportements des neurites observés sur ondulations, les hypothèses que nous pouvons formuler pour expliquer l'effet inhibiteur sont les suivantes :

1. Selon notre hypothèse de départ dérivée du travail de Katz [3], la courbure elle-même inhiberait la différenciation. Les neurites qui suivent parfaitement l'ondulation y seraient donc les plus sensibles, tandis que ceux qui s'étirent ou se séparent par réaction aux ondulations auraient plus de chances de déjouer l'inhibition.

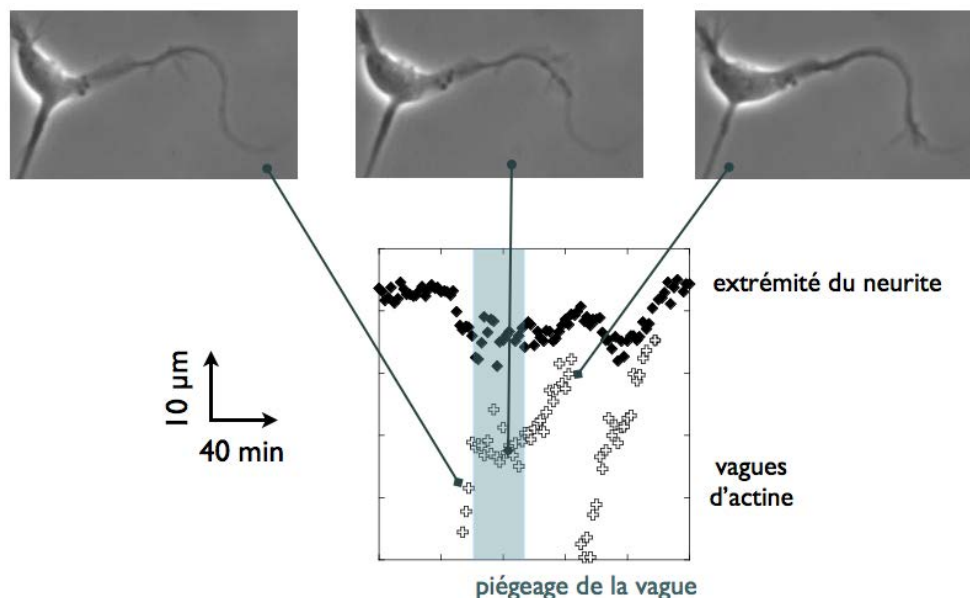


FIGURE IV.9 – Les vagues peuvent être piégées par les étirements neuritiques. Dans cet exemple, la position de deux vagues consécutives (croix blanches) ainsi que le cône de croissance (points noirs) sont repérés sur un graphe temporel. La première vague illustre clairement le phénomène de piégeage par l'étirement neuritique. On notera sur le graphe la rétraction neuritique systématique lorsque les vagues s'approchent de l'extrémité neuritique, et la hausse de croissance qui intervient au contraire lorsque la vague atteint le cône de croissance.

2. Au contraire, on peut penser que ce sont les séparations des neurites en deux parties qui induisent l'inhibition. La raison essentielle serait l'absence d'adhésion sous la partie rectiligne : il a été montré que le décrochement de neurites de leur substrat d'adhésion entraînait leur rétraction [10]. Ainsi l'absence d'adhésion sur une longueur de l'ordre de $20\mu m$ pourrait inhiber la croissance en engageant une rétraction neuritique.
3. Enfin, on peut supposer que c'est l'état de transition c'est-à-dire l'étirement adhérent qui inhiberait la différenciation, tandis que les deux autres états permettraient au neurite de devenir l'axone s'ils sont suffisamment stables. Pour supporter cette idée, une grande activité du squelette d'actine est observée dans les étirements neuritiques, et les vagues sont absorbées par cette structure dynamique. Cela indique une mobilisation des ressources pour assurer la cohésion du neurite, ce qui en conséquence pourrait réduire les ressources disponibles pour la croissance et la différenciation. De fait, les étirements sont associés à une rétraction neuritique importante. Dans un contexte de compétition neuritique, les ondulations apporteraient donc un retard de croissance qui donnerait l'avantage à la ligne droite.

Dans la section suivante, nous présenterons les expériences que nous avons réalisées dans le but de discriminer ces trois hypothèses en vérifiant dans quelles conditions l'inhibition est la plus forte.

La première expérience consiste à faire varier le rayon des demi-cercles composant les ondulations, pour vérifier si l'effet des ondulations dépend de la courbure. Une deuxième expérience consiste à opposer deux types de courbures sur le même motif. Ensuite, pour changer les conditions de croissance nous avons creusé le motif d'adhésion dans le substrat, de sorte que les neurites se développent dans des tranchées : l'effet d'inhibition sera-t-il supprimé si les neurites peuvent prendre appui sur les parois et ainsi éviter l'étirement et la séparation ? Enfin, si l'on modifie le motif de sorte que les ondulations soient asymétriques, comment la polarisation en sera-t-elle affectée ?

IV.3 Étude des mécanismes d'inhibition sur ondulations

Cette section présente les résultats de polarisation axonale obtenus dans ces conditions originales ou sur différentes variations des motifs avec ondulations. L'objectif est de déterminer l'influence de la courbure, des étirements et des séparations neuritiques sur l'inhibition de la différenciation axonale. Par conséquent nous présenterons, en plus des résultats de polarisation de chaque motif, le taux d'axones présentant des étirements/séparations parmi ceux qui sont parvenus à se différencier sur les ondulations. Notons que ces deux structures sont réunies car dans la grande majorité des cas nous ne pouvons pas distinguer un étirement d'une séparation neuritique : l'état du neurite est le plus souvent intermédiaire du fait de la grande dynamique de ces structures. Enfin, le marquage de l'axone utilisé pour l'ensemble des résultats de cette section est le marquage de l'ankyrine-G, protéine spécifique du segment initial de l'axone qui peut s'observer dès *6DIV*. En comparaison, le marqueur tau-1 est plus précoce mais marque toute l'arborisation axonale. Les contrôles réalisés sur divers motifs montrent que les résultats de taux de polarisation avec ces deux types de marquages sont identiques.

IV.3.1 Polarisation sur des gammes de courbures

Afin d'examiner l'influence de la courbure des lignes sur les neurites et leur différenciation en axone, deux séries de motifs ont été créés sur la base du même schéma, à savoir une suite d'arcs de cercles pour les ondulations, toujours avec une épaisseur de ligne de $2\mu m$ et un disque de $20\mu m$ pour le soma. Sur ces motifs chaque neurone dispose de quatre neurites, ce qui permet d'atténuer l'effet de resserrement angulaire que nous avons sur le motif DS et ainsi d'observer uniquement l'effet des courbures. Le pourcentage attendu dans le cas aléatoire est donc ici de 25%. Comme on le voit en figure IV.10, la définition d'un arc de cercle peut faire intervenir plusieurs variables : le rayon du cercle R , la demi-longueur d'onde $\lambda/2$, l'angle caractérisant l'étendue de l'arc de cercle γ , et la hauteur de l'oscillation H . Ces quatre variables sont reliées par ces deux équations : $\sin(\gamma) = \frac{R-H}{R}$ et $\cos(\gamma) = \frac{\lambda/4}{R}$, donc un couple de ces variables suffit pour définir l'arc de cercle composant le motif. Nous pouvons donc de fixer un de ces paramètres et faire varier les autres pour étudier une certaine gamme de ces motifs. Nous avons testé deux de ces possibilités (voir figure IV.10) :

- **Gamme 1** : Dans la première gamme d'ondulations, nous fixons le paramètre $\lambda/2 = 20\mu m$ et faisons varier H de 0 à $10\mu m$. Le cas $H = 10\mu m$ est un demi-cercle et correspond aux ondulations des motifs DW et BmW présentés auparavant, nous nommons ce motif DW4 (“Disc, 4 Wavy lines” [2]).

- **Gamme 2** : Dans la seconde gamme, nous fixons l'angle caractérisant l'arc de cercle à $\gamma = 0^\circ$ pour ne travailler qu'avec des demi-cercles, et faisons varier le rayon de courbure (ici $H = R$) de 5 à $20\mu m$ (le cas $H = 10\mu m$ est donc le motif commun aux deux gammes, DW4).

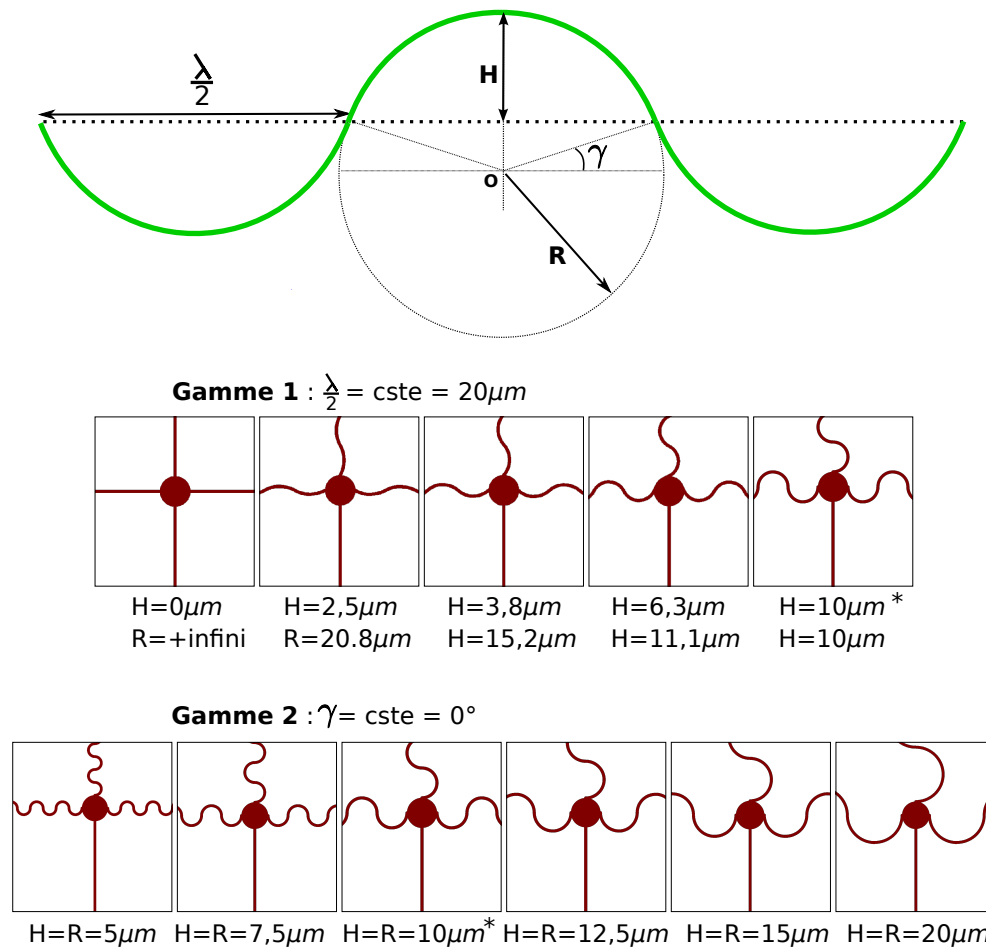


FIGURE IV.10 – **Présentation des deux gammes de courbures étudiées** Ces motifs, construits à partir d'une répétition d'arcs de cercles, peuvent être définis par un couple de variables parmi les quatre suivantes : le rayon de courbure R , la hauteur H , la demi-longueur d'onde $\frac{\lambda}{2}$, et l'angle caractérisant l'ouverture de l'arc γ . La gamme 1 est définie par une longueur d'onde fixe, tandis que la gamme 2 n'est composée que de demi-cercles (angle d'ouverture fixe).

* Le motif marqué d'une étoile, nommé DW4, est commun aux deux gammes et possède les mêmes caractéristiques d'ondulations que le motif à trois neurites DW (voir p. 100).

Les résultats concernant la gamme de motifs à longueur d'onde constante (Gamme 1) sont résumés en table IV.4. Ils indiquent que l'inhibition sur ondulations est d'autant plus efficace que la courbure est importante. De fait, les motifs à plus faibles courbures (voir figure IV.11.A) se rapprochent progressivement du motif à quatre lignes droites qui naturellement donne une polarisation aléatoire. Cependant cela ne prouve pas que la courbure est la raison exclusive de

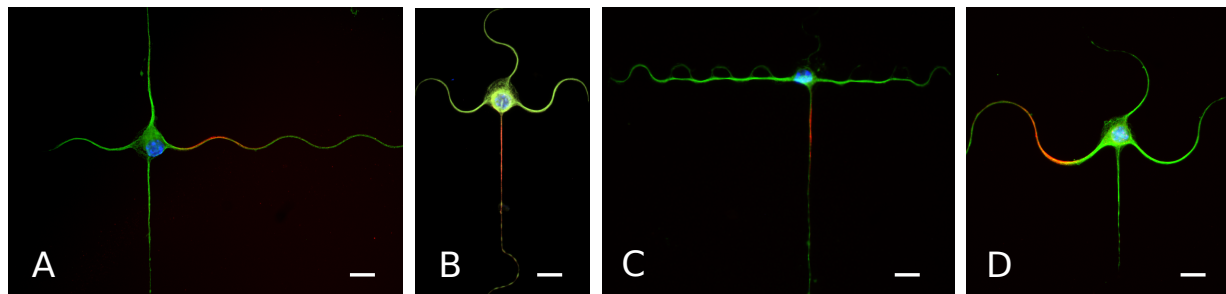


FIGURE IV.11 – Exemples de neurones à 6DIV sur les deux gammes de courbures étudiées. A/ Gamme 1, $H = 3,8\mu m$; B/ DW4, Gamme 1 et 2, $H = 10\mu m$; C/ Gamme 2, $H = 5\mu m$; D/ Gamme 2, $H = 20\mu m$

Marquages : segment proximal de l'axone (ankyrine, rouge) ; microtubules (YL1/2, vert) ; noyau (Hoechst, bleu). | Barres : $10\mu m$

l'inhibition car le nombre d'axones étirés/séparés est lui aussi d'autant plus faible que la courbure est faible.

Gamme1					
Motif : $H =$	$0\mu m$	$2,5\mu m$	$3,8\mu m$	$6,3\mu m$	$10\mu m$
$R =$	$+\infty$	$20,8\mu m$	$15,2\mu m$	$11,1\mu m$	$10\mu m$
Nombre de neurones	115	285	225	330	217
% axones selon D1	25%	33%	35%	46%	52%
% étirements/séparations	0%	5%	9%	15%	28%

TABLE IV.4 – Pourcentages d'axones dans la direction D1 et taux de séparations neuritiques pour les axones sur ondulations sur les motifs de la gamme 1.

Gamme2						
Motif : $H = R =$	$5\mu m$	$7,5\mu m$	$10\mu m$	$12,5\mu m$	$15\mu m$	$20\mu m$
Nombre de neurones	310	341	217	359	286	558
% axones selon D1	49%	45%	45%	35%	39%	29%
% étirements/séparations	63%	66%	42%	26%	33%	20%

TABLE IV.5 – Pourcentages d'axones dans la direction D1 et taux de séparations neuritiques pour les axones sur ondulations sur les motifs de la gamme 2.

Dans la gamme d'ondulations composées de demi-cercles (Gamme 2), les résultats de polarisation mettent en relief la même tendance globale entre la polarisation et le rayon de courbure (voir figure IV.12). Sur le motif au plus grand rayon de courbure ($20\mu m$) visible en figure IV.11.D notamment, l'effet des motifs est suffisamment réduit pour que le pourcentage d'axones dans le sens D1 (29%) ne soit pas significativement différent du cas aléatoire. La faible courbure est donc

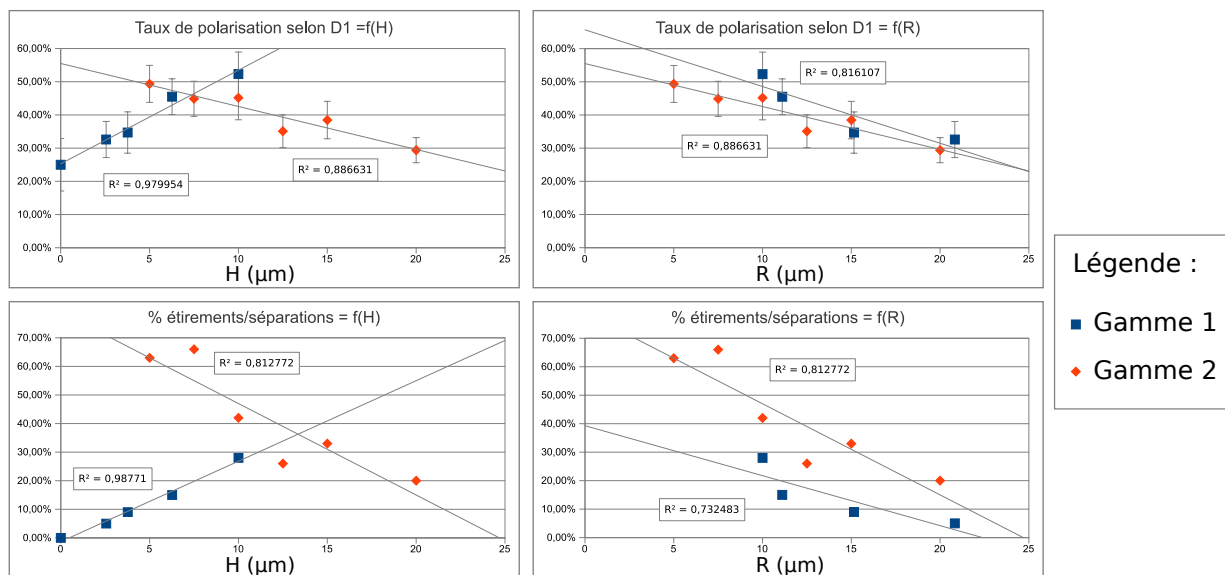


FIGURE IV.12 – **Bilan des résultats de polarisation et d'étirements/séparations sur les deux gammes.** Pour les deux mesures effectuées, la hauteur du motif est la variable qui donne la meilleure linéarité. Néanmoins, si l'on veut trouver une variable dont l'effet est similaire dans les deux gammes, alors le rayon de courbure sera plus adapté, bien que le taux d'étirements/séparations présente une différence de comportement importante entre les deux gammes. Notons que par extrapolation il apparaît sur les deux mesures et dans les deux gammes qu'aucun effet ne doit être attendu au delà d'une valeur limite de $R = 25\mu\text{m}$ (taux d'étirements/séparations de 0% et taux de polarisation de 25%)

perçue par le neurite comme une ligne droite, même si sur cette fois les ondulations sont composées de demi-cercles. A l'autre extrémité de la gamme de courbures, le motif au plus petit rayon (figure IV.11.C) ($5\mu\text{m}$) donne le meilleur taux de polarisation. Nous n'avons pas dessiné de masque en deçà de ce rayon de $5\mu\text{m}$, car la largeur de la ligne d'adhésion ($2\mu\text{m}$) ne serait plus négligeable devant le rayon de courbure et les neurites auraient l'opportunité de croître selon une ligne droite comme selon D1.

Si l'on réunit les deux gammes afin de chercher une loi générale entre la forme du motif et le taux de polarisation, on constate que la meilleure adéquation est obtenue en traçant le taux de polarisation en fonction de la courbure (voir figure IV.12). Néanmoins, le tracé du taux de polarisation en fonction de la hauteur du motif (H) est la représentation qui donne la linéarité la plus nette pour chacune des gammes, qui se rejoignent au niveau du motif DW4. Nous avons en effet deux mesures du taux de polarisation sur ce motif (visible en figure IV.11.B), avec une moyenne de $P_{(DW4)} = 49\% \pm 5\%$ ($N = 434$ cellules).

Pour aller plus loin, nous pouvons extrapoler les résultats de ces deux gammes comme illustré en figure IV.13 : en supposant que toute gamme basée sur le même type de contrainte (longueur

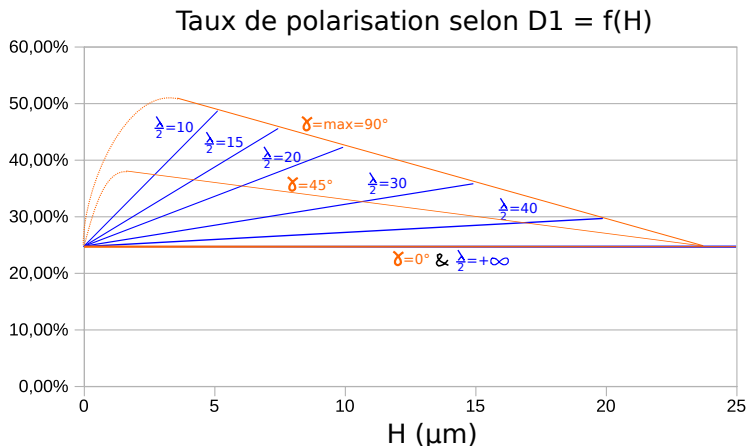


FIGURE IV.13 – **Extrapolation de la loi de linéarité entre taux de polarisation P et hauteur H sur les gammes d’ondulations.** Toute gamme qui serait construite à partir d’une longueur d’onde constante (comme la gamme 1) aurait comme motifs extrêmes un motif à lignes droites (polarisation de 25%) et un motif de la gamme 2 (car on ne peut aller au delà d’un demi-cercle en gardant une longueur d’onde constante). En supposant que l’effet de la hauteur sur la polarisation serait toujours affine, nous obtiendrions alors un ensemble de droites repérées en bleu. Inversement, si nous réalisons un ensemble de gammes avec pour chacune un angle d’ouverture d’ondulation fixé (comme la gamme 2), nous pouvons supposer que nous obtiendrions un ensemble de droites repérées en orange. Notons que nous aurions nécessairement une chute du taux de polarisation pour les motifs avec un H de l’ordre de $2\mu m$ car la largeur de la ligne d’adhésion ne serait plus négligeable.

d’onde ou angle d’ouverture fixe) donnerait une relation affine entre le taux de polarisation et la hauteur H, nous pouvons prévoir la valeur du taux de polarisation de n’importe quel motif composé d’ondulations à arcs de cercles.

Enfin, la gamme 2 apporte une information différente de la précédente lorsque l’on observe les taux de séparations/étirements. Le fait que les ondulations soient composées de demi-cercles résulte en un plus grand nombre moyen d’étirements/séparations pour les axones. Plus précisément, sur les motifs à plus grand rayon de courbure ($20\mu m$) les étirements ont une amplitude trop faible pour être comptés avec précision mais les séparations neuritiques sont beaucoup plus fréquentes que sur les motifs à courbure équivalente de la gamme 1 (20% vs 5% des axones séparés sur la plus faible courbure, pour une taux de polarisation de 29% vs 33%, respectivement). Ainsi, il semble que les séparations neuritiques ne soient pas responsables de l’effet d’inhibition car un pourcentage différent peut être associé à une polarisation semblable. Cependant le motif à plus faible rayon de courbure induit des séparations quasi-systématiques (voir figure IV.12), tout en atteignant la polarisation selon D1 la plus importante de ces gammes, c’est-à-dire l’inhibition maximale des ondulations testées. Les séparations neuritiques ne sont donc ni le mécanisme qui inhibe la différenciation sur les courbures, ni au contraire un élément qui la favoriserait.

IV.3.2 Un motif à contraste de courbures

Pour forcer la position de l'axone dans la direction D1, les motifs précédents présentaient tous un seul type de courbure opposé à une ligne droite. Afin d'étudier plus en détail le mode d'inhibition des ondulations, nous avons réalisé le motif $DW_{\text{contraste}}$, qui est un motif DW (voir p. 100) où la ligne droite en D1 est remplacée par une ondulation de faible amplitude. Cette ondulation issue de la première gamme de courbures avait donné 35% d'orientation dans un motif à quatre neurites (voir figure IV.12).

La question qui nous a amenés à tester ce motif est la suivante : comment l'inhibition de chaque courbure serait-elle modifiée si l'on oppose dans un même motif deux courbures différentes ? Cette question est importante pour comprendre le mode d'inhibition des ondulations, car deux cas de figure s'opposent :

1. Si la cellule intègre l'information issue de chacun des neurites, alors le contraste d'inhibition entre fortes et faible ondulation devrait écraser l'effet de la faible courbure et mener à une polarisation dans la direction D1 à peine plus faible que sur le motif DW (69%).
2. Si au contraire les neurites sont indépendants du point de vue de l'inhibition par la courbure, alors la faible ondulation devrait parvenir à inhiber une proportion non négligeable d'axones même si la direction D1 reste bien-sûr privilégiée.

Les résultats présentés en table IV.6 apportent une réponse claire à cette question : le taux de polarisation selon D1 passe de 69% avec une ligne droite à 51% avec la faible ondulation (différence significative, $\varepsilon = 2,74$). Ainsi, bien qu'aucune séparation ne soit observée sur la faible ondulation⁽³⁾, la polarisation y est réduite par rapport à la ligne droite sur le motif équivalent DW. Ce motif confirme que la compétition neuritique s'effectue dans une relative indépendance des neurites, car le contraste d'inhibition n'a pas empêché la faible ondulation de réduire la polarisation en D1. Tout comme avec les deux gammes de motifs précédents, il semble que l'inhibition ne repose pas sur les séparations, mais essentiellement sur la courbure des lignes ou bien sur les étirements neuritiques, dont nous n'avons pas encore discriminé les effets. Par quel moyen pourrions nous transformer ces lignes ondulées de sorte que la courbure soit conservée mais les étirements rendus impossibles ? L'idée présentée dans le paragraphe suivant consiste à creuser la forme du motif dans un substrat pour faire croître les neurites dans des tranchées.

3. Sur ces faibles ondulations les étirements sont de très faible amplitude et n'ont pas pu être pris en compte

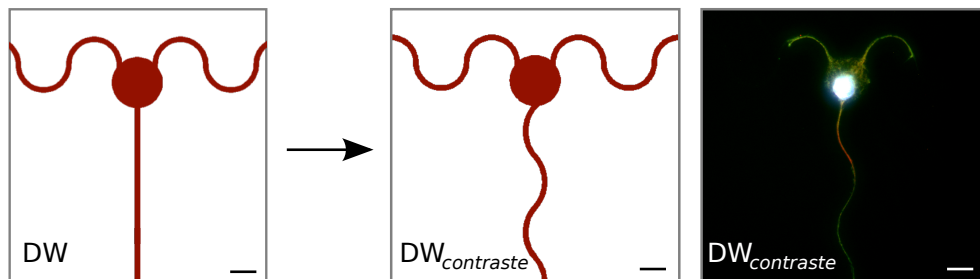


FIGURE IV.14 – **Présentation du motif $DW_{\text{contraste}}$.** Le motif DW a été modifié pour opposer deux types de courbures sur le même motif. Droite : exemple de neurone à 6DIV avec l'axone en direction D1. Marquages : segment proximal de l'axone (ankyrine, rouge) ; microtubules (YL1/2, vert) ; noyau (Hoechst, bleu). | Barres : $10\mu\text{m}$

Directions	D1	D2	D3	Total
Nombre d'axones	61	32	26	119
% du total	51%	27%	22%	100%
% étirements/séparations	X	25%	31%	28%

TABLE IV.6 – **Position des axones sur le motif DW_{courbure} à 3DIV.** Le taux de polarisation selon D1 est réduit de 69% à 51% entre le motif DW et le motif DW_{courbure}

IV.3.3 Différenciation des neurites dans des tranchées

Afin de discriminer l'effet des étirements neuritiques de l'effet de la courbure elle-même, nous avons gravé le motif DW4 dans un substrat de Silicium à l'aide d'une étape supplémentaire de gravure ionique réactive (voir p.54). Notre objectif était de supprimer les étirements neuritiques : les tranchées ainsi obtenues devaient permettre aux neurites de prendre appui sur les parois dans les ondulations plutôt que de s'étirer au dessus de la surface non-adhésive.

Les résultats de polarisation sur ce motif en tranchées sont résumés en table IV.7, et montrent que l'effet du motif est significativement réduit (31% d'axones selon D1 contre 52% sur DW4 sans tranchées, $\varepsilon = 16,3$). Le taux de polarisation reste donc supérieur au cas aléatoire ($\varepsilon = 2,34$), mais sa diminution nous permet de conclure que la courbure n'est pas une condition suffisante pour inhiber la polarisation sur ondulations. L'inhibition est-elle réduite parce que les étirements/séparations sont évités ? Le taux d'axones étirés ou séparés sur ondulations s'élève à 24% : ces phénomènes n'ont donc pas été supprimés, mais ce taux est significativement inférieur au cas plan (35%, $\varepsilon = 2,81$). Comme l'illustre la figure IV.15, les parois des tranchées permettent de retenir certains neurites mais ne sont pas parfaitement verticales. Nous avons donc supposé que les étirements/séparations obtenus étaient dus à cette imperfection de la gravure.

Nous avons à plusieurs reprises réalisé des tranchées plus profondes et aux bords plus verticaux

grâce à une étape de gravure profonde, néanmoins nous ne sommes jamais parvenus à faire adhérer les cellules dans ces conditions. Nous pensons que l'aspect de surface (rapport largeur/profondeur) était trop faible pour permettre un mouillage de liquide au fond des tranchées, et qu'ainsi le dépôt de PLL (Poly-L-Lysine) ne se réalisait pas correctement même si un plasma oxygène était employé pour rendre la surface hydrophile.

En conclusion, les tranchées permettent à un plus grand nombre de neurites de se différencier en axones dans les ondulations, et nous constatons que le taux d'étirement ou de séparation neuritique y est significativement réduit. Ces deux observations indiquent que l'effet d'inhibition résiderait dans les étirements/séparations neuritiques, et non pas dans la courbure elle-même. Pourtant, les expériences précédentes montraient que les séparations neuritiques n'étaient pas suffisantes pour induire une inhibition. Comment pouvons-nous relier ces observations qui semblent contradictoires ? Le motif présenté ci-après permet de répondre à cette question en introduisant la notion de stabilité des séparations.

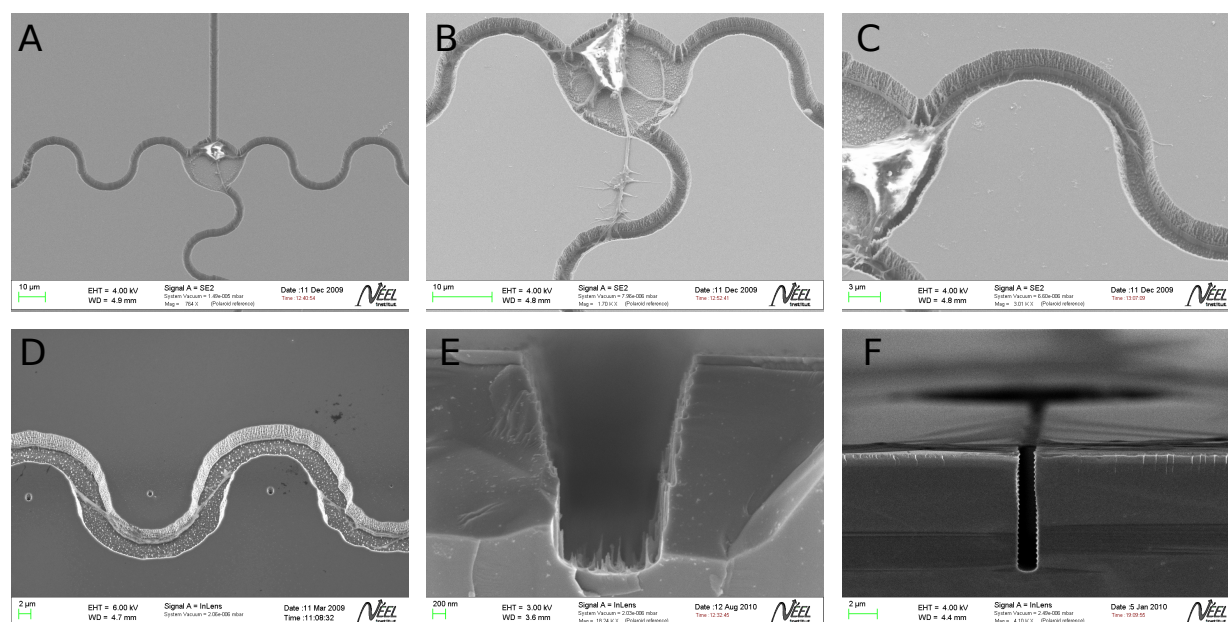


FIGURE IV.15 – **Neurones en tranchées.** **A/** Motif DW4 gravé dans un substrat de silicium par gravure ionique réactive. **B/** Exemple de neurone ayant à formé une séparation neuritique malgré les tranchées. **C/** Le plus souvent, les cônes de croissance restent dans les tranchées, et **D/** les neurites qui se tendent peuvent prendre appui sur les parois pour rester sur la zone d'adhésion. **E/** Notons que dans cette expérience, les tranchées étaient relativement peu profondes ($3\mu\text{m}$) et pas parfaitement verticales. **F/** Des essais ont été effectués avec des tranchées beaucoup plus profondes ($10\mu\text{m}$) et verticales, mais nous ne sommes pas parvenus à faire adhérer les cellules dans ces conditions.

Directions	D1	D2	D3	D4	Total
Nombre d'axones	168	125	143	98	534
% du total	31%	23%	27%	18%	100%
% étirements/séparations	X	25%	20%	27%	24%

TABLE IV.7 – **Position des axones sur le motif DW4 en tranchées à 3DIV.** Le taux de polarisation selon D1 est réduit de 49% à 31% entre le motif DW4 classique et en tranchées.

IV.3.4 Enseignements d'un motif asymétrique

Les motifs à trois neurites présentés jusque là possédaient une symétrie d'axe D1. Or, lors de la réalisation d'un réseau de trois neurones nous avons été amenés à modifier le motif BmW en réduisant l'angle entre les directions D2 et D1 de 90° à 60°, tandis que l'angle entre D3 et D1 est conservé à 90°. Toutes les autres caractéristiques des ondulations, dont la courbure, sont identiques entre D2 et D3. Les résultats en table IV.8 montrent que cette asymétrie a eu pour conséquence une augmentation du taux d'axones dans la direction D2 en comparaison au motif BmW ($\chi^2 = 6,36 > 5,99$ pour 5% d'erreur et 2 degrés de liberté, voir p.62). Comme l'illustre la figure IV.16, cette asymétrie a deux conséquences sur les séparations neuritiques : d'une part, la distance parcourue par les parties rectilignes des séparations est plus courte dans la direction D2 que D3 (14 μm contre 18 μm , respectivement); d'autre part l'angle que font les deux parties du neurite au niveau de la jonction neuritique est un angle droit dans la direction D2, alors que cet angle est limité à 45° dans la direction D3.

Deux hypothèses peuvent alors être avancées.

1. En premier lieu, la distance entre adhésions lorsqu'il y a séparation pourrait influencer la différenciation des neurites en axones. Ainsi, le taux d'axones selon D2 serait plus grand parce que la distance de "saut" y est réduite.
2. En second lieu, les séparations neuritiques pourraient au contraire être le moyen par lequel les neurites parviennent à se différencier sur ondulations, si elles sont suffisamment stables. Dans la direction D2 l'angle au niveau de la jonction neuritique avoisine les 90° donc la séparation est probablement beaucoup plus stable : si l'on reprend l'image de la fermeture éclair, l'effort nécessaire pour rapprocher les deux parties est plus important si elles sont éloignées. Pour étayer cette hypothèse, le taux de séparations semble supérieur dans la direction D2, toutefois la différence n'est pas significative du fait du faible nombre d'axones dans ces directions (93% de séparations pour les axones dans le sens D2 contre 67% sens D3, $\varepsilon = 1,6$).

