



HAL
open science

Micro/Nano ingénierie pour le contrôle de la croissance de cellules neuronales et l'élaboration d'une bioprothèse cérébrale à base de cellules souches organisées

Amélie Bédier

► **To cite this version:**

Amélie Bédier. Micro/Nano ingénierie pour le contrôle de la croissance de cellules neuronales et l'élaboration d'une bioprothèse cérébrale à base de cellules souches organisées. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2012. Français. NNT: . tel-00766823

HAL Id: tel-00766823

<https://theses.hal.science/tel-00766823>

Submitted on 19 Dec 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.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Amélie BEDUER

Le 28 septembre 2012

Titre :

Micro/Nano Ingénierie pour le contrôle de la croissance de cellules neuronales
et l'élaboration d'une bioprothèse cérébrale à base de cellules souches
organisées

ED SDM : Nano-physique, nano-composants, nano-mesures - COP 00

Unité de recherche :

LAAS-CNRS

Directeur(s) de Thèse :

M. Christophe VIEU, Professeur, INSA Toulouse

Mme Isabelle LOUBINOX, Chargée de Recherches, INSERM, CHU Purpan, Toulouse

Rapporteurs :

François Berger, Neuro-oncologue, CLINATEC, Université Joseph Fourier, CHU Grenoble

Emmanuel Delamarche, Chargé de recherches, IBM Zürich, Suisse

Autre(s) membre(s) du jury :

Alain-Michel Boudet, Professeur émérite, Université Paul Sabatier Toulouse III

François Chollet, neurologue, CHU Purpan, INSERM, Toulouse

Christophe Lanneau, Chargé de recherches, SANOFI, Chilly-Mazarin

Laurent Malaquin, Chargé de recherches, Institut Curie, Paris

Remerciements

**« La reconnaissance est la mémoire du cœur »
Hans Christian Andersen**

Ces trois dernières années ont été d'une grande intensité, tant du point de vue scientifique, que du point de vue humain. Je tiens ici à remercier chaleureusement les personnes et les organismes qui m'ont permis de vivre avec passion cette expérience de partage, de découverte et d'interdisciplinarité. Je remercie le LAAS, et ses directeurs successifs, Jean-Louis Sanchez et Jean Arlat. Ce grand laboratoire développe ses activités à l'interface avec le vivant et permet à ses doctorants de travailler dans des conditions confortables. Merci aussi à l'ITAV – centre Pierre Potier de l'oncopôle de Toulouse et à ses directeurs successifs, Martine Knibiehler et Bernard Ducommun.

Cette thèse a été menée en collaboration entre le LAAS-CNRS et l'unité 825 de l'INSERM et co-dirigée par Christophe Vieu et Isabelle Loubinoux. Je remercie mes deux encadrants de s'être associés pour la première fois, autour d'un projet commun ambitieux, représentant de nouveaux défis, et notamment celui de comprendre le monde de l'autre sans le caricaturer. Cela a constitué une fondation solide pour construire la suite, présentée dans ce manuscrit. Christophe, merci de m'avoir confié ce projet. Merci d'avoir soufflé dans ma voile, comme tu le dis, mais aussi d'avoir été un phare, auquel me repérer. Je te remercie pour ton soutien, dans mes activités de recherche, mais aussi dans mes activités d'enseignement. Ton optimisme, ta confiance en l'avenir, et ton esprit solidaire sont autant d'encouragements qui m'ont amenés à me surpasser. Isabelle, merci pour ta force de persuasion et ton enthousiasme. Je te remercie de m'avoir guidée dans les expériences in vivo. Cette image de toi vérifiant mes gestes techniques par-dessus mon épaule restera dans ma mémoire.

Mes pensées vont aussi à Laurence Vaysse et Emmanuel Flahaut, j'ai énormément appris à votre contact, durant ces trois années. Laurence, merci pour tes explications sur la culture des neurones et sur le cerveau. Nos discussions m'ont beaucoup aidée. Je continuerai de prendre exemple sur ta rigueur et sur ton sens pratique. Emmanuel, tu m'as fait découvrir le monde des nanotubes, leur synthèse et leur mise en suspension (ou devrai-je dire leur mise en solution, avantageusement leur dispersion colloïdale ? ;-). Notre collaboration a été un réel plaisir, merci pour ta confiance et ta curiosité. Mes pensées aussi à Florent A., Renaud et Inés.

Je souhaite remercier les bourses L'Oréal- UNESCO-Académie des Sciences et les différents membres de l'organisation et du jury, pour m'avoir démontré leur confiance.

Merci à l'ensemble du groupe Nanobiosystèmes du LAAS et à l'équipe Bionano de l'ITAV, aux personnels des différentes plate-formes et laboratoires dans lesquels j'ai travaillé. Merci à Childerick, Franck, Jacques, Laurent, Adrian, David et à l'ensemble du service TEAM du LAAS et des plate-

formes de l'ITAV. Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont apporté de l'aide, lorsqu'au début, la physicienne que je suis débutait dans la culture cellulaire. Un coup d'œil dans ma boîte de pétri, un échange de protocole ou des discussions au coin de l'incubateur... Merci à Christelle V., Guillaume, Martine, Annaïck, Jennifer, Odile...

Je tiens à remercier également les doctorants avec qui j'ai partagé des moments conviviaux, autour d'un coca, d'un microscope, d'un bécher, d'une Guinness, d'une pizza ... Nous avons un bout d'histoire commune. Merci en particulier Florent, de bons et nombreux souvenirs ensemble, à Toulouse et ailleurs, merci pour cette complicité et solidarité. Merci Aline, pour tes conseils avisés et bienveillants, pendant et après nos thèses respectives. Merci aussi Sven, Angélique, Jon pour votre bonne humeur et votre amitié. Mes pensées également à l'effet Florian, Carlos, Denis, Amandine, Laurène, Pattamon et aux p'tits nouveaux à qui je souhaite beaucoup de réussite.

Je n'oublie pas mes amis, qui me font toujours oublier mes petits tracas de la vie, vous êtes une immense richesse. Enfin, je remercie ma famille, mon arbre solide. Merci en particulier à mes parents, votre soutien et nos discussions m'aident souvent à voir plus clair quand je suis dans le brouillard. Clément, merci de croire en moi comme tu le fais.

***« Quoi que tu rêves d'entreprendre, commence-le.
L'audace a du génie, du pouvoir, de la magie. »***

Johann Wolfgang von Goethe

Sommaire

SOMMAIRE	1
LISTE DES ABBREVIATIONS	5
PREAMBULE GENERAL	7
PARTIE 1: ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE DES CELLULES NEURONALES ET DES SURFACES INGENIEREES AUX ECHELLES MICRO ET NANOMETRIQUES.	9
Introduction	12
CHAPITRE 1 – CONCEPTS FONDAMENTAUX SUR L’INTERACTION ENTRE UNE CELLULE ET UNE SURFACE : CAS DU NEURONE	14
1. Informations sur les cellules et leur développement <i>in vitro</i>	14
2. La croissance du neurone sur une surface ingénierée.....	31
3. Positionnement des travaux de thèse.....	48
CHAPITRE 2 - INTERACTIONS ENTRE DES CELLULES NEURONALES ET DES SURFACES INGENIEREES A L’ECHELLE MICROMETRIQUE	49
1. Matériel et méthodes	50
2. Résultats	71
3. Discussion de l’influence de la géométrie des microsillons sur le comportement de trois types de cellules neuronales	97
4. Exploitation des effets d’alignement des neurites dans une perspective d’ingénierie cellulaire	107
5. Conclusion	112
CHAPITRE 3 - INTERACTIONS ENTRE DES CELLULES NEURONALES ET DES NANOTUBES DE CARBONE	114
1. Pourquoi s’intéresser aux interactions entre les cellules neuronales et les nanotubes de carbone ?	114
2. Résultats de surfaces comportant des NTCs générées pour la culture cellulaire	116
3. Effet des NTCs sur la culture de cellules neuronales	120
4. Elucidation du rôle des NTCs sur la culture cellulaire	126
5. Vers de nouveaux procédés de culture cellulaire sur des couches de NTCs ?	136