Les motifs présentés précédemment permettent-ils d'éliminer une de ces hypothèses ? Dans la gamme de courbure composée de demi-cercles de différents rayons (Gamme 2, voir p.112), les deux

motifs extrêmes nous apportent des observations supplémentaires. Le motif au rayon de courbure $R = 5\mu m$ est celui qui mène au plus grand nombre de séparations neuritiques (voir table IV.5), or c'est aussi le rayon qui donnait le meilleur taux de polarisation selon D1. Ces séparations forment des sauts de l'ordre de $10\mu m$, les plus courts que nous ayons observés. De l'autre côté de cette gamme, le motif au rayon $R = 20\mu m$ donnait une polarisation selon D1 à peine supérieure à l'aléatoire avec un taux relativement important de séparations neuritiques. Ainsi, des séparations plus longues n'impliquent pas une inhibition plus efficace. Ces motifs renforcent même la seconde hypothèse : sur le petit rayon, l'angle au niveau des jonctions est de l'ordre de 45° tandis que sur le motif au plus grand rayon cet angle est proche de 90° (voir figure IV.11 en p.113).

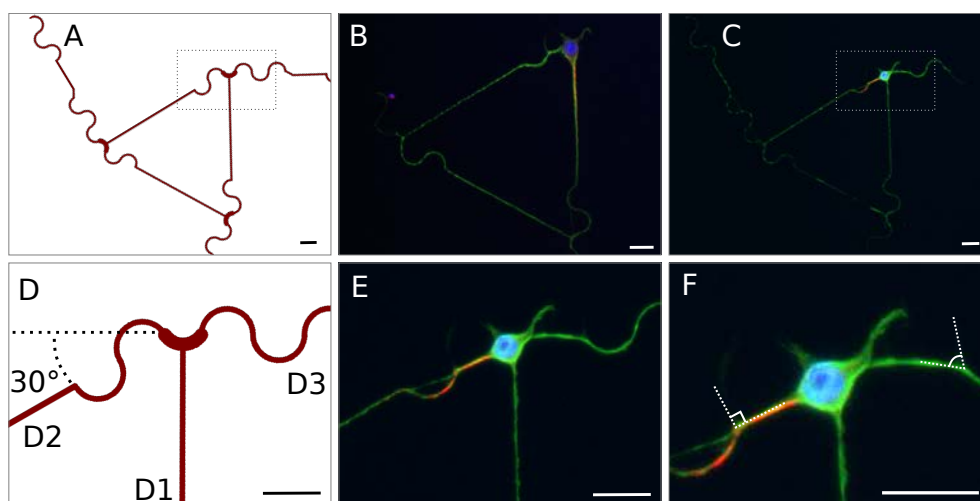


FIGURE IV.16 – **Modification du motif BmW pour la réalisation d'un réseau triangulaire.** **A/** Motif de réseau triangulaire adapté du motif BmW. **B-C/** Exemples de neurones à 6DIV polarisés en D1 ou D2. On constate dans les deux cas qu'une séparation neuritique est établie en D2. **D** Détail du motif. La réduction de 30° de l'angle entre les directions D1 et D2 suffit à augmenter significativement le taux d'axones parvenant à se polariser en D2. **E-F/** Détails du (C) où l'on observe que la séparation est plus courte en D2 ($14\mu m$) qu'en D3 ($18\mu m$) et que l'angle de jonction est plus proche de 90° en D2, ce que nous interprétons comme le signe que cet élément serait plus stable.

Marquages : segment proximal de l'axone (ankyrine, rouge) ; microtubules (YL1/2, vert) ; noyau (Hoechst, bleu). | Barres : $20\mu m$

Directions	D1	D2	D3	Total
Nombre d'axones	116	15	6	137
% du total	85%	11%	4%	100%
% étirements/séparations	X	93%	67%	86%

TABLE IV.8 – **Position des axones sur la variation asymétrique du motif BmW.** Le taux de polarisation selon D2 passe de 6% sur le motif symétrique à 11% sur le motif asymétrique.

IV.3.5 Conclusion

Lorsqu'un neurite croît sur une ligne courbée, les variations de sa tension interne induisent des étirements et/ou séparations périodiques. Ces structures sont très dynamiques et la tension supportée par les microtubules semble contrée par l'activité du cytosquelette d'actine dans les étirements neuritiques comme aux jonctions des séparations pour recouvrir l'intégrité du neurite. Nous rassemblons ici l'ensemble des motifs présentés dans cette section.

Les deux cas extrêmes vis à vis des étirements/séparations sont d'une part les neurites qui suivent parfaitement le motif, et d'autre part les neurites qui établissent une séparation neuritique permanente. Nous avons éliminé ces deux situations dans la recherche du phénomène responsable de l'inhibition des ondulations. En effet, dans la première, les neurites subissent uniquement l'effet de la courbure. Or, l'expérience des tranchées montre que lorsque l'on force les neurites à suivre la courbure l'effet inhibiteur des ondulations est réduit. En ce qui concerne les séparations stables, nous avons remarqué que les motifs induisant des séparations avec un angle de jonction d'environ 90° , mécaniquement plus stables, induisaient une baisse de l'inhibition dans ces directions de croissance neuritique. Mais lorsque l'angle de jonction est plus faible ($\approx 45^\circ$), ce que nous avons interprété comme un état moins stable, on peut obtenir une forte inhibition même si le taux de séparations est relativement important.

En conclusion, le mode d'inhibition des ondulations semble résider dans la dynamique de ces structures originales. Mais comment entrer dans le détail du mécanisme inhibiteur? Pour la plupart nos comptages ont été effectués à 6DIV sur cellules fixées pour évaluer le taux de polarisation final dans la direction voulue, cependant la polarisation axonale se déroule entre 1DIV et 3DIV. Ainsi, pour donner une vision plus détaillée des mécanismes impliqués, des informations supplémentaires sur la dynamique de ces phénomènes pendant la polarisation sont nécessaires. Cette vision dynamique impliquerait l'observation en fluorescence de marqueurs axonaux très précoces [11], en parallèle avec ces étirements/séparations.

Le caractère séquentiel des vagues et donc des phénomènes d'étirements/séparations sur courbures ou encore des phénomènes de croissance en extrémité de neurite pointent la polarisation axonale comme le résultat d'une compétition neuritique (pour la plus grande tension, la plus grande longueur, le moins d'étirements/séparations...). Dans le paragraphe suivant, nous développons un modèle basé sur cette conception brute de la polarisation de façon à estimer quantitativement mais de façon purement phénoménologique, sans nécessité d'une compréhension des mécanismes de base, l'effet d'un biais géométrique en terme de taux d'inhibition dans une direction de croissance neuritique donnée.

IV.4 Vers une modélisation phénoménologique de la compétition neuritique sur motifs géométriques

Sur l'ensemble des expériences que nous avons réalisées pour le contrôle de la polarisation axonale, nous avons été amenés à travailler avec des motifs à trois ou quatre neurites, ce qui rend complexe la comparaison des efficacités d'inhibition. Nous avons donc cherché à déterminer des constantes propres aux ondulations, qui caractériseraient leur efficacité d'inhibition indépendamment du nombre de neurites. En construisant un modèle, nous pourrions alors prédire l'efficacité des nouveaux motifs. Pour introduire les modèles que nous avons développés, nous définirons les variables caractérisant le motif comme suit :

- n : nombre de directions possibles sur le motif (la direction D1 est incluse)
- P : pourcentage d'axones obtenus dans la direction D1 (P pour "Polarisation")
- P_{ond} : pourcentage d'axones obtenus dans chaque direction composée d'ondulations équivalentes (donc $P + (n - 1) * P_{ond} = 1$)
- $P_{aléatoire}$: pourcentage sur chaque ondulation si la polarisation était aléatoire : $P_{aléatoire} = \frac{1}{n}$

IV.4.1 Modèle statique : l'hypothèse d'un taux de refus constant

La façon la plus simple de caractériser l'effet inhibiteur des ondulations est de considérer que chacune refuse un certain taux d'axones sur le taux aléatoire attendu. Nous définissons donc un taux de refus τ_{refus} , et par simplicité de calcul le taux d'acceptation $\tau_{acceptation} = 1 - \tau_{refus}$ comme suit : le taux d'acceptation est le rapport du pourcentage d'axones obtenus sur une ondulation divisé par le pourcentage aléatoire attendu : $\tau_{acceptation} = \frac{P_{ond}}{P_{aléatoire}}$. Si l'on veut exprimer ce taux en fonction du taux de polarisation selon la ligne droite D1 (P), en prenant en compte que $P_{aléatoire} = \frac{1}{n}$, on obtient l'expression $\tau_{acceptation} = \frac{1-P}{1-\frac{1}{n}}$. En conséquence nous obtenons :

$$\boxed{\tau_{refus} = \frac{P - \frac{1}{n}}{1 - \frac{1}{n}}} \quad (IV.2)$$

Le taux de refus se résume donc à la différence entre pourcentages observé et aléatoire dans le sens D1, divisée par cette différence si la polarisation était parfaite ($P = 1$). Il caractérise bien l'efficacité inhibitrice des ondulations : il vaut 1 si 100% des axones sont dans la direction D1 et 0 si les pourcentages sont de $\frac{1}{n}$ comme dans le cas aléatoire. Jusque là nous n'avons fait que décrire l'effet des ondulations, mais l'hypothèse que l'on peut émettre est que ce taux serait propre à un type d'ondulations, indépendamment du nombre de neurites sur le motif. Concrètement, on devrait

alors obtenir le même taux pour les motifs DW et DW4, car ils possèdent respectivement 2 et 3 ondulations identiques. Le calcul donne $\tau_{refus\ DW} = \frac{69\% - 33\%}{1 - 33\%} = 54\%$ et $\tau_{refus\ DW4} = \frac{49\% - 25\%}{1 - 25\%} = 36\%$. Ainsi l'hypothèse selon laquelle le taux de refus (ou d'acceptation) serait indépendant du nombre de neurites n'est pas valable, car l'effet individuel des ondulations dans le motif à trois branches est plus fort selon ce point de vue que dans le motif à quatre branches.

IV.4.2 Modèle dynamique : compétition neuritique par essais-erreurs

Nous avons donc construit un modèle plus complexe dans le but de mettre en évidence un paramètre caractéristique des ondulations. En s'inspirant de la description de la compétition neuritique, nous avons basé notre modèle sur un principe d'essais-erreurs pour mimer l'aspect périodique des phases de croissance des neurites pendant la compétition. Le modèle repose donc sur une succession de tentatives de différenciation axonale dans les différents neurites. A chaque essai, un neurite peut devenir l'axone selon un certain taux d'acceptation a_i qui dépend de sa position i sur le motif ($i = 1 \dots n$ avec n le nombre de neurites). Si l'essai échoue, le processus de différenciation est remis en jeu et un nouveau neurite est tiré aléatoirement pour subir un nouvel essai. Cette succession d'essais-erreurs se poursuit ainsi jusqu'à ce que le neurone soit polarisé. Notons que ce tirage aléatoire peut être biaisé par des contraintes géométriques autres que la courbure neuritique, notamment la forme du plot cellulaire dans le cas du motif boomerang. Ce biais sera pris en compte dans le modèle par un taux de redistribution dans chaque direction b_i qui n'est pas nécessairement égal à $\frac{1}{n}$.

Pour formaliser ce modèle, nous avons construit une suite R_m qui représente la probabilité qu'un neurone ne soit pas encore polarisé après m tours. Détaillons le raisonnement en examinant le passage du tour $(m - 1)$ au tour m : à la fin du tour $(m - 1)$ la probabilité que le neurone ne soit pas polarisé vaut R_{m-1} . Cette probabilité se distribue ensuite sur chacune des directions possibles selon les taux de redistribution b_i . Chacune des directions refuse le taux $(1 - a_i)$. La probabilité que le neurone ne soit toujours pas polarisé après m tours vaut donc :

$$R_m = \underbrace{(1 - a_1) * b_1 * R_{m-1}}_{\text{direction 1}} + \underbrace{(1 - a_2) * b_2 * R_{m-1}}_{\text{direction 2}} + \dots + \underbrace{(1 - a_n) * b_n * R_{m-1}}_{\text{direction n}}$$

En factorisant la relation précédente par R_{m-1} , on obtient donc l'expression générale suivante :

$$\left\{ \begin{array}{l} R_0 = 1 \\ R_1 = R_0 * \sum_{i=1}^n (1 - a_i) b_i \\ \vdots \\ R_m = R_{m-1} * \sum_{i=1}^n (1 - a_i) b_i \end{array} \right. \begin{array}{l} \text{Au départ le neurone n'est pas polarisé} \\ \\ \\ \text{A chaque tour } m \text{ la probabilité } R_{m-1} \text{ est réduite du même taux, } R_1 \end{array}$$

Ainsi :

$$R_m = \left(\sum_{i=1}^n (1 - a_i) b_i \right)^m = (R_1)^m$$

La probabilité qu'un neurone ne soit pas encore polarisé au tour m est donc représentée par une suite géométrique. Dans le cadre d'un motif où l'on oppose une direction D1 à $(n-1)$ autres directions composées d'ondulations, nous pouvons simplifier l'expression du terme R_1 . Nous noterons a_{ond} le taux d'acceptation propre aux ondulations $a_{ond} = a_{(i=2 \dots n)}$ et de même $b_{ond} = b_{(i=2 \dots n)}$. Nous pouvons alors simplifier l'expression de R_m en remarquant que la somme des probabilités de redistribution dans les n directions possibles vaut 1 ($\sum_{i=1}^n b_i = 1$) ce qui se traduit par $b_{ond} = \frac{1-b_1}{n-1}$. On obtient alors par simplification des $(n-1)$:

$$R_m = (R_1)^m = \left((1 - a_1) b_1 + (1 - a_{ond})(1 - b_1) \right)^m \quad (\text{IV.3})$$

A présent, nous pouvons appliquer le même type de raisonnement pour définir la suite P_m qui décrit la probabilité que le neurone ait été polarisé avec l'axone dans la direction D1 entre le 1^{er} et le $m^{\text{ième}}$ tour. A chaque tour cette probabilité augmente proportionnellement à la probabilité R_{m-1} qu'il n'ait pas encore été polarisé, multipliée par la probabilité que l'essai se fasse dans la direction D1 et enfin réduite par le taux d'acceptation de la direction D1 :

$$P_m = P_{m-1} + a_1 * b_1 * R_{m-1}$$

Nous pouvons donc exprimer le terme général de cette suite P_m en fonction de la suite R_m définie

auparavant :

$$\left\{ \begin{array}{l} P_0 = 0 \\ P_1 = a_1 b_1 R_0 \\ P_2 = a_1 b_1 R_0 + a_1 b_1 R_1 \\ \vdots \\ P_m = P_{m-1} + a_1 b_1 R_{m-1} \end{array} \right. \quad \begin{array}{l} \text{La probabilité que l'axone soit accepté selon D1 au tour } m \\ \text{se calcule par le produit } a_1 * b_1 * R_{m-1} \end{array}$$

Ainsi en remplaçant l'expression de R_{m-1} :

$$P_m = \sum_{k=0}^{m-1} a_1 b_1 \left(\underbrace{b_1(1 - a_1) + (1 - b_1)(1 - a_{ond})}_{R_1} \right)^k$$

La valeur qui nous intéresse dans cette suite est sa limite lorsque m tend vers l'infini⁽⁴⁾, qui n'est autre que le taux de polarisation final P . Notons que cela ne signifie pas que les essais-erreurs se poursuivent indéfiniment : si l'on applique le raisonnement à N neurones, P_m ne variera plus à partir du moment où le nombre de neurones non encore polarisés sera considéré comme nul (*i.e.* quand $R_m * N < 1$). Le calcul de limite donne :

$$\begin{aligned} P &= P_{m \rightarrow \infty} \\ &= \sum_{k=0}^{\infty} a_1 b_1 \left(\underbrace{b_1(1 - a_1) + (1 - b_1)(1 - a_{ond})}_{R_1} \right)^k \\ &= a_1 b_1 \sum_{k=0}^{\infty} (R_1)^k \quad (R_1 < 1) \\ &= a_1 b_1 * \frac{1}{1 - R_1} \end{aligned}$$

On obtient alors :

$$\boxed{P = \frac{1}{1 + \left(\frac{1}{b_1} - 1\right) \frac{a_{ond}}{a_1}}} \quad (IV.4)$$

Ainsi, ce modèle prédit que la polarisation axonale P dépend uniquement du taux de redistribution des essais dans la direction d'intérêt b_1 (les taux dans les directions autres que D1 s'en déduisent par $b_{ond} = \frac{1-b_1}{n-1}$), et du rapport des taux d'acceptations entre la direction D1 et les ondulations : $\frac{a_{ond}}{a_1}$. Cette dernière variable, que nous nommerons "rapport d'acceptation" par la suite, est particulièrement intéressante car elle implique qu'il n'est pas nécessaire de dissocier ces deux taux parce que seul leur rapport compte.

Afin de caractériser un motif avec notre modèle, l'équation IV.4 montre qu'il suffira de connaître

4. Cette série géométrique est bien convergente vers 0 car par définition des taux de redistribution et d'acceptation on a $\sum_{i=1}^n b_i = 1$ et $\forall i, 0 < a_i < 1$ donc $\sum_{i=1}^n b_i(1 - a_i) < 1$.

deux de ces trois variables (P , b_1 et $\frac{a_{ond}}{a_1}$). Selon les cas présentés dans la section suivante, P sera considérée comme une donnée ou une inconnue. Transformons l'équation IV.4 pour donner les autres variables :

$$\boxed{\frac{a_{ond}}{a_1} = \frac{\frac{1}{P} - 1}{\frac{1}{b_1} - 1}} \quad (IV.5)$$

Le rapport d'acceptation est une variable caractérisant l'effet d'une ondulation. Il est donc lié aux variables caractérisant l'ondulation, notamment la courbure, mais l'hypothèse sous-jacente est qu'il est indépendant du nombre de neurites ou des autres caractéristiques du motif. C'est ce que nous testerons pour valider le modèle.

$$\boxed{b_1 = \frac{1}{1 + \frac{\frac{1}{P} - 1}{\frac{a_{ond}}{a_1}}}} \quad (IV.6)$$

Le taux de redistribution dans la direction D1 est une variable dépendant de la forme globale du motif au niveau du soma : il sera influencé par le nombre de neurites et le type de contrainte somatique (Disque ou Boomerang par exemple), mais aussi par la répartition des forces comme on l'a vu dans l'exemple du motif DS. Si le motif ne présente que des lignes de même courbure, ou à l'inverse que des lignes droites comme dans le cas du motif DS, le rapport d'acceptation vaudra 1 et donc on obtient $b_1 = P$. Ainsi, le taux de redistribution d'un motif représente le taux de polarisation que l'on obtiendrait si le motif ne présentait pas de contraste de contrainte neuritique. La section suivante montre comment évaluer b_1 lorsqu'il y a une contrainte neuritique.

IV.4.3 Modèle dynamique : évaluation du taux de redistribution

Afin de tester le modèle d'essais-erreurs en comparant les motifs DW et DW4 comme nous l'avons fait pour le modèle statique précédent, la première étape consiste à déterminer les taux de redistribution b_1 sur les deux motifs. A priori, ce taux serait de $\frac{1}{n}$ car les deux motifs présentent un plot cellulaire circulaire et n'ont donc pas de contrainte somatique. Cependant, nous avons vu que le motif DW présente une similarité avec le motif DS et que la contrainte liée au resserrement angulaire des neurites en D2 et D3 s'y applique vraisemblablement de la même façon, bien que le motif DW induise un effet polarisant significativement supérieur grâce aux ondulations. Dans notre modèle, cela implique que le rapport d'acceptation n'est pas le seul élément qui participe au résultat de polarisation du motif DW : le taux de redistribution $b_{1(DW)}$ serait différent de $\frac{1}{n}$.

Il convient donc d'appliquer notre modèle d'abord au motif DS pour en déduire les conséquences sur $b_{1(DW)}$.

Le motif DS ne comporte pas d'ondulations, par conséquent le rapport d'acceptation est de 1. Dans ce cas, on voit d'après la formule IV.4 que les fractions se simplifient et que l'on obtient $P_{(DS)} = b_{1(DS)}$. Par ailleurs la formule IV.1 (voir p.104) basée sur l'équilibre des forces pour le motif DS permet d'obtenir l'expression du taux de polarisation théorique selon D1 en fonction de l'angle θ caractérisant le resserrement des neurites :

$$P_1 = \frac{1}{1 + \frac{1}{\cos(\frac{\theta}{2})}}$$

Etant donné que $P_{(DS)} = b_{1(DS)}$, nous supposons que pour tout motif le taux de redistribution b_1 se calcule à partir des angles d'émergence des neurites suivant cette même expression :

$$b_1 = \frac{1}{1 + \frac{1}{\cos(\frac{\theta}{2})}}$$

Ainsi, en appliquant cette formule au cas du motif DW avec la valeur expérimentale de $\theta = 80^\circ$, nous obtenons $b_{1(DW)} = 43\%$. Cette valeur va nous permettre de déduire la valeur de $\frac{a_{ond}}{a_1}$ pour ce type d'ondulation.

A l'opposé, dans le cas des motifs composés de quatre neurites les points d'émergence sont répartis aux quatre points cardinaux des motifs. En l'absence de resserrement des neurites, nous considérerons par conséquent que l'équilibre des forces est respecté sans avantage pour aucun des neurites : $b_{1(\text{quatre neurites})} = 25\%$.

IV.4.4 Modèle dynamique : validation

A l'aide de $b_{1(DW)}$ et du taux de polarisation expérimental $P_{(DW)} = 69\%$, nous pouvons alors calculer le rapport d'acceptation qui d'après le modèle serait propre à ce type d'ondulations composées de demi-cercles de rayon $R = 10\mu m$:

$$\frac{a_{ond}}{a_1} = \frac{\frac{1}{69\%} - 1}{\frac{1}{43\%} - 1} = 35\%$$

En résumé le motif DW atteindrait un taux de polarisation de 69% grâce à la combinaison d'un effet de resserrement angulaire des neurites qui influence b_1 et d'un taux d'acceptation sur ondulations plus faible de 65% que celui sur ligne droite (car $100\% - 35\% = 65\%$).

Nous pouvons maintenant appliquer le modèle au motif DW4 pour obtenir son taux de polarisation théorique à partir du taux de redistribution $b_{1(DW4)} = 25\%$ et du rapport d'acceptation obtenu ci-dessus et propre à ce type d'ondulations $\frac{a_{ond}}{a_1} = 35\%$:

$$P_{(DW4)théorique} = \frac{1}{1 + (\frac{1}{25\%} - 1) * 35\%} = 49\%$$

Cette valeur est très proche du taux moyen issu de nos deux expériences, $49\% \pm 5\%$, par conséquent le modèle est en accord avec les résultats expérimentaux de polarisation sur motifs à trois et quatre neurites.

IV.4.5 Modèle dynamique : confrontation de deux courbures

Le motif $DW_{m}athitcontraste$ présenté en p. 117 nous a permis de confronter deux courbures dans le même motif. Le taux de polarisation obtenu est-il en accord avec les prévisions que le modèle d'essais-erreurs aurait faites ? Notons que dans la mise en place du modèle nous n'avons pas eu à prendre en compte le fait que la direction D1 était rectiligne : le modèle s'applique pour tout motif présentant $(n - 1)$ directions semblables et 1 direction d'intérêt quelle qu'elle soit. Ici, nous distinguerons les variables concernant les deux types d'ondulations par les symboles $-$ et $+$ respectivement pour la faible et la forte ondulations, et conserverons la notation "1" pour la ligne droite des autres motifs. Pour réaliser le calcul du taux de polarisation théorique, nous devons donc déterminer b_{ond-} ainsi que $\frac{a_{ond+}}{a_{ond-}}$.

La géométrie du motif à proximité du soma étant à peine modifiée par la présence de la faible ondulation, le resserrement angulaire est identique et le raisonnement concernant l'équilibre des forces est toujours valable : nous considérerons que le taux de redistribution est inchangé entre le motif DW et le motif $DW_{contraste}$, donc $b_{ond-} = 43\%$.

Pour déterminer le rapport d'acceptation $\frac{a_{ond+}}{a_{ond-}}$, nous pouvons tirer profit des deux motifs à partir desquels a été dessiné le motif $DW_{contraste}$. D'une part, la faible ondulation placée en D1 est identique à celle d'un des motifs de la première gamme de courbures qui avait donné $P = 36\%$ d'orientation. Il s'agit d'un motif à quatre neurites, équilibré du point de vue des forces : comme pour le motif DW4 nous pouvons supposer que $b_1 = 25\%$. Le calcul du rapport d'acceptation pour ce type d'ondulation par la formule IV.5 donne alors : $\frac{a_{ond-}}{a_1} = 59\%$. D'autre part, le motif DW nous a permis de calculer la valeur de $\frac{a_{ond+}}{a_1} = 35\%$. A partir de ces deux rapports, nous pouvons alors déterminer le taux d'acceptation du motif $DW_{contraste}$:

$$\frac{a_{ond+}}{a_{ond-}} = \frac{\frac{a_{ond+}}{a_1}}{\frac{a_{ond-}}{a_1}} = \frac{35}{59} = 59\% \quad (5)$$

Notons que ce calcul sous-entend que le taux d'acceptation selon une ligne droite est indépendant du motif, ce qui est une hypothèse implicite du modèle : lorsqu'un essai est réalisé sur un type de ligne, nous supposons que le neurite est indépendant vis-à-vis du reste de la cellule de sorte que

5. L'égalité des taux d'acceptation forte/faible et faible/nulle courbure est fortuite. Mais si l'on réalisait un motif à trois neurites avec une ligne droite en D1 et deux faibles ondulations nous obtiendrions le même taux de polarisation qu'avec $DW_{contraste}$.

seul l’environnement local influence le taux d’acceptation. Nous pouvons alors calculer le taux de polarisation théorique du motif $DW_{\text{contraste}}$:

$$P_{\text{contraste}} = 56\%$$

Une nouvelle fois, le taux théorique est bien dans la marge d’erreur à 5% du taux expérimental : $51 \pm 9\%$ ($N = 119$ cellules). En conclusion, le fait que la constante associée aux ondulations soit un rapport nous permet de prévoir le résultat de l’association de deux courbures différentes sur un même motif, pour peu que nous ayons opposé ces courbures à une tierce ondulation ou à une ligne droite sur d’autres motifs.

IV.4.6 Modèle dynamique : application à un motif à lignes triangulaires

Dans le but d’étudier les étirements et séparations neuritiques dans des conditions originales, nous avons réalisé un motif inspiré du DW4 avec deux différences majeures (voir figure IV.17) : d’une part les ondulations sont remplacées par une succession de segments de droite perpendiculaires les uns aux autres formant une oscillation “triangulaire” de même amplitude et de même longueur d’onde que le DW4 ⁽⁶⁾, et d’autre part le motif possède une symétrie centrale pour respecter au mieux l’équilibre des forces, ce qui fait qu’il possède deux lignes droites et deux lignes triangulaires. Le taux de polarisation cumulé sur les deux lignes droites est de $76\% \pm 9\%$ ($N = 83$ cellules). Ce taux est significativement supérieur au taux aléatoire de 50%, mais comment comparer l’efficacité inhibitrice des lignes triangulaires à celle des ondulations équivalentes ?

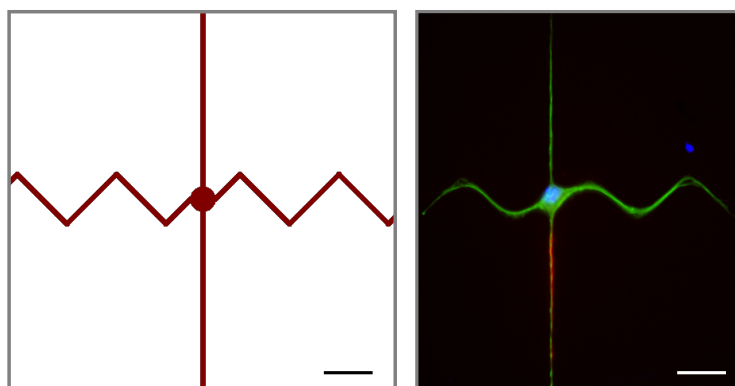


FIGURE IV.17 – **Présentation du motif à lignes dites triangulaires.** Une symétrie centrale a été respectée sur ce motif pour éviter les effets de resserrement angulaire des neurites. Les lignes triangulaires induisent des étirements quasi-systématiques au niveau des angles droits. Naturellement aucun étirement n’est observé sur les portions rectilignes. | Barres : $20\mu m$

Nous avons repris le raisonnement du modèle d’essais-erreurs pour ce type de motif, et le

6. l’élément de base des lignes triangulaires est en fait le carré inscrit dans le cercle de base des ondulations, de rayon $R = 10\mu m$.

calcul mène à un simple facteur 2 devant le taux de redistribution b_1 dans l'expression du taux de polarisation théorique (voir équation IV.4 en p. 125) :

$$P_{\text{deux lignes triangulaires}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{1}{2 * b_1} - 1\right) \frac{a_{\text{ond}}}{a_1}}$$

Le motif étant parfaitement symétrique nous pouvons à nouveau fixer $b_1 = 25\%$, ce qui nous permet de calculer le rapport d'acceptation des lignes triangulaires par rapport aux lignes droites :

$$\frac{a_{\text{triangle}}}{a_1} = 32\%$$

Nous pouvons alors calculer le taux de polarisation qu'aurait donné ce motif dans une configuration à trois lignes triangulaires pour une ligne droite :

$$P_{\text{trois lignes triangulaires}} = 51\%$$

Ainsi, le modèle suggère que ces lignes composées de segments de droites perpendiculaires seraient aussi efficaces pour inhiber la polarisation que les ondulations de rayon $R = 10\mu m$ dont elles sont inspirées car le motif DW4 donne une polarisation moyenne de 49% (voir p. 114). Ce résultat est un argument supplémentaire en faveur de l'idée selon laquelle ce n'est pas la courbure elle-même mais la géométrie globale des lignes à proximité du soma qui serait responsable de l'inhibition de polarisation axonale.

IV.4.7 Modèle dynamique : influence du boomerang

Le modèle n'a pas été conçu pour différencier les deux effets géométriques qui peuvent s'appliquer au niveau du soma : l'angle d'émergence des neurites et la forme du soma. La raison essentielle à ce choix était la volonté de conserver un faible nombre de variables. De ce fait, les deux effets se combinent dans une unique variable qui est le taux de redistribution. Nous pouvons néanmoins calculer ce taux de redistribution dans le cas du BmW à partir du rapport d'acceptation issu du motif DW ($\frac{a_{\text{ond}}}{a_1} = 35\%$) et du taux de polarisation expérimental ($P_{\text{BmW}} = 86\%$) pour donner un ordre de grandeur de la combinaison de ces deux effets :

$b_{1(\text{BmW})} = 68\%$, ce qui constitue logiquement le plus grand taux de redistribution dans la direction D1 sur l'ensemble de nos motifs.

IV.5 Interprétation du modèle d'essais-erreurs

Dans le but de comparer les différents éléments géométriques dont nous avons montré qu'ils influencent la polarisation axonale, nous avons construit un modèle mathématique simplifié de la polarisation. Celui-ci est basé sur la notion de compétition neuritique, qu'il met en scène au travers d'une succession d'essais-erreurs : à chaque tour de ce modèle, tant qu'un neurone n'est pas polarisé un de ses neurites subit un "essai" de polarisation. S'il parvient à se différencier le

processus est terminé, mais s'il échoue la polarisation est "remise en jeu" et un neurite, selon une certaine loi de redistribution, subit un nouvel essai.

IV.5.1 Vagues et taux de redistribution

Quelle signification pouvons-nous donner aux phases d'essais de ce modèle ? Nous avons vu que la notion de compétition neuritique est issue de l'observation de neurones par vidéo-microscopie : la croissance des neurites suit une succession de phases de croissance et de rétraction où l'arrivée des vagues déclenche systématiquement une hausse de l'activité de croissance (voir p. 67). Ces vagues étant émises par le soma, nous pouvons faire le lien entre leur émission périodique et la redistribution centralisée des essais-erreurs : chaque vague serait une phase d'essai du modèle.

Dans ce contexte, le taux de redistribution du modèle représente la probabilité qu'une vague soit émise dans une direction donnée, donc les directions privilégiées par un fort taux de redistribution reçoivent un nombre moyen de vagues plus important et en conséquence ont une croissance moyenne plus élevée. Cela leur permet de dépasser le seuil de longueur de $35\mu m$ plus rapidement. En conclusion, notre modèle est tout-à-fait compatible avec l'hypothèse de polarisation axonale par dépassement d'un seuil de longueur.

IV.5.2 Signification du rapport d'acceptation

Le modèle dynamique a fait apparaître un rapport de taux d'acceptations, dont la signification peut paraître très proche des taux d'acceptation et de refus du modèle statique précédent. Un rapport d'acceptation faible signifie en effet que les ondulations acceptent peu d'axones et donc que le taux de polarisation dans la direction D1 est important. Il convient donc de vérifier que le modèle dynamique apporte bien une différence, non seulement par l'introduction d'un taux de redistribution b_1 , mais aussi par l'influence du rapport d'acceptation $\frac{a_{ond}}{a_1}$. Autrement dit, l'hypothèse selon laquelle $\frac{a_{ond}}{a_1}$ serait constant revient-elle au même que de supposer que le taux de refus dans la vision statique est constant ? Pour faire le parallèle entre nos deux modèles, nous nous placerons dans le cas aléatoire où le taux de redistribution n'apporte pas de nouveauté dans le modèle dynamique, $b_1 = \frac{1}{n}$. On a alors d'après l'équation IV.5 :

$$\frac{a_{ond}}{a_1} = \frac{\frac{1}{P} - 1}{n - 1}$$

Ce rapport d'acceptation vaut 1 lorsque $P = P_{aléatoire} = \frac{1}{n}$, et 0 lorsque $P = 1$, ce qui est le comportement contraire de celui du taux de refus du modèle statique. Pour mettre en évidence une variable qui prendrait les mêmes valeurs extrêmes que le taux de refus, nous définissons la quantité $(1 - \frac{a_{ond}}{a_1}) = \frac{(a_1 - a_{ond})}{a_1}$ qui représente la différence relative des taux d'acceptation. Cette différence relative, notée $D_{acceptation}$, s'écrit :

$$D_{acceptation} = \frac{(a_1 - a_{ond})}{a_1} = 1 - \frac{a_{ond}}{a_1} = \frac{\frac{1}{P} - n}{1 - n}$$

On constate alors que cette différence relative s'écrit comme le taux de refus du modèle statique où l'on aurait inversé chacun des termes :

$$D_{acceptation} = \frac{(P)^{(-1)} - (\frac{1}{n})^{(-1)}}{(1)^{(-1)} - (\frac{1}{n})^{(-1)}}$$

Le comportement de ce paramètre $D_{acceptation}$ lorsque P prend des valeurs extrêmes (*i.e.* $\frac{1}{n}$ et 1) est maintenant identique au taux de refus statique, mais ce sont les variations intermédiaires de ces deux paramètres en fonction du taux de polarisation qui sont différentes. On voit sur la figure IV.18 que $D_{acceptation}$ est toujours supérieur ou égal au taux de refus statique τ_{refus} , ce qui signifie que pour obtenir un taux de polarisation donné le modèle dynamique fera intervenir une différence plus importante entre la ligne ondulée et la ligne droite. La raison pour laquelle cette différence doit être plus importante est que dans le modèle dynamique les échecs de différenciation dans une direction ne sont pas définitifs : les essais-erreurs peuvent intervenir plusieurs fois sur le même neurite, donc le taux d'acceptation de la ligne ondulée doit être plus faible pour obtenir le même taux de polarisation final. En conclusion, le modèle dynamique apporte une nouveauté non seulement par la présence d'un taux de redistribution b_1 dont la valeur peut être différente de $\frac{1}{n}$, mais aussi par le rapport d'acceptation qui se distingue du comportement d'un taux de refus statique car les échecs peuvent ici être plusieurs fois remis en jeu avant polarisation.

IV.5.3 Durée caractéristique de polarisation

D'autre part, il est remarquable que ce soit uniquement le rapport des taux d'acceptations qui compte dans le modèle dynamique et non les taux eux-mêmes : on pourrait par exemple supposer que la ligne droite accepte $a_1 = 100\%$ ou bien $a_1 = 50\%$ des essais de différenciation, cela ne changerait pas le résultat final du taux de polarisation car le taux d'acceptation sur ondulations a_{ond} s'adapterait proportionnellement de sorte que le rapport reste constant. On peut néanmoins trouver une signification dans les valeurs des taux eux-mêmes : si les deux taux d'acceptation sont plus faibles tout en conservant un rapport égal, le modèle prévoit que les neurones nécessitent un plus grand nombre de tours pour se différencier. Il est donc possible de déterminer ces taux mais en ajoutant une hypothèse supplémentaire sur le nombre d'essais-erreurs à effectuer et donc sur la durée de la compétition. Par exemple, on peut ajouter comme condition que 50% des neurones doivent être polarisés après un certain nombre de tours. Cela revient à fixer le nombre d'essais-erreurs (m) à réaliser pour que la probabilité que le neurone ne soit toujours pas polarisé (R_m) soit inférieure à 50%. En reprenant les équations IV.3 et IV.5 en pages 124 et 126, nous obtenons alors l'expression du nombre de tours $m_{50\%}$ nécessaire pour atteindre 50% de neurones polarisés

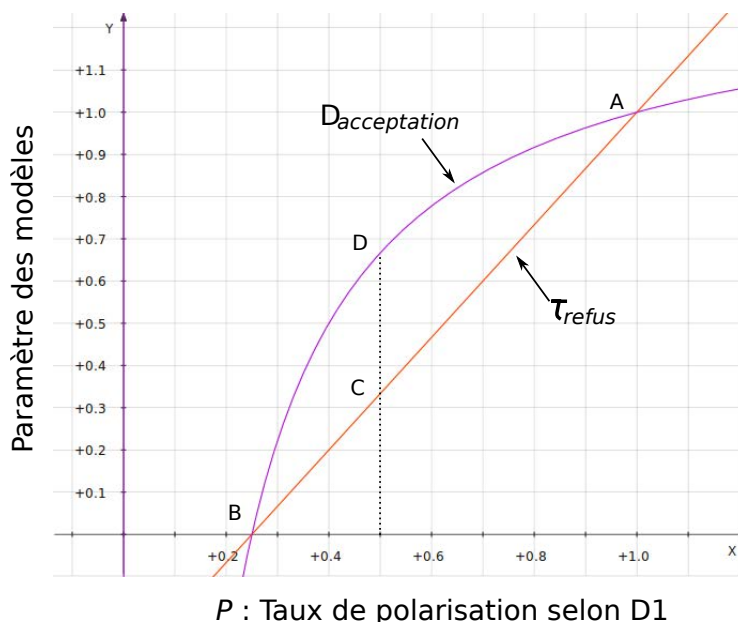


FIGURE IV.18 – **Comparaison des paramètres issus des modèles statique et dynamique.** Les deux paramètres possèdent les mêmes valeurs extrêmes, à savoir 1 lorsque la polarisation est totale (point A, $P = 100\%$) et 0 lorsque la polarisation est aléatoire (point B, $P = \frac{1}{n} = 25\%$ dans cet exemple). Néanmoins, leurs variations sont distinctes entre ces deux valeurs extrêmes. Si le taux de polarisation d'un motif vaut 50%, alors la différence relative d'acceptation prendra une valeur plus importante (point D) que le taux de refus (point C). Cela signifie que la remise en jeu des échecs dans le modèle dynamique induit une différence de comportement entre les deux modèles.

en fonction du taux a_1 , du nombre de neurites n et du taux de polarisation P : ⁽⁷⁾

$$m_{50\%} = \frac{\ln(50\%)}{\ln(1 - \frac{a_1}{nP})} \tag{IV.7}$$

Dans le cadre du rapprochement que nous avons effectué entre les tours du modèle et l'émission de vagues, il serait possible d'évaluer cette durée en multipliant le nombre de tours $m_{50\%}$ par la fréquence d'émission des vagues. Pour illustrer l'effet de cette formule, nous l'avons appliquée au motif DW4, pour représenter l'effet du taux d'acceptation a_1 sur la durée de polarisation en sachant que $P = 49\%$ et $n = 4$ pour ce motif. La figure IV.19 illustre la variation exponentielle de $m_{50\%}$ lorsque a_1 décroît.

Grâce à cette courbe, nous pourrions évaluer le taux d'acceptation si nous connaissions le temps nécessaire pour que la moitié des neurones soient polarisés. L'expérience nécessaire consis-

7. Notons que cette formule est valable pour toute valeur de la probabilité "critique" $(1 - R_m)$ autre que 50%. Par exemple remplacer 50% par 99% permettrait de calculer le nombre de tours nécessaires pour que 99% des neurones soient polarisés.

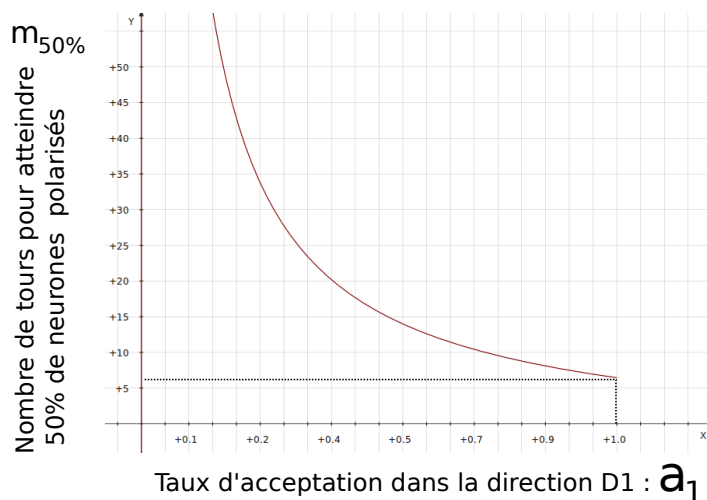


FIGURE IV.19 – **Interdépendance de la durée de polarisation et du taux d'acceptation dans la direction D1.** L'équation IV.7 indique que le taux d'acceptation dans la direction D1 influence la durée nécessaire pour que les neurones soient polarisés (toutes directions confondues). Par exemple, une valeur du taux d'acceptation de 1 (100% d'essais de polarisation réussis dans la direction 1) conduit à une durée de 6 tours pour polariser la moitié des neurones. Un taux d'acceptation plus faible conduirait à une durée plus importante.

terait à suivre l'évolution temporelle du pourcentage de neurones polarisés (indépendamment de la direction) sur les différents motifs, tout en mesurant la fréquence des vagues émises par le soma pour fixer un ordre de grandeur de la durée associée à un tour du modèle.

L'équation IV.7 prévoit qu'un motif ne possédant pas de ligne droite comme le $DW_{\text{contraste}}$ nécessiterait plus de temps pour atteindre 50% de neurones polarisés (car a_1 serait remplacé par $a_{\text{ond-}}$). D'autre part, cette formule suggère que plus un motif donne un taux de polarisation selon D1 important, et plus le temps de polarisation global des neurones sur ce motif serait long. Cet aspect dynamique, qui n'a pas été étudié jusqu'à présent, offre des perspectives intéressantes pour l'étude approfondie des mécanismes de polarisation.

IV.5.4 Défauts du modèle

Bien qu'il nous permette de différencier des contraintes géométriques appliquées au soma ou aux neurites, et de construire une description schématique sur le mode d'association de ces contraintes qui est validée par l'expérience, le modèle est intrinsèquement une vision simplifiée des mécanismes réels mis en jeu. Les défauts immédiats du modèle, qui n'auraient pas pu être évités sans entraîner la définition d'un trop grand nombre de variables, sont les suivants :

- La longueur des neurites n'est pas prise en compte dans le modèle, bien que les essais-

erreurs puissent être reliés aux vagues et donc à l'accroissement de longueur des neurites. Ainsi, le modèle ne représente pas la croissance des neurones depuis les premiers stades de développement et jusqu'à la polarisation, mais plutôt le mode de compétition neuritique qui s'établit lorsque les neurites ont atteint une longueur proche de la limite des $35\mu m$, au stade 2 de développement (voir la définition des stades de développement p. 27).

- Bien que la position du centrosome puisse être considérée comme importante car elle induirait un biais initial quant au choix de l'axone, le modèle fait la supposition implicite que ce biais initial est déjà distribué dans les n directions selon les taux de redistribution b_i .
- Les taux d'acceptation sont supposés être caractéristiques des lignes qu'ils représentent (ondulations, ligne droite,...), par conséquent ils ne varient pas dans le temps. Or, comme nous l'avons supposé dans le cadre des rugosités il est possible que les neurones soient d'autant plus sensibles à leur environnement local que leur compétition neuritique se prolonge. Dans le cadre du modèle actuel, le taux de polarisation dans une direction quelconque après m tours ne dépend pas de m .
- L'effet de la forme du plot cellulaire, en boomerang notamment, a été intégré dans le taux de redistribution du modèle mais nous n'avons pas avancé d'hypothèse sur la façon dont cet effet s'ajoute à celui du resserrement angulaire
- Enfin, le modèle ne prend pas en compte la proportion de neurones qui ne développent pas immédiatement de neurites dans les n directions disponibles. Il est en effet probable que le nombre moyen de neurites participant à la compétition neuritique soit inférieur au nombre de neurites moyen développés par les neurones (4 neurites en moyenne dans des conditions classiques *in vitro*). Cette remarque a naturellement moins de conséquences sur les motifs à trois neurites.

IV.6 Discussion

IV.6.1 Trois effets géométriques peuvent participer au contrôle de la polarisation

L'ensemble des expériences réalisées dans le cadre de l'étude de la polarisation axonale par des géométries contrôlées nous ont amenés à proposer trois processus distincts pouvant influencer la polarisation. Ces trois contraintes ont été réunies au sein du motif BmW, ce qui a donné un taux de polarisation dans la direction voulue de 86%.

Resserrement angulaire des neurites

Tout d'abord, comme vu dans le cas du motif DS, l'angle que forment les segments initiaux des neurites sur les motifs à trois branches peut favoriser la polarisation selon la direction du neurite le plus isolé. Pour expliquer ce résultat, nous avons fait l'hypothèse que les moyennes temporelles des forces subies par le soma respecteraient un équilibre au moment de la polarisation axonale, et donc que le resserrement angulaire des neurites entraînerait un rééquilibrage des tensions neuritiques favorable à la direction isolée. Une plus grande tension pourrait alors entraîner une croissance plus rapide comme l'indiquent les résultats de Lamoureux [7]. A son tour la croissance accélérée entraînerait un plus fort taux de polarisation dans le cadre du seuil de tension.

Par quel mécanisme, et au niveau de quelle structure les forces subies par le soma respecteraient-elles un équilibre ? Un candidat possible pour jouer le rôle de capteur de tension pourrait être le centrosome. Nous avons en effet noté que celui-ci était placé à l'intersection des directions neuritiques, comme constituant un point d'équilibre des forces. Si un mécanisme régulateur de la position du centrosome au sein du soma était à l'œuvre, comme nous l'avons entrevu en p. 86, alors tout déséquilibre initial des tensions neuritiques entraînant un décentrage du centrosome devrait finir par être compensée par un réajustement de ces tensions ramenant le centrosome à sa position d'équilibre. La géométrie implique que la tension induite par cette réaction sera plus importante en moyenne dans la direction isolée (D1).

Ondulations

Ensuite, l'utilisation de lignes sous forme d'ondulations de dimensions caractéristiques de l'ordre de $10\mu m$ (demi-cercles ou segments de droites perpendiculaires) peut entraîner l'inhibition de la différenciation axonale des neurites dans ces directions. Le phénomène reposerait non pas sur la courbure de ces ondulations elle-même, mais plutôt sur les déformations que nous avons appelées étirements neuritiques et qui sont induites par la tension neuritique sur ces géométries. Ces struc-

tures très dynamiques pourraient en effet retarder la croissance dans ces directions, en mobilisant une grande quantité de ressources nécessaires à la croissance et/ou en retardant la progression des vagues dans ces neurites. Si le motif permet aux neurites de former des séparations neuritiques précoces et durables, il semble que les neurites pourront au contraire se différencier en axones sur ces ondulations. Dans le cadre de l'hypothèse de polarisation axonale par dépassement d'un seuil de longueur, le retard des vagues et la réduction des ressources entraînerait une réduction de la vitesse de croissance moyenne du neurite. En conséquence, cela peut réduire les chances de dépasser le seuil de longueur avant le neurite sur lignes droites.

Boomerang

Enfin, une contrainte géométrique imposée au soma peut s'ajouter aux effets précédents sur le principe du placement précoce du centrosome à proximité de la direction D1. Le mécanisme sous-jacent reste cependant mystérieux : bien que le taux de polarisation sur BmW le long de D1 soit significativement supérieur au taux sur DW, le travail de thèse de Sophie Roth a montré que la relation centrosome-axone n'était pas causale.

IV.6.2 Structure et dynamique des étirements neuritiques

Les résultats présentés dans ce chapitre ont mis en évidence le fait que les étirements neuritiques étaient associés au phénomène d'inhibition observé sur les ondulations. A notre connaissance, de telles déformations neuritiques n'ont jamais été rencontrées : les étirements nécessitent une ligne d'adhésion courbée de rayon de courbure proche de $10\mu m$ qui contourne une surface plane non-adhésive. Ils se forment sous l'effet d'une augmentation de la tension neuritique, supportée par les microtubules, qui déforme la membrane cellulaire de sorte que les microtubules suivent le plus court chemin. Mais quelle est la composition de ces structures ? Comment l'équilibre des forces s'y établit-il ? Et comment l'interaction avec les vagues s'y effectue-t-elle ?

Structure

La figure géométrique qui caractérise le plus fidèlement les étirements neuritiques est la lunule : la surface obtenue en réalisant la soustraction de deux disques non concentriques. Pour éclaircir notre description, nous désignerons par "arc intérieur" et "arc extérieur" les deux bords arrondis de cette figure géométrique. Les images de fluorescence présentées en page 106 montrent que les microtubules suivent en grande majorité l'arc intérieur, tandis que l'actine filamenteuse forme un réseau croisé sur tout le reste de la surface comme cela a été décrit dans les lamellipodes ou dans la partie centrale des cônes de croissance. Les adhésions quant à elles sont restreintes à l'arc

extérieur, car par définition la ligne d'adhésion a une largeur de $2\mu m$. On peut aussi observer des faisceaux/fagots d'actine (“*actin bundles*”) perpendiculaires à cette ligne d'adhésion, qui se poursuivent au delà de l'arc extérieur sous la forme de filopodes. Ces filopodes témoignent d'une activité exploratoire, comme à l'avant d'un cône de croissance.

Forces

Bien que ces structures soient très dynamiques, les vidéo-microscopies indiquent qu'elles passent par des phases d'équilibre provisoire : comment l'équilibre des forces s'établit-il dans une telle configuration des éléments du cytosquelette ? Du fait de la géométrie, la tension supportée par les microtubules induit une force dirigée vers l'intérieur de l'ondulation, renforçant l'effet d'étirement. Pour s'opposer à cette force, deux éléments pourraient avoir de l'importance : la membrane cellulaire d'abord, dont la tension de surface induit une force pour reprendre une forme cylindrique, et le réseau d'actine qui maintient des liens mécaniques avec les adhésions et avec les microtubules [12]. Le réseau d'actine peut se contracter en interaction avec d'autres protéines, notamment la myosine II. En particulier, le réseau d'actino-myosine est mis en cause dans le cas de la contraction de fibroblastes au dessus d'une surface non adhésive dans une étude réalisée par l'équipe de Sheetz [13]. Notons que la force induite par la membrane seule est vraisemblablement négligeable devant les forces développées par les éléments du cytosquelette⁽⁸⁾, mais le réseau d'actine peut être intimement associé à la membrane, notamment par l'intermédiaire de la spectrine, pour former un “cortex” lui conférant des propriétés mécaniques plus robustes [14]. Dans une structure fine comme l'étirement, le réseau d'actine et la membrane seraient donc fortement liés et concourraient pour s'opposer à la force induite par les microtubules.

Les vagues induisent les étirements

L'ensemble de nos observations en vidéo-microscopie, l'hypothèse du mécanisme de polarisation par dépassement de seuil ainsi que la construction de notre modèle de compétition neuritique nous ont conduits à accorder une importance particulière aux vagues et à la tension qu'elles génèrent. Ces structures à riche activité du cytosquelette d'actine semblent en relation étroite avec les complexes d'adhésions ainsi que les microtubules. Lorsque les neurites sont suffisamment longs pour nous permettre de suivre la progression d'une vague, nos observations montrent que les étirements sont systématiquement créés lors du passage d'une vague. Ces structures qui possèdent de nombreux points communs avec les cônes de croissance sont donc responsables de l'augmentation de tension

8. La membrane peut par exemple subir une déformation importante par la simple polymérisation de l'actine dans le cas des filopodes notamment

neuritique, avec comme originalité le fait que cette tension se manifeste à l'avant comme à l'arrière de la vague. La vision mécanique de ce phénomène est que la vague forme un nœud de compression local qui entraînerait le coulisement des microtubules dans le sens de leur densification.

Ainsi un mécanisme moléculaire local pourrait induire la transmission d'une force sur quelques dizaines de microns, par l'intermédiaire de la tension supportée par les microtubules. Cela entraînerait une disjonction des microtubules et des adhésions si la courbure est suffisamment importante. Notons que la tension se relâche après que la vague a parcouru une distance suffisante ou a atteint le cône de croissance et lui a permis de progresser.

Rétraction neuritique

Les études de vidéo-microscopie montrent de plus qu'une rétraction neuritique, c'est-à-dire le recul du cône de croissance, survient simultanément aux étirements neuritiques. L'augmentation de tension se propage donc au travers de la rigidité du faisceau de microtubules jusqu'au cône de croissance. Il est difficile de déterminer s'il reste une portion de membrane sur la distance de rétraction du cône de croissance en contraste de phase, mais la re-colonisation de cette longueur de neurite perdue semble nécessiter un temps similaire à une croissance normale. La rétraction peut donc être interprétée comme un "échec" de la tentative de croissance en écho au modèle de compétition neuritique que nous avons développé.

Le calcium participe-t-il à l'effet inhibiteur des ondulations ?

La concentration de calcium intracellulaire est un élément majeur dans la réponse de la cellule aux sollicitations mécaniques. L'équipe de J. Käs a notamment montré qu'un fort stress mécanique appliqué au cône de croissance entraîne une entrée massive de calcium qui se propage dans le neurite et est suivie par la rupture des adhésions et la rétraction partielle du neurite [15]. Le calcium pourrait-il apporter des informations sur l'interaction entre les vagues, les étirements et la rétraction neuritique ?

L'équipe d'Antoine Triller au laboratoire de biologie de l'ENS-Paris m'a accueilli pendant une semaine dans le but de d'explorer ces questions au travers de leur expertise en imagerie calcique. Nous avons réalisé des cultures de neurones hippocampiques sur nos motifs géométriques dans les conditions habituelles puis avons observé le signal calcique au niveau des étirements neuritiques. Les données préliminaires présentées en figure IV.20 indiquent que des entrées de calcium précèdent la rétraction neuritique au niveau des étirements.

La corrélation entre les entrées de calcium et les rétractions suggère qu'une voie de signalisation impliquant la concentration de calcium participerait au mécanisme inhibiteur des ondulations. Bien

que nous n'ayons pas observé de vagues dans cette expérience, nous prévoyons de la reproduire en ciblant ces structures car la tension neuritique leur est intimement liée. L'objectif est de vérifier si les hausses de concentration calcique interviennent à chaque passage de vague, comme témoin de l'augmentation de tension, ou si elles sont plutôt des caractéristiques des étirements indépendantes du passage des vagues.

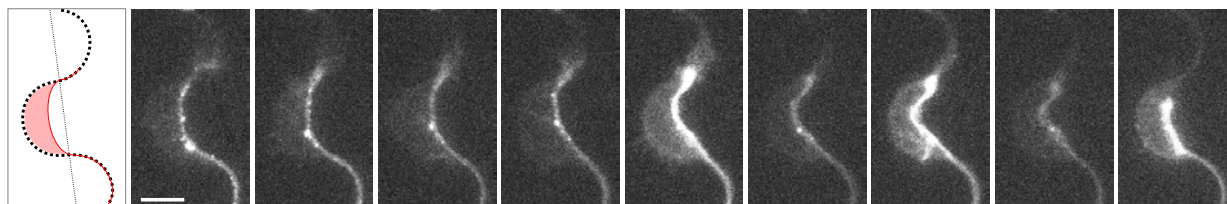


FIGURE IV.20 – **Séquence d'imagerie calcique sur un étirement neuritique.** Après une période de relative stabilité, des hausses de signal calcique d'une durée de l'ordre de 15s se succèdent dans cet exemple (intervalle de 30s entre les images sélectionnées), et une rétraction neuritique importante se produit. Marqueur : fluo-4 | Barre : $10\mu\text{m}$

IV.6.3 Absorption des vagues par les étirements

Si les vagues sont la source de la force qui génère les étirements neuritiques, sont-elles affectées en retour par ces structures originales? Nous avons vu qu'elles peuvent être absorbées par les étirements neuritiques, c'est-à-dire que leur progression est momentanément stoppée dans ces structures. La hausse d'activité du cytosquelette d'actine qui en résulte témoigne qu'elles participent à l'effort de cohésion du neurite. De plus, l'étirement neuritique se caractérise par une augmentation conséquente de la surface membranaire, et les vagues pourraient permettre la formation des étirements en apportant le surplus de matériel nécessaire.

Notre interprétation de l'arrêt temporaire des vagues est que celles-ci seraient des structures auto-entretenues dont le déplacement est intrinsèquement lié à la forme cylindrique du neurite. Cette auto-organisation serait basée sur une polymérisation constante des filaments d'actine à l'avant de la vague, relayée par la dépolymérisation à l'arrière et la diffusion des monomères vers la zone de polymérisation où la concentration est réduite. Le fait d'entrer dans une zone étirée et donc bidimensionnelle pourrait perturber cette organisation et la réorienter. La disjonction des microtubules et de la ligne d'adhésion entraîne la mobilisation de l'actine pour induire des forces radiales, c'est-à-dire perpendiculaires à la direction du neurite, et non plus longitudinales. La polymérisation de l'actine semble alors s'effectuer sur l'arc extérieur, donc au niveau des adhésions, ce qui confirme que la dynamique de l'actine est profondément modifiée dans les étirements.

Il est important de noter que les pauses des vagues n'induisent pas de réduction de la tension

neuritique : l'effet de compression active des microtubules est donc conservé. En conséquence, les pauses des vagues s'accompagnent d'un arrêt prolongé de la croissance neuritique, et cela pourrait participer à l'effet d'inhibition des ondulations.

Une dissipation de la tension moins efficace ?

Comment pouvons-nous expliquer l'existence d'une rétraction neuritique importante en réponse à un étirement ? Une explication possible réside dans l'interaction microtubules-actine. Comme on l'a vu au chapitre 1, la transmission des forces le long des neurites dépend de la distance : la tension neuritique est atténuée le long du neurite. Il y a donc vraisemblablement un lien mécanique entre le "câble" des microtubules supportant la tension et le "cortex" d'actine qui réalise l'interaction avec les adhésions. L'effet de ce lien étant de dissiper progressivement la tension, nous pouvons nous référer à la notion d'embrayage moléculaire : l'interaction se représenterait ainsi par un embrayage pas totalement engagé, c'est-à-dire un frottement visqueux. Dans le cas des ondulations, nous avons vu que la formation des étirements neuritiques induit une disjonction de ces deux structures, car les microtubules suivent le plus court chemin. Le frottement pourrait donc être diminué simplement parce que microtubules et actine ne sont plus autant liés par les complexes protéiques responsables du frottement. Ainsi la tension neuritique issue des vagues se transmettrait sur une plus grande longueur lorsque le neurite croît sur les ondulations, entraînant une rétraction plus conséquente.

Notons qu'en règle générale une forte tension est associée à une croissance rapide, mais dans ce cas particulier il semble que ces deux phénomènes sont dissociés du fait de l'existence des étirements neuritiques.

IV.6.4 L'importance des ruptures de membrane

Le phénomène qui se produit dans le passage d'un étirement à une séparation neuritique n'est pas un phénomène habituel dans la croissance neuritique. Sous l'effet de la compétition entre l'adhésion et la tension, une portion du neurite déjà formé se sépare en deux parties, mais cette séparation ne conduit pas à la formation d'un embranchement. L'élément le plus inhabituel est la rupture de la membrane, qui intervient lorsque le neurite est très étiré. Nous ne savons pas si cette rupture intervient par fusion de la membrane supérieure et inférieure qui sont alors très rapprochées, ou bien par cassure d'un de ces côtés de la membrane rapidement réparée par fusion avec l'autre côté.

La différence essentielle entre ces deux points de vue est que le cytoplasme pourrait être exposé directement au milieu de culture dans le cas d'une cassure. Cela entraînerait une entrée massive de calcium entre autres, puis une forte dépense énergétique due à l'activité des pompes ioniques pour

reformer l'équilibre initial. Ces structures étant très dynamiques, une telle dépense énergétique se reproduirait périodiquement et l'hypothèse d'un épuisement des ressources nécessaires à la croissance prend tout son sens.

Dans le cas inverse, la fusion des deux parties de la membrane témoignerait de la rupture de la structure d'actine sous-jacente. En effet, nous avons vu qu'une structure d'actine tapisse l'étirement neuritique, et cette structure est vraisemblablement celle qui s'oppose à l'étirement. La fusion doit s'opérer par contact entre les deux parties internes de la membrane, ce qui impose une courbure concave inhabituelle pour la membrane cellulaire. Cette hypothèse d'une fusion n'exclurait pas l'entrée massive de calcium dans la cellule car des canaux ioniques sont sensibles à la tension membranaire [15], qui est précisément très importante dans les étirements.

Enfin, une autre caractéristique originale des ruptures de membranes est qu'elles sont réversibles. Lorsque l'activité du cytosquelette d'actine parvient à rapprocher suffisamment les microtubules de la ligne d'adhésion, la rupture membranaire peut se résorber : l'unité du neurite est alors retrouvée. Le stade critique de cette réparation est l'instant où le "tore" de membrane se resserre pour reformer deux membranes parallèles. Cette fois, la transition ne peut pas être due à une déchirure de la membrane car celle-ci n'est plus sous tension. Le mécanisme impliquerait donc une séparation naturelle des membranes supérieures et inférieures au niveau du point central de ce tore.

En conclusion, ces phénomènes de rupture sont non seulement des éléments révélateurs de la plasticité caractérisant les réactions des cellules à un stress de l'environnement, mais sont aussi des événements révélateurs de l'activité dynamique et coordonnée des composants du cytosquelette au niveau des étirements neuritiques.

Bibliographie

- [1] A.A. Oliva, C.D. James, C.E. Kingman, H.G. Craighead, and G.A. Banker. Patterning axonal guidance molecules using a novel strategy for microcontact printing. *Neurochemical research*, 28(11) :1639–1648, 2003. [97](#)
- [2] S. Roth. *Réseaux de neurones modèles : Contrôle de la différenciation axonale par micropatterns*. PhD thesis, Université Joseph Fourier, Grenoble, 2009. [97](#), [111](#)
- [3] M.J. Katz. How straight do axons grow? *The Journal of neuroscience*, 5(3) :589, 1985. [98](#), [108](#)
- [4] F.C. De Anda, G. Pollarolo, J.S. Da Silva, P.G. Camoletto, F. Feiguin, and C.G. Dotti. Centrosome localization determines neuronal polarity. *NATURE-LONDON-*, 7051 :704, 2005. [99](#), [100](#)
- [5] M. Théry, V. Racine, A. Pépin, M. Piel, Y. Chen, J.B. Sibarita, M. Bornens, et al. The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nature cell biology*, 7(10) :947–953, 2005. [99](#), [100](#)
- [6] H. Witte and F. Bradke. The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Current opinion in neurobiology*, 18(5) :479–487, 2008. [102](#)
- [7] P. Lamoureux, G. Ruthel, R.E. Buxbaum, and S.R. Heidemann. Mechanical tension can specify axonal fate in hippocampal neurons. *The Journal of cell biology*, 159(3) :499, 2002. [102](#), [136](#)
- [8] M. O’Toole, P. Lamoureux, and K.E. Miller. A physical model of axonal elongation : force, viscosity, and adhesions govern the mode of outgrowth. *Biophysical journal*, 94(7) :2610–2620, 2008. [103](#)
- [9] D. Bray. Mechanical tension produced by nerve cells in tissue culture. *Journal of cell science*, 37(1) :391, 1979. [103](#)
- [10] J. Zheng, P. Lamoureux, V. Santiago, T. Dennerll, R.E. Buxbaum, and S.R. Heidemann. Tensile regulation of axonal elongation and initiation. *The Journal of neuroscience*, 11(4) :1117, 1991. [109](#)
- [11] C. Jacobson, B. Schnapp, and G.A. Banker. A change in the selective translocation of the kinesin-1 motor domain marks the initial specification of the axon. *Neuron*, 49(6) :797–804, 2006. [121](#)
- [12] L. Dehmelt and S. Halpain. Actin and microtubules in neurite initiation : Are maps the missing link? *Journal of neurobiology*, 58(1) :18–33, 2004. [138](#)
- [13] O.M. Rossier, N. Gauthier, N. Biais, W. Vonnegut, M.A. Fardin, P. Avigan, E.R. Heller, A. Mathur, S. Ghassemi, M.S. Koeckert, et al. Force generated by actomyosin contraction builds bridges between adhesive contacts. *The EMBO Journal*, 29(6) :1055, 2010. [138](#)
- [14] J. Brugués, B. Maugis, J. Casademunt, P. Nassoy, F. Amblard, and P. Sens. Dynamical organization of the cytoskeletal cortex probed by micropipette aspiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(35) :15415, 2010. [138](#)
- [15] K. Franze, J. Gerdemann, M. Weick, T. Betz, S. Pawlizak, M. Lakadamyali, J. Bayer, K. Rillich, M. Gögler, Y.B. Lu, et al. Neurite branch retraction is caused by a threshold-dependent mechanical impact. *Biophysical journal*, 97(7) :1883–1890, 2009. [139](#), [142](#)

Conclusion Partie I

Les expériences que nous avons menées dans ces deux chapitres reposent sur le contrôle de la géométrie imposée aux cellules. Ce contrôle est d'abord un atout majeur lorsque l'on souhaite étudier de façon systématique une caractéristique cellulaire, car il réduit considérablement la variabilité de morphologie cellulaire. Mais ce contrôle permet aussi de mettre en évidence des aspects mécaniques de la croissance neuritique, qui révèlent des processus non nécessairement apparents dans les conditions de cultures habituelles. En particulier, les expériences sur motifs en lignes et sur motifs à ondulations montrent que la tension neuritique joue un rôle important dans la croissance et la polarisation neuronale. Sur les motifs d'adhésion caractérisés par une rupture de symétrie, la tension interne des neurites semble même intégrée par la cellule pour induire une réponse adaptée, qui résulte en un biais sur la direction de différenciation des axones.

Les hypothèses que nous avons avancées pour expliquer les différences de comportement sur lignes et plots (chapitre 3) ainsi que les trois effets possibles de la géométrie sur la polarisation (chapitre 4) se rapportent à une relation complexe entre le centrosome, les vagues et la tension neuritique. Cette relation pourrait résulter en un effet de rétroaction positive de la croissance neuritique lorsque les conditions sont favorables : les vagues génèrent la tension supportée par les microtubules, celles-ci en conséquence peuvent entraîner un déplacement du centrosome, et un mécanisme de repositionnement actif du centrosome pourrait entraîner, par un mécanisme qui nous est inconnu, une plus grande probabilité pour que la prochaine vague soit émise dans cette direction. Si au contraire les conditions ne sont pas favorables, du fait d'une faible surface d'adhésion, de la présence d'une ondulation sur le chemin de la vague ou d'une contrainte cellulaire particulière, l'effet pourrait devenir négatif et entraîner l'inhibition de la polarisation dans cette direction neuritique.

Les motifs que nous avons développés peuvent en outre être un cas de figure modèle pour étudier, par exemple, les relations entre les éléments du cytosquelette à travers l'effet de drogues, ou bien l'effet d'une manipulation génétique sur les caractéristiques mécaniques du développement des cellules. Beaucoup de questions reliant la mécanique cellulaire, la croissance neuritique et la

polarisation axonale restent à explorer, et il ne fait nul doute que les contraintes de géométrie cellulaire seront un atout majeur dans l'exploration de ces mécanismes.

Troisième partie

Couplage neurones - silicium : structuration de surface et puces électroniques

Chapitre V

Adhésion, croissance et morphologie de neurones fakir *in vitro*.

Sommaire

V.1 Introduction	151
V.1.1 Pourquoi des neurones sur Silicium rugueux?	151
V.1.2 Préparation d'états de surface complexes sur silicium	152
V.2 Résultats	154
V.2.1 Croissance et morphologie	154
V.2.2 Polarisation	159
V.2.3 Etude géométrique de l'interaction neurite-substrat	163
V.3 Discussion	171
V.3.1 Adhésion	171
V.3.2 Croissance globale et croissance des neurites	172
V.3.3 Interférence de signaux stimulant la croissance	173
V.3.4 Nombre de neurites	175
V.3.5 Mécanismes de polarisation	176
V.3.6 Frontières et polarisation	178
V.3.7 Interaction neurite-substrat	180
V.3.8 Conclusion	182

V.1 Introduction

La croissance neuronale est habituellement caractérisée dans des conditions de croissance *in vitro* contrôlées, le plus souvent sur des substrats de verre plan. Il est évident que l'environnement des cellules influence leur développement, et de nombreuses études montrent que l'aspect biochimique de la surface, par le choix des molécules d'adhésion, est déterminante. Mais un autre aspect de l'environnement cellulaire, à savoir les propriétés de l'environnement physique, est moins étudié. Ces propriétés pourraient-elles influencer la croissance, la compétition neuritique, et jusqu'à la polarisation axonale ?

V.1.1 Pourquoi des neurones sur Silicium rugueux ?