6. Conclusion	156
CONCLUSION PARTIE 1.....	158
PARTIE 2 : TRANSFERT DES ETUDES IN VITRO VERS UNE APPLICATION MEDICALE : REALISATION D'UNE BIOPROTHESE INGENIEREE POUR LA REGENERATION DE RESEAUX NEURONAUX.....	159
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION ET POSITION DE L'ETUDE	162
1. Pourra-t-on réparer le cerveau en cas de lésion ?	162
2. Les bio-échafaudages pour la reconstruction dans le système nerveux central.....	167
3. Conclusion	175
CHAPITRE 2 - FABRICATION D'UNE BIOPROTHÈSE CÉRÉBRALE	177
1. Fabrication d'une bioprothèse de première génération.....	177
2. Fabrication d'une bioprothèse de deuxième génération	191
3. Conclusion	197
CHAPITRE 3 – PREMIERS ESSAIS IN VIVO.....	199
1. Introduction.....	199
2. Modèle animal	199
3. Modèle lésionnel	202
4. Implantation des bioprothèses et premiers résultats de récupération fonctionnelle	208
5. Analyse des résultats.....	217
6. Perspectives	219
CONCLUSION PARTIE 2.....	221
CONCLUSION GENERALE.....	222
BIBLIOGRAPHIE	223
ANNEXES	235
<i>Annexe 1 : Procédés de photolithographie pour la fabrication de moules de silicium</i>	<i>236</i>
<i>Annexe 2 : Résultats de mesures d'angles de goutte sur le PDMS</i>	<i>238</i>
<i>Annexe 3 : Protocoles de culture des cellules.....</i>	<i>240</i>
<i>Annexe 4 : Comparaison de plusieurs méthodes de traitement des images en fluorescence</i>	<i>245</i>

<i>Annexe 5 : Matériel et méthodes pour la réalisation de couches et de motifs de nanotubes de carbone</i>	247
1. Réalisation d'une suspension stable de nanotubes de carbone	247
2. Réalisation de couches minces de nanotubes de carbone par dépôt par pulvérisation	249
3. Mise au point d'une méthode permettant de réaliser des micro-motifs de NTCs	254
<i>Annexe 6 : Réflexions personnelles</i>	260
Quelques pistes de réflexions sur les enjeux règlementaires et éthiques liés à mes recherches	260

Liste des abréviations

AFM	Atomic force microscope
ATCC	American type culture collection
ATP	Adénosine triphosphate
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BSA	Bovine serum albumine
CCVD	Catalytic chemical vapor deposition
CMC	Carboxymethylcellulose
CVD	Chemical vapor deposition
DAPI	Diamidino-2-Phenylindole
EGF	Epidermal growth factor
FGF	Facteur de croissance fibroblastique
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
iPS	Cellule souche pluripotente induite
MEA	Multy electrode array
MEC	Matrice extracellulaire
NGF	Nerve growth factor
NTC	Nanotube de carbone
PBS	Phosphate buffered saline
PCL	Polycaprolactone
PDMS	Polydimethylsiloxane
PEI	Polyéthylène immine
PET	Polyéthylène téréphtalate
PGA	Acide polyglycolique
PLA	Acide polylactique
PLL	Polylysine
PSM	Poste de sécurité microbiologique
QCM	Quartz crystal microbalance
RIE	Reactive ion etching
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SNC	Système nerveux central
SVF	Sérum de veau foetal
TRITC	Tetramethyl rhodamine isothiocyanate

Préambule général

Les aléas et les épreuves de la vie ont amené l'être humain à trouver des méthodes toujours plus efficaces pour remplacer un tissu, un membre ou un organe disparu. Pour pallier les déficiences du corps humain, l'utilisation de prothèses a été largement exploitée. Les premières prothèses de membres remontent à l'Antiquité et on les retrouve dans plusieurs textes anciens. Elles ne comportaient aucune articulation, elles étaient rigides et sculptées dans le bois, n'offrant qu'un support pour favoriser les déplacements. Dès le XV^e siècle, les mains articulées faites de fer forgé apparaissent. À cette époque, ce sont les horlogers et les serruriers qui se spécialisent dans la fabrication de prothèses et il n'est pas étonnant d'apprendre que le développement de ces nouvelles prothèses est concomitant avec le perfectionnement des automates. Ces exemples mettent en évidence l'intérêt de la forte coopération entre la « technique » et la médecine de l'époque. A travers les siècles, l'association de la technologie et de la médecine ont permis de faire des progrès incontestables, au point de pouvoir suppléer complètement un organe ou une partie du corps. Les stratégies thérapeutiques visant à pallier un déficit fonctionnel ou à remplacer une partie défectueuse du corps humain s'étendent à d'autres organes, et les matériaux qui les constituent ainsi que les technologies mises en œuvre pour les fabriquer sont de plus en plus perfectionnés. En cette année olympique, nous voyons par exemple pour la première fois un coureur, Oscar Pistorius, amputé sous les genoux à onze mois, s'élancer sur la piste de l'épreuve du 400m, muni de deux prothèses en carbone, aux côtés des coureurs dits « valides ».

La mise au point d'un cœur artificiel par les équipes du professeur Carpentier et de la société Carmat est aussi un exemple retentissant. Ce cœur artificiel, d'un coût estimé à 180 000 euros a débuté les phases d'essais clinique cette année et permettra peut être un jour à des patients de vivre durablement sans avoir besoin d'une greffe.

On peut légitimement se demander si l'homme pourra un jour être complètement réparé par la technologie et quelles en seront les limites. Lorsqu'il s'agit de réparer des tissus, les méthodes les plus courantes actuelles consistent en des greffes de tissus autologues ou issus de donneurs. Les dernières stratégies thérapeutiques développées se sont orientées vers l'utilisation de biomatériaux bioactifs, associant une greffe de cellules et des biopolymères servant d'échafaudage pour la confection des nouveaux tissus in vitro. Ces constructions, associant éléments naturels et artificiels ont donné lieu à des produits aujourd'hui commercialisés, tels que Apligraf® de l'entreprise Organogenesis, en vente aux Etats-Unis, qui associe des cellules de peau à une matrice de collagène pour accélérer la régénération de parties de peau endommagées.

Ces stratégies s'étendent aujourd'hui à la recherche sur les thérapies pour le cerveau, organe qui conserve encore une part d'inconnu, voire de mystère, et dont la lésion entraîne de lourds handicaps pour les patients.

C'est dans ce contexte passionnant que s'inscrivent mes travaux de thèse, visant à étudier les interactions entre des matériaux ingénierés et des cellules neurales, afin de créer une prothèse cérébrale pour la reconstruction tissulaire. Cette thèse, première initiative du groupe de recherche nanobiosystèmes du LAAS dans ce domaine, se trouve à la croisée de plusieurs disciplines : la physique et la technologie, la chimie des matériaux, la biologie cellulaire et la neurochirurgie. Ayant une formation en physique, je me suis captivée pour ce sujet, qui m'a permis de mettre à profit mes connaissances et compétences en physique au service d'un projet comportant des aspects d'études fondamentales et d'autres plus applicatifs. J'ai également acquis de nouvelles connaissances et compétences auprès de partenaires de différents horizons, associés autour de ce projet commun et sans qui cette thèse n'aurait pu exister. Ces partenaires sont l'INSERM (unité 825, équipe d'Isabelle Loubinoux) et le CIRIMAT (équipe d'Emmanuel Flahaut).

Ce manuscrit est composé de deux parties, qui peuvent être abordées de manière indépendante :

- La première partie est consacrée à l'étude *in vitro* des interactions entre des cellules neuronales, et notamment de cellules souches neurales adultes humaines, et des facteurs physiques et chimiques, aux échelles micro et nanométriques. Cette partie débute par une revue détaillée de la biologie du neurone et de son développement sur une surface. Le lecteur non spécialiste de ce domaine y trouvera les informations pour une meilleure compréhension des chapitres suivants. Le lecteur biologiste, pourra s'il le souhaite débiter sa lecture aux chapitres suivants, qui présentent les résultats obtenus.