La grande majorité des cultures cellulaires s'effectue au fond de boîtes de pétri en plastique ou sur des substrats de verre. Les raisons principales sont que ces substrats sont peu chers, plans et bio-compatibles. Ils sont aussi transparents et fins, ce qui permet d'observer les cellules à travers le substrat plutôt qu'à travers le milieu de culture.

Dans le projet NeuroFETs, nous avons été amenés à réaliser des cultures sur Silicium dans la perspective d'un couplage neurones-nanotransistors. Les substrats sont des mono-cristaux de silicium, atomiquement plans, et par conséquent plus chers. Ils sont opaques, ce qui force à adapter les outils traditionnels d'observation cellulaire, mais leur surface d'oxyde de Silicium (SiO_2) est semblable à celle de verre, ce qui permet de la fonctionnaliser par les mêmes moyens. L'avantage majeur du Silicium est la possibilité d'utiliser de nombreuses techniques de micro- et nano-fabrication développées par l'industrie de la microélectronique. Parmi ces techniques, la gravure ionique réactive (Reactive Ion Etching, RIE) permet de nettoyer ou de graver une surface à l'aide d'un plasma. Le mélange des gaz SF_6 et O_2 , en particulier, permet de graver le silicium en générant une rugosité à sa surface.

Des modifications de surface à l'échelle nanométrique ont été récemment employées par Fan *et al.* [1], ce qui leur a permis de montrer que l'adhésion des neurones dépend de la rugosité de surface. Dans une étude plus récente, Jang *et al.* [2] rapportent que les neurites peuvent être guidés par des tranchées de largeur et de profondeur sub-micrométriques creusées dans le substrat, et que leur croissance y est accélérée. L'équipe de Sheetz montre par ailleurs qu'une surface composée de plots d'adhésion espacés de quelques centaines de nanomètres influence les forces développées par des cellules des tissus conjonctifs (fibroblastes) [3]. En parallèle, un travail de Geiger *et al.* révèle que l'étalement cellulaire des cellules de la synthèse du squelette osseux (ostéoblastes) est maximal lorsque la distance imposée entre points d'adhésion est de l'ordre de $60nm$ [4]. Les

deux premiers travaux montrent que la topologie de la surface peut influencer l'adhésion et le développement cellulaire des neurones, tandis que les deux suivants indiquent que la répartition des points d'adhésion sur le substrat peut suffire à modifier l'étalement et les forces générées par différents types cellulaires. La réunion de tous ces résultats nous a invités à réaliser des cultures de neurones sur des substrats présentant un état de surface complexe, pour étudier son effet sur le développement neuronal. Les questions que nous nous posons sont en particulier les suivantes : (i) quelles caractéristiques morphologiques voire fonctionnelles des neurones peut-on modifier en jouant uniquement sur la topologie de leur surface d'adhésion, (ii) la compétition neuritique peut-elle être altérée par cette modification de l'environnement ? Ce chapitre est consacré à l'étude de ces questions.

V.1.2 Préparation d'états de surface complexes sur silicium

Diverses techniques permettent la création de topologies de surface à une échelle sub-micronique. Dans la perspective d'établir une preuve de concept, nous avons choisi une des plus simples à notre disposition : la gravure plasma. Une gravure par plasma dite "gravure ionique réactive" (RIE) repose sur deux types d'attaques : chimique et physique. L'attaque physique est très sensible aux facteurs géométriques, et la chambre de plasma utilisée dans la salle blanche NanoFab' donne des résultats assez inhomogènes. Nos premières expériences montraient que les neurones ne parvenaient pas à adhérer sur le centre de l'échantillon, tandis qu'une croissance normale -voire accélérée- avait lieu sur la périphérie de l'échantillon. Imagée au MEB (voir Figure V.1), la surface centrale présentait des pics très hauts et pointus (rayon de courbure au sommet : $8nm$), formant ce qu'on appelle le *Black Silicon*⁽¹⁾. Le reste de la surface était composé de pics plus espacés, plus courts et aux sommets moins effilés (rayon de courbure au sommet $24nm$).

Par conséquent, nous avons développé une méthode permettant à la fois de rendre la gravure plus homogène, et d'éviter la formation de *Black Silicon*. Nous avons ainsi réalisé une alternance de bandes rugueuses/planes de $1mm$ de large par photolithographie, une résine épaisse de $1,8\mu m$ (S1818) servant de masque pendant la gravure (voir méthode p. 54). La périodicité du motif réduit les effets d'inhomogénéité en imposant les mêmes conditions locales du plasma sur chaque bande, tout en empêchant la formation de *Black Silicon* au centre. L'autre avantage de cette méthode est que l'on dispose d'une surface plane qui servira de contrôle sur le même échantillon et à proximité de la zone rugueuse. Cela permet de s'affranchir de multiples effets participant à la variabilité des mesures biologiques. En particulier, la densité cellulaire peut causer des variations

1. Cette surface absorbe les ondes électromagnétiques aux longueurs d'ondes visibles, ce qui contraste avec l'aspect 'miroir' du Silicium poli.

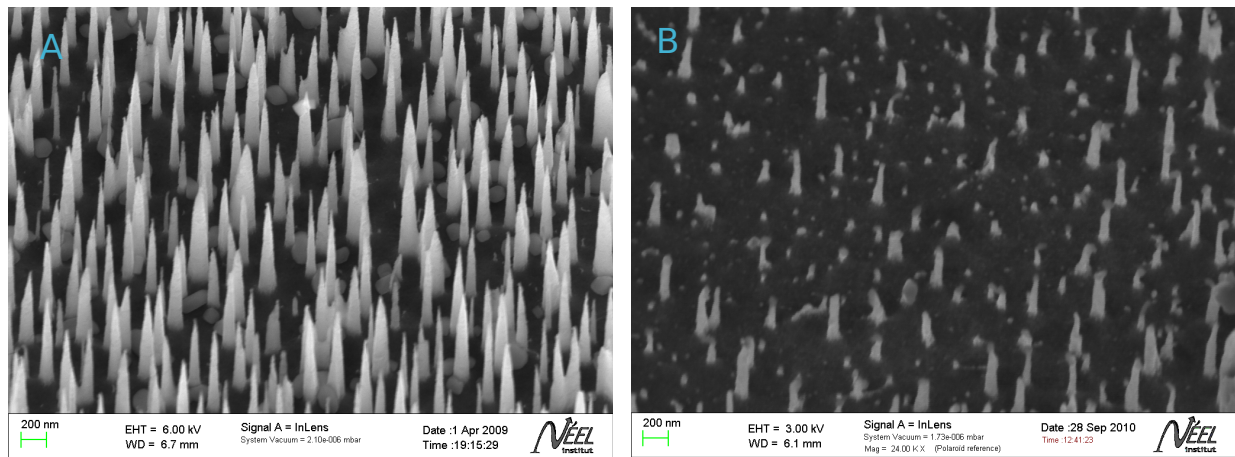


FIGURE V.1 – Effet inhomogène de la gravure sur un échantillon standard, (A) au centre de l'échantillon ou (B) en périphérie.

Barre : 200nm

de croissance et de survie des cellules [5], ce qui pose problème lorsque l'on compare deux échantillons différents car la densité cellulaire est difficile à contrôler et peut présenter des gradients à l'échelle de l'échantillon, i.e. à une échelle centimétrique.

V.2 Résultats

Nous avons donc réalisé des cultures de neurones hippocampiques d'embryons de souris (voir méthode p. 57) sur des substrats qui présentent des bandes alternées de texture rugueuse et de texture plane. Par commodité, nous désignerons ces surfaces par la “zone rugueuse” et la “zone plane”.

V.2.1 Croissance et morphologie

Longueurs et nombre de neurites

Les neurones ont été fixés après deux et trois jours de culture (2&3DIV), puis les microtubules ont été marqués en fluorescence (anticorps : YL $\frac{1}{2}$) selon la méthode décrite p. 58. La figure V.2 présente des exemples d'images utilisées pour réaliser la mesure automatique de la longueur des neurites, sur zones rugueuse et plane (voir méthode p. 64). La longueur totale des neurites sur une image est divisée par le nombre de cellules pour obtenir la longueur totale des neurites par cellule. Cette longueur totale, divisée par le nombre moyen de neurites émergeant du soma, donne alors la longueur moyenne des neurites.

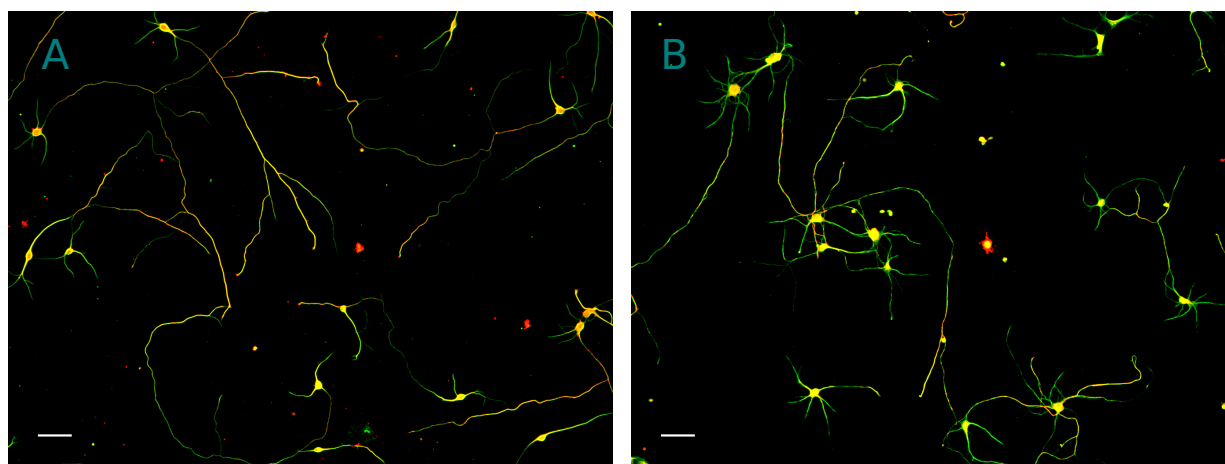


FIGURE V.2 – Neurones sur zones rugueuse (A) et plane (B) à 3DIV. Pour la même densité cellulaire (13 cellules), ces exemples présentent un développement différent : la longueur moyenne des neurites vaut $220\mu\text{m}$ sur zone rugueuse contre $130\mu\text{m}$ sur zone plane (différence supérieure à 50%).

Marquages fluorescents : axones (tau-1, rouge) ; microtubules (YL $\frac{1}{2}$, vert) | Barre : $50\mu\text{m}$

Les mesures à 3DIV, résumées dans la table V.1, montrent que la croissance des neurites est plus importante sur zone rugueuse alors que le nombre de neurites émis est réduit de 4,2 à 3,5 en moyenne par cellule. L'accroissement de la longueur moyenne des neurites est supérieur à +50% en moyenne sur trois cultures ($179\mu\text{m}$ sur zone rugueuse contre $115\mu\text{m}$ sur zone plane).

Longueur totale par cellule		Nombre de neurites		Longueur moyenne des neurites	
Rugueux	Plan	Rugueux	Plan	Rugueux	Plan
$628 \pm 91\mu m$	$436 \pm 101\mu m$	$3,53 \pm 0,19$	$4,17 \pm 0,23$	$178 \pm 26\mu m$	$104 \pm 23\mu m$
$p = 3,6 \cdot 10^{-7} < 0,001 (***)$		$p = 8,7 \cdot 10^{-10} < 0,001 (***)$		$p = 4,5 \cdot 10^{-11} < 0,001 (***)$	

TABLE V.1 – Longueur et nombre de neurites des neurones à 3 *DIV* sur surfaces plane et rugueuse ($n \approx 300$ cellules par condition)

La table V.2 présente des résultats similaires à 2 *DIV*. En rassemblant les résultats à 2 & 3 *DIV* sur PLL, la vitesse de croissance apparaît constante quel que soit le substrat, car la longueur des neurites est proportionnelle au temps écoulé, sur zone rugueuse comme sur zone plane. En effet l'accroissement de longueur moyen est de $60\mu m$ par jour sur zone rugueuse contre $40\mu m$ sur zone plane. Cela indique que l'effet de la rugosité est régulier dans la fenêtre temporelle étudiée. Nous n'avons pas pu quantifier la longueur des cellules après 3 *DIV* car la fasciculation progressive des neurites ne permet plus d'effectuer des mesures correctes des longueurs⁽²⁾. De la même manière, le nombre de neurites émis par la cellule est stable entre 2 & 3 *DIV*, significativement inférieur sur zone rugueuse. Il n'y a donc pas de formation tardive de neurites, ou au contraire de rétraction neuritique suite à des éventuels échecs de croissance après 2 *DIV*.

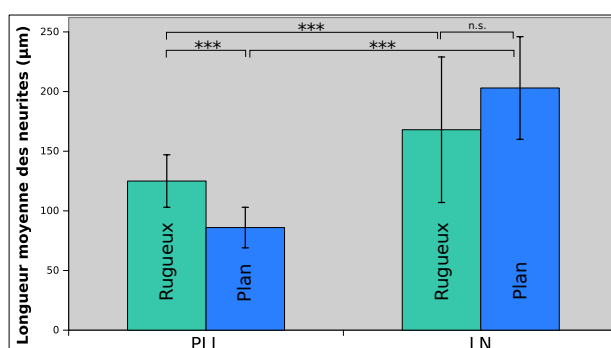
L'expérience a été menée en parallèle avec comme substrat d'adhésion la Laminine (LN), protéine fournissant aux neurones un signal spécifique qui stimule leur croissance [6]. Comme on peut s'y attendre, la croissance est significativement accélérée sur les deux zones par rapport à la PLL, mais dans des proportions différentes : l'accroissement dû à la LN se limite à +35% sur zone rugueuse, tandis qu'il atteint +140% sur zone plane (voir table V.3 et figure V.3). En d'autres termes, si l'on compare les zones rugueuse et plane en présence de LN, la rugosité n'apporte pas d'augmentation de croissance : la longueur des neurites y est même inférieure de 20% (différence à peine significative) par rapport à la zone plane. Les effets de ces deux signaux, qui indépendamment l'un de l'autre stimulent la croissance, ne s'additionnent donc pas.

2. Cette remarque vaut aussi pour la Laminine (LN) après 2 *DIV*

Neurones cultivés sur Poly-L-lysine, 2 DIV					
Longueur totale par cellule		Nombre de neurites		Longueur moyenne des neurites	
Rugueux	Plan	Rugueux	Plan	Rugueux	Plan
$442 \pm 81\mu m$	$382 \pm 72\mu m$	$3,56 \pm 0,44$	$4,50 \pm 0,69$	$125 \pm 22\mu m$	$86 \pm 17\mu m$
$p = 2,0 \cdot 10^{-3} < 0,005 (**)$		$p = 1,1 \cdot 10^{-8} < 0,001 (***)$		$p = 3,7 \cdot 10^{-11} < 0,001 (***)$	

TABLE V.2 – Longueur et nombre de neurites des neurones à 2 DIV sur Poly-L-Lysine ($n \approx 400$ cellules par condition)

Neurones cultivés sur Laminine, 2 DIV					
Longueur totale par cellule		Nombre de neurites		Longueur moyenne des neurites	
Rugueux	Plan	Rugueux	Plan	Rugueux	Plan
$660 \pm 174\mu m$	$773 \pm 138\mu m$	$4,05 \pm 0,64$	$3,85 \pm 0,55$	$168 \pm 61\mu m$	$203 \pm 43\mu m$
$p = 0,038 < 0,05 (*)$		$p = 0,31 (NS)$		$p = 0,054 (NS)$	

TABLE V.3 – Longueur et nombre de neurites des neurones à 2 DIV sur Laminine ($n \approx 200$ cellules par condition) | NS = Non SignificatifFIGURE V.3 – Effet du passage de plan à rugueux ou de PLL à LN sur la longueur neuritique à 2DIV. La combinaison des deux signaux promoteurs de croissance n’induit pas d’augmentation supplémentaire à la Laminine seule. *** signifie $p < 0,001$, $p = p\text{-value}$ du test de Student (voir méthode p. 63)

Adhésion du soma et initiation des neurites

Le nombre réduit de neurites observé sur substrat rugueux pourrait provenir d’un périmètre moindre du soma, c’est-à dire d’un étalement moins important du soma au contact de la rugosité. Or, les neurites s’initient principalement dans le premier jour de culture. Par conséquent nous avons fixé les neurones après 10h de culture pour mesurer la surface des somas et étudier la genèse des neurites. Les mesures sont basées sur un signal de fluorescence distribué dans tout le volume de la cellule, grâce à la lignée de souris FM131. Cette lignée de souris exprime en effet la protéine verte fluorescente GFP de façon constitutive, en particulier dans les cellules de l’hippocampe, et cette protéine est libre dans le cytoplasme. Les résultats résumés dans la table V.4 montrent qu’il

n'y a pas de différence d'étalement entre rugueux et plan, que l'on observe la surface moyenne des somas ou celle des lamellipodes. A ce stade de développement le nombre de neurites n'est pas encore différent : il y en a environ 1,7 par cellule. De même le nombre de lamellipodes, qui sont les précurseurs des neurites, est similaire. Cependant, une différence significative est observée pour la largeur des lamellipodes, mesurée comme l'angle sur lequel s'étend le lamellipode vu depuis le centre du soma. Ainsi, les lamellipodes ont la même surface mais occupent une moins grande partie de la périphérie de la cellule, ce qui signifie qu'ils s'étendent plus en longueur sur la zone rugueuse.

	Surface soma	Nombre de neurites	Nombre de lamellipodes	Surface lamellipode	Angle lamellipode
Rugueux	$100 \pm 30,4\mu m^2$	$1,50 \pm 1,75$	$1,13 \pm 0,90$	$75,6 \pm 41,3\mu m^2$	$94,3 \pm 111^\circ$
Plan	$99,5 \pm 32,6\mu m^2$	$1,36 \pm 1,60$	$0,90 \pm 0,78$	$81,4 \pm 59,4\mu m^2$	$188 \pm 150^\circ$
p-value	0,83 (<i>NS</i>)	0,75 (<i>NS</i>)	0,26 (<i>NS</i>)	0,69 (<i>NS</i>)	0,013 < 0.05 *

TABLE V.4 – **Étalement cellulaire et initiation des neurites après 10h *in vitro*.** “Angle lamellipode” dénote l’angle sur lequel s’étend le lamellipode vu depuis le centre du soma.

Cônes de croissance et signal d’actine

Les résultats précédents montrent que la rugosité affecte le développement des cellules dès les premières heures de culture. Par la suite, la croissance est plus rapide sur rugosité. Or, le cône de croissance joue un rôle très important dans l’exploration de l’environnement et la croissance des neurites. Nous avons donc tenté de caractériser les cônes de croissance en zone rugueuse et plane, par le marquage de l’actine filamenteuse (actine F) (voir méthode p. 58). La surface moyenne des cônes de croissance ainsi déterminée est très similaire entre zone rugueuse et zone plane, de même que l’intensité moyenne de fluorescence (voir table V.5). Un cône de croissance n’étant pas constamment actif, ce qui se détermine simplement par la présence ou non d’une structure d’actine F, nous avons mesuré les taux de cônes au repos. Ces taux sur zones rugueuse et plane ne sont pas significativement différents, ce qui indique que les périodes d’activité se composent du même pourcentage d’inactivité. Il serait intéressant de compléter ces données par la comparaison de la durée de ces périodes et de la vitesse de croissance pendant les phases d’activité, ce qui nécessiterait une expérience de vidéo-microscopie. Mais pour les mesures réalisées, aucune différence significative n’a été mise en relief pour les cônes de croissance. Cependant, nous avons observé que le signal d’actine le long des neurites présentait un motif en “pointillés”, plus fréquemment sur zone rugueuse (45% des neurites) que sur zone plane (15%). La distance entre ces points visibles étant inférieure au micron, proche de la limite de résolution optique, nous interprétons ces points comme des

rassemblements de filaments d'actine au niveau des adhésions. En effet, nous verrons p. 166 que sur rugosité la distance entre les points d'adhésion est de l'ordre de $500nm$. Une telle organisation du cytosquelette autour des zones d'adhésion a par ailleurs été observée autour d'excroissances de surface plus importante (carrés de $1\mu m$ de côté, $0,5\mu m$ de hauteur espacés de $2\mu m$) pour des cardiomyocytes [7].

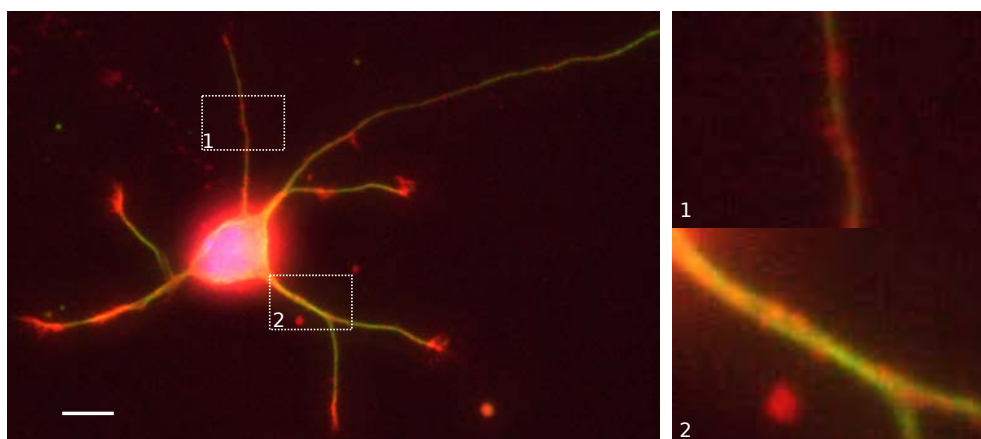


FIGURE V.4 – Exemple d'un neurone sur rugosité à 3DIV. Le cône de croissance du neurite du haut est inactif. Sur certains neurites, les zones d'adhésion semblent marquées par des “pointillés” d'actine (zooms 1 et 2 des encadrés).

Marquages fluorescents : microtubules (YL $\frac{1}{2}$, vert), actine F (phalloïdine-TxRed, rouge) | Barre : $10\mu m$

	Surface du cône de croissance	Intensité moyenne de fluorescence	Taux d'inactivité
Rugueux	$757 \pm 360\mu m^2$	2,84 (u.a.)	29%
Plan	$754 \pm 458\mu m^2$	2,76 (u.a.)	25%
	<i>N.S.</i>	<i>N.S.</i>	<i>N.S.</i>

TABLE V.5 – Etude des cônes de croissance et du signal d'actine le long des neurites à 3DIV. *N.S.* = différence Non Significative.

Conclusion

Nous avons montré que la rugosité modifie l'initiation puis le nombre de neurites émis par les neurones, ainsi que la vitesse de croissance de ces neurites au moins pendant les premiers jours de culture. Or, un événement majeur qui est fortement lié à la croissance des neurites a lieu pendant cette période : il s'agit de l'établissement d'une polarité pour la cellule, c'est à dire l'acquisition d'un axone. Quelle peut être l'influence de la rugosité sur la polarisation axonale ?

V.2.2 Polarisation

Dynamique de polarisation

La mise en évidence des axones par le marquage de la protéine tau-1, qui en est un marqueur spécifique et précoce, nous permet d'évaluer le pourcentage de neurones polarisés sur les images telles que présentées en figure V.2. Les résultats sont résumés en table V.6. La conclusion majeure est que le taux de polarisation sur zone rugueuse a déjà atteint 75% à 2DIV alors que cette limite n'est atteinte qu'après 3DIV sur la zone plane. Cela signifie que la polarisation axonale est accélérée sur zone rugueuse. Par ailleurs, la Laminine (LN) induit une polarisation plus précoce sur plan comparée à la PLL, mais n'induit pas de différence sur rugosité.

	Rugueux	Plan
2 DIV	74%	58%
3 DIV	77%	75%
LN, 2 DIV	77%	85%

TABLE V.6 – Évolution du taux de polarisation entre 2DIV et 3DIV sur Poly-L-lysine, et comparaison avec la polarisation sur Laminine ($n \approx 200$ cellules par condition)

Lorsque nous rassemblons ces résultats à 2DIV et les résultats de longueur totale des cellules, nous constatons que les taux de polarisation sont d'autant plus élevés que les neurones se développent vite. L'effet de la Laminine confirme cette tendance, car c'est la condition plane qui présente le plus haut taux de polarisation, condition où la longueur totale des cellules est la plus importante. La dynamique de polarisation axonale est donc intimement liée à la longueur des neurites.

Par ailleurs, l'étude détaillée de Banker [6] montre que la croissance accélérée sous l'effet de la LN est strictement réservée aux axones : les autres neurites ne sont pas plus longs que sur PLL. Par conséquent, nous avons quantifié la longueur des axones sur zones rugueuse et plane (voir méthode p. 64). Les résultats sont présentés dans la table V.7. En contraste avec le mode de croissance sur LN, nous observons que les axones sur zone rugueuse présentent le même accroissement de longueur que la longueur totale des neurites (+22% par rapport au cas plan). De plus nous déduisons de la longueur totale neuritique, à laquelle nous soustrayons la longueur axonale, la longueur totale des autres neurites. Celle-ci est elle aussi augmentée de +22%. Par la suite, nous nommerons ces neurites "dendrites" pour les différencier de l'axone, bien qu'elles n'en présentent pas encore toutes les fonctionnalités à 3DIV. La présence de la rugosité induit donc une augmentation de la vitesse de croissance selon le même taux pour l'axone d'un côté, et les dendrites de l'autre. Nous pouvons en conclure que son effet n'est pas discriminant selon la spécialisation des neurites : l'action de la

rugosité n'est pas spécifique.

Si nous étudions plus en détail ces résultats en tenant compte de la différence dans le nombre de neurites, les dendrites semblent avoir une croissance individuelle plus importante. En effet, sur zone plane et rugueuse les axones représentent 45% de la longueur totale, donc les dendrites se partagent les 55% restant, mais leur nombre est de 2,5 et 3,2 respectivement sur zone rugueuse et plane. Ainsi, la longueur moyenne des dendrites déduite de ce raisonnement est de $157\mu m$ sur zone rugueuse contre $101\mu m$ sur zone plane, soit une augmentation individuelle de +57%. En conclusion, la longueur des dendrites semble compenser la réduction du nombre de neurites, de sorte que la longueur totale des deux pôles de la cellule (axone/dendrites) conserve la même proportion de longueurs.

	Rugueux	Plan	Accroissement sur rugosité
Longueur des axones	$324 \pm 117\mu m$	$263 \pm 136\mu m$	+ 23,1%
Longueur totale des neurites	$716 \pm 121\mu m$	$585 \pm 82\mu m$	+ 22,4%
Proportion de longueur axonale	45,3%	45,0%	

TABLE V.7 – Longueur axonale comparée à la longueur moyenne des neurites à 3DIV ($n \approx 50$ cellules par condition)

Nous venons de voir que la rugosité a une influence sur la croissance des neurones, ainsi que sur la dynamique de leur polarisation, en comparaison à une surface plane. Au regard de ces résultats, comment les neurones se développent-ils et se polarisent-ils lorsqu'ils sont précisément à l'interface entre les deux zones ?

Polarisation à la frontière entre zones rugueuse et plane

La frontière qui sépare la zone rugueuse de la zone plane fournit un environnement très particulier aux neurones. Les neurites qu'ils émettent explorent les deux zones simultanément, ce qui invite à étudier dans quelle zone sera déterminé l'axone : peut-on influencer la polarisation axonale en affectant la localisation de l'axone à l'aide de la rugosité ? Pour examiner cette question, il convient de définir précisément les règles de sélection des neurones pour s'assurer que la population sélectionnée était en contact avec les deux zones avant polarisation.

L'étude de Banker [8] indique que la longueur moyenne des neurites avant polarisation est de $35\mu m$. Cette observation s'accompagne d'un cadre théorique selon lequel ces $35\mu m$ seraient un seuil, intrinsèque aux neurones, que le neurite doit dépasser pour devenir un axone. Dans ce cadre, une règle de sélection simple est qu'au moins un neurite doit avoir franchi cette frontière avant d'atteindre une longueur limite de $35\mu m$. Sur neurones fixés à 2 & 3 DIV, cela revient à

sélectionner les neurones tels que la distance entre le soma et la frontière en suivant un neurite est inférieure à cette limite de $35\mu m$. Les neurones sont ensuite classés selon le côté de la frontière où est le soma, et le côté où se situe l'axone.

Les résultats sont présentés en table V.8, et comparés à des pourcentages théoriques dans le cas où la frontière n'influencerait pas la polarisation. Pour obtenir ce pourcentage théorique, nous avons mesuré la distance moyenne entre soma et frontière dans la population de neurones sélectionnés. Cette distance moyenne expérimentale est de $10\mu m$. Ensuite, nous traçons un cercle de rayon $35\mu m$ dont le centre est à $10\mu m$ de la frontière (voir schéma en figure V.5.C). Cela modélise un neurone typique, le cercle représentant une limite que doivent atteindre les neurites pour devenir l'axone. En l'absence de tout biais dû à l'environnement, l'axone devrait franchir le cercle en une position aléatoire. Ainsi, le rapport de la portion de périmètre en zone rugueuse sur le périmètre total donne le pourcentage théorique d'axones dans la zone rugueuse, si celle-ci n'apportait pas de biais.

Cette comparaison aux pourcentages théoriques démontre qu'il y a une préférence axonale pour la zone rugueuse, que le soma soit du côté rugueux ou qu'il soit du côté plan. En effet, à 3 DIV les différences sont significatives avec un risque d'erreur inférieur à 1%. Il est intéressant de noter qu'à 2 DIV les écarts au cas théorique sont moins marqués, et non significatifs à 5%, ce qui signifie que les neurones se polarisant entre 0 & 2 DIV subissent peu l'influence du substrat, alors que les neurones se polarisant entre 2 & 3 DIV y sont très sensibles.

		Soma côté rugueux	Soma côté plan	Total des cellules
2 DIV	Nombre de neurones	33	31	64
	Axones côté rugueux (%)	67%	45%	56%
3 DIV	Nombre de neurones	46	38	84
	Axones côté rugueux (%)	85%	66%	76%
Pourcentages théoriques d'axones côté rugueux		60%	40%	50%

TABLE V.8 – Localisation préférentielle des axones côté rugueux pour les neurones situés à la frontière plan/rugueux à 2 & 3 DIV. Les neurones sont séparés selon que le soma adhère à la zone rugueuse ou plane, les pourcentages correspondant au nombre de neurones dont l'axone est côté rugueux.

La frontière n'est cependant pas un simple changement de texture de surface, car l'étape de gravure qui crée la rugosité entraîne la formation d'une marche d'environ $2\mu m$ de hauteur, comme en témoigne la figure V.6 A. Cette marche, qui n'est pas une frontière symétrique, peut-elle remettre en cause les résultats précédents en perturbant le passage des neurites ? Les travaux de Li et Folch [9] montrent qu'une marche verticale de $2,5\mu m$ séparant deux zones planes ne

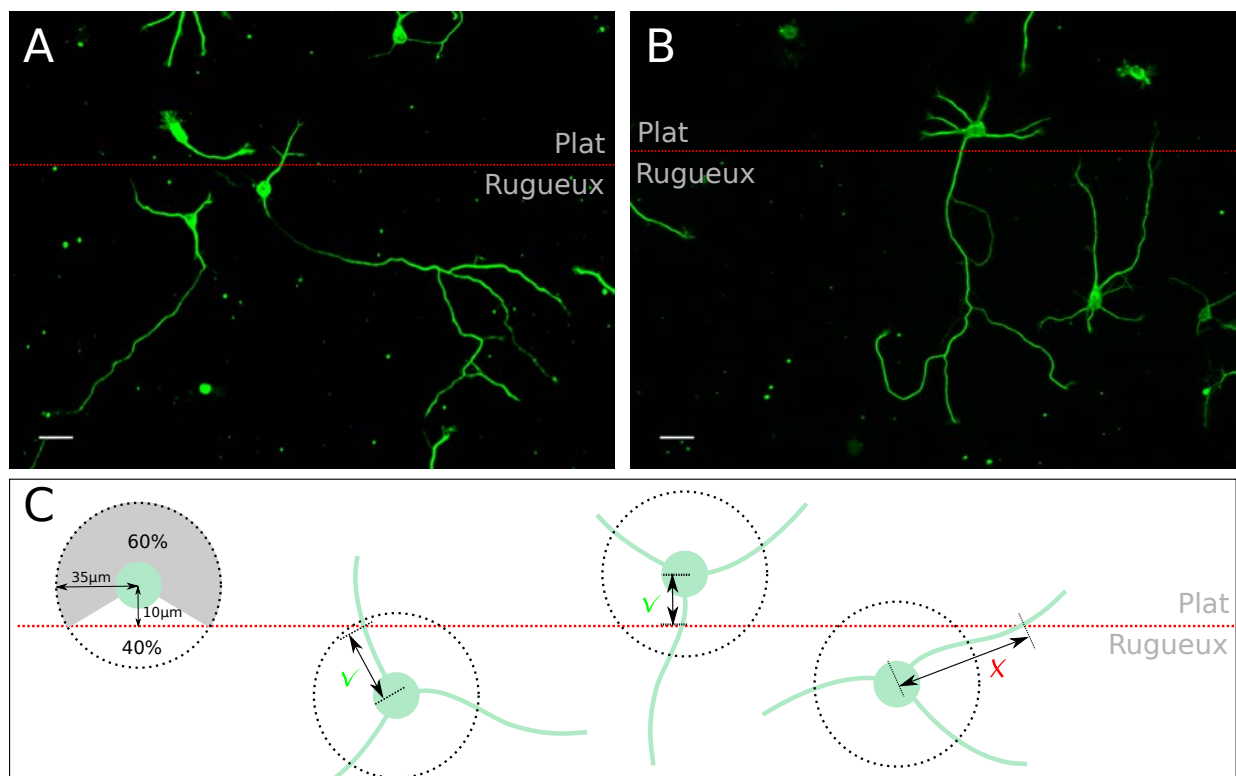


FIGURE V.5 – **Polarisation des neurones aux frontières.** **A-B/** Exemples de neurones polarisés pour lesquels au moins un neurite atteint la frontière à une distance inférieure à $35\mu m$ du soma. Les axones de ces neurones s'étendent préférentiellement sur la zone rugueuse, que le soma soit sur la zone rugueuse (A) ou plane (B). **C/** La règle de sélection des neurones dans cette étude est qu'au moins un neurite doit avoir atteint la frontière à une distance inférieure à $35\mu m$ du soma. Après cette sélection, nous constatons que la distance moyenne entre soma et frontière est de $10\mu m$, ce qui implique que nous attendons 60% de neurites du côté où est le soma, et donc 60% d'axones côté soma si leur répartition est aléatoire. Marquages fluorescents : axones (tau-1, vert), microtubules (non affichés) | Barre : $25\mu m$

suffit pas à perturber significativement le passage d'axones. Cependant, ils rapportent qu'une marche de $11\mu m$ empêche le passage de 50% des axones, indépendamment du sens de passage. Ces résultats sont interprétés comme une résistance des neurites à la courbure, car ces axones montrent une tendance à se courber pour éviter la frontière lorsque l'angle nécessaire est inférieur à l'angle imposé par la marche. D'après ces résultats, nos marches de $2\mu m$ ne devraient pas avoir d'influence notable, d'autant plus que les flancs ne sont pas purement verticaux, ce qui réduit la courbure nécessaire à leur franchissement. De plus, un éventuel effet serait symétrique : les neurones sur zone plane auraient plus d'axones côté plan et les neurones en zone rugueuse plus d'axones côté rugueux. Or, nous remarquons que les accroissements de pourcentage d'axones côté rugueux par rapport au cas théorique sont similaires : +25% ($85\% - 60\%$) pour les somas côté rugueux et +26% ($66\% - 40\%$) pour les somas côté plan. On peut donc rejeter l'hypothèse selon

laquelle les marches influenceraient fortement le comportement des neurones aux frontières.

Si la marche elle-même n'affecte pas le franchissement des neurites, le passage d'un type de surface à un autre peut-il influencer notre résultat ? Nous avons constaté qu'une faible population de neurones (8% du total à *3DIV*, soit 7 cellules) atteignent mais ne franchissent pas la frontière. Il s'agit exclusivement de neurones dont le soma est côté plan. Autrement dit, tous les neurones côté rugueux qui atteignent la frontière parviennent à la franchir, tandis que certains neurones côté plan n'y parviennent pas et évitent la frontière. Bien que cette population soit faible, l'asymétrie est significative avec un risque d'erreur inférieur à 5%. L'observation de cônes de croissance à la frontière (voir figure V.6) indique que les neurites explorent bien la surface rugueuse, mais s'en écartent. Une simple explication serait que le cône de croissance intègre la surface d'adhésion disponible de part et d'autre de la frontière et que la surface plus importante sur zone plane serait un signal déterminant pour la direction de croissance. Si nous choisissons d'ignorer cette population de neurones qui évitent la zone rugueuse, cela ne fait que renforcer le résultat de préférence axonale envers la rugosité car ces neurones ont bien évidemment leur axone côté plan.

En conclusion, la croissance sur zone rugueuse accélère la croissance neuritique, augmente la vitesse de polarisation, et peut même favoriser l'établissement d'axones dans une zone donnée. Quels sont mécanismes physiques mis en jeu ? En effet, si la Laminine augmente la croissance des axones [8], cela passe par un signal biochimique qui entraîne une réaction spécifique. Dans le cas de la rugosité, comment les caractéristiques physiques de l'environnement peuvent-elles induire une augmentation de croissance de tous les neurites ?

V.2.3 Etude géométrique de l'interaction neurite-substrat

Les modifications dans la vitesse de croissance, la morphologie et la dynamique de polarisation des neurones sont nécessairement liées à la topologie de la surface rugueuse. La première caractéristique d'une telle surface, comparée à une surface plane, est la surface développée. En effet, plus une surface est rugueuse, et plus la surface de contact avec le milieu environnant est importante, pour la même surface projetée (qui correspond à la surface d'un substrat plan). On peut penser que les cellules entrent en contact avec une surface plus importante, ce qui facilite leur adhésion au substrat et pourrait entraîner une croissance plus rapide, par exemple. Il est donc important de pouvoir observer l'interaction de la cellule avec le substrat. La taille caractéristique de la rugosité présentée ici, en deçà du micron, rend nécessaire l'observation des neurones par microscope électronique à balayage (MEB ou SEM). Comme l'avait suggéré l'observation du signal d'actine, la figure V.7 montre que les cellules adhèrent sur la partie supérieure de pics qui composent cette rugosité, les neurites formant des "ponts suspendus" cylindriques entre les points

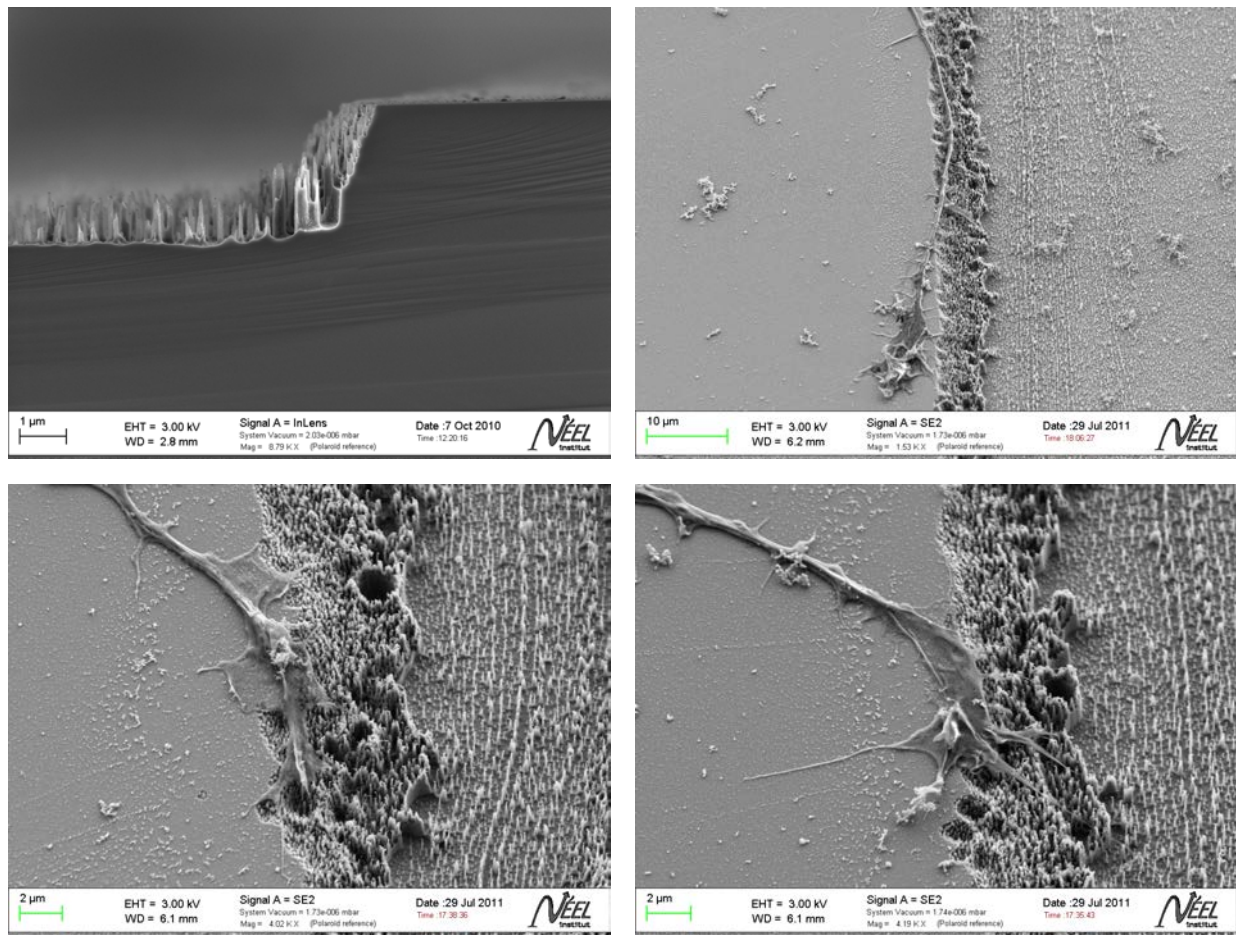


FIGURE V.6 – **Franchissement de la marche à la frontière.** Bien que la marche soit relativement faible devant la taille d'une cellule ($2\mu\text{m}$), ces images au microscope électronique à balayage montrent que les cônes de croissance semblent éviter la zone rugueuse. Paradoxalement, le nombre d'axones sur zone rugueuse est plus important que le nombre théorique, ce qui signifie que les neurites qui franchissent la frontière se différencient presque tous en axone.

d'adhésion. Notons que l'épaisseur de Poly-L-Lysine (PLL), de même que celle de la Laminine, sont très faibles devant la hauteur des pics, et les observations au MEB confirment que l'aspect de surface n'est pas modifié par ces couches de matrice extra-cellulaire. Par conséquent, les observations invalident l'hypothèse selon laquelle une surface d'adhésion plus importante expliquerait les effets observés. Au contraire, la surface d'adhésion est réduite et discontinue. En conséquence, comment pouvons-nous caractériser la surface sur laquelle les neurones évoluent ?

Les mesures habituelles de rugosité sont des représentations complémentaires de la distribution verticale des points de la surface : il s'agit de la moyenne des écarts à la hauteur moyenne d'une surface Ra , et de l'écart-type de ces écarts à la hauteur moyenne Rq .

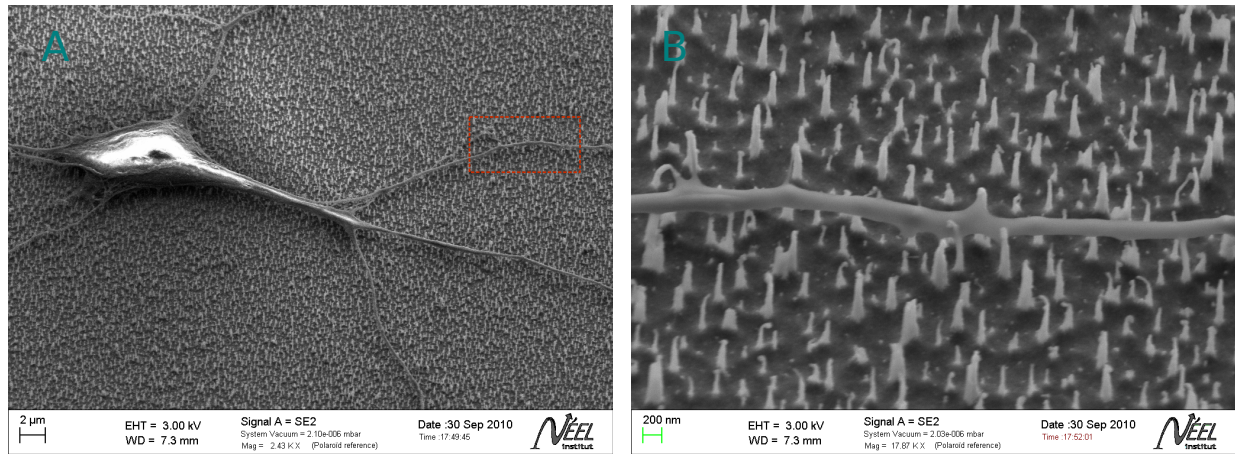


FIGURE V.7 – **A/** Neurone sur substrat rugueux, observé au microscope électronique à balayage (MEB) après 3 jours de culture puis fixation et déshydratation. L’adhésion se fait clairement sur le sommet des pics formant la rugosité. **B/** Zoom sur l’encadré de l’image A. Les points d’adhésion le long du neurite sont régulièrement espacés, la distance moyenne étant $\approx 500\text{ nm}$.

$Ra = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N z_i - \bar{z} $	N : nombre de points; z_i : hauteurs des points; \bar{z} : hauteur moyenne
$Rq = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (z_i - \bar{z})^2}$	

Ces définitions ne tiennent pas compte de la répartition horizontale des irrégularités de surface. Ainsi, deux surfaces sinusoïdales (forme de “tôle ondulée”) de même amplitude présentent les mêmes valeurs R_a et R_q , quelles que soient leurs longueurs d’ondes. Dans notre cas, la rugosité prend la forme de pics verticaux. Ainsi, les mesures classiques de rugosité ont très peu d’intérêt : si l’on compare deux surfaces A et B aux pics de même hauteur, elles auront les mêmes valeurs R_a et R_q même si la surface B présente des pics plus fins et plus rapprochés que la surface A. De plus, au delà d’une hauteur minimale, la hauteur des pics en elle-même ne peut pas influencer la croissance des neurones, car l’adhésion se fait aux sommets de ces pics.

Nous avons donc choisi des paramètres plus adaptés à la topologie observée. Tout d’abord, la distance de chaque pic à son premier voisin est une mesure adaptée à ce type de surface, car les pics sont répartis de façon homogène sans pour autant être ordonnés. Cette distance est liée à la densité des pics sur la surface. On peut généraliser la mesure à la distance au $n^{\text{ème}}$ voisin, ce qui donne plus d’informations sur l’aspect ordonné de la distribution surfacique des pics. La deuxième mesure est la distance entre les pics sur lesquels adhère le neurite, ce qui rend compte de la distance entre les points d’adhésion. A cette échelle les neurites se courbent peu, tout comme sur substrat plan, ce qui implique que la distance entre points d’adhésion sera nécessairement supérieure à la distance au premier voisin. En conséquence, nous avons effectué une troisième mesure : celle de la distance d’un pic au prochain voisin dans une direction donnée, c’est-à-dire en suivant une ligne

droite choisie arbitrairement. Cette dernière mesure est nécessairement supérieure aux premières, car elle simule la présence d'un neurite rectiligne d'épaisseur nulle. Enfin, nous avons mesuré la surface moyenne des pics, vus du dessus, par seuillage automatique des niveaux de gris de l'image. Il n'est pas aberrant de considérer cette surface comme un disque. Par commodité, nous représentons donc cette surface moyenne par un "rayon équivalent", i.e. le rayon d'un disque de même surface.

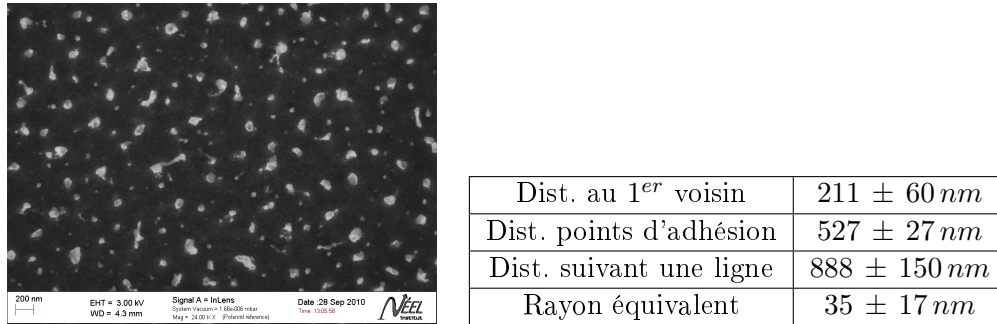


FIGURE V.8 – Vue de dessus et caractérisation de la surface rugueuse par différentes longueurs physiques ou biologiques

Dans la figure V.8, qui résume les résultats de ces mesures, nous constatons que la distance entre points d'adhésion du neurite est effectivement encadrée par les deux autres mesures de distance qui caractérisent le substrat. Nous avons vu que cela implique l'aspect rectiligne du neurite : plus il est droit, et plus la distance entre points d'adhésion s'approchera de la mesure suivant une ligne. Mais comment relier ces mesures entre elles ? Il nous faut définir un *angle de tolérance à la courbure* qui caractériserait les neurites, définissant une zone dans laquelle le neurite accepte de se courber pour atteindre le pic le plus proche dans cette direction. La formule ci-dessous est un calcul basé sur les distances au $n^{\text{ème}}$ voisin autour d'un pic : quelle sera la distance au voisin le plus proche si l'on restreint la zone de tolérance à un angle α donné ?

Cette formule permet alors d'ajuster α de sorte que D_α prenne la valeur de la distance expérimentale entre points d'adhésion. L'angle α , dont la figure V.9 présente la distribution des valeurs, vaut en moyenne 50° . Cela ne signifie pas que le cône de croissance explore l'environnement dans cet angle, car nous n'étudions pas l'exploration de la surface par le cône de croissance. La conclusion est plutôt qu'à l'échelle des adhésions, le neurite une fois formé tolère un angle de 25° de part et d'autre de la trajectoire moyenne pour se courber (soit un angle total de 50°). Si le trajet emprunté par le cône de croissance entraîne une courbure plus importante, le neurite pourrait se tendre jusqu'à décrocher des pics trop éloignés de la trajectoire moyenne. La valeur de 50°

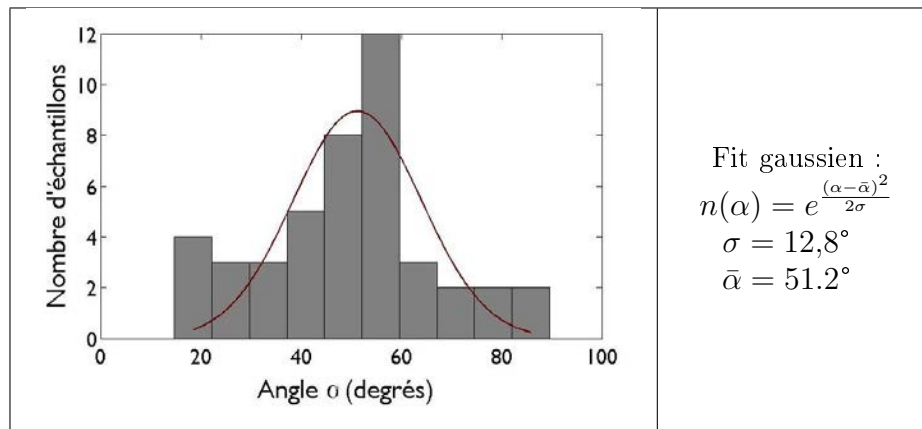
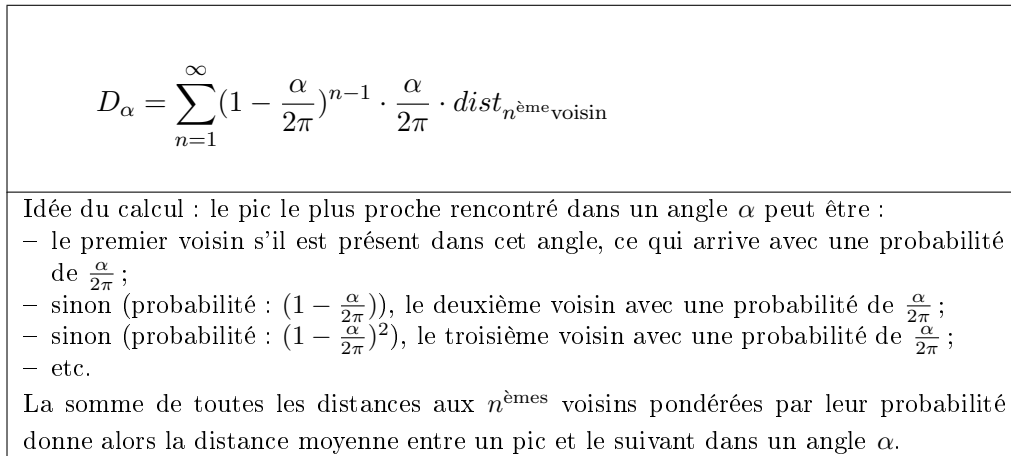


FIGURE V.9 – Histogramme des valeurs de α et ajustement gaussien (par le package *easyfit* de Matlab) pour un total de 44 images analysées, $n \approx 20$ pics par image.

est identique à celle donnée par Katz [10] sur la base de mesures de changements d’orientation d’axones d’embryons de poulet et de Xénope en cours de croissance, sur une échelle de 10min.

Nous avons vu que la distance moyenne entre points d’adhésion est de 527nm. Mais comment obtenir un ordre de grandeur de la surface d’adhésion sur rugosité ? Sur la majorité des pics, la membrane cellulaire semble englober totalement le sommet. Pour évaluer la surface d’interaction, les pics peuvent être modélisés comme des cylindres, ce qui est réaliste si l’on observe uniquement la faible hauteur relative sur laquelle adhèrent les cellules. A partir des images telles qu’en figure V.7.B, nous avons mesuré la surface d’adhésion pour les pics situés du côté visible des neurites. La surface est bien-sûr identique de l’autre côté par symétrie. Une adhésion moyenne englobe un pic d’environ 24nm de rayon sur une hauteur d’environ 100nm, ce qui donne une surface de contact de $1,7 \cdot 10^4 \text{ nm}^2$. Cette surface se répète périodiquement, donc si l’on veut “étaier” cette

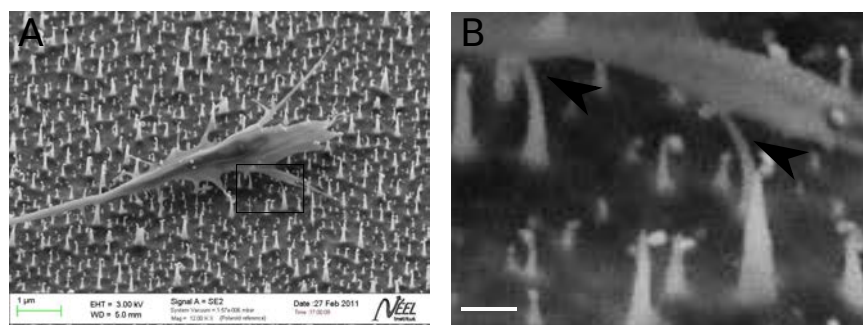


FIGURE V.10 – Les forces générées par le cône de croissance peuvent déformer les pics. A/ Exemple de cône de croissance sur rugosité. B/ Détail du cadre en (A). | Barres : (A) $1\mu m$; (B) $200nm$

surface en une bande pour la ramener à une surface d'adhésion équivalente sur zone plane, nous pouvons diviser la surface obtenue par $527nm$, ce qui donne une largeur de bande de $33nm$. Ainsi, la surface d'adhésion équivaldrait à une bande continue de $33nm$ de largeur. Or, sur zone plane la largeur d'un neurite similaire à ceux qui ont été sélectionnés pour la mesure de distance entre points d'adhésion (voir méthode p. 64) est de l'ordre de $300nm$. En conséquence, la surface d'adhésion que nous avons évaluée sur zone rugueuse serait dix fois inférieure à la surface équivalente sur zone plane.

Déformation du substrat

Sur le cône de croissance visible dans la figure V.10, certains des pics sur lesquels adhèrent les filopodes semblent fléchis sous l'action d'une force parallèle à la surface et dirigée vers l'axe du cône de croissance. Comme indiqué dans un article de Chan et Odde, les filopodes peuvent effectivement induire une force de traction de l'ordre de $100pN$ sur le substrat [11]. Or, plusieurs travaux indiquent que le caractère déformable du substrat peut influencer le comportement cellulaire. Par exemple, la culture de cellules souches sur des substrats de différentes rigidités induit une différenciation de ces cellules en différents types cellulaires, dont des neurones sur les substrats les moins rigides (module de Young⁽³⁾ $< 1kPa$) [12]. La vitesse de croissance des neurites elle-même peut dépendre de la rigidité du milieu ($\approx 10Pa$) [13].

La rigidité du silicium (module de Young $\approx 170GPa$) est nettement au delà de la gamme de sensibilité à la rigidité des neurones (de quelques Pa au kPa), mais la formation de pics lors de la gravure peut réduire considérablement la rigidité effective. D'une part, la forme des pics implique qu'ils sont beaucoup plus sensibles à la déformation due aux forces horizontales qu'un substrat plan. D'autre part, le faible rayon moyen des pics indique qu'ils sont composés majoritairement d'oxyde

3. aussi appelé "module d'élasticité"

de silicium (SiO_2 , module d'Young $\approx 50GPa$). En effet, cet oxyde recouvre tout échantillon de silicium d'une couche d'environ 5nm lorsqu'il est exposé au dioxygène présent dans l'air ou dans le milieu de culture cellulaire, mais cette épaisseur est accrue lors de l'emploi d'un plasma employant le dioxygène comme c'est le cas dans notre attaque. Dans ce cas, comment peut-on évaluer la rigidité apparente de la rugosité ? L'idée consiste à comparer la déformation de nos piliers avec la déformation d'un milieu continu semi-infini : quelle serait la rigidité d'un gel plan qui se déformerait avec la même amplitude horizontale que nos piliers, sous l'action de la même force ?

Pour modéliser nos piliers, la déflexion d'une poutre cylindrique d'axe O_x et de longueur L encastrée à sa base de rayon R se calcule à partir de l'équation reliant la courbure au moment fléchissant : $y'' = \frac{M}{EI}$. Deux valeurs propres à la poutre interviennent dans cette formule, le module de Young du matériau $E = E_{pilier}$ et le moment quadratique de la section de la poutre par rapport à l'axe de flexion $I = I_z = \frac{\pi r^4}{4}$. Par double intégration, nous obtenons la déflexion D au sommet de nos piliers côniques sous l'effet de la force F :

$$D = \frac{12}{\pi} \frac{F L^3}{R^4 E_{pilier}} \quad (V.1)$$

Par ailleurs, la déformation horizontale d'un gel sous l'effet de la même force s'appliquant sur une surface de rayon r peut se modéliser par :

$$D = \frac{9}{4\pi r} \frac{F}{E_{effective}} \quad (V.2)$$

[14] (Coef. de Poisson = 1/2). Nous pouvons ainsi combiner ces deux équations pour exprimer la rigidité apparente en fonction de la rigidité réelle et des dimensions des piliers. La combinaison des équations V.1 et V.2 donne alors :

$$E_{effective} = E_{pilier} \cdot \frac{3}{16} \frac{R^4}{r L^3} \quad (V.3)$$

Ces formules peuvent alors être exploitées selon les deux raisonnements suivants :

- Tout d'abord, la rigidité apparente peut être déduite des caractéristiques du pilier conique (module de Young $E_{reel} = E_{SiO_2} = 50GPa$, hauteur $L = 700nm$, rayon de la base $R = 35nm$ et du sommet $r = 12nm$) sans faire d'hypothèse sur l'intensité de la force le déformant. Le module de Young équivalent évalué directement par l'équation V.3 vaut $3.4MPa$.
- Dans le second raisonnement, le module de Young du matériau composant les piliers peut être remis en cause. Dans ce cas, nous pouvons utiliser l'équation V.1 pour calculer le module de Young du pilier en nous basant sur la déflexion observée des pics ($D = 150nm$) et sur une évaluation de la force exercée par le filopode de l'ordre de $100pN$: $E_{pilier} = \frac{12}{\pi} \frac{F L^3}{R^4 D}$.

On obtient ainsi $E_{\text{pilier}} = 0,6\text{GPa}$. En conséquence, le résultat issu de l'équation V.3 en modifiant uniquement la valeur de E_{pilier} est réduit à $E_{\text{apparent}} = 40\text{kPa}$.

Ainsi, la topologie de surface sous forme de pics réduit considérablement la rigidité apparente du substrat, mais celle-ci reste supérieure aux valeurs connues pour induire des effets sur le développement neuronal, même si l'on remet en cause la rigidité des piliers. La rigidité effective traduit les forces qui sont impliquées dans l'adhésion et le développement neuronal, mais elle ne peut pas fournir un signal mécanique expliquant les effets de la rugosité.

V.3 Discussion

Les résultats obtenus sur nos substrats rugueux et plans démontrent que la rugosité modifie la genèse des neurites, puis la dynamique de croissance et de polarisation des neurones. Ces observations révèlent-elles des mécanismes de développement des neurones ? Peuvent-elles amener à des modèles reliant l'adhésion, la mécanique cellulaire, la croissance et l'acquisition de fonctions spécifiques ?

V.3.1 Adhésion

Des modifications dans la croissance et le nombre de neurites de neurones cultivées sur verre ont déjà été étudiées dans d'autres travaux. Il s'agissait essentiellement de modifier la matrice extracellulaire pour étudier l'effet de molécules d'adhésion spécifiques comme la Laminine (LN) par exemple [15]. Le travail de Lochter [16] recense l'effet de diverses protéines d'adhésion, spécifiques ou non, et montre qu'il n'y a pas de rapport clair entre la force d'adhésion, mesurée comme la résistance des cellules à un flux de milieu, et les variations de croissance. Par exemple, la LN et la Concanavalin A (ConA) accélèrent toutes deux le développement des neurones, mais la force d'adhésion est faible sur LN et forte sur ConA, en comparaison à la Poly-L-Lysine (PLL). Ces études analysent donc les effets de signaux biochimiques sur l'adhésion et la croissance de neurones. La nouveauté de notre étude réside dans le fait d'analyser uniquement l'effet de l'environnement physique sur la croissance, la rugosité étant le seul élément qui apporte une perturbation et puisse engendrer une réaction. Par conséquent, nous avons choisi la PLL comme substrat d'adhésion principal pour sa non-spécificité.

Nous avons remarqué que la densité de cellules adhérant à la zone rugueuse tendait à être plus importante qu'en zone plane, bien que la différence ne soit pas significative sur tous les échantillons. Notons que cela n'a pas pu influencer les mesures effectuées, car nous n'avons pris en compte que les mesures sur les images où la densité était similaire. Pour expliquer cette observation, une hypothèse intéressante serait une plus forte adhésion sur zone rugueuse que sur zone plane. Deux heures après ensemencement des cellules, nous effectuons un changement de milieu (voir le protocole p. 57) qui a l'avantage de laver l'échantillon des débris cellulaires issus de la dissociation. Ce lavage peut suffire à décoller les cellules peu adhérentes, ce qui expliquerait la différence de densité cellulaire observée si les cellules adhèrent différemment. Cela expliquerait aussi l'aspect non systématique de cette observation, car la force du lavage peut varier selon chaque échantillon. Cette hypothèse soulève une apparente contradiction, car la rugosité favoriserait l'adhésion alors même que la surface de contact est plus faible car les cellules adhèrent sur le sommet des pics. L'idée est que

l'espacement des points d'adhésion et leur faible surface entraînerait un recrutement important des protéines membranaires responsables de l'adhésion. Comme nous l'avons vu, le marquage d'actine présente un signal "en pointillés" le long de nombreux neurites, et nous avons interprété ce signal comme une densification du cytosquelette d'actine autour des adhésions, c'est-à-dire du sommet des pics. Dans d'autres types cellulaires, y compris dans une lignée modèle de neurones (PC12), il a été rapporté qu'une telle densification dans des structures d'adhésion nommées "adhésions focales" peut entraîner un renforcement de l'adhésion, chaque élément participant plus à la force d'adhésion que lorsqu'il est isolé [17]. Bien que les neurones hippocampiques ne présentent pas d'adhésions focales, il est possible que la discrétisation des adhésions sur zone rugueuse entraîne une concentration locale des structures protéiques impliquées, résultant en une plus forte adhésion globale.

V.3.2 Croissance globale et croissance des neurites

Pour analyser le développement des neurones de quelques heures à quelques jours de croissance, deux composantes peuvent être prises en compte :

- la longueur totale des neurites par cellule,
- la longueur moyenne des neurites.

Naturellement, ces deux mesures sont reliées par le nombre de neurites émis par la cellule, mais elles sous-tendent des approches différentes.

D'une part, la cellule peut être considérée comme une entité globale en interaction avec le milieu extérieur. De ce point de vue, l'ensemble des activités concourant à la croissance neuronale, qui comprend surtout la synthèse des protéines et des lipides, leur acheminement aux zones de croissance, et l'énergie disponible pour chacune des tâches de la cellule, est modulé par une régulation interne à la cellule. Il ne s'agit pas d'une saturation des échanges avec le milieu extra-cellulaire, précisément parce que différents signaux peuvent affecter le développement total des cellules. Par exemple, la présence de glycosaminoglycanes dans le milieu de culture a pour effet d'augmenter la croissance de tous les neurites [18]. C'est dans ce cadre que l'on peut comparer les longueurs totales des cellules (somme de tous les neurites) dans différentes conditions.

D'autre part, le neurite peut être considéré comme indépendant du reste du corps cellulaire en cela que les interactions avec le substrat sont locales. Lorsqu'une voie de signalisation est activée au niveau d'un cône de croissance par la présence d'une molécule d'adhésion particulière par exemple, seul ce neurite présentera un changement dans sa dynamique de croissance [8]. Bien que la cellule centralise l'information de ce signal⁽⁴⁾, la réponse est donc limitée à ce neurite. De ce point de

4. ce qui mène d'ailleurs à une inhibition de la croissance des autres neurites au moment de la polarisation

vue, on peut mesurer et comparer la taille moyenne des neurites entre nos différentes conditions.

C'est pourquoi nous rendons compte à la fois de la longueur totale des cellules et de la longueur des neurites. Il est intéressant de remarquer que les deux mesures présentent une augmentation sur rugosité, bien que l'accroissement soit plus important pour la taille moyenne des neurites. Nous pouvons en conclure que la présence de rugosité induit une plus grande croissance des neurites au niveau individuel, et que bien que le nombre de neurites soit réduit, la régulation interne de la cellule permet un approvisionnement efficace des neurites en matière et énergie qui résulte en une croissance globale de la cellule plus importante.

De plus, nous avons montré que l'action de la rugosité n'est pas spécifique : l'augmentation de croissance des neurites ne se restreint pas à un seul pôle du neurone (axone ou dendrites) comme c'est le cas sur Laminine (LN) par exemple. L'explication la plus simple est que le signal topologique, qui passe par la sensibilité mécanique de la cellule et donc par les adhésions et le cytosquelette, repose sur des éléments présents dans tous les neurites tandis qu'un signal spécifique nécessite les récepteurs associés qui peuvent être isolés dans un domaine particulier de la cellule. Néanmoins, l'effet de la rugosité ne se limite pas à un accroissement des vitesses de croissance individuelles des neurites, car nous avons vu que les deux pôles de la cellule, axone et dendrites, semblent avoir un accroissement de longueur similaire. La raison pour laquelle ce phénomène est remarquable est que les dendrites sont moins nombreux en moyenne sur rugosité. Le neurone semble donc effectuer une régulation de la vitesse de croissance respective des deux pôles de sorte que leur croissance reste proportionnelle.

La constance se retrouve aussi dans la dynamique de croissance des neurones. En effet, les cellules ne sont pas sensibles à la rugosité uniquement pendant une courte période de leur développement : le rapport de développement entre substrats rugueux et plan est identique entre 2 DIV et 3 DIV , de l'ordre de 150% (longueur moyenne des neurites). La vitesse moyenne de croissance entre 0 & 2 DIV est donc égale à la vitesse moyenne entre 2 & 3 DIV . On peut raisonnablement en conclure que la vitesse de croissance est constante, augmentée de façon permanente sur rugosité, et qu'il ne s'agit pas d'un délai réduit avant initiation des neurites par exemple.

V.3.3 Interférence de signaux stimulant la croissance

Dans l'expérience menée sur Laminine (LN), on constate que deux effets qui stimulent la croissance des neurones ne s'ajoutent pas nécessairement, car un signal spécifique (LN) peut interférer avec l'effet de environnement physique (rugosité). Une première explication possible est que les signaux perçus par la cellule pour la rugosité et la LN passent par deux modes d'action qui s'opposent partiellement. L'étude de Banker [6] montre que l'effet de la LN dépend de sa concentration lors

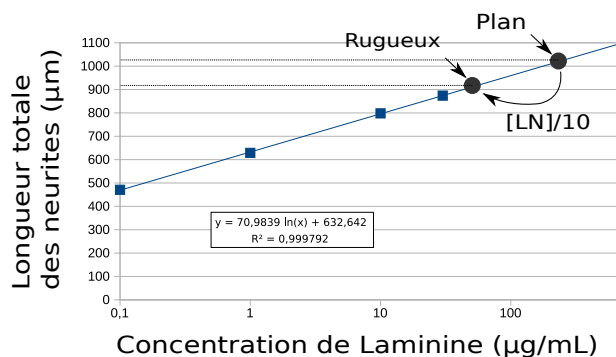


FIGURE V.11 – Courbe de dépendance entre la concentration de Laminine (LN) lors du dépôt et la longueur des neurites à 2DIV, déduite des données de Banker [6]. Cela nous permet de déduire la différence de concentration effective dans notre expérience entre zone plane et zone rugueuse.

du dépôt. Plus précisément, le développement des neurones à 2DIV suit une loi logarithmique en fonction de la concentration de LN (voir figure V.11). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la réaction de la cellule dépend de la proportion de récepteurs spécifiques qui rencontrent la LN, et que ces récepteurs sont distribués aléatoirement sur la surface de la cellule. En comparant ces résultats avec notre expérience, ce qui requiert d'ajuster les mesures selon les développements des neurones dans les contrôles PLL respectifs ⁽⁵⁾, la différence de développement entre zones rugueuse et plane correspondrait à un rapport de concentrations de 10. Les neurones se développent donc en zone rugueuse comme s'ils étaient en présence d'une concentration de LN dix fois inférieure à la concentration en zone plane. Or la concentration est la même, mais nous avons justement évalué que la surface de contact serait dix fois inférieure en zone rugueuse. Ainsi, l'hypothèse selon laquelle la croissance cellulaire dépendrait de la proportion de récepteurs spécifiques qui rencontrent la LN nous permet de faire le lien entre concentration et surface d'adhésion. En résumé, si la rugosité permet d'accroître le développement des neurones par la réduction de la surface qui renforcerait les adhésions, cette même configuration topologique pourrait réduire la concentration apparente de LN et donc en réduire l'effet. Ainsi, les mécanismes de transduction de ces deux signaux qui stimulent la croissance pourraient interférer négativement.