- La deuxième partie de ce manuscrit est de nature plus appliquée et traite de la réalisation d'une bioprothèse pour le cerveau du murin, puis de son implantation, avec l'objectif de reconstruire une partie de tissus cérébraux lésés suite à un traumatisme. Le lecteur davantage intéressé par les issues applicatives de cette thèse pourra se reporter directement à cette deuxième partie et y découvrir les résultats de nos premiers essais *in vivo* menés chez le rat.

*PARTIE 1: Etude des interactions entre des
cellules neuronales et des surfaces ingénierées
aux échelles micro et nanométriques.*

PARTIE 1: ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE DES CELLULES NEURONALES ET DES SURFACES INGENIEREES AUX ECHELLES MICRO ET NANOMETRIQUES.	9
Introduction	12
CHAPITRE 1 – CONCEPTS FONDAMENTAUX SUR L’INTERACTION ENTRE UNE CELLULE ET UNE SURFACE : CAS DU NEURONE	14
1. Informations sur les cellules et leur développement <i>in vitro</i>	14
1.1 Le neurone, vue d’ensemble.....	14
1.2 Le cytosquelette, la charpente dynamique des cellules	18
1.3. Les mécanismes d’adhésion, de migration et de développement <i>in vitro</i> des cellules et du neurone en particulier.....	23
2. La croissance du neurone sur une surface ingénierée	31
2.1 Interactions entre les neurones et la microtopographie	33
2.2 Ingénierie combinant des indices physiques et chimiques	38
2.3 Interactions entre les neurones et des facteurs à l’échelle nanométrique	40
3. Positionnement des travaux de thèse	48
CHAPITRE 2 - INTERACTIONS ENTRE DES CELLULES NEURONALES ET DES SURFACES INGENIEREES A L’ECHELLE MICROMETRIQUE	49
1. Matériel et méthodes	50
1.1. Réalisation de microstructures sur la surface d’un matériau biocompatible	50
1.2. Culture de cellules neuronales.....	60
1.3. Méthode de quantification des résultats	66
2. Résultats	71
2.1. Effet de la microtopographie sur le comportement des cellules de la lignée de souris « neuro2a »..	71
2.2. Effet de la microtopographie sur le comportement des cellules de la lignée humaine « Luhmes » ..	75
2.3. Effet de la microtopographie sur le comportement des cellules souches neurales adultes humaines	86
3. Discussion de l’influence de la géométrie des microsillons sur le comportement de trois types de cellules neuronales	97
4. Exploitation des effets d’alignement des neurites dans une perspective d’ingénierie cellulaire	107
4.1. Etude de la limite de courbure des neurites.....	107
4.2. Vers une architecture neuronale tissulaire ?.....	110
5. Conclusion	112
CHAPITRE 3 - INTERACTIONS ENTRE DES CELLULES NEURONALES ET DES NANOTUBES DE CARBONE	114
1. Pourquoi s’intéresser aux interactions entre les cellules neuronales et les nanotubes de carbone ?	114
2. Résultats de surfaces comportant des NTCs pour la culture cellulaire	116
2.1. Caractérisation de couches homogènes obtenues par pulvérisation	116
2.2. Caractérisation de surfaces comportant des motifs de NTCs obtenus par pulvérisation et microcontact printing.....	117
2.3. Traitement des surfaces avant la mise en culture des neurones.....	119
3. Effet des NTCs sur la culture de cellules neuronales	120

3.1. Effet des couches de NTCs sur le développement de cellules neuronales issues de la lignée « neuro2a »	120
3.2. Effet des motifs de NTCs sur le développement de cellules neuronales issues de la lignée « neuro2a »	122
4. Elucidation du rôle des NTCs sur la culture cellulaire	126
4.1. Etude de l'adsorption de protéines sur des couches de NTCs par micro-balance à quartz	127
5. Vers de nouveaux procédés de culture cellulaire sur des couches de NTCs ?	136
5.1. Utiliser une couche de NTCs pour la culture de cellules en milieu pauvre en nutriments ?.....	136
5.2. Utiliser une couche de NTCs pour améliorer la différenciation des cellules souches adultes humaines ?	140
5.3. Utiliser une couche de NTCs pour améliorer la fonctionnalité de réseaux neuronaux et sa mesure ?	148
6. Conclusion	156
 CONCLUSION PARTIE 1.....	 158

Introduction

La cellule, élément unitaire des organismes vivants, est un système complexe, qui entretient de nombreuses interactions avec son environnement. Les cellules ont, pour la plupart, besoin de créer des liens avec un substrat afin de survivre et de se développer. En effet, seuls quelques types cellulaires particuliers, comme les globules sanguins ou les spermatozoïdes, sont capables de survivre dans un milieu purement liquide. Dans les tissus, les cellules adhèrent à des protéines de la matrice extracellulaire (par exemple la laminine) et elles se connectent les unes aux autres afin de constituer des tissus. Le comportement des cellules y est déterminé. Les cellules n'y ont pas de liberté d'action. Elles ne peuvent pas migrer, et elles établissent des contacts qu'à des endroits bien précis. Dans de telles conditions, la forme et les fonctions qu'elles acquièrent sont très reproductibles d'une cellule à l'autre, assurant ainsi une cohésion pour former des tissus répondant à une organisation fonctionnelle. L'acquisition de ces formes et fonctions est « programmée » et les mécanismes mis en place pour les acquérir impliquent une cascade de réactions biologiques. Il est difficile de comprendre ces mécanismes de manière générique car ils sont masqués par la multiplicité des interactions et par la variabilité des situations biologiques.

Pour mieux comprendre le fonctionnement des cellules, et également pour mettre en évidence certaines de leurs capacités invisibles in situ, on les cultive in vitro dans un environnement différent de leur environnement « naturel ». De nombreux procédés permettent de créer et moduler cet environnement en fonction des questions biologiques auxquelles on souhaite répondre. En particulier, on peut jouer sur les propriétés des surfaces sur lesquelles les cellules sont cultivées. Plusieurs paramètres sont engagés dans le contrôle des interactions entre les cellules et une surface. Parmi ces paramètres, on trouve la topographie à différentes échelles, y compris nanométrique, et la nature chimique de la surface des substrats. L'élasticité ou la rigidité des surfaces influencent aussi la capacité des cellules à adhérer, migrer, se multiplier et se développer. D'une manière globale, la fonction et la forme des cellules sont le résultat d'un ensemble de signaux de types spatial, chimique, topographique et mécanique. En leur donnant une surface de croissance qui combine de manière déterminée et intentionnelle certains de ces signaux, on peut observer certains types de comportements, voire même les contrôler. Les techniques de micro et nanofabrication permettent de fabriquer des surfaces dont on maîtrise finement le relief topographique ainsi que les propriétés chimiques, mécaniques et électriques. L'observation du comportement de cellules cultivées sur ces surfaces ingénierées est riche d'enseignements et permet de répondre à certaines questions biologiques. D'un point de vue applicatif, ces connaissances amènent à sélectionner et à mettre au point des biomatériaux répondant à des besoins précis, qui peuvent être par exemple de fournir aux cellules des surfaces qui soient permissives pour leur développement.

Dans la perspective de fabriquer une prothèse comportant des facteurs topographiques et/ou chimiques, favorisant l'adhérence et le développement de cellules souches neurales, nous étudions dans cette première partie de manuscrit les interactions entre différents types de cellules neurales et

des surfaces ingénierées aux échelles micro et nanométriques. Pour cela, nous fabriquons des surfaces comportant des indices topographiques et chimiques. Pour créer des surfaces pertinentes en fonction des questions biologiques auxquelles nous souhaitons répondre, j'ai rapidement acquis de nouvelles connaissances en biologie, appris à cultiver des cellules neurales ainsi qu'à en analyser leur comportement.