Une autre explication possible pour expliquer la non-superposition des effets de la LN et de la rugosité repose sur la voie de signalisation associée au signal de la LN. On peut en effet émettre l'hypothèse que le mode d'adhésion et la réaction du cytosquelette en zone rugueuse bloqueraient ou satureraient une cascade de signalisation impliquée dans la réponse à la LN. La rugosité monopoliserait ainsi le mode de transduction du signal à l'intérieur de la cellule, alors que dans le

5. La concentration de Laminine utilisée est à $10\mu\text{g}/\text{mL}$, mais nous ne pouvons pas affirmer que le dépôt obtenu soit comparable. Il convient donc de comparer les contrôles sur PLL des deux expériences

cadre de la première hypothèse la perturbation interviendrait au niveau de l'interaction avec le milieu extérieur.

Pour discriminer ces deux hypothèses, l'expérience pourrait être reproduite avec deux concentrations de Laminine différentes, car la première hypothèse prévoit que la croissance sur rugosité sera dépendante de la concentration, tandis que la seconde prévoit une saturation de croissance indépendante de la concentration.

V.3.4 Nombre de neurites

Comme nous l'avons vu, le facteur qui différencie les mesures de longueur totale d'une cellule et de longueur moyenne des neurites est le nombre moyen de neurites. Un nombre de neurites réduit n'est pas nécessairement le témoin d'un neurone souffrant d'un stress, qu'il soit physique ou biochimique. Au contraire, nous constatons que les cellules parviennent à acquérir une longueur totale plus importante sur rugosité malgré le nombre de neurites réduit. Comment expliquer la différence observée ? Nos observations à 10h de culture permettent d'étudier un mécanisme important dans le développement neuronal : la genèse des neurites.

Décrite par Dotti [19] et complétée par Dehmelt et Halpain [20] (voir figure V.12), la genèse des neurites débute par la formation d'un lamellipode unique sur le pourtour de la cellule, structure très étalée et peu épaisse composée d'un maillage de fibres d'actine. Ce lamellipode se segmente ensuite en plusieurs lamellipodes, qui peuvent à leur tour se segmenter ou bien devenir les sites d'initiation des futurs neurites. La transition d'un lamellipode segmenté à un cône de croissance est difficile à définir car ces deux structures partagent la même forme et la même dynamique. C'est en fait l'organisation et le resserrement des microtubules à l'arrière du lamellipode qui définit l'initiation du neurite, et donc ce passage du lamellipode au cône de croissance. D'après cette phénoménologie, comment expliquer les différences observées entre zones rugueuse et plane ?

Nos résultats montrent que les lamellipodes sur rugosité sont aussi nombreux et aussi étendus en surface que sur zone plane, mais plus resserrés à la base. Étant moins larges, ces lamellipodes se segmenteraient en un nombre plus faible de neurites, car il est probable que le nombre de neurites obtenu soit fortement dépendant de la largeur du lamellipode. Pour corroborer cette hypothèse, le taux de neurites que chacun de ces lamellipodes va donner, β , peut être calculé à partir de nos résultats sur le nombre de neurites et de lamellipodes : $n_{neurites\ final} = n_{neurites\ 10h} + \beta * n_{lamellipodes\ 10h}$. Par ce simple raisonnement, chaque lamellipode sur zone rugueuse donnerait $\beta_{rugueux} = 1,8$ neurites, alors que sur zone plane chaque lamellipode donnerait $\beta_{plan} = 3,2$ neurites. Si l'on fait le rapport de ces taux de génération de neurites, nous obtenons $\frac{\beta_{plan}}{\beta_{rugueux}} = 1,8$. Or, le rapport des largeurs moyennes des lamellipodes, mesurées comme l'angle au centre du soma, est

très proche de cette valeur : $\frac{188^\circ}{94,3^\circ} = 2,0$. Le nombre de neurites émis par un lamellipode semble donc être proportionnel à sa largeur, et non à sa surface qui est la même sur zones plane et rugueuse.

Ainsi, le nombre de neurites réduit sur rugosité serait relié au fait que les lamellipodes sont aussi nombreux mais moins larges après 10h de culture. Mais comment expliquer cette deuxième observation ? L'étape fondamentale semble être les effondrements de la structure branchée d'actine menant à la segmentation dans les lamellipodes. Notre hypothèse est que cette segmentation des lamellipodes arrive plus précocement sur zone rugueuse, lorsque ces lamellipodes ne sont pas encore aussi étendu que sur zone plane. La force des adhésions pourrait d'ailleurs intervenir dans ce phénomène, en déclenchant plus vite les modifications de structure d'actine menant à la segmentation. Alors les lamellipodes divisés continueraient à s'étendre sur la surface, mais plus en longueur et à partir d'une base plus resserrée. Sur la figure V.12 issue de la description de Dehmelt et Halpain [20], le mode d'adhésion sur rugosité pourrait donc faire passer très rapidement les neurones du début de l'étape 1.1 à l'étape 1.3, réduisant par ce mécanisme le nombre de neurites par cellule.

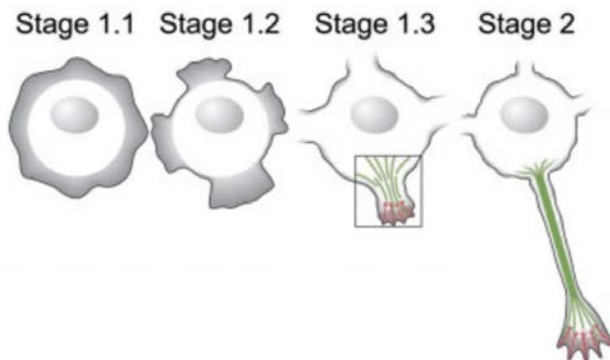


FIGURE V.12 – Description de la genèse des neurites par Dehmelt et Halpain [20]

V.3.5 Mécanismes de polarisation

Polarisation par dépassement d'un seuil

La croissance accélérée et le nombre réduit de neurites sont des conséquences morphologiques de l'interaction des neurites avec leur substrat. Or, l'acquisition du caractère fonctionnel déterminant qu'est la polarisation axonale est elle aussi accélérée sur rugosité. Comment pouvons-nous relier ces observations ?

L'équipe de Banker [21], a remarqué par vidéo-microscopie que les neurites atteignent une longueur moyenne de $35\mu m$ lorsqu'ils se polarisent en axone. Dans une étude plus récente [22], l'équipe de

Bradke montre que le fait de couper l'axone avec une micro-pipette entraîne la reprise de la croissance de cet axone, sauf si l'on coupe l'axone à une distance au soma inférieure à $35\mu m$. Dans ce cas, un autre neurite peut se différencier en axone, même s'il avait d'abord acquis les caractéristiques fonctionnelles des dendrites.

Il y a donc un lien fort entre polarisation et longueur des neurites, que nos résultats confirment : pour atteindre 75% de neurones polarisés, il faut deux jours sur rugosité et trois jours pour le contrôle plan. Tout comme le rapport des vitesses de croissance, le rapport des temps nécessaires à la polarisation est donc de l'ordre de 150%. Notons que l'effet est similaire sur LN par rapport à PLL : croissance et polarisation sont plus rapides sur LN. Nous proposons donc également un mécanisme de polarisation par dépassement d'un seuil de longueur : le premier neurite atteignant cette limite de $35\mu m$ déclencherait une rétroaction positive entraînant sa croissance accélérée, tandis que la croissance des autres neurites s'interromprait par inhibition. Par la suite, les caractéristiques fonctionnelles de l'axone se mettraient en place progressivement. Sur rugosité, la croissance accélérée permettrait aux neurites d'atteindre la longueur critique de $35\mu m$ plus rapidement, ce qui expliquerait que les taux de polarisation suivent le même accroissement.

Le modèle inclut une supposition implicite : la limite de $35\mu m$ est supposée robuste, indépendante des conditions. Il est possible d'imaginer qu'un signal spécifique entraîne une réduction de la limite, mais cela ne remet pas en cause le principe fondamental du modèle : celui de la polarisation par dépassement d'un seuil de longueur.

Une hypothèse alternative consiste à inverser l'ordre de déclenchement des mécanismes : la détermination de l'axone se déciderait d'abord, aléatoirement ou par intégration de signaux bio-chimiques, puis la croissance accélérée en serait une conséquence. Le seuil apparent des $35\mu m$ ne serait qu'une longueur moyenne atteinte après le temps nécessaire pour la détermination de l'axone. Pour distinguer ces deux hypothèses, il convient d'étudier plus en détail les mécanismes de polarisation, notamment la compétition neuritique.

Compétition neuritique

Nous avons vu que la différenciation d'un neurite en axone donnait lieu à une inhibition de la croissance des autres neurites. Néanmoins, il arrive que des neurones présentent deux axones. Dans le modèle de polarisation par seuil de longueur, ces neurones "doubles-axones" seraient les rares cas où deux neurites dépassent le seuil simultanément. Dans ce cadre, le mécanisme de croissance alternée des neurites est alors une méthode parfaite pour que ces doubles-axones restent des exceptions. Cela est probablement ce qui permet de limiter leur nombre à environ 1% des neurones *in vitro*. Sur rugosité, ce taux de doubles axones n'est pas significativement plus fort (3% pour

$n \approx 200$ cellules), alors que cela peut par exemple arriver lors d'utilisation de drogues perturbant le cytosquelette [23]. Les mécanismes de compétition neuritique et d'inhibition après polarisation ne sont donc pas significativement affectés sur rugosité.

V.3.6 Frontières et polarisation

Compétition neuritique aux frontières

La compétition neuritique est bien-sûr mise en relief lorsque le neurone est situé à une interface, car se pose alors la question de la zone dans laquelle va s'établir l'axone. L'étude de Banker en 1999 [8] montre qu'il existe deux réactions possibles face à une frontière entre deux types de molécules d'adhésion (voir figure V.13). Tout d'abord, il peut y avoir une préférence pour une zone. Entre PLL et LN, il y a une préférence pour la LN, que le soma soit du côté PLL ou du côté LN. Il en est de même pour le couple PLL et NgCAM (molécule d'adhésion neurone-glie, dont les effets sur la croissance neuronale sont similaires à la LN). Mais lorsque l'expérience est reproduite avec ces deux molécules favorables à la détermination de l'axone, LN et NgCAM, cette fois l'axone se différencie préférentiellement dans la zone opposée au soma. Dans ce cas donc, le signal favorisant la différenciation de l'axone n'est pas la protéine reconnue, mais le franchissement d'une frontière. Il convient de noter que dans ces résultats seuls les axones présentent une préférence, car les autres neurites respectent parfaitement les pourcentages théoriques d'occupation des deux zones que nous avons calculés (60% côté soma et 40% côté opposé).

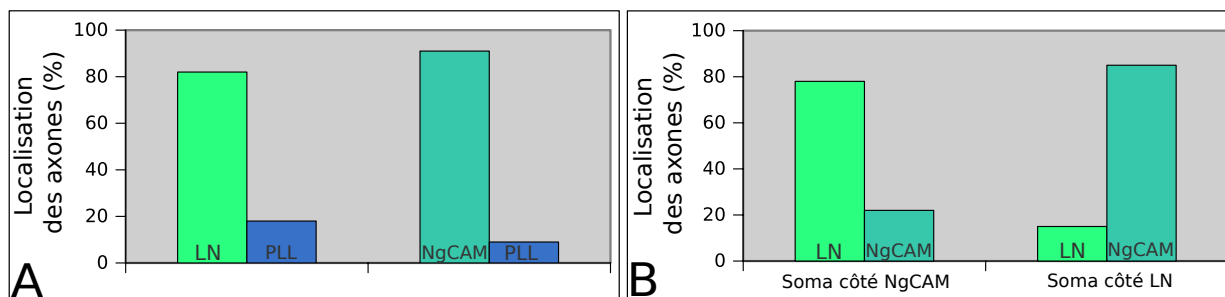


FIGURE V.13 – Deux effets de préférence axonale peuvent être observés à une frontière entre deux zones. **A/** Entre une zone d'adhésion non spécifique (PLL) et une zone d'adhésion spécifique promouvant la croissance de l'axone (LN ou NgCAM), la préférence axonale est observée du côté à adhésion spécifique. **B/** Si les deux zones promeuvent la croissance de l'axone, la préférence axonale est pour la zone opposée à celle où est situé le soma. Données issues de l'étude de Banker [8].

Dans l'expérience des frontières entre zones rugueuse et plane, nous avons vu que les axones se différencient préférentiellement du côté rugueux quelle que soit la position du soma, ce qui nous place dans le premier cas ci-dessus. La rugosité apporte donc un réel biais dans la compétition neu-

ritique, tout comme la LN ou la NgCAM en contraste à la PLL. Pourtant, la molécule d'adhésion sur rugosité est bien la PLL. Cela invalide donc l'hypothèse d'une détermination de l'axone par intégration des signaux bio-chimiques, et renforce l'hypothèse de la polarisation par dépassement d'un seuil de longueur. Les neurites en contact avec la zone rugueuse auraient simplement plus de chances de dépasser le seuil des $35\mu m$ car leur croissance est plus rapide.

Frontières et dynamique de polarisation

Dans l'expérience des frontières, nous avons vu qu'il existe une nette préférence axonale pour la zone rugueuse à $3DIV$. Que les somas soient du côté plan ou rugueux, les neurites qui explorent le côté rugueux avant polarisation ont une plus grande probabilité de devenir axones que dans le cas théorique sans biais. Cependant, la même étude à $2DIV$ donne des écarts plus faibles, non significatifs. Comment expliquer cette différence ? Comme nous l'avons vu, il existerait une prédétermination de l'axone dans une direction déterminée par la position du centrosome [24]. Bien sûr, cette direction initiale est aléatoire dans le référentiel de la frontière. Mais la compétition neuritique, grâce à son principe exploratoire, peut remettre en cause cette prédétermination. Les résultats indiquent que les neurones qui se polarisent entre 2 & $3DIV$ sont plus sensibles à leur environnement qu'entre 0 & $2DIV$. On peut donc supposer que plus les neurones acquièrent leur polarité tard, plus ils seront sensibles à la rugosité car leur période de compétition neuritique est prolongée. Pour aller plus loin, une hypothèse raisonnable est que les neurones qui se polarisent plus tôt sont ceux qui ont la prédétermination axonale la plus forte, entraînant la croissance d'un neurite très long dès le début de la culture. A l'inverse, les neurones ayant une prédétermination moins marquée pourraient acquérir un plus grand nombre de neurites approchant les $35\mu m$ avant polarisation, ce qui augmente à la fois les chances et la durée d'exposition à la rugosité. Ainsi, l'expérience des frontières nous a orienté vers des mécanismes de polarisation indépendants du type de substrat.

Comme déjà évoqué dans l'étude de Banker en 1992 [6], nous avons remarqué un taux de polarisation d'environ 75% semble constituer une limite supérieure qui est atteinte après les premiers jours de croissance. Cela signifie que 25% des neurones ne parviennent pas à se polariser aussi rapidement que les autres ; or ces neurones sont beaucoup moins développés que les neurones polarisés. Ces deux observations peuvent s'interpréter comme une prolongation de la compétition entre neurites dans cette population de neurones car le seuil de $35\mu m$ n'est pas atteint. La présence de LN réduit ce taux à 15% sur plan à $2DIV$, donc un signal spécifique peut accélérer la polarisation, mais sans la rendre totale.

Asymétrie de franchissement

Pour aller plus loin, comment pouvons-nous interpréter l'asymétrie de franchissement de la frontière que nous avons observée, indiquant que seuls les neurones sur zone plane semblent éviter la frontière ? Si la littérature et les dimensions de la marche éliminent la possibilité d'un effet de la marche elle-même, cela signifie que l'asymétrie est due à un contraste de surfaces. Les cônes de croissance, qui déterminent la direction de croissance, seraient plus facilement guidés vers la zone plane que la zone rugueuse dans 10% des cas. Pourtant, les neurites qui parviennent à passer de la zone plane à rugueuse présentent une préférence axonale pour cette dernière. Cette apparente contradiction montre que le problème ne se résume pas à un contraste de force d'adhésion. Il faut au contraire distinguer l'effet de l'interface de l'effet de la rugosité seule.

En ce qui concerne l'interface, le facteur essentiel favorisant le guidage des cônes de croissance pourrait être la quantité d'adhésions : il est clair que la surface de contact avec le substrat est plus importante sur zone plane même si les cônes de croissance sont aussi étendus sur les deux surfaces (voir figure V.6 en p. 164). La sélection d'une surface de croissance par le cône pourrait donc passer par une intégration de la surface de contact, représentée par le nombre de protéines d'adhésion (en majorité des intégrines) qui se lient au substrat.

Lorsqu'au contraire le cône de croissance parvient à franchir la frontière, la discrétisation des points d'adhésion pourrait entraîner un renforcement de ces adhésions : plutôt que la quantité d'adhésions, ce serait cette fois la qualité des adhésions qui influencerait la dynamique de croissance. Les mécanismes impliqués seront discutés dans le paragraphe suivant.

V.3.7 Interaction neurite-substrat

Les filopodes du cône de croissance aussi bien que les neurites peuvent courber les pics constituant la rugosité. Cette force traduit une adhésion robuste, sur une surface d'interaction réduite. Dans le modèle de la densification des protéines d'adhésion que nous avons introduit en p. V.3.1, un plus faible nombre de ces protéines pourrait résulter en une adhésion plus forte si elles sont concentrées en un point. A présent, comment faire le lien entre l'adhésion, les forces et la croissance ?

Le modèle d'"embrayage moléculaire" (molecular clutch) défendu par Mitchinson et Kirschner [25] et repris par Forscher [26] (voir p. 29), postule qu'il peut y avoir un effet de glissement passif ("débrayage") lorsque des adhésions ne sont pas coordonnées, tandis qu'un ensemble d'adhésions coordonnées ("embrayées") pourrait mieux résister aux forces induites par le cytosquelette. Dans le cas de neurones, cet "embrayage" pourrait notamment réduire le flux rétrograde d'actine dans le cône de croissance. Ce flux régule le taux de polymérisation des microtubules dans le cône en

y exerçant une pression, donc sa réduction dans une direction donnée peut entraîner une invasion des microtubules dans cette direction, donnant lieu à la croissance du neurite.

Ainsi, notre substrat rugueux pourrait entraîner une croissance accélérée simplement parce que les adhésions locales sont consolidées du fait de leur faible surface, et qu'elles induisent un meilleur "embrayage", voire "ancrage", du cytosquelette. Le modèle de l'"embrayage" moléculaire s'adapte particulièrement bien au contraste observé entre nos deux types de surfaces : en zone rugueuse la membrane englobe tout ou partie du sommet des pics comme pour y prendre un appui solide, tandis que sur zone plane l'adhésion se fait sur une surface homogène, ce qui rend possible le "glissement" progressif des adhésions parallèlement à cette surface. La rugosité serait donc un moyen topologique de concentrer les adhésions, ce qui permettrait au complexe qu'elles forment avec le cytosquelette de mieux se coordonner.

De plus, la courbure concave et convexe que prend la membrane sur les pics peut évoquer le mécanisme d'endocytose. Or, certaines protéines sont spécifiques d'un type de courbure particulier, et pourraient être recrutées sur les adhésions en zone rugueuse et non en zone plane. Cela a été mis à profit dans un travail de Spira, où des neurones d'*Aplysia* cultivés sur des électrodes en forme de "champignons" forment des structures propres au mécanisme d'endocytose [27]. Dans notre cas, une telle courbure de membrane pourrait induire la formation d'un échafaudage autour du point d'adhésion, rendant cette adhésion ou son interaction avec le cytosquelette plus efficace.

Enfin, la discrétisation des points d'adhésion implique l'existence d'une autre caractéristique importante de la surface : la distance entre ces points d'adhésion. L'équipe de Sheetz rapporte ainsi qu'une force maximale est générée par le cytosquelette lorsque la distance entre points d'adhésion est proche de $500nm$. M. Sheetz a avancé l'idée que cette distance correspond à la longueur d'un complexe protéique d'acto-myosine qui participe aux complexes protéiques associés à l'adhésion, ce qui entraîne une meilleure transduction des forces entre le substrat et le cytosquelette (Conférence "Actin, the Cytoskeleton and the Nucleus", Singapour 2010). Or, la présence de myosine dans les neurones et son interaction avec l'actine pour concourir notamment au guidage axonal sont des faits démontrés [28]. Nous pouvons alors penser que sur substrat plan, ces complexes d'acto-myosine sont reliés à deux adhésions distantes d'une longueur aléatoire, tandis que sur rugosité la distance d'environ $500nm$ entre adhésions permettrait d'organiser géométriquement ces complexes. Une telle organisation inter-adhésions pourrait donc s'ajouter à la coordination intra-adhésion évoquée par le modèle d'embrayage moléculaire pour résulter en des forces plus importantes qui pourraient directement mener à une croissance plus rapide.

V.3.8 Conclusion

Nos résultats nous ont indiqué que la discrétisation des points d'adhésion par des piliers espacés d'une distance moyenne inférieure au micron influence le développement des neurones au point de générer une croissance plus rapide des neurites, une accélération du processus de polarisation axonale, ainsi qu'une préférence axonale lorsque le neurone est à la frontière entre zones rugueuse et plane. L'effet de la rugosité débute dès les premiers stades de développement, où l'arrangement des lamellipodes autour du soma est modifié, et se poursuit dans les jours qui suivent en augmentant la vitesse de croissance des axones et des futures dendrites. Nous avons émis l'hypothèse que cette discrétisation des points d'adhésion s'accompagnait d'une concentration des complexes d'adhésion sur une échelle nanométrique, qui renforcerait l'interaction avec le cytosquelette. En agissant sur le flux rétrograde d'actine, la modification de l'interaction neurite-substrat induite par la rugosité pourrait modifier les cinétiques de croissance neuritique. L'effet mettrait donc en jeu la transduction des forces entre cellule et substrat, et la structure du cytosquelette.

Bibliographie

- [1] YW Fan, FZ Cui, SP Hou, QY Xu, LN Chen, and I.S. Lee. Culture of neural cells on silicon wafers with nano-scale surface topograph. *Journal of neuroscience methods*, 120(1) :17–23, 2002. [151](#)
- [2] K.J. Jang, M.S. Kim, D. Feltrin, N.L. Jeon, K.Y. Suh, and O. Pertz. Two distinct filopodia populations at the growth cone allow to sense nanotopographical extracellular matrix cues to guide neurite outgrowth. *PLoS One*, 5(12) :15966, 2010. [151](#)
- [3] S. Ghassemi, N. Biais, K. Maniura, SJ Wind, MP Sheetz, and J. Hone. Fabrication of elastomer pillar arrays with modulated stiffness for cellular force measurements. *Journal of Vacuum Science & Technology B : Microelectronics and Nanometer Structures*, 26(6) :2549–2553, 2008. [151](#)
- [4] J.P. Spatz and B. Geiger. Molecular engineering of cellular environments : cell adhesion to nano-digital surfaces. *Methods in cell biology*, 83 :89–111, 2007. [151](#)
- [5] Y. Ikegaya, Y. Itsukaichi-Nishida, M. Ishihara, D. Tanaka, and N. Matsuki. Distance of target search of isolated rat hippocampal neuron is about 150 [μ] m. *Neuroscience*, 97(2) :215–217, 2000. [153](#)
- [6] P.J. Lein, G.A. Banker, and D. Higgins. Laminin selectively enhances axonal growth and accelerates the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *Developmental brain research*, 69(2) :191–197, 1992. [155](#), [159](#), [173](#), [174](#), [179](#)
- [7] D. Braeken, D. Jans, D. Rand, B. Van Meerbergen, R. Huys, J. Loo, G. Callewaert, G. Borghs, and C. Bartic. Micronail-structured micro electrode arrays for selective local stimulation of excitable cells. In *Proceedings of the 6th International Meeting of Substrate Integrated Micro Electrode Arrays*, pages 255–258, 2008. [158](#)
- [8] T. Esch, V. Lemmon, and G. Banker. Local presentation of substrate molecules directs axon specification by cultured hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience*, 19(15) :6417, 1999. [160](#), [163](#), [172](#), [178](#)
- [9] N. Li and A. Folch. Integration of topographical and biochemical cues by axons during growth on microfabricated 3-d substrates. *Experimental cell research*, 311(2) :307–316, 2005. [161](#)
- [10] M.J. Katz. How straight do axons grow? *The Journal of neuroscience*, 5(3) :589, 1985. [167](#)
- [11] C.E. Chan and D.J. Odde. Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science*, 322(5908) :1687, 2008. [168](#)
- [12] A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, and D.E. Discher. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4) :677–689, 2006. [168](#)
- [13] R.K. Willits and S.L. Skornia. Effect of collagen gel stiffness on neurite extension. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 15(12) :1521–1531, 2004. [168](#)
- [14] LD Landau and EM Lifshitz. Elasticity theory, 1975. [169](#)
- [15] G. Ruthel and G. Banker. Role of moving growth cone-like "wave" structures in the outgrowth of cultured hippocampal axons and dendrites. *Journal of neurobiology*, 39(1) :97–106, 1999. [171](#)
- [16] A. Lochter and M. Schachner. Tenascin and extracellular matrix glycoproteins : from promotion to polarization of neurite growth in vitro. *The Journal of neuroscience*, 13(9) :3986, 1993. [171](#)

- [17] A. Ferrari, M. Cecchini, M. Serresi, P. Faraci, D. Pisignano, and F. Beltram. Neuronal polarity selection by topography-induced focal adhesion control. *Biomaterials*, 31(17) :4682–4694, 2010. 172
- [18] F. Lafont, M. Rouget, A. Triller, A. Prochiantz, and A. Rousset. In vitro control of neuronal polarity by glycosaminoglycans. *Development*, 114(1) :17, 1992. 172
- [19] C.G. Dotti, C.A. Sullivan, and G.A. Banker. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of neuroscience*, 8(4) :1454, 1988. 175
- [20] L. Dehmelt and S. Halpain. Actin and microtubules in neurite initiation : Are maps the missing link ? *Journal of neurobiology*, 58(1) :18–33, 2004. 175, 176
- [21] A.M. Craig, M. Jareb, and G. Banker. Neuronal polarity. *Current Opinion in Neurobiology*, 2(5) :602–606, 1992. 176
- [22] S. Gomis-Ruth, C.J. Wierenga, and F. Bradke. Plasticity of polarization : changing dendrites into axons in neurons integrated in neuronal circuits. *Current Biology*, 18(13) :992–1000, 2008. 176
- [23] H. Witte, D. Neukirchen, and F. Bradke. Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *The Journal of cell biology*, 180(3) :619, 2008. 178
- [24] F.C. De Anda, G. Pollarolo, J.S. Da Silva, P.G. Camoletto, F. Feiguin, and C.G. Dotti. Centrosome localization determines neuronal polarity. *NATURE-LONDON-*, 7051 :704, 2005. 179
- [25] T. Mitchison and M. Kirschner. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron*, 1(9) :761–772, 1988. 180
- [26] A.W. Schaefer, V.T.G. Schoonderwoert, L. Ji, N. Mederios, G. Danuser, and P. Forscher. Coordination of actin filament and microtubule dynamics during neurite outgrowth. *Developmental cell*, 15(1) :146–162, 2008. 180
- [27] M.E. Spira, D. Kamber, A. Dormann, A. Cohen, C. Bartic, G. Borghs, JPM Langedijk, S. Yitzchaik, K. Shabthai, and J. Shappir. Improved neuronal adhesion to the surface of electronic device by engulfment of protruding micro-nails fabricated on the chip surface. In *Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference, 2007. TRANSDUCERS 2007. International*, pages 1247–1250. IEEE, 2007. 181
- [28] S.G. Turney and P.C. Bridgman. Laminin stimulates and guides axonal outgrowth via growth cone myosin ii activity. *Nature neuroscience*, 8(6) :717–719, 2005. 181

Chapitre VI

Neurones sur nanotransistors : aspects cellulaires

Sommaire

VI.1 Description du projet NeuroFETs	187
VI.1.1 Contexte	187
VI.1.2 Transistors	189
VI.1.3 Objectifs	190
VI.2 Présentation de la puce NeuroFETs	192
VI.2.1 Principe de la mesure	192
VI.2.2 La puce NeuroFETs	192
VI.3 Aspects d'intégration cellulaire du projet NeuroFETs	195
VI.3.1 Réseaux à géométries contrôlées	195
VI.3.2 Adaptation réciproque des réseaux et des capteurs	195
VI.4 La problématique du placement cellulaire	198
VI.4.1 Pourquoi faut-il placer les cellules?	198
VI.4.2 Techniques de placement	198
VI.4.3 Placement magnétique	199
VI.4.4 Résultats de placement magnétique	202
VI.5 Conclusion et perspectives	206
VI.5.1 Tri magnétique des cellules	206
VI.5.2 Vers un contrôle micro-fluidique de l'ensemencement	206
VI.5.3 Nocivité des champs magnétiques	207
VI.5.4 Choix des particules	208

VI.1 Description du projet NeuroFETs

VI.1.1 Contexte

L'utilisation de motifs d'adhésion cellulaire permet d'une part de créer une architecture organisée au sein des cultures *in vitro*, et d'autre part de placer les corps cellulaires au dessus de capteurs. On peut ainsi enregistrer l'activité électrique des neurones sur des dispositifs tels que les matrices d'électrodes [1] ou les transistors[2] (voir figure VI.1).

Il est donc possible, en utilisant ce genre de technologie, de disposer de réseaux de neurones dont l'activité peut être enregistrée en temps réel. Reste alors à optimiser au mieux la position des corps cellulaires, la détection des signaux ainsi que la survie de ces réseaux. De nombreuses études ont été réalisées afin de trouver les géométries d'adhésion adéquates dans le but à la fois d'améliorer la survie des réseaux de neurones sur micropattern mais aussi d'améliorer le placement des corps cellulaires aux endroits désirés sans agrégats. En effet, l'objectif technique recherché consiste souvent à disposer d'un réseau de neurones pour lequel chaque neurone peut être enregistré et stimulé de manière indépendante. La taille du plot et l'épaisseur des lignes d'adhésion ont été étudiées [3] [4] [5], sachant que la taille des corps cellulaires peut varier selon le neurone utilisé : de $10\mu m$ de diamètre pour un neurone d'hippocampe de souris par exemple à $40\mu m$ de diamètre pour un neurone d'escargot. Typiquement, plus on augmente le diamètre du plot pour le corps cellulaire, moins le neurone est contraint, mais plusieurs neurones peuvent alors y adhérer. Les lignes aussi ne doivent pas être trop épaisses pour éviter que les corps cellulaires y adhèrent. Différents traitements de surface ont également été testés afin de trouver le substrat le plus adapté pour permettre à la fois la survie des neurones mais aussi la conservation d'un bon contraste d'adhésion ⁽¹⁾ [6] [7]. Les cellules gliales peuvent en effet synthétiser des protéines de matrice extra-cellulaire qui envahissent les zones non permissives, les rendant par la même occasion adhésives, d'où une perte du contraste d'adhésion. La densité de cellulesensemencées a également été étudiée dans le but de garder la géométrie du pattern. En effet, plus la densité est importante, plus les 'câbles' formés sur les neurites peuvent déformer le réseau. Une équipe a même mis au point des 'neurocages' afin de pouvoir piéger chaque corps cellulaire près d'une électrode [8]. Ces neurocages sont des structures tri-dimensionnelles en parylène disposant d'une zone centrale pour l'emplacement d'un corps cellulaire au dessus d'une électrode, et de tunnels pour que les neurites puissent se développer et se connecter à d'autres neurones (voir figure VI.2).