Dans un premier chapitre, nous expliquons quelques notions élémentaires de biologie, qui aideront le lecteur non familier avec la biologie cellulaire à comprendre la suite des travaux réalisés. Les deux chapitres suivants détaillent les deux stratégies expérimentales développées afin de mieux comprendre comment des cellules neurales, et des cellules souches adultes en particulier, interagissent avec des facteurs topographiques et chimiques présents à la surface d'un matériau.

Chapitre 1 – Concepts fondamentaux sur l'interaction entre une cellule et une surface : cas du neurone

Dans ce chapitre, nous proposons en premier lieu une vue d'ensemble sur le neurone et son fonctionnement. Ensuite, nous présentons les éléments clés de biologie qui nous permettront de comprendre comment une cellule interagit avec une surface. Puis, nous montrons comment l'utilisation de surfaces ingénierées à différentes échelles a permis de découvrir de nouveaux phénomènes sur le comportement des cellules. Enfin, nous exposons les problématiques qui nous ont particulièrement intéressés pendant ces travaux.

1. Informations sur les cellules et leur développement *in vitro*

1.1 Le neurone, vue d'ensemble

a. Le neurone, rôle et morphologie

Depuis le début du XXe siècle (1906) et les travaux du chercheur espagnol Santiago Ramon y Cajal, on sait que la pièce maîtresse du système nerveux central est le neurone. Cette cellule spécialisée est apparue très tôt au cours de l'évolution : on en trouve chez les vers, les insectes ou les mollusques. Le cerveau humain en comporterait environ cent milliards.

Les neurones organisés en réseaux forment le socle des fonctions motrices, perceptives, émotives ou cognitives. Ces réseaux sont caractérisés par une grande plasticité, ils évoluent constamment. Les connexions entre neurones peuvent se renforcer ou disparaître, et de nouvelles connexions peuvent être créées. Ce phénomène de plasticité permet notamment l'apprentissage et est à l'origine de la mémoire. Tout en ayant des spécificités moléculaires, morphologiques et fonctionnelles, les différents types de cellules nerveuses ont une structure de base semblable à celle des autres cellules. Ce sont des cellules eucaryotes. Elles comportent un corps cellulaire contenant un noyau, un réticulum endoplasmique, un appareil de golgi, des mitochondries ainsi que les autres organites nécessaires au fonctionnement d'une cellule.

La spécificité des cellules nerveuses vient de leur spécialisation pour la communication intercellulaire. Cette propriété se manifeste dans :

- leur morphologie générale (présence de dendrites et d'un axone)
- la spécialisation de leur membrane pour la signalisation électrique
- la complexité de leurs contacts synaptiques.

Leur particularité morphologique générale tient aux expansions cellulaires, appelées arborisations dendritiques (ou arborisations neuritiques dans le cas de neurones en développement). Il existe deux types de prolongements, les dendrites et l'axone, qui accomplissent des rôles biologiques différents (voir Figure 1a). Lorsque le développement des neurones n'est pas terminé, on ne peut pas distinguer l'axone des dendrites et on parle alors de « neurites » et d'arborescence neuritique pour désigner l'ensemble de ces prolongements. Autour des corps cellulaires (aussi appelés « somas »), ces prolongements plus ou moins longs s'étendent, leur permettant de se connecter à d'autres neurones.

Les dendrites et le corps cellulaire sont les récepteurs du neurone, ils reçoivent et intègrent des signaux provenant d'autres neurones du réseau. L'axone constitue le pôle émetteur, il transmet le signal depuis son origine sur le corps cellulaire vers les neurones suivants. Le mécanisme par lequel l'axone transmet un signal est le potentiel d'action. Il s'agit d'un signal qui se propage depuis son lieu d'origine, le segment initial de l'axone (ou cône axonique) au niveau du corps cellulaire, jusqu'à l'extrémité de l'axone. Au bout de l'axone, un groupe de contacts synaptiques s'établit avec d'autres cellules. La communication entre neurones s'effectue via des synapses, jonctions cellulaires où le signal est transmis le plus souvent par voie chimique.

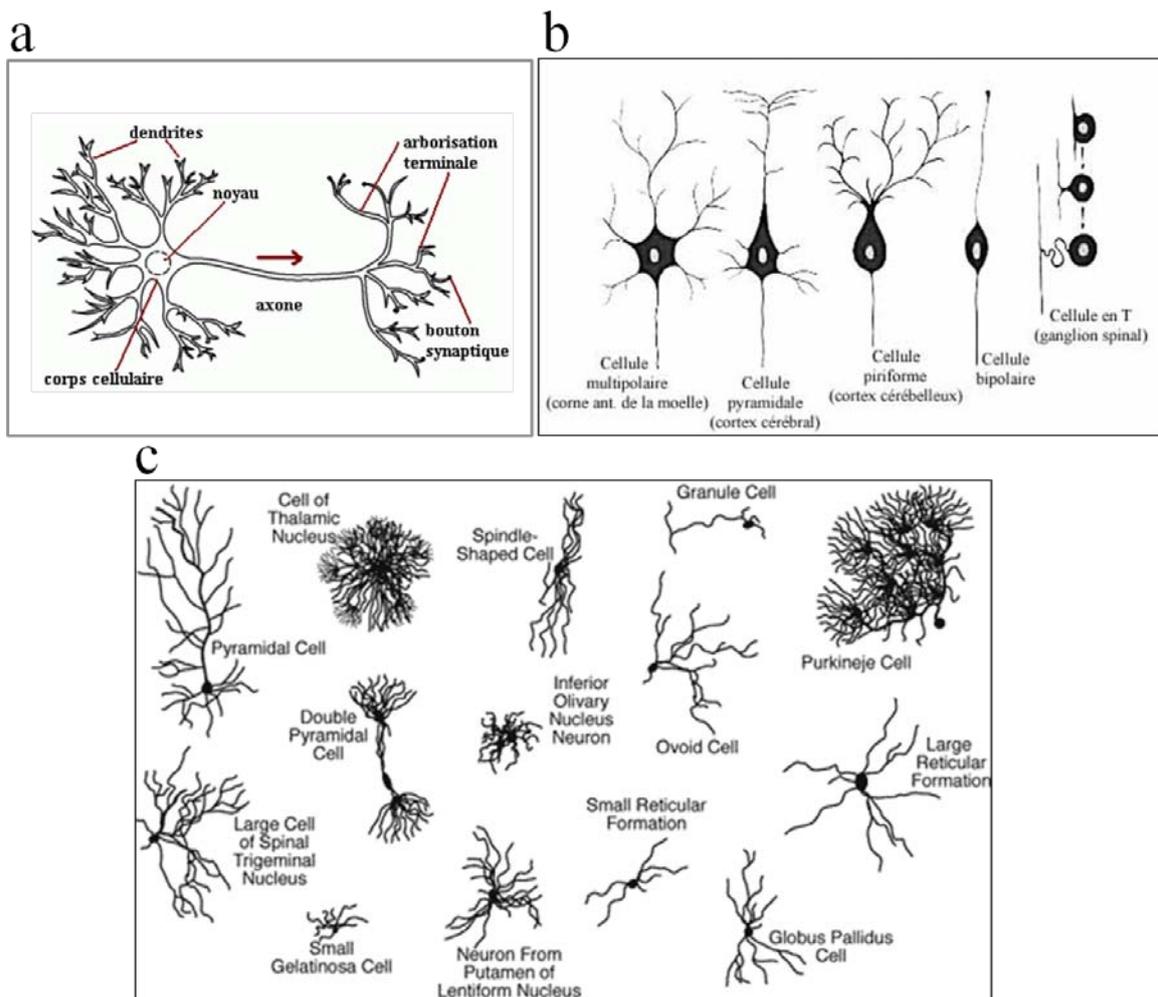


Figure 1 : Schémas illustrant la morphologie des neurones. a : schéma des différentes parties d'un neurone. b : représentation des différents types de morphologie que peuvent avoir les neurones. c : exemples d'arborisations dendritiques de neurones que l'on trouve dans différents tissus.