Ainsi, de nombreuses techniques se sont développées pour contrôler la position des corps cellulaires et le développement des neurites le plus durablement possible. Cependant, une des questions

1. Ces techniques sont multiples selon le substrat utilisé et la molécule d'adhésion choisie.

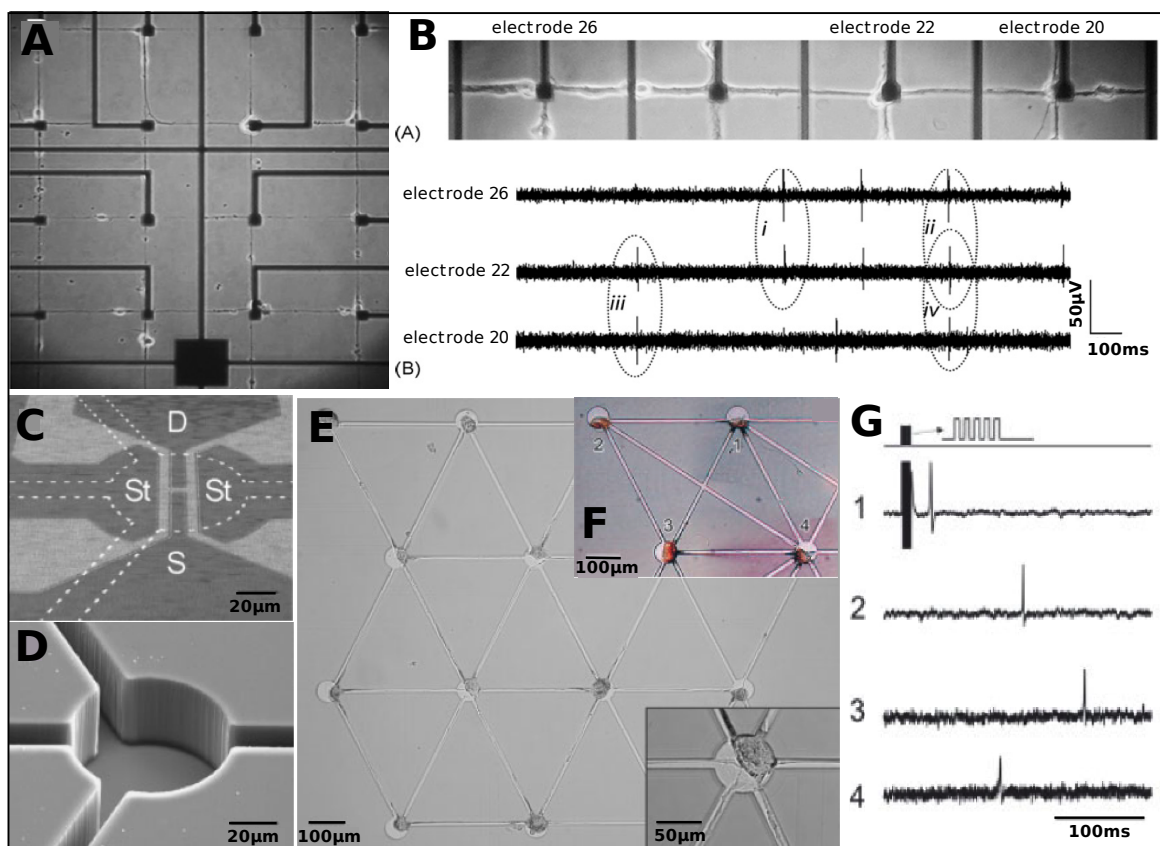


FIGURE VI.1 – Des micropatterns pour le placement de neurones sur des appareils de mesure extra-cellulaire : Matrices d'électrodes (A et B) et Microtransistors (C à G). Culture de neurones micropatternés sur des micro-électrodes (A et B). A/ Neurones d'hippocampe de rat 2 semaines après l'ensemencement sur des micro-électrodes avec une architecture contrôlée. Photo en contraste de phase. B/ Exemple d'enregistrements montrant la propagation du signal dans une chaîne de neurones à 20 jours de culture. Photographie en contraste de phase des trois emplacements cellulaires enregistrés avec leurs enregistrements correspondants [1]. **Microtransistors pour la mesure de l'activité électrique de neurones d'escargots.** C/ Image en microscopie optique du transistor : la source (S) et le drain (D) sont indiqués. La petite zone claire ($3\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$) entre le drain et la source est la grille ouverte (le neurone fera office de grille) d'un transistor à effet de champs. 'St' représente les deux armatures d'une capacité qui permettra de stimuler le neurone. En pointillé est indiqué le positionnement de la structure de guidage des neurones. D/ Image de microscopie électronique de la structure de guidage des neurones en polyester : trou central pour le positionnement du soma et lignes pour le développement des neurites. E/ Réseau de neurones d'escargots à architecture contrôlée (zoom en bas à droite). F-G/ Réponse d'un réseau de quatre neurones (F) à une stimulation électrique sur le neurone 1 [2]

fondamentales est de savoir si les nombreuses contraintes appliquées sur les neurones les empêchent de créer des réseaux fonctionnels. Dans ce but, une équipe a vérifié la fonctionnalité des réseaux de neurones sur micropatterns par patch clamp [9]. Ils ont ainsi montré, en étudiant leur comportement électrique, que les neurones adhèrent, se différencient et forment des synapses matures et fonctionnelles même s'ils sont cultivés à faible densité sur micropatterns. Cette même équipe

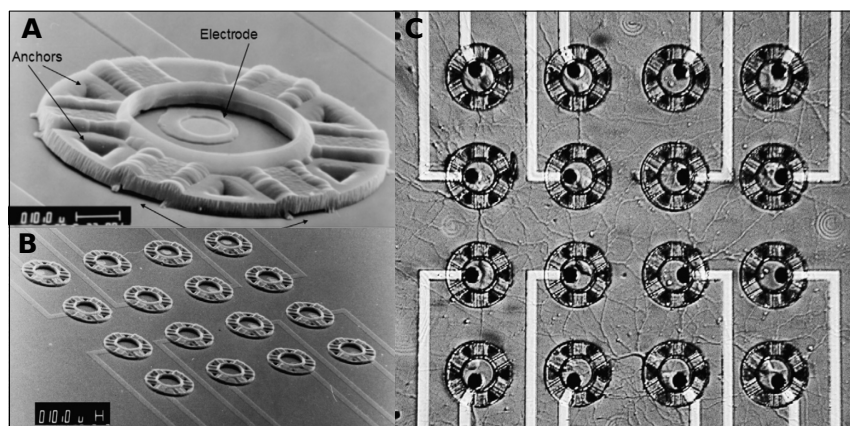


FIGURE VI.2 – Des neurocages pour le contrôle de la position des corps cellulaires au-dessus d'électrodes de mesure. **A/** Détail d'une neurocage en photographie SEM. La barre d'échelle mesure $10\mu\text{m}$. **B/** Réseau de neurocages. La barre d'échelle mesure $10\mu\text{m}$. **C/** Réseau de neurones d'hippocampe de rat à $10DIV$ cultivé sur les neurocages. Certains corps cellulaires sont piégés dans des neurocages. Les neurites sont passées à travers les tunnels. [8]

a démontré qu'ils possèdent également, comme les réseaux de neurones *in vivo* une plasticité synaptique [10].

Les réseaux de neurones à architecture contrôlée sont donc de formidables outils dont la fonctionnalité a été prouvée. Les neurones peuvent être enregistrés individuellement et simultanément, permettant l'étude du traitement de l'information qu'ils opèrent en fonction de leur architecture et leur évolution en fonction de leur expérience. Cependant, ces mesures ont été effectuées sous les somas des neurones, et non sous leurs prolongements, ce qui limite l'échelle d'étude aux neurones et non à leurs sous-ensembles.

VI.1.2 Transistors

Les nanotransistors sont une miniaturisation du principe utilisé par les microtransistors visibles en figure VI.1. Ils sont la clé des mesures électriques à l'échelle sub-cellulaire. L'équipe de Peter Fromherz a été la première à détecter des signaux neuronaux grâce à ce type de transistors (voir figure VI.3) [11]. Toutefois, les premières mesures de neurones dissociés de mammifères guidés par un contraste d'adhésion n'ont été conduites que beaucoup plus récemment dans l'équipe de Charles Lieber grâce à des nanofils de silicium dopés de diamètre 20nm perpendiculaires aux prolongements axonaux ou dendritiques [12] [13](voir figure VI.3). Ces auteurs ont pu reconstruire point par point une pseudo-propagation d'un potentiel d'action le long d'un axone en effectuant cinquante stimulations intra-cellulaires du soma consécutives et en enregistrant un à un les signaux résultants sur les nanofils placés le long de l'axone. Leur technique de formation des nanofils de silicium

(dite “bottom-up”) consiste à déposer les nanofils en phase liquide, ce qui les oriente tous dans la même direction : les nanotransistors sont tous parallèles. Dans ces conditions, l’instrumentation de réseaux de neurones de géométrie complexe est exclue.

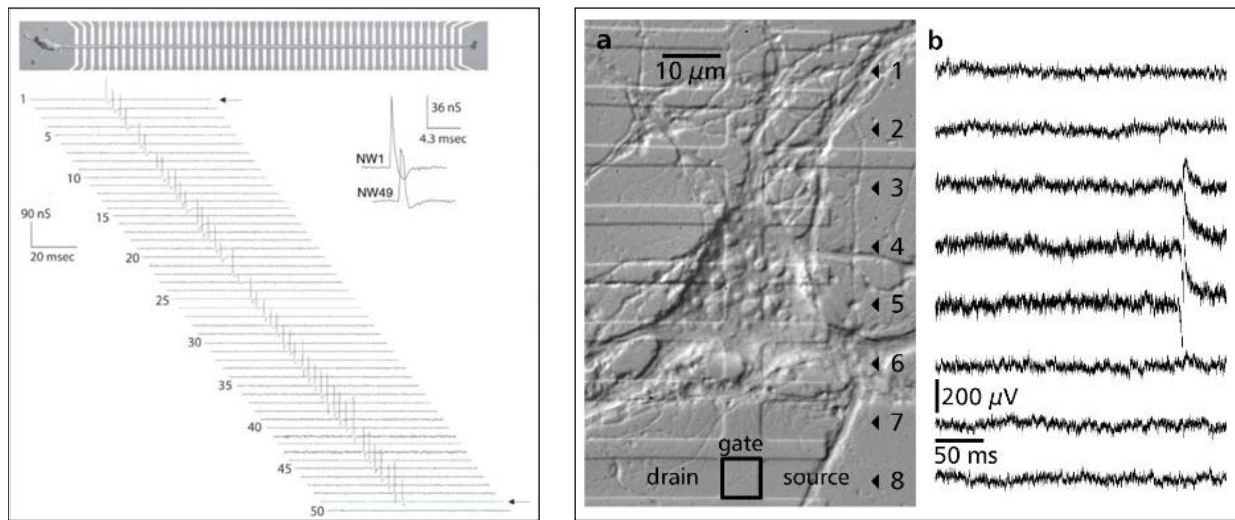


FIGURE VI.3 – Neurones sur transistors. Gauche : réalisation de l’équipe de Lieber [12] ; Droite, réalisation de l’équipe de Fromherz [2]

VI.1.3 Objectifs

Le projet NeuroFETs dans lequel ma thèse s’est insérée vise à exploiter les techniques issues de la microélectronique pour réaliser le même type de nanocapteurs, qui seront sensibles aux variations du potentiel membranaire des neurones cultivés à leur surface (voir p. 18). A l’aide de notre maîtrise de la polarisation axonale, il serait ainsi possible d’explorer l’activité électrique de réseaux de neurones modèles et le traitement de l’information qui s’y opère à une échelle sub-cellulaire jamais explorée.

La construction de circuits logiques élémentaires à base de neurones en culture est un des débouchés de ce couplage neurone/capteur. Des circuits présentant une fonction de type AND a par exemple été mise en évidence dans des assemblées neuronales confinés dans des patterns asymétriques de taille millimétrique ⁽²⁾ (voir figure VI.4) [14]. De telles études profiteraient d’une maîtrise de la polarité au niveau d’une cellule individuelle, car cela améliorerait le taux de fiabilité et la reproductibilité de ces circuits logiques tout en permettant de réduire leurs dimensions. Par ailleurs, la possibilité de stimuler et d’enregistrer de façon très locale de part et d’autre

2. La pousse rectiligne de l’axone permet à ceux-ci de franchir la pointe des triangles relativement plus que les dendrites, donnant une polarité globale au réseau.

d'une connexion synaptique, par exemple à l'aide d'un motif faisant se croiser axone et dendrite, permettrait d'agir sur les phénomènes de plasticité synaptique de façon contrôlée dans le temps et dans l'espace.

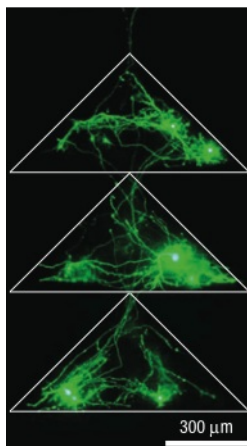


FIGURE VI.4 – Motifs macroscopiques de localisation neuronale permettant l'obtention d'un effet diode dans la réponse du réseau [14].

Deux problèmes majeurs sont apparus dans les études présentées précédemment : il s'agit de la difficulté de réaliser des mesures simultanées en parallèle et de l'impossibilité d'étudier des réseaux de neurones de géométrie parfaitement contrôlée. Le nom du projet NeuroFETs, est en fait inspiré de la méthode de mesure employée : les capteurs sont des transistors à effet de champ (*Field Effect Transistors*, FETs) modifiés pour être couplés avec les neurones (voir figure VI.5). Le projet NeuroFETs intègre :

1. la fabrication de nanotransistors à effet de champ par une technique top-down plutôt que, à la manière du groupe de Lieber, bottom-up en construisant la puce autour des nanofils. Dans NeuroFETs, les nanofils sont en effet gravés dans une couche fine (50nm) de silicium monocristallin et leur orientation peut donc être définie à façon.
2. la réalisation de réseau de neurones à architecture et polarité contrôlée au-dessus des nanofils,
3. le développement d'une électronique permettant de suivre en temps réel une véritable propagation d'un signal neuronal.

Ce chapitre décrit ma contribution dans le projet NeuroFETs. Celle-ci concerne principalement le lien entre la technologie des NeuroFETs et la réalisation de réseaux neuronaux, avec en particulier le développement d'une technique de placement cellulaire qui s'avère déterminante pour la réalisation systématique de nos réseaux.

VI.2 Présentation de la puce NeuroFETs

Au départ, la puce est une plaque de silicium très fine (50nm) isolée d'un substrat de silicium massif d'épaisseur $600\mu\text{m}$ par une couche d'oxyde (200 nm) découpée en puce de $16\times 16\text{mm}^2$.

VI.2.1 Principe de la mesure

En microélectronique, les transistors sont des éléments composés de trois électrodes : source, drain et grille (voir figure VI.5). La source et le drain sont deux électrodes reliées par un canal semi-conducteur dont la conductivité est modulée par la tension appliquée à la troisième électrode, la grille. Dans le cas des NeuroFETs le schéma est très similaire, avec un nanofil de silicium comme canal semi-conducteur, mais sans l'électrode de la grille car c'est la portion du neurone alignée au dessus du transistor (axone, dendrite, ou soma) qui fera office de troisième électrode. Ainsi, le signal électrique neuronal sera suivi par les variations de conductivité du nanofil de silicium. Une autre grille existe cependant, mais celle-ci est constituée par le silicium massif de la puce et a pour rôle de moduler le point de fonctionnement de tous les nanofils simultanément.

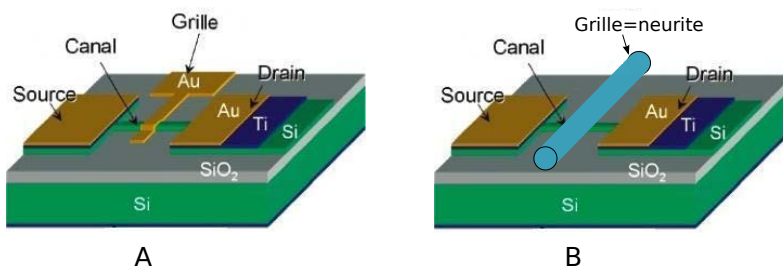


FIGURE VI.5 – **A/** Éléments de base du transistor à effet de champ. Le canal semiconducteur est connecté à la Source et au Drain, et la grille module la conductivité du canal par le champ électrique local que son potentiel induit. **B/** Principe de la mesure par neuroFETs : dans ce transistor original, la grille est remplacée par le neurite à mesurer (axone ou dendrite). Les variations locales de potentiel membranaire seront donc mesurées à travers les variations de l'intensité dans le canal, à tension Source-Drain fixe.

VI.2.2 La puce NeuroFETs

Les puces NeuroFETs ont été conçues et réalisées par les post-doctorants de l'équipe. Elles intègrent plus de trente étapes de lithographie (optique et électronique), dépôts, gravures et fonctionnalisations (voir figure VI.6). La mise au point et la réalisation des transistors était un réel défi, qui a nécessité plus de deux ans de travail.

Le résultat est une puce présentant des nanofils de silicium de 100nm de large et 50nm de haut pour $5\mu\text{m}$ de long, isolés du milieu de culture par une fine couche d'oxyde d'Hafnium (HfO_2) de 10nm , puis connectés à des pistes d'or elles-mêmes isolées du milieu par une couche de SiO_2

de 500nm (voir figure VI.6). Nous disposons de 120 connexions sur la puce NeuroFETs, ce qui fixe le nombre de transistors à 89 capteurs en rassemblant les sources de groupes de transistors en sources communes et avec certaines pistes réservées à des électrodes de référence.

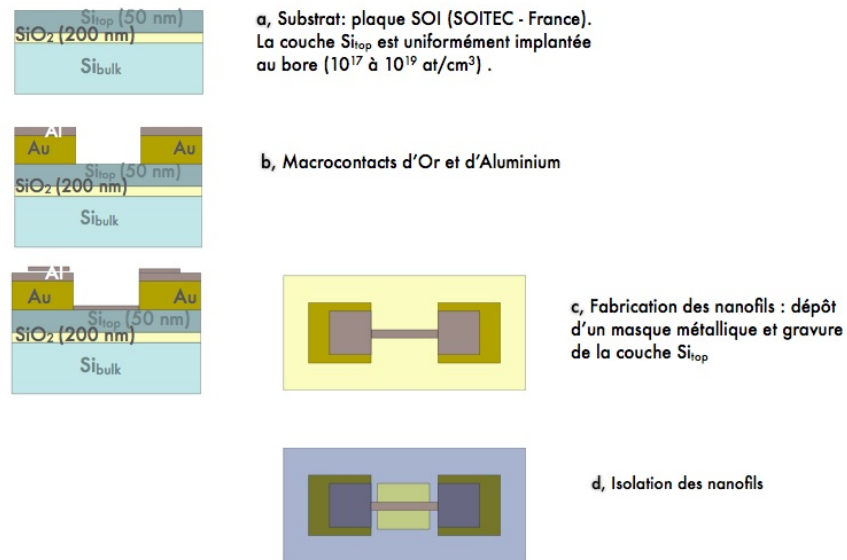


FIGURE VI.6 – Principales étapes de fabrication de la puce NeuroFETs, qui en compte plus de trente.

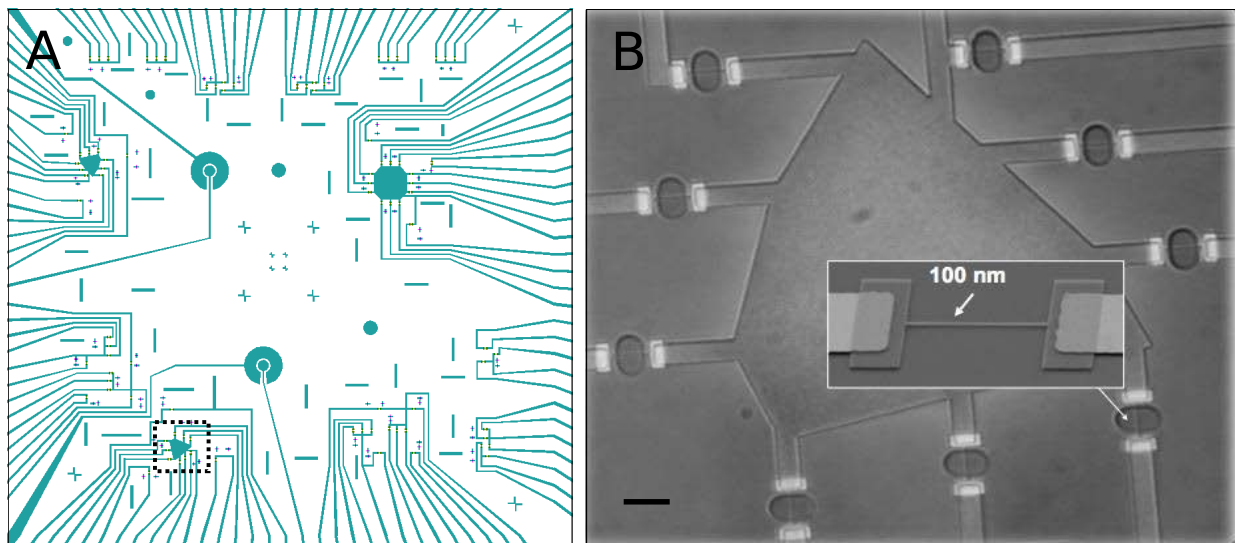


FIGURE VI.7 – **A/** Masque des contacts métalliques et des transistors au niveau de la zone centrale de la puce ($2\text{mm}\times 2\text{mm}$). **B/** Détail du rectangle en (A) : image au microscope électronique à balayage de transistors achevés, disposés en triangle autour d'une source commune. | Barre : $10\mu\text{m}$

Le fonctionnement des transistors a été très récemment validé sur échantillon biologique à travers la mesure d'un rythme de décharge synchrone connu (environ 10Hz) dans une tranche

aiguë de la substance noire. Lors de cette mesure la tranche était posée sur la puce, ce qui signifie que la distance entre les neurones et les capteurs était relativement grande comparée à l'objectif du projet, où les axones/dendrites seront directement en contact avec les fils de silicium. On peut donc avancer que les mesures posséderont un excellent rapport signal sur bruit.

VI.3 Aspects d'intégration cellulaire du projet NeuroFETs

VI.3.1 Réseaux à géométries contrôlées

Parmi les nombreux réseaux possibles, quels réseaux choisir pour valider le dispositif NeuroFETs? Nous avons sélectionné pour les premiers essais de motifs des réseaux en chaînes et des réseaux bouclés de quelques neurones (de 2 à 4 neurones). L'avantage essentiel est que le faible nombre de neurones augmente les probabilités d'obtenir un réseau modèle, ce qui permet de reproduire plus facilement des expériences systématiques. De plus ces réseaux permettent d'étudier d'un côté la transmission linéaire de l'information, et d'un autre côté le bouclage de l'information dans un réseau simple.

Afin d'augmenter les chances d'obtenir un réseau correctement orienté, nous avons naturellement reproduit le motif sur lequel le taux de polarisation selon la direction voulue était maximal, nommé BmW. Étant donné que ce motif oriente 86% des axones dans la bonne direction, un réseau de trois neurones sera correctement orienté dans $(0,86)^3 = 64\%$ des cas. A titre comparatif, un réseau sans contraintes géométriques favorisant le positionnement de l'axone parmi trois directions possibles donnerait $(0,33)^3 = 3,6\%$ de réseaux à trois neurones bien orientés.

La figure VI.8 donne un exemple d'un réseau triangulaire construit à partir de l'agencement de trois motifs BmW. Dans ce cas précis, la construction du réseau s'appuie sur une continuité physique entre la direction de l'axone du neurone pré-synaptique et celle d'une des dendrites du neurone post-synaptique.

En revanche, nous avons choisi une autre stratégie pour la construction des motifs chaînes en disposant les motifs BmW élémentaires bout à bout. S'est alors posé la question de la distance entre l'extrémité de l'axone du neurone pré-synaptique (N1) et du soma du neurone post-synaptique (N2). Une distance de $15\mu\text{m}$ s'est avérée bien calibrée pour d'une part empêcher le développement d'un 4^{me} neurite sur la cellule N2 et d'autre part pour permettre la connexion de N1 avec N2 (voir figure VI.9).

VI.3.2 Adaptation réciproque des réseaux et des capteurs

En étroite collaboration avec les post-doctorants, dont les objectifs étaient la conception, la réalisation et les tests des puces, ma participation à la puce NeuroFETs a consisté à adapter les réseaux de neurones pour permettre une mesure par les transistors, et inversement à adapter la position des transistors aux réseaux de neurones le cas échéant.

L'organisation des transistors par rapport aux motifs géométriques d'adhésion a été fixée le plus souvent à un transistor par dendrite (à $40\mu\text{m}$ du soma) pour suivre les signaux reçus par

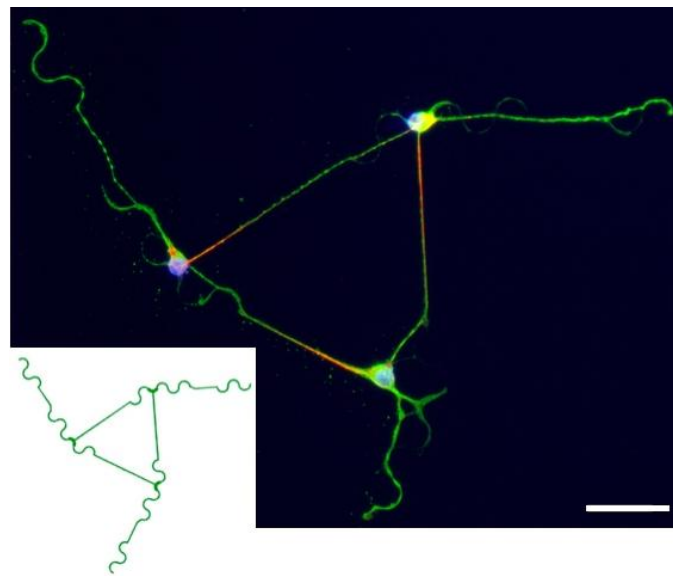


FIGURE VI.8 – Exemple de réseau triangulaire après 7DIV parfaitement orienté : chaque axone est émis dans la direction voulue, pour former un réseau bouclé modèle à trois neurones. Bas : motif correspondant sur le masque.

Marquages : microtubules tyrosinées (YL1/2, vert), segment proximal de l'axone (ankyrine, rouge), noyaux (Hoechst, bleu). | Barre : $50\mu\text{m}$

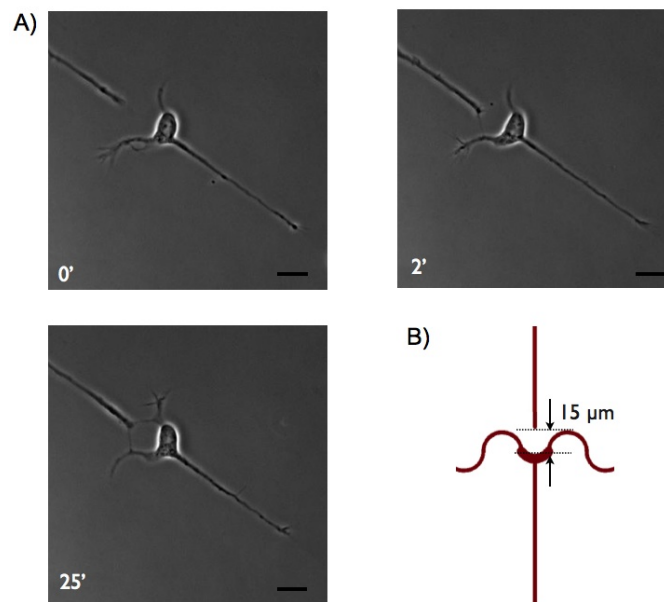


FIGURE VI.9 – A/ Vidéo (temps indiqué en minutes) d'un neurone se développant sur un réseau linéaire formé de la juxtaposition de motifs élémentaires BmW. B/ Des espaces de $15\mu\text{m}$ les séparent. | Barre : $20\mu\text{m}$.

la cellule, et à trois transistors consécutifs sur l'axone pour suivre l'évolution du signal émis (à intervalle régulier de $40\mu m$). Du fait de cette décision, le nombre de cellules sur la puce est limité à 24 neurones.

Le choix du motif BmW pour maîtriser la polarisation implique la présence d'ondulations sur les dendrites, et donc d'étirements/séparations neuritiques (voir Chap2). Les transistors ont été positionnés en conséquence pour suivre les éventuels signaux électriques dans ces structures (voir figure VI.10D).

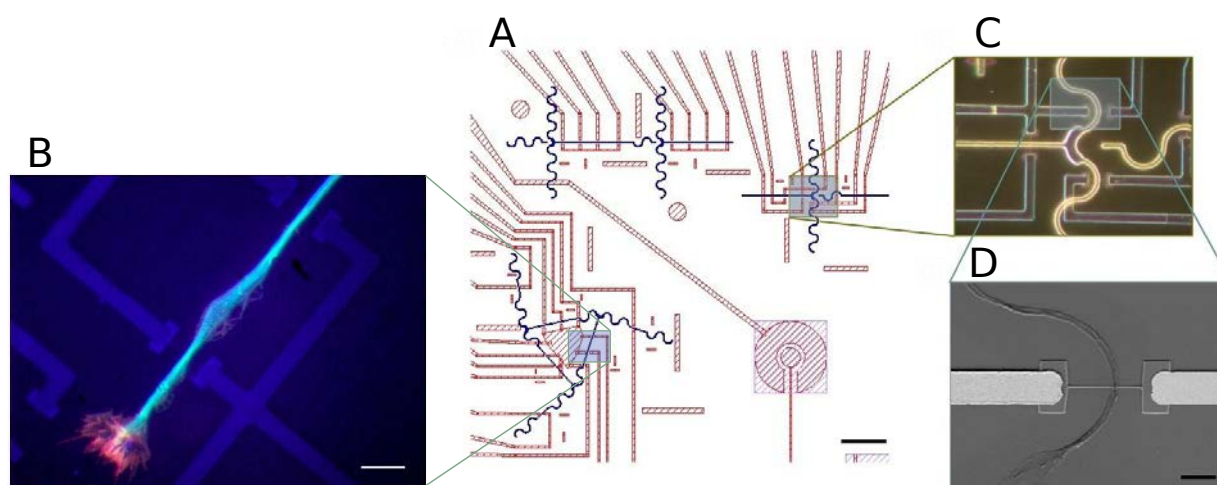


FIGURE VI.10 – **A/** Superposition des masques de réalisation des NeuroFETs et du masque d'adhésion des neurones sur les motifs correspondants. **B/** Image de fluorescence de l'extrémité distale d'un neurite qui croît sur les lignes d'adhésion alignées par rapport aux transistors (rouge : actine; vert : microtubules). Les contacts métalliques ainsi que les transistors sont visibles par réflexion (bleu). **C/** Détail d'un emplacement neuronal en bout d'une chaîne de trois neurones lors de l'étape de photolithographie : le motif est dessiné par la résine. **D/** Détail au microscope électronique à balayage d'un neurite passant sur un transistor au niveau d'une ondulation. Le transistor est décalé en prévision d'éventuels étirements neuritiques

Les cultures que nous avons réalisées ont montré que la survie des neurones est compatible avec la technologie des NeuroFETs, et que l'alignement des lignes d'adhésion sur les transistors est parfaitement contrôlé. Nous pouvons donc affirmer que notre développement technique est suffisant pour réaliser les premières expériences avec des transistors fonctionnels. Néanmoins, le paramètre sur lequel nous n'avons pas encore joué et qui peut se révéler crucial pour l'obtention de signaux reproductibles est le placement cellulaire. Nous présentons ce développement technique en détail dans la section suivante.

VI.4 La problématique du placement cellulaire

VI.4.1 Pourquoi faut-il placer les cellules ?

Les études de polarisation axonale réalisées dans le chapitre 2 s'appuyaient sur des motifs géométriques comportant des emplacements cellulaires. Par conséquent, les cellules considérées étaient celles dont le soma était bien positionné sur un emplacement (voir p. 59). Un problème immédiat se pose alors : la proportion de cellules bien placées est relativement faible (100 à 200 cellules sur un échantillon comportant environ 5000 plots cellulaires, soit moins de 5%). Sur la puce NeuroFETs, nous ne disposons que de 24 emplacements cellulaires. Si seuls 5% des cellules sont correctement placées, il est clair que nous n'obtiendrons pas les réseaux modèles attendus du fait d'un problème de remplissage, même avec une maîtrise de la polarité supérieure à 80%. De plus, d'autres problèmes peuvent apparaître si le soma adhère en dehors de l'emplacement prévu pour son adhésion. La figure VI.11 illustre les conséquences des défauts de placement des somas.

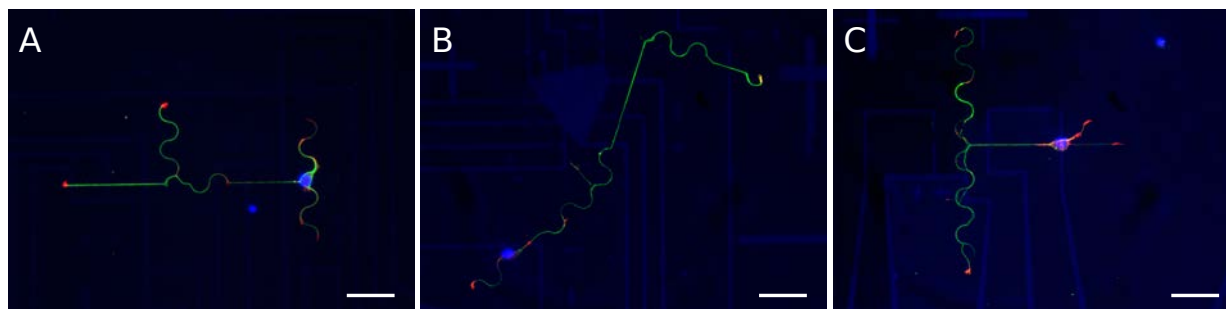


FIGURE VI.11 – **Le problème du positionnement des cellules sur NeuroFETs** : exemples de neurones à 3DIV. **A**/ Neurone correctement positionné et polarisé sur un motif de chaîne de neurones. **(B-C)** Dans ces deux cas, le soma a débuté la croissance sur une ligne de croissance neuritique ($2\mu\text{m}$ de large). En conséquence, les axones ont été émis dans des directions non contrôlées (marquage de l'axone non visible sur ces figures).

Marquages : microtubules tyrosinées (YL1/2, vert), actine (phalloïdine-TxRed, rouge), noyaux (Hoechst, bleu, saturé pour révéler les lignes métalliques). | Barres : $50\mu\text{m}$

Cette contrainte pourrait être résolue si nous pouvions placer les cellules directement sur les plots cellulaires au début de la culture. Notons que cela devrait de plus augmenter l'efficacité des motifs géométriques en terme de polarisation axonale, puisque les cellules y seraient toutes exposées dès le début de leur croissance. Mais quelles techniques permettraient de réaliser ce placement ?

VI.4.2 Techniques de placement

La première méthode que nous avons testée consiste à déposer les cellules une à une sur les plots cellulaires : la suspension cellulaire est contenue dans une micropipette, que nous déplaçons

au dessus de l'échantillon pour faire tomber les cellules une à une sur les plots. Cette méthode n'est pas satisfaisante pour trois raisons. Premièrement, le flux de liquide dans la pipette est très difficile à contrôler car le diamètre de l'extrémité de la pipette est relativement grand ($> 10\mu m$ pour laisser passer les corps cellulaires). Il est donc très difficile de contrôler le flux de liquide pour s'opposer à la gravité qui tend à faire tomber les cellules. Deuxièmement, les débris cellulaires issus de la dissociation s'accumulent et s'agrègent très vite à l'extrémité de la pipette, jusqu'à gêner le passage des cellules. Troisièmement, cette méthode nécessite beaucoup de temps et il est difficile de la réaliser en condition stérile. Elle ne sera donc pas utilisée pour placer les cellules, mais l'utilisation de pipettes reste une solution très pratique pour enlever les éventuelles cellules surnuméraires sur un réseau.

Nous avons par la suite testé une technique de "pochoir" pour placer les cellules de façon automatique. L'idée est de placer un objet troué sur l'échantillon lors de l'ensemencement, et de l'ôter lorsque les cellules ont adhéré. Une membrane de nitrure de silicium comportant des trous de quelques centaines de microns a été réalisée par l'équipe technique du pôle technologique NanoFab' pour tester cette méthode, et les tests que nous avons effectués ont conduit à deux comportements opposés : soit la membrane est trop hydrophobe pour laisser passer la suspension cellulaire, et dans ce cas aucune cellule ne peut atteindre l'échantillon ; soit la membrane est suffisamment hydrophile mais dans ce cas le liquide colonise par capillarité toute la surface sous la membrane, dispersant des cellules dans un rayon de l'ordre de $1mm$. Ainsi, cette technique pourrait être utilisée pour réaliser un placement grossier de cellules, ou pour réaliser des gradients de densité cellulaire, mais n'est pas suffisamment précise dans notre cas où la position des cellules doit être contrôlée à environ $20\mu m$ près.⁽³⁾

Nous avons enfin développé une technique de placement cellulaire radicalement différente des deux premières. L'idée consiste à donner des propriétés magnétiques aux cellules, puis à placer les cellules grâce à des aimants positionnés sur le substrat.

VI.4.3 Placement magnétique

La mise en oeuvre de cette idée, concrétisée grâce à une collaboration avec une équipe spécialiste du magnétisme composée de Nora Dempsey, Frédéric Dumas-Bouchiat et Dominique Givors à l'Institut Néel, repose sur deux éléments : des particules magnétiques pour rendre les cellules sensibles au champ magnétique, et un motif magnétique sur le substrat pour attirer les cellules précisément sur les plots cellulaires.

3. Nous avons en effet observé sur certaines vidéo-microscopies que des neurones tombés sur une zone non adhésive peuvent émettre des filopodes d'une vingtaine des microns de longueur. Si un filopode atteint une surface de Poly-L-Lysine (PLL), le soma est immédiatement tiré vers la zone adhésive.

Les particules que nous utilisons sont des particules “super-paramagnétiques”, c’est-à-dire capables de s’aimanter fortement lorsqu’elles sont placées dans un champ externe. Ces particules tirent leurs propriétés de leur faible dimension : les spins basculent de façon corrélée à l’échelle de la particule, mais avec un temps de relaxation très court entre les directions de facile aimantation. L’état constaté sur des temps plus longs est apparemment désordonnée, analogue donc au paramagnétisme, d’où la dénomination de ces particules [15].

Les particules que nous avons testées ont une taille de $200nm$ et $2\mu m$, et sont fonctionnalisées par la PLL par la même méthode que les zones d’adhésion sur le substrat. Elles sont ajoutées à la suspension cellulaire avant l’ensemencement, et s’associent aux cellules en suspension par la même interaction électrostatique que celle qui est impliquée dans l’adhésion des neurones sur les substrats.

Afin de définir les zones de placement des cellules sur le substrat, les motifs d’aimantation peuvent être réalisés par deux techniques : la création de micro-aimants et la création de contrastes magnétiques sur une couche uniforme.

Micro-aimants

Des micro-aimants de NdFeB de 2 à $20\mu m$ peuvent tout d’abord être réalisés par des étapes de lithographie-dépôt-lift-off (voir p. 56). Dans ce cas, nous obtenons un contraste entre des plots ferromagnétiques et le reste de la surface sans propriété magnétique. A ce stade, les plots ne possèdent pas d’aimantation particulière car le matériau est composé de micro-domaines magnétiques non coordonnées. Deux solutions sont alors possibles pour définir un contraste magnétique :

- Dans le cas le plus intuitif, le matériau peut être recuit à l’intérieur d’un champ magnétique pour le re-cristalliser et aligner les micro-domaines magnétiques avec le champ extérieur. Après ce recuit, on dit que le matériau est “dur” car il a acquis une aimantation permanente. Ainsi, les billes magnétiques seront attirées par ces micro-aimants.
- Au contraire, le matériau peut ne pas être recuit pour conserver ses caractéristiques de matériau “doux”. Dans ce cas, le substrat sera plongé dans un champ extérieur pendant l’expérience (imposé par un aimant permanent sous l’échantillon), ce qui aura pour effet d’aligner les micro-domaines magnétiques des plots, mais cette fois pas de façon permanente. La présence des plots concentrera les lignes du champ externe localement, ce qui aura pour effet d’y attirer les particules. A la fin de l’expérience, l’aimant sous l’échantillon peut être enlevé, auquel cas les plots magnétiques perdent leur aimantation et les neurones sont cultivés dans un environnement neutre du point de vue magnétique.

Contrastes magnétiques par TMP

L'autre solution est de déposer une couche ferromagnétique sur tout l'échantillon, pour laquelle on définit une aimantation uniforme par recuit, et d'y créer des micro-domaines d'aimantation opposée : cette méthode se nomme TMP (*thermomagnetic patterning*) [16]. L'idée est de chauffer très localement le matériau par un laser à impulsion (laser excimère, fluence de $240mJ.cm^{-2}$ pour une exposition de $25ns$). Les zones insolées acquièrent alors, en refroidissant en dessous de la température de Curie, une aimantation alignée par rapport au champ magnétique extérieur (imposé une nouvelle fois par un aimant permanent sous l'échantillon). On obtient donc un contraste magnétique entre les zones chauffées par le laser, dont la taille peut descendre à quelques microns grâce à la faible durée de chauffage, et le reste de la surface qui conserve son aimantation initiale.

Principe du piégeage magnétique

Les deux méthodes décrites ci-dessus reposent en fait sur le même principe. En effet, dans les deux cas c'est le contraste d'aimantation qui est supposé piéger les particules magnétiques : celles-ci doivent donc se positionner sur le pourtour des plots ou des micro-domaines magnétiques.

La force magnétique que subit une particule super-paramagnétique s'exprime comme le produit de sa perméabilité magnétique μ_0 , son volume magnétique V_{mag} son aimantation \vec{M} , et le gradient du champ appliqué $\nabla\vec{H}_{app}$:

$$\vec{F} = \mu_0 \cdot V_{mag} \cdot \vec{M} \cdot \nabla\vec{H}_{app}$$

La propriété principale de ces particules est qu'il suffit d'un faible champ pour que leur aimantation se sature⁽⁴⁾. Dans ce cas, l'aimantation est proportionnelle au champ appliqué, et on obtient que la norme de la force d'attraction magnétique subie par cette particule est proportionnelle au produit du champ par son gradient :

$$\|\vec{F}\| \propto \|\vec{H}_{app}\| \cdot \|\nabla\vec{H}_{app}\| \quad (VI.1)$$

Ainsi, les particules sont piégées par les zones où il y a à la fois un champ et une variation de champ importants. La figure VI.12 montre le résultat de modélisations réalisées par nos collaborateurs pour les deux techniques que nous avons décrites. Les calculs sont réalisés à $3\mu m$ au dessus de la surface, c'est-à-dire à une distance représentative de ce que vont subir les billes accrochées aux neurones qui passent à proximité de la surface. Nous voyons que dans les deux cas le champ et

4. On dit que l'aimantation est saturée lorsque tous les domaines magnétiques d'un matériau sont orientés dans le même sens

son gradient sont plus importants aux frontières, et que leur produit donne une force dirigée vers le substrat. Cela confirme que les particules doivent y être piégées.

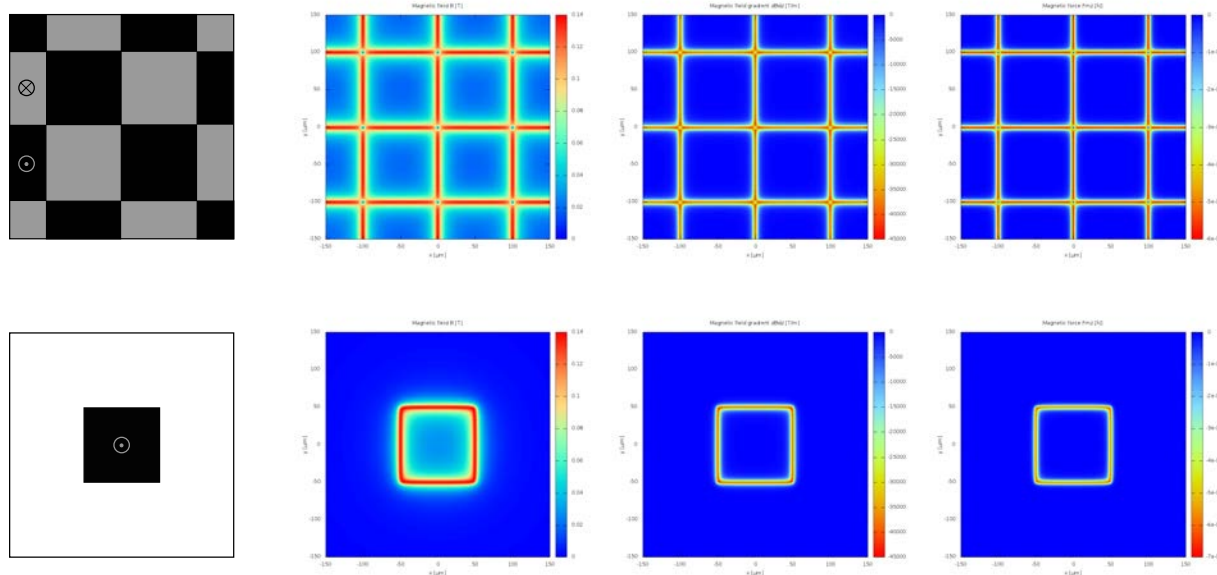


FIGURE VI.12 – **Modélisation des caractéristiques magnétiques obtenues par les deux méthodes de piégeage.** De gauche à droite : pattern d’aimantation, champ, gradient de champ, et force verticale subie par la particule (négatif = vers le substrat). **Haut** : cas d’un échiquier typiquement obtenu par TMP (noir et gris : zones d’aimantations opposées). **Bas** : plot magnétique seul (blanc : zone d’aimantation nulle).

VI.4.4 Résultats de placement magnétique

Pour valider la technique de placement par les aimants, nous avons réalisé deux expériences. La première consiste à placer les cellules sur un substrat où toute la surface est couverte de PLL. Ainsi, l’adhésion elle-même ne peut pas affecter la position des cellules. Dans ce cas précis, il s’agissait d’un substrat où des micro-domaines magnétiques en forme de bandes ont été dessinés par TMP. Les cellules ont ici été associées à des particules magnétiques de 200nm . La figure VI.13 montre que les cellules suivent alors le motif des aimants, ce qui prouve que le positionnement cellulaire fonctionne en l’absence de contraste d’adhésion.

La seconde expérience a été menée sur des motifs hexagonaux visibles en figure VI.14 alignés sur des micro-aimants en forme de disques. Ces micro-aimants mesuraient $10\mu\text{m}$ de diamètre pour 400nm d’épaisseur. Les motifs d’adhésion de PLL ont été alignés sur ces aimants grâce à des marques d’alignement sur les masques de lithographie réalisés pour cette collaboration. Pour quantifier l’effet de l’attraction magnétique par rapport à un contraste d’adhésion simple,

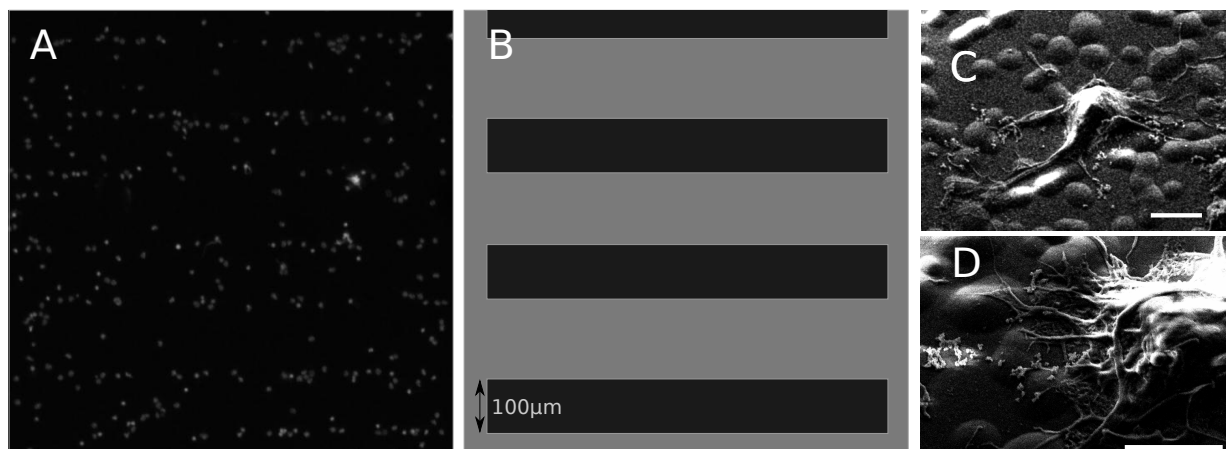


FIGURE VI.13 – **Validation de la méthode de placement magnétique sur substrat sans contraste d'adhésion.** **A** / Image en fluorescence des noyaux de cellules après quelques heures de culture. Des particules magnétiques de $200nm$ combinées à un motif d'aimantation visible en (B) permettent d'aligner une majorité de cellules sur les bords des domaines magnétiques. (C-D) Images au microscope électronique à balayage de neurones alignés sur des bords de domaines magnétiques. Les particules non attachées à des cellules dessinent ces bords avec une dispersion de l'ordre de $5\mu m$. Etant donné la taille des particules, il est possible que les cellules en aient incorporé par endocytose. (Barres : $5\mu m$)

l'idée est de comparer le nombre de cellules qui se positionnent sur les plots et le nombre de cellules qui se positionnent sur les croisements du motif, sachant que nous n'avons positionné des pièges magnétiques que sous les plots. Une expérience contrôle, sans aimants, montre que l'on doit attendre 57% de cellules sur les plots et 43% sur les croisements ($n_{total} = 108$). Notons que cette différence entre plots et croisements dans le cas contrôle se justifie par le fait qu'il y a plus de surface d'adhésion au niveau des plots cellulaires. Dans cette expérience, nous avons utilisé des particules magnétiques sphériques de $2\mu m$ qui ont l'avantage d'être fluorescentes (longueur d'onde d'excitation : $560nm$, voir figure VI.14), et que nous nommerons ici les "billes" magnétiques.

Les observations sont les suivantes : nous avons comptabilisé les neurones liés à des billes magnétiques sur plots et croisements, ce qui donne 49 cellules contre 7, respectivement. Les cellules associées à des billes semblent donc avoir subi une forte influence des pièges magnétiques. Or, nous avons aussi comptabilisé, parmi les plots inoccupés par des cellules, ceux qui sont occupés par des billes magnétiques seules : sur l'ensemble de ces plots inoccupés par des cellules, 37% sont occupés par des particules magnétiques. Comme attendu, aucun croisement n'est occupé par ces billes seules. Comme le positionnement de ces billes non attachées aux cellules est indépendant de la présence ou non de neurones, nous pouvons étendre ce résultat et affirmer que 37% de tous les plots magnétiques ont reçu des billes seules. Ainsi, les neurones liés à des billes que nous observons sur plots pourraient être issus de la réunion de deux populations : celle des neurones déjà liés à

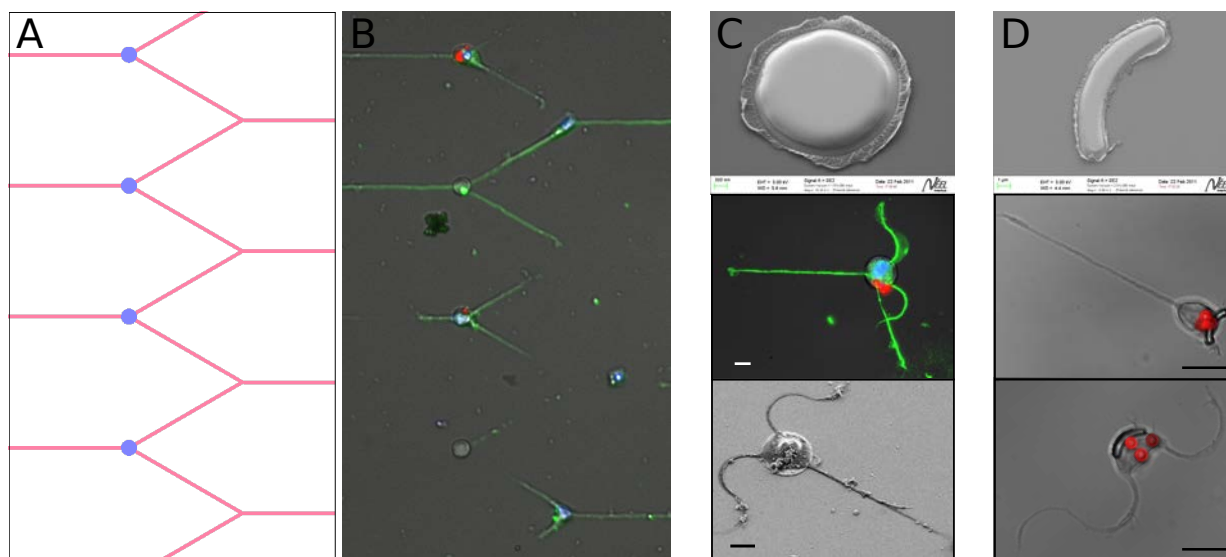


FIGURE VI.14 – **Méthode de placement cellulaire par des plots magnétiques.** **A/** Motifs hexagonaux utilisés dans cette expérience. Il y a autant de plots cellulaires que de croisements, et des aimants de diamètre $10\mu m$ sont placés sous les plots cellulaires. **B/** Exemple de neurones après 1DIV (rouge : billes ; vert : microtubules ; bleu : noyaux). Dans ce champ, deux neurones sans billes sont placés sur les croisements et deux neurones avec billes sont positionnés sur les plots. **C-D/** Images au microscope électronique à balayage des plots magnétiques en forme de disque (C) ou de boomerang (D), et exemples de neurones avec billes correctement positionnés sur ces plots (l'image au microscope électronique à balayage en C concerne un essai de placement par des particules de $200nm$, non visibles en microscopie optique). | Barres : $10\mu m$)

des billes avant adhésion, et celle des neurones s'alliant à des billes après adhésion. Ainsi, parmi la population de neurones sans billes qui sont tombés par hasard sur des plots magnétiques, nous pouvons considérer que 37% de ces cellules ont reçu des billes auxquelles elles n'étaient pas accrochées initialement. En conclusion, le nombre de neurones qui ont été réellement attirés par les plots magnétiques est vraisemblablement plus faible que le nombre de 49 cellules avec billes observé sur plots.

Nous avons donc corrigé ce résultat par les formules suivantes, avec :

- N_{S_o} = nombre de cellules seules observées sur plots,
- N_{S_i} = nombre de cellules seules réellement tombées sur plots,
- N_{B_o} = nombre de cellules avec billes observées sur plots,
- N_{B_i} = nombre de cellules avec billes réellement tombées sur plots).

$$N_{S_o} = N_{S_i} - 37\% * N_{S_i} \quad \rightarrow \quad N_{S_i} = \frac{N_{S_o}}{1 - 37\%}$$

$$N_{B_o} = N_{B_i} + 37\% * N_{S_i} \quad \rightarrow \quad N_{B_i} = N_{B_o} - \frac{37\%}{1 - 37\%} * N_{S_o}$$

Ce calcul indique que les cellules réellement tombées sur les plots avec des billes magnétiques seraient au nombre de 35 (et non 49). Notons que le nombre de neurones avec ou sans billes au niveau des croisements n'a pas à être corrigé de cette façon, car aucune bille seule n'est observée sur ces zones du fait de l'absence d'aimants.

Malgré cette correction, nous pouvons conclure de cette expérience que 83% des cellules associées à des billes magnétiques ont été placées sur les aimants, ce qui est significativement supérieur au taux obtenu dans l'expérience contrôle avec 57% de cellules sur plots ($\varepsilon = 2,96$).

VI.5 Conclusion et perspectives

Notre collaboration avec une équipe de spécialistes du magnétisme à l'Institut Néel nous a permis de développer une méthode de placement cellulaire qui donne l'opportunité de placer simultanément un nombre *a priori* illimité de cellules sur des zones précises du substrat, non seulement dans le cadre du projet neuroFETs, mais aussi dans toute étude ultérieure où le placement de cellules sera nécessaire. Le développement technique de cette méthode n'est pas entièrement achevé, mais les éléments essentiels sont regroupés et nos prochains objectifs sont clairs. Dans le cadre du projet actuel, si l'on s'inspire de nos résultats et pour reprendre l'exemple du réseau triangulaire, un placement de chaque cellule avec un taux de réussite de 83% mènerait à $(83\%)^3 = 57\%$ de réseaux de trois neurones bien positionnés, contre $(57\%)^3 = 19\%$ sans placement magnétique. Nous avons donc atteint une amélioration du placement d'un facteur trois, que nous espérons encore perfectionner.

VI.5.1 Tri magnétique des cellules

Bien que les deux expériences que nous avons présentées valident la technique de placement, une observation importante est que le nombre de cellules qui ne sont pas en contact avec des particules magnétiques au moment de l'ensemencement est conséquent (60% de cellules sans billes dans la seconde expérience). Ce phénomène pourrait être supprimé par un tri préliminaire des cellules en suspension de façon à isoler celles qui sont attachées à des billes magnétiques. Pour cela, il pourrait suffire de placer un aimant sur un côté du tube contenant la suspension cellulaire, pour augmenter la densité relative de cellules attachées à des billes d'un côté de ce tube. Une deuxième solution, plus contraignante, consisterait à déposer les cellules et les billes magnétiques sur une surface passivée, c'est-à-dire où l'adhésion de cellules est impossible, puis de soulever les cellules qui adhèrent à des billes magnétiques grâce à un aimant au dessus de l'échantillon, pour les récupérer et enfin les ensemercer sur le substrat d'adhésion.

VI.5.2 Vers un contrôle micro-fluidique de l'ensemencement

Lors des cultures habituelles, les neurones sont ensemercés par ajout d'une goutte de suspension cellulaire dans le milieu de culture. Une agitation de quelques secondes permet d'homogénéiser la densité de cellules dans le volume de milieu, puis les cellules tombent sur le substrat par gravité. Si nous avons utilisé un tel protocole dans le cas des aimants, très peu de cellules auraient subi une attraction de la part des plots ou domaines magnétiques. En effet, le rayon d'action des aimants est de l'ordre de $10\mu\text{m}$ mais la distance entre plots cellulaires sur nos motifs est de l'ordre de

150 μm . Il est donc nécessaire d'augmenter les chances que les cellules passent à proximité des plots magnétiques.

Lors de l'ensemencement, nos tests ont été réalisés en faisant passer plusieurs fois la suspension cellulaire sur l'échantillon incliné, de sorte de maximiser les chances de capture des cellules par les pièges magnétiques, tout en minimisant le nombre de cellules qui adhèrent directement au substrat. Toutefois, la vitesse d'écoulement est très mal contrôlée et lorsqu'une goutte est déposée sur le substrat elle ne s'y étale pas parfaitement, ce qui fait que la plupart des cellules dans le volume de la goutte ne passent pas à proximité des plots magnétiques. Ensuite, la goutte laisse derrière elle un film de liquide dans lequel les cellules non piégées ont l'opportunité d'adhérer en des positions aléatoires.

Une solution qui est en cours de développement consiste à réaliser le dépôt des cellules à l'aide d'un canal micro-fluidique. En effet, un canal de PDMS (PolyDiMéthylSiloxane, gel bio-compatible et fréquemment utilisé dans les applications micro-fluidiques) d'une hauteur de l'ordre de 20 μm permettrait à la fois de faire passer toutes les cellules à proximité des plots magnétiques, ainsi que de contrôler le flux de suspension cellulaire (et en conséquence le taux de cellules qui sont piégées par les aimants). Si les pièges magnétiques sont suffisamment forts, il serait même possible de moduler le flux de liquide tout en observant la zone d'intérêt au microscope pour détacher d'éventuelles cellules qui adhéreraient au substrat sans interaction magnétique.

VI.5.3 Nocivité des champs magnétiques

De nombreuses études s'intéressent à l'effet des champs magnétiques sur les neurones. Jusque là, les seuls effets connus des champs magnétiques concernent des champs à haute fréquence et haute amplitude, ou bien des effets transitoires des champs statiques. Une équipe a notamment montré qu'une configuration particulière de champ magnétique statique peut mener à une inhibition partielle de neurones sensoriels dans les cinq minutes après le début de l'exposition au champ [17]. Mais au delà de ces cinq minutes, cette équipe n'a noté aucun effet. Dans notre cas, les champs rayonnés pendant la culture sont statiques et ne doivent donc pas avoir d'influence sur le développement et l'activité des neurones sur des durées de plusieurs semaines. Toutefois, nous privilégions le cas des plots formés de matériau magnétique "mou", pour lesquels le champ rayonné est nul dès que les cellules ont été ensemencées (car l'aimant qui définit le champ magnétique ambiant est enlevé du dessous de l'échantillon). Ainsi, aucun effet ne peut avoir lieu.

VI.5.4 Choix des particules

Outre les champs rayonnés, une question importante est de savoir si les particules magnétiques peuvent avoir un effet sur le développement des neurones. De toute évidence, l'éventuel effet dépend de la taille des particules.

Pour les plus petites que nous ayons testées ($200nm$), l'observation au microscope électronique à balayage montre des particules sur le pourtour des cellules et au niveau des lamellipodes et filopodes, mais pas sur la membrane des somas. Cela porte à penser que les cellules ont internalisé les particules à leur surface par endocytose. Toutefois nous n'en avons pas la certitude car les particules pourraient s'être regroupées sous les cellules. En cas d'endocytose, nous pouvons craindre que la cellule accumule les particules au cours de la croissance et les concentre au niveau du soma. En cas d'accumulation, ces particules pourraient perturber les fonctions biologiques, ce que nous devons éviter.

Pour les particules sphériques de $2\mu m$ au contraire, nous pouvons affirmer qu'elles ne sont pas internalisées par observation au microscope optique. Par conséquent, elles forment des zones d'adhésion de surface non négligeables par rapport à la surface du plot d'adhésion sur le motif BmW, ce qui pourrait influencer la façon dont la cellule répond aux motifs géométriques. Si le matériau des plots magnétiques est doux, alors les billes sont libres après mise en culture. Dans ce cas il est difficile de prévoir leur effet sur l'efficacité de polarisation des motifs géométriques : elles apportent une surface d'adhésion supplémentaire au soma, mais pas de support mécanique. Au contraire si le matériau magnétique est dur, alors les billes seront bloquées sur les aimants et pourraient ainsi faire office de point d'ancrage pour que la cellule ne se déplace pas trop sous l'effet des contraintes neuritiques. Les billes pourraient alors renforcer l'effet des motifs en participant à un meilleur positionnement des cellules, non seulement au début mais aussi pendant la culture.

Bibliographie

- [1] S.B. Jun, M.R. Hynd, N. Dowell-Mesfin, K.L. Smith, J.N. Turner, W. Shain, and S.J. Kim. Low-density neuronal networks cultured using patterned poly-l-lysine on microelectrode arrays. *Journal of neuroscience methods*, 160(2) :317–326, 2007. [187](#), [188](#)
- [2] M. Merz and P. Fromherz. Silicon chip interfaced with a geometrically defined net of snail neurons. *Advanced Functional Materials*, 15(5) :739–744, 2005. [187](#), [188](#), [190](#)
- [3] C. Wyart, C. Ybert, L. Bourdieu, C. Herr, C. Prinz, and D. Chatenay. Constrained synaptic connectivity in functional mammalian neuronal networks grown on patterned surfaces. *Journal of neuroscience methods*, 117(2) :123–131, 2002. [187](#)
- [4] L. Lauer, C. Klein, and A. Offenhäusser. Spot compliant neuronal networks by structure optimized micro-contact printing. *Biomaterials*, 22(13) :1925–1932, 2001. [187](#)
- [5] M. Scholl, C. Sprossler, M. Denyer, M. Krause, K. Nakajima, A. Maelicke, W. Knoll, and A. Offenhausser. Ordered networks of rat hippocampal neurons attached to silicon oxide surfaces. *Journal of neuroscience methods*, 104(1) :65–75, 2000. [187](#)
- [6] Y. Nam, D.W. Branch, and B.C. Wheeler. Epoxy-silane linking of biomolecules is simple and effective for patterning neuronal cultures. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(5) :589–597, 2006. [187](#)
- [7] Z. Zhang, R. Yoo, M. Wells, T.P. Beebe, et al. Neurite outgrowth on well-characterized surfaces : preparation and characterization of chemically and spatially controlled fibronectin and rgd substrates with good bioactivity. *Biomaterials*, 26(1) :47–61, 2005. [187](#)
- [8] J. Erickson, A. Tooker, Y.C. Tai, and J. Pine. Caged neuron mea : A system for long-term investigation of cultured neural network connectivity. *Journal of neuroscience methods*, 175(1) :1–16, 2008. [187](#), [189](#)
- [9] A.K. Vogt, L. Lauer, W. Knoll, and A. Offenhäusser. Micropatterned substrates for the growth of functional neuronal networks of defined geometry. *Biotechnology progress*, 19(5) :1562–1568, 2003. [188](#)
- [10] A.K. Vogt, G. Wrobel, W. Meyer, W. Knoll, and A. Offenhäusser. Synaptic plasticity in micropatterned neuronal networks. *Biomaterials*, 26(15) :2549–2557, 2005. [189](#)
- [11] P. Fromherz. Nanoelectronics and information technology, 2005. [189](#)
- [12] F. Patolsky, B.P. Timko, G. Yu, Y. Fang, A.B. Greytak, G. Zheng, and C.M. Lieber. Detection, stimulation, and inhibition of neuronal signals with high-density nanowire transistor arrays. *Science*, 313(5790) :1100, 2006. [189](#), [190](#)
- [13] Q. Qing, S.K. Pal, B. Tian, X. Duan, B.P. Timko, T. Cohen-Karni, V.N. Murthy, and C.M. Lieber. Nanowire transistor arrays for mapping neural circuits in acute brain slices. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5) :1882, 2010. [189](#)
- [14] O. Feinerman, A. Rotem, and E. Moses. Reliable neuronal logic devices from patterned hippocampal cultures. *Nature Physics*, 4(12) :967–973, 2008. [190](#), [191](#)
- [15] JL Dormann. Le phénomène de superparamagnétisme. *Revue de Physique Appliquée*, 16(6) :275–301, 1981. [200](#)
- [16] F. Dumas-Bouchiat, LF Zanini, M. Kustov, NM Dempsey, R. Grechishkin, K. Hasselbach, JC Orlianges, C. Champeaux, A. Catherinot, and D. Givord. Thermomagnetically patterned micromagnets. *Applied Physics Letters*, 96 :102511, 2010. [201](#)
- [17] MJ McLean, RR Holcomb, AW Wamil, J.D. Pickett, and AV Cavopol. Blockade of sensory neuron action potentials by a static magnetic field in the 10 mt range. *Bioelectromagnetics*, 16(1) :20–32, 1995. [207](#)

Conclusion générale

Dans ce travail de thèse, nous avons exploré un ensemble de modifications de l'environnement cellulaire et analysé leurs conséquences dans le développement et la polarisation neuronale.

Tout d'abord, nous avons révélé la sensibilité des cellules à l'étendue de la surface d'adhésion dont elles disposent. Les neurones qui adhèrent uniquement sur le sommet de pics formant une rugosité sub-micrométrique voient leur croissance accélérée. Par ailleurs, sur la surface confinée mais continue que forment des lignes ou des plots adhésifs, les cellules s'étalent latéralement sur toute la surface qui leur est offerte, et la longueur des neurites augmente pour une faible surface d'adhésion. Il semble donc que la cellule puisse intégrer la surface qu'elle occupe, et que les contraintes cellulaires puissent apporter quelques pistes à la question fondamentale de la régulation du développement cellulaire. Plus précisément, c'est la perception latérale des discontinuités d'adhésion plus qu'une reconnaissance longitudinale d'une route privilégiée de croissance qui pourrait contrôler cette taille ⁽⁵⁾. Pour explorer plus avant cette question, nous avons débuté une étude systématique du développement neuritique et de la surface occupée par la cellule sur des lignes de différentes largeurs.

La compétition neuritique, que nous avons interprétée dans un modèle phénoménologique comme un mécanisme d'essais-erreurs, s'est révélée comme étant un élément fondamental de la polarisation axonale. Ce processus permet en effet de contrôler la direction de différenciation de l'axone par l'environnement, en particulier physique, de la cellule. Sur les motifs d'adhésion, nous avons vu que la forme générale de la surface destinée à la cellule définit un équilibre des tensions et un placement du centrosome, qui peuvent être exploités pour influencer le choix de l'axone. Un autre facteur géométrique, la présence d'ondulations sur les lignes de croissance neuritique, permet d'inhiber la différenciation de l'axone dans certaines directions. Nous avons attribué la responsabilité de cet effet à la formation de structures inédites, les étirements et séparations neuritiques, dont l'aspect dynamique pourrait réduire les ressources nécessaires à la croissance. Ces résultats seront mis à profit dans le projet NeuroFETs, afin de réaliser des réseaux de neurones modèles

5. Raisonnement en accord avec la croissance neuritique accélérée rapportée sur un réseau parallèle de tranchées de dimensions sub-micrométriques en profondeur et largeur (voir p.151).

de façon beaucoup plus reproductible qu'en l'absence de contraintes. Enfin, nous avons vu que la compétition neuritique peut être influencée par la topologie de la surface d'adhésion, car une nette préférence pour une surface rugueuse est observée dans le cadre de la détermination de l'axone pour les neurones à la frontière entre zone rugueuse et plane. Bien que ces résultats ne puissent être mis à profit dans le projet NeuroFETs pour des raisons de compatibilité technologique, il est envisageable de combiner les rugosités et les motifs d'adhésion pour améliorer le contrôle de la polarisation axonale. De plus, la rugosité pourrait être exploitée pour réaliser des électrodes, car les surfaces rugueuses se caractérisent aussi par une amélioration du transfert de signaux électriques.

L'influence des caractéristiques physiques de l'environnement dans le développement neuronal, et en particulier dans le contrôle de la polarisation, fait appel à des mécanismes complexes qui doivent être abordés selon différents points de vue pour être compris dans leur ensemble. Dans nos travaux, nous contribuons à cette description par le point de vue de la mécanique cellulaire, et dans ce cadre des structures telles que les vagues sont particulièrement intéressantes. Nous avons en effet mis en évidence leur implication dans la génération de tension neuritique, et montré que leur fréquence d'émission dépend de la surface d'adhésion au niveau du soma. De plus, les vagues pourraient faire partie intégrante du processus d'inhibition de la différenciation axonale sur les motifs avec lignes ondulées. Leur impact dans la compétition neuritique pourrait reposer sur la tension elle-même, ou sur une réorganisation du cytosquelette lors de leur passage, ou encore sur une augmentation de la vitesse moyenne de croissance dans le cadre de notre hypothèse d'une rétroaction positive de l'émission des vagues.

Il est possible que le rôle de structures génératrices de forces comme les vagues dans la croissance et la polarisation se traduise dans d'autres types neuronaux par des processus plus discrets, mais tout aussi importants. Les neurones artificiellement bipolaires que nous avons créés présentent ainsi des comportements similaires (caryokinèse et mouvement oscillatoire du soma) à ceux des neurones bipolaires de l'éminence ganglionnaire en migration lors de l'embryogenèse. Le mouvement du centrosome à l'avant du soma est alors régi par un renflement du prolongement leader identifié comme une structure générant des forces. L'analogie entre polarisation et migration est d'ailleurs évidente dans notre système par simple changement de référentiel de coordonnées, ce qui nous a conduit à la réalisation de gradients de largeur de ligne pour étudier plus avant le lien entre ces deux phénomènes en perspective de ce travail.

Enfin, nous avons développé une technique de placement magnétique des neurones conjuguée à des motifs d'adhésion qui apportera une maîtrise du positionnement cellulaire indispensable dans la conduite du projet NeuroFETs. Cette technique, qui offre la possibilité de positionner des objets biologiques, pourrait être utilisée dans un grand nombre d'applications où la répartition et

la position relative des cellules sur un substrat serait primordiale.

Nous avons utilisé dans ce travail des outils et des approches issues de la physique pour l'étude de phénomènes biologiques. Le développement neuronal est intrinsèquement lié à des phénomènes mécaniques. Ceux-ci jouent un rôle dans le processus particulier de la polarisation axonale, notamment à travers les propriétés mécaniques du cytosquelette. En conséquence de ce travail, un ensemble de travaux doivent être menés, avec une approche biologique, pour étudier les mécanismes moléculaires, les régulations et les réponses spécifiques qui pourraient être impliquées dans ces phénomènes.