La gamme des configurations de l'arborisation neuritique va d'une petite minorité de cellules complètement dépourvue de dendrites jusqu'à des neurones dont l'arborisation neuritique est très développée. La Figure 1b et c montre des exemples de configurations neuronales. Ainsi, la géométrie de l'axone et des dendrites diffère selon le type de neurones. Il existe par exemple des neurones multipolaires qui ont un long axone et plusieurs dendrites, des cellules bipolaires, qui ont un axone et un dendrite ou encore des cellules « en T », ou cellules « pseudo-unipolaires » qui ont un unique prolongement qui se divise en deux.

Le nombre d'afférences que reçoit un neurone donné dépend de la complexité de son arborisation dendritique. Les cellules nerveuses qui n'ont pas de dendrites ne sont innervées que par un petit nombre d'autres neurones, voire par un seul. En revanche, celles dont l'arborisation dendritique est plus élaborée reçoivent une innervation d'un grand nombre de neurones.

b. Les autres types cellulaires du système nerveux

Les études histologiques effectuées au 19^{ème} siècle par Cajal, Golgi, et leurs successeurs ont montré que le système nerveux n'est pas seulement composé de neurones, mais également d'une variété d'autres cellules, dites « cellules de soutien ». Contrairement aux neurones, ces dernières sont incapables d'émettre des signaux électriques. Dans le système nerveux central, elles sont essentiellement des cellules de la névroglie, aussi appelées cellules gliales. Leurs fonctions de soutien contribuent à maintenir les neurones en l'état d'émettre des signaux. En particulier, elles participent au maintien de l'environnement ionique des neurones, à la modulation de fréquence de propagation des signaux nerveux, à la modulation de l'action synaptique [1]. Ces cellules servent d'échafaudage¹ dans certains cas du développement neural [2].

Dans le système nerveux central adulte, il y a trois types de cellules gliales qui sont :

- les astrocytes : ils maintiennent un environnement chimique adéquat pour la production de signaux nerveux [3].

- les oligodendrocytes : ils déposent autour de certains axones une gaine de myéline. Il s'agit d'une enveloppe riche en lipides, ayant des effets importants sur la vitesse de conduction du potentiel d'action.

- les cellules de la microglie : elles jouent essentiellement le rôle d'éboueurs en enlevant les résidus cellulaires lors d'une lésion ou du remplacement cellulaire.

¹ On entend par « échafaudage » une structure, qui peut être de nature biologique (un ensemble de cellules par exemple) ou de nature synthétique (un biomatériau par exemple) qui sert de support pour la croissance de cellules.

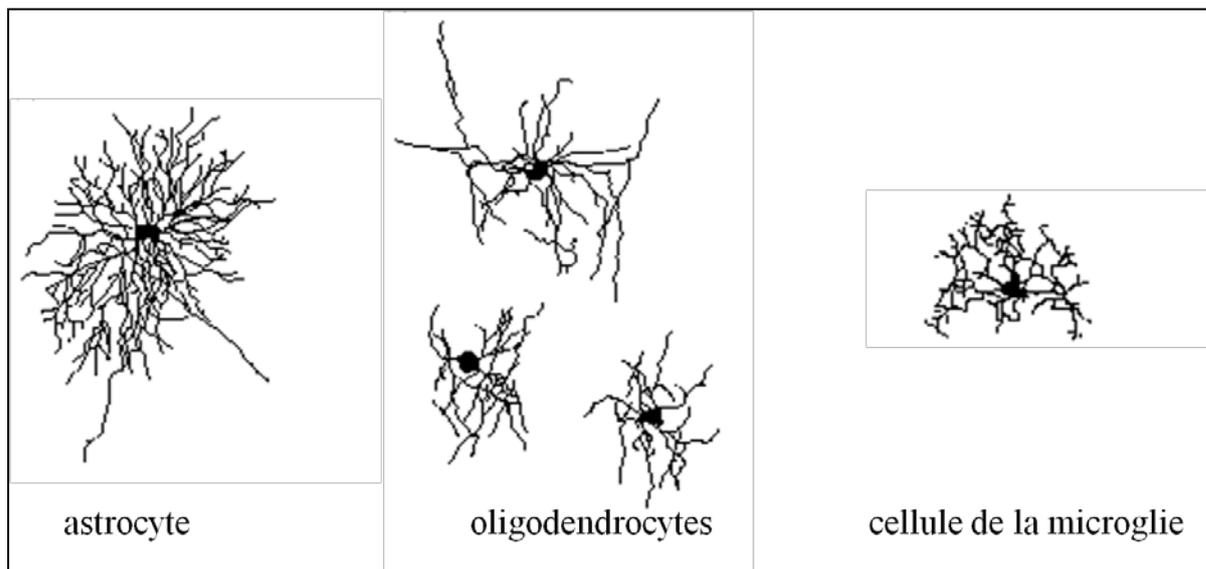


Figure 2 : schéma représentant les morphologies des cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes, cellules de la microglie).

c. Le cas particulier des cellules souches neurales adultes

Les neurones matures et différenciés ne peuvent pas se diviser. Cela ne signifie pas pour autant que tous les neurones qui forment le cerveau adulte ont été produits au cours du développement embryonnaire. En effet, dans les années 1980, Fernando Nottebohm et al. mirent en évidence la production de nouveaux neurones dans le cerveau de canaris adultes [4], [5]. Ces cellules nouvellement formées émettent des axones et des dendrites et s'intègrent dans des circuits synaptiques fonctionnels. Ce phénomène a depuis été observé dans le cerveau adulte de souris, de rats, de primates et de l'homme. Il s'agit toutefois d'un phénomène peu fréquent.

Comment le cerveau peut-il, à l'âge adulte, produire de nouveaux neurones si les neurones qu'il contient ne peuvent pas se diviser ? La réponse a été apportée par la découverte de cellules souches neurales dans la zone sous ventriculaire, qui produit les neurones durant le développement du cerveau. Au début des années 1990, l'isolement et la mise au point de cultures spécifiques de cellules souches neurales, notamment par la formation d'agrégats cellulaires en suspension (aussi appelés « neurosphères ») ont représenté une étape importante [6]. Ces cultures ont permis de démontrer que ces cellules possédaient les propriétés intrinsèques des cellules souches, à savoir : la capacité de conserver leur caractère immature au cours des divisions (autorenouvellement) et de générer plusieurs types de cellules (multipotence).

La différenciation de ces cellules souches peut ainsi donner, en fonction des signaux auxquels on les expose, des neurones ou des cellules gliales (astrocytes ou oligodendrocytes) (voir Figure 3).

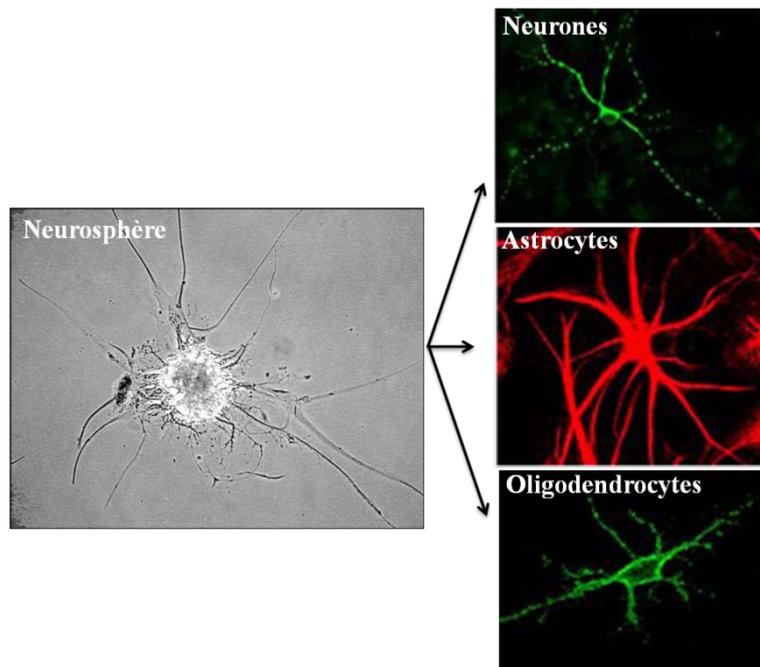


Figure 3 : Image d'une neurosphère (prise au microscope optique à contraste de phase) et des trois types de cellules qu'il est possible d'obtenir après avoir induit la différenciation : neurones, astrocytes et oligodendrocytes (images prises au microscope optique à fluorescence). D'après [7].

Les cellules souches du cerveau sont situées dans des niches, des régions qui rassemblent des conditions très particulières pour leur maintien en vie. Ces niches ont une organisation très complexe qui permet aux cellules souches d'interagir avec d'autres types de cellules, vasculaires, par exemple et de recevoir des signaux moléculaires précis tels que des facteurs de croissance, des morphogènes ou encore des facteurs d'adhésion maintenant les cellules dans un état d'immaturité et contrôlant leur entrée en différenciation. Les trois principales niches sont la zone sous-ventriculaire, la région du gyrus denté dans l'hippocampe et le canal central de la moelle épinière [8].

En dehors des niches, il existe un ensemble de cellules dites progénitrices neurales. Contrairement aux cellules souches, celles-ci ont une capacité de prolifération limitée et peuvent seulement se différencier en un nombre de types cellulaires restreint [9].

1.2 Le cytosquelette, la charpente dynamique des cellules

Les cellules eucaryotes ont des dimensions comprises entre quelques micromètres et plusieurs dizaines de micromètres. Pour qu'une cellule survive et se développe, des nutriments doivent lui parvenir depuis l'extérieur à travers la membrane plasmique et les déchets du métabolisme cellulaire doivent s'en évacuer. Pour rendre ces échanges possibles, les membranes sont percées de canaux et de pompes ioniques très sélectifs. D'autres molécules de la membrane servent de capteur et permettent à la cellule de recevoir et d'émettre des signaux avec son environnement.

Les cellules eucaryotes sont capables de prendre différentes formes, d'organiser leurs composants et de réagir à l'environnement. Cette dernière capacité nous a particulièrement intéressés au cours de

ces travaux de thèse. Cette faculté met en jeu le **cytosquelette** de la cellule, un réseau de filaments protéiques structurant qui s'étend à travers le cytoplasme.

Le cytosquelette est une structure très dynamique qui est continuellement réorganisée au fur et à mesure qu'une cellule change de forme, adhère, migre, se divise et répond à son environnement. Il est construit à partir de trois types de filaments protéiques : les filaments intermédiaires, les microtubules et les filaments d'actine. Chaque type de filament a des propriétés mécaniques spécifiques.

Dans les paragraphes suivants, nous décrivons la structure et la fonction des trois types de filaments afin de comprendre comment une cellule se développe sur une surface et se déplace. Nous montrons ensuite comment ces filaments sont organisés dans le cas particulier du neurone.

a. Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires peuvent être comparés à des cordes (voir Figure 4). Ils mesurent 10nm de diamètre et sont constitués de nombreux brins torsadés entre eux, ce qui leur donne une grande résistance à la traction. Ils sont répartis un peu partout dans la cellule (voir Figure 4a). Leur principale fonction est de permettre aux cellules de résister aux contraintes mécaniques, notamment de traction, auxquelles elles sont soumises. En s'étirant et en distribuant localement les effets des forces appliquées, ils empêchent les cellules de se déchirer [10].

On trouve des filaments intermédiaires dans le cytoplasme de presque toutes les cellules. On les regroupe en trois catégories :

- les filaments de kératine dans les cellules épithéliales
- les filaments de vimentine que l'on trouve notamment dans les tissus conjonctifs
- les neurofilaments dans les cellules nerveuses

Chaque type cellulaire ne semble posséder qu'un type de filament intermédiaire cytoplasmique.

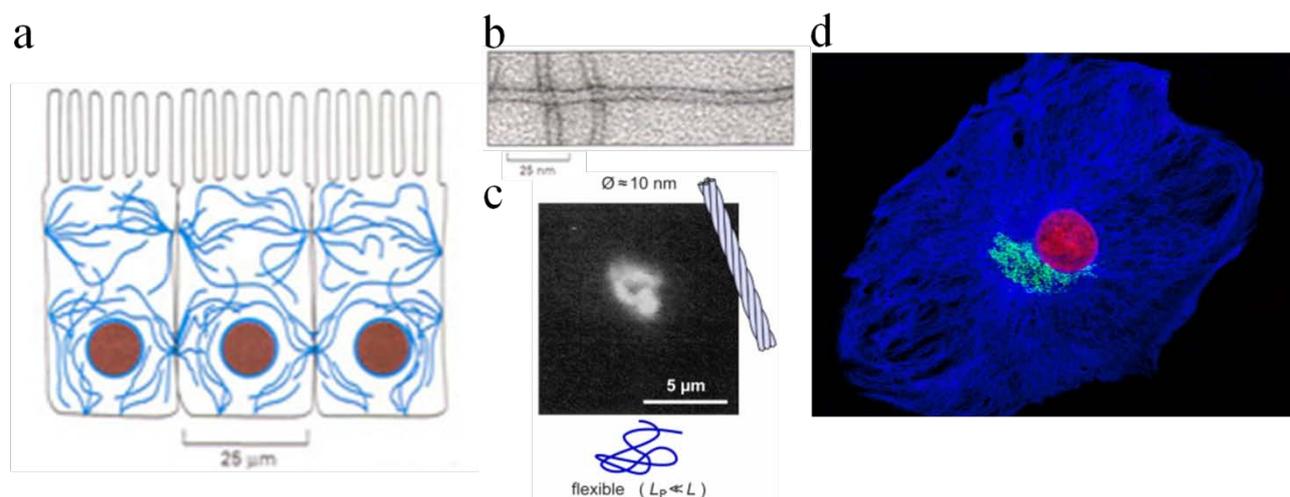


Figure 4 : **a.** Représentation des **filaments intermédiaires** dans une cellule. **b.** Image prise au microscope électronique en transmission d'un filament intermédiaire. **c.** Image prise au microscope optique en fluorescence d'un filament intermédiaire et schématisation de sa forme. **d.** Image prise au microscope à fluorescence d'une cellule de lignée BPAE (Bovine Pulmonary Artery Endothelial cell) (marquage avec un anticorps primaire anti-vimentine et anticorps secondaire fluorescent Alexa 568nm, bleu). L'appareil de Golgi a été marqué avec un anticorps primaire anti-GPP130 couplé à un anticorps secondaire fluorescent (Alexa 488nm, vert). Le noyau apparaît en rouge. D'après [11].

b. Microtubules

Dans toutes les cellules, les microtubules ont un rôle d'organisateur. Ce sont de longs tubes de protéines, qui peuvent rapidement se dissocier à un endroit et se réassocier à un autre. Ils ont un diamètre de 24nm et sont les filaments les plus rigides du cytosquelette (voir Figure 5). Ils sont formés de dimères de tubuline α et β .

Les microtubules se développent à partir d'une petite structure située près du centre de la cellule et appelée centrosome (voir Figure 5a). En s'étendant vers la périphérie de la cellule, ils créent à l'intérieur de celle-ci un système de rails le long duquel les vésicules, les organites et d'autres composants peuvent se déplacer. Le microtubule comporte une polarité structurelle, c'est-à-dire que sa structure a une direction définie. Cette polarité permet de définir la direction du transport intracellulaire [12].

Les microtubules en croissance font preuve d'une grande instabilité dynamique. Ils subissent ainsi continuellement des remaniements rapides, fondamentaux pour leur fonction. Dans une cellule, le centrosome envoie constamment de nouveaux microtubules dans toutes les directions, puis les rétractent, comme pour explorer l'espace. Cependant, si l'extrémité d'un microtubule sortant du centrosome est stabilisée de façon permanente en se fixant à une autre molécule ou structure cellulaire, il ne pourra pas se rétracter. Cette stabilisation sélective conduit à une réorientation de l'ensemble des microtubules et transforme la cellule en une cellule fortement polarisée.

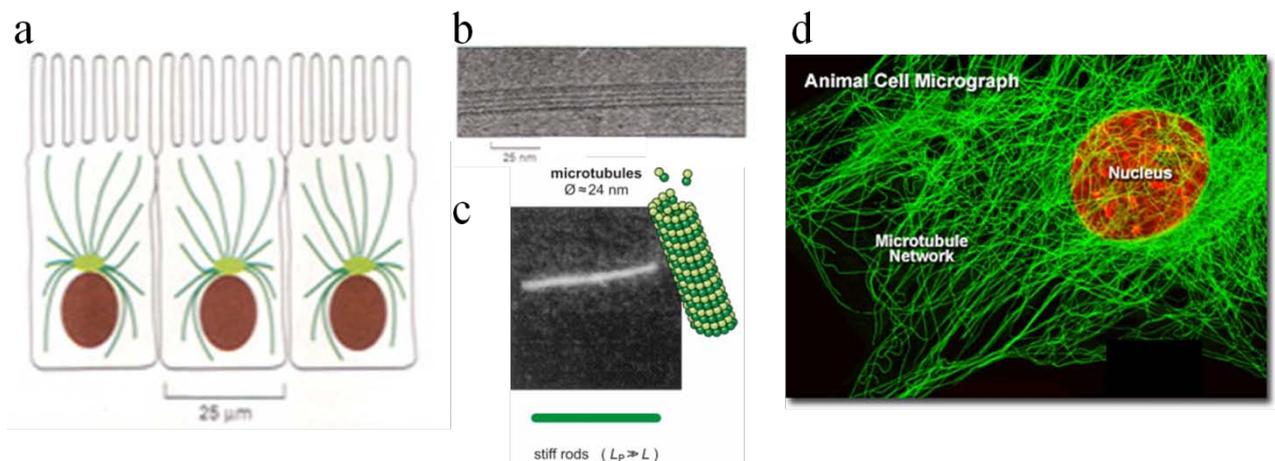


Figure 5 : **a.** Représentation des **microtubules** dans une cellule. **b.** Image prise au microscope électronique en transmission d'un microtubule. **c.** Image prise au microscope optique en fluorescence d'un microtubule et schématisation de sa forme. **d.** Image prise au microscope à fluorescence d'une cellule embryonnaire de souris (marquage avec un anticorps primaire spécifique de la tubuline alpha et anticorps secondaire fluorescent Alexa 488nm, vert). Le noyau de la cellule apparaît en rouge. D'après [13].

c. Filaments d'actine

On trouve des filaments d'actine dans toutes les cellules eucaryotes, ils jouent un rôle essentiel dans de nombreux mouvements, particulièrement ceux qui impliquent la surface cellulaire. Sans filaments d'actine, une cellule ne pourrait par exemple pas ramper sur une surface. Les filaments d'actine sont fins (diamètre d'environ 7nm) et flexibles (voir Figure 6). Ils se trouvent essentiellement à la périphérie des cellules (voir Figure 6a). Comme un microtubule, un filament d'actine a une polarité structurale. Un filament d'actine est instable par nature, il peut se dissocier à partir de ses deux extrémités. Cette capacité à s'assembler et à se désassembler est nécessaire à de nombreuses fonctions remplies par les filaments d'actine, comme pour la locomotion cellulaire. Nous reviendrons sur ce point plus spécifiquement dans le paragraphe 1.3.

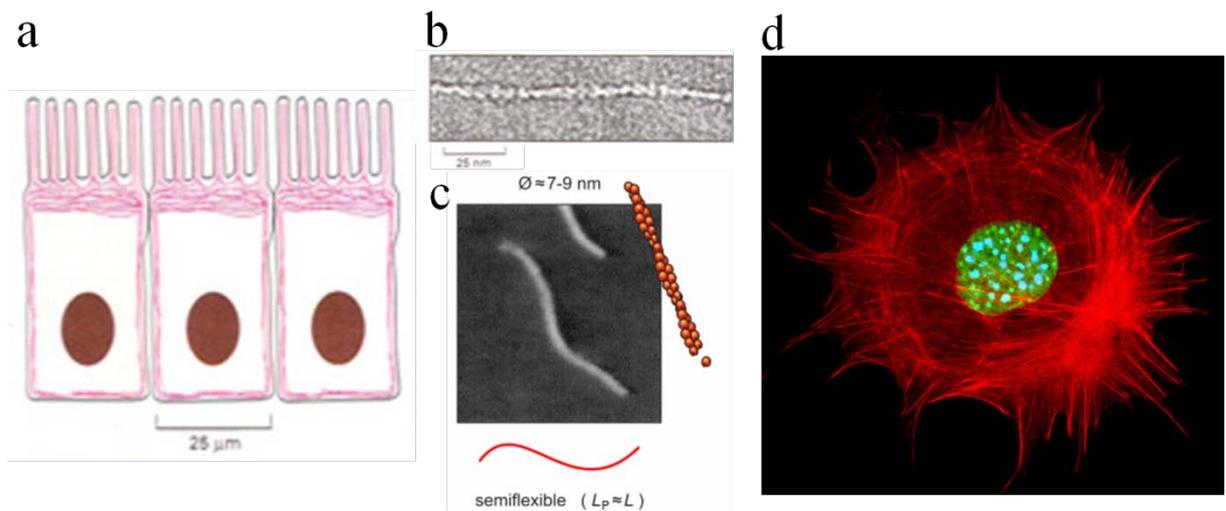


Figure 6 : **a.** Représentation des **filaments d'actine** dans une cellule. **b.** Image prise au microscope électronique en transmission d'un filament d'actine. **c.** Image prise au microscope optique en fluorescence d'un filament d'actine et schématisation de sa forme. **d.** Image prise au microscope à fluorescence d'une cellule épithéliale (marquage avec un anticorps primaire spécifique de l'actine et anticorps secondaire fluorescent Alexa 546nm, rouge). D'après [14].

Les filaments d'actine peuvent adopter différentes configurations, comme illustré sur la Figure 7 : filopode, lamellipode ou fibre de stress.

- **Les filopodes** sont des extensions fines et rigides. Ils permettent à la cellule de sonder son environnement local. En particulier, l'extrémité d'un axone, appelé cône de croissance, envoie des filopodes pour tester son environnement et détecter la voie la plus propice à son développement (voir paragraphe e suivant pour plus de détails sur cette structure).

- **Les lamellipodes** sont larges et plats, semblables à de fins feuillets. Ils donnent la direction du mouvement de la cellule.

- **Les fibres de stress** sont des amas épais de filaments d'actine. Elles servent notamment à la contraction cellulaire.

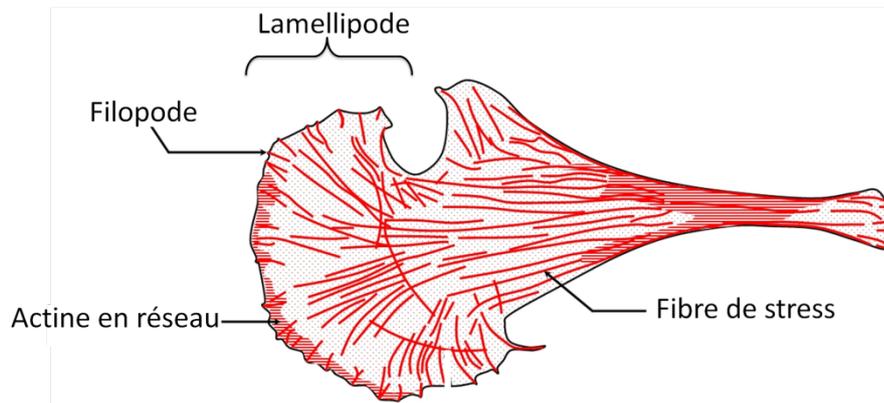


Figure 7 : **Organisation des filaments d'actine dans une cellule fibroblastique de cœur de poussin.**

d. Le cytosquelette du neurone

Les neurones sont des cellules eucaryotes qui étendent de longs prolongements pour établir des connexions dans le système nerveux. Ce sont des cellules fortement polarisées.

Comme les autres cellules, les neurones ont un cytosquelette qui est aussi composé des trois polymères suivants : les microtubules, les filaments intermédiaires, les filaments d'actine (respectivement en vert, violet et rouge sur la Figure 8).

- Les **filaments intermédiaires** se trouvent en grande quantité sur toute la longueur des neurites (axones et dendrites). Ils apportent un renforcement interne à ces extensions cellulaires longues et fines. Dans les neurones, les filaments intermédiaires sont nommés « neurofilaments ». Dans les cellules gliales, les filaments intermédiaires sont constitués de la protéine GFAP (glial fibrillary acidic protein)².

- Dans le neurone, les **microtubules** de l'axone (pôle émetteur) pointent dans la même direction. Ils servent de rails pour le transport de molécules synthétisées dans le corps cellulaire nécessaires au niveau de l'extrémité de l'axone et notamment pour le fonctionnement synaptique.

- L'**actine** s'organise plutôt à la périphérie des neurones, en réseau. A l'extrémité du cône de croissance, l'actine forme des filopodes, très dynamiques. Les boutons synaptiques (voir schémas d et g Figure 8) contiennent également un réseau d'actine dense auquel sont ancrées les vésicules de neurotransmetteurs.

² Le marquage en fluorescence spécifique des ces deux types distincts de filaments intermédiaires permet de distinguer les neurones des cellules gliales (astrocytes notamment).

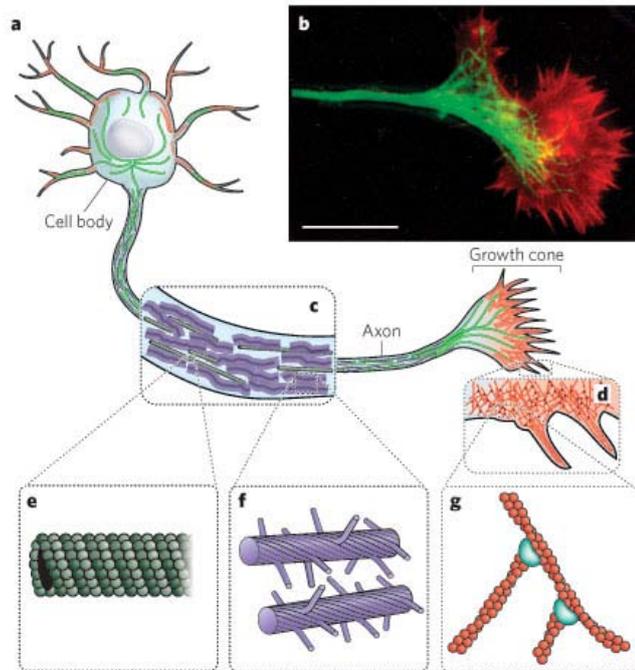


Figure 8 : **Constitution et organisation du cytosquelette des neurones.** **a.** Comme les autres cellules, les neurones ont un cytosquelette composé de microtubules (représentés en vert), de filaments intermédiaires (représentés en violet), de filaments d'actine (représentés en rouge). **b.** Image optique en fluorescence du cône de croissance d'un neurone, qui migre en réponse à des indices chimiques pendant le développement du système nerveux. Les microtubules (marqués en vert) émanent de l'axone et le réseau de filaments d'actine (marquée en rouge) forme une structure en forme de feuillet, comportant des filopodes en extension à son extrémité. Barre d'échelle = 20µm. **c.** Les dendrites et l'axone sont composés de microtubules, de neurofilaments. **d.** Le cône de croissance comporte des filaments d'actine en réseau et des filaments d'actine organisés en filopodes, fines protrusions se trouvant à l'extrémité du cône de croissance. **e.** Les microtubules sont composés de dimères de tubuline, torsadés entre eux, formant un tube. **f.** Les neurofilaments sont flexibles et étendent de courts bras qui repoussent les autres neurofilaments. **g.** Filaments d'actine. Ils sont organisés en réseaux branchés et pouvant adopter différentes géométries. D'après [15].

1.3. Les mécanismes d'adhésion, de migration et de développement *in vitro* des cellules et du neurone en particulier

a. Les interactions entre les cellules et leur environnement

Une cellule est exposée dans son environnement à des centaines de molécules de signalisation différentes. Celles-ci peuvent être libres dans le milieu extracellulaire, faire partie de la matrice extracellulaire, qui joue le rôle d'échafaudage (de support) pour les cellules et les composants primaires extracellulaires des tissus, ou bien encore elles peuvent être liées à la surface de cellules voisines. Les cellules sont capables de détecter et de répondre à une pléthore de ces signaux, qui sont biochimiques et biophysiques, sur une grande échelle de longueur. Les interactions avec l'extérieur génèrent des signaux essentiels pour la réalisation de nombreuses fonctions cellulaires telles que la migration, la prolifération, la différenciation ou la mort programmée (appelée apoptose).

L'information à laquelle les cellules réagissent peut se présenter sous différentes formes, et la communication (ou l'interaction) commence souvent par la transformation des signaux d'une forme en une autre. Par exemple, des indices mécaniques sont transformés par la cellule en indices biochimiques. De nombreux signaux extracellulaires agissent par l'intermédiaire de **récepteurs membranaires** situés sur la surface de la cellule, ce qui aboutit à un changement de comportement de la cellule. Le récepteur accomplit la première étape de la transduction du signal : il lit un signal externe et en réponse, le transforme en signal interne. Cela implique une cascade de réactions à l'intérieur de la cellule. Le message passe d'une molécule de signalisation intracellulaire à une autre, chacune activant ou engendrant la molécule de signalisation suivante, jusqu'à ce qu'une enzyme du métabolisme soit mise en action, amenant par exemple à ce que le cytosquelette soit déformé ou à ce qu'un gène soit activé. Par cette série de mécanismes, on dit que **la cellule « répond » à son environnement** [14].

- **Communication entre les cellules**

Dans les organismes multi-cellulaires, le système de communication entre cellules le plus courant consiste à envoyer des signaux dans tout le corps, en les sécrétant dans le courant sanguin.

Il existe un autre procédé de communication inter-cellulaire, dit de « **signalisation paracrine** ». Dans ce cas, les molécules de signalisation sécrétées par les cellules n'entrent pas dans le courant sanguin mais diffusent localement, à travers le milieu extracellulaire, restant au voisinage des cellules qui les ont sécrétées. Elles agissent comme des médiateurs locaux sur les cellules voisines et influencent leur comportement [14].

Cette signalisation joue un rôle important pour la cellule. En effet, il ne suffit pas qu'une cellule ait des aliments pour qu'elle se divise, grandisse ou même survive. Il faut aussi qu'elle reçoive des signaux chimiques d'autres cellules, le plus souvent de ses voisines. La plupart des molécules de signalisation extracellulaire qui influencent la division, la croissance et la survie cellulaires sont des protéines solubles dans l'environnement extracellulaire sécrétées par d'autres cellules, ou des protéines liées à la membrane d'autres cellules ou à la matrice extracellulaire. Parmi les protéines qui agissent comme des signaux favorisant la vie des cellules, on trouve les facteurs de survie, qui inhibent essentiellement l'apoptose et les facteurs de croissance, qui stimulent la croissance cellulaire

- **Perception des propriétés mécaniques de l'environnement des cellules**

Les cellules du corps sont soumises en permanence à des contraintes (pression sanguine, contraintes liées aux mouvements). Celles-ci varient de quelques Pascals (contraintes de cisaillement à la paroi vasculaire) au méga-Pascal (contrainte sur le cartilage de la hanche). Ces contraintes sont susceptibles d'influencer les propriétés de la cellule (physiologie, synthèse, expression de gènes...) au même titre que les modifications biochimiques.

Si les effets biologiques des contraintes mécaniques sont relativement bien décrits, les mécanismes expliquant ces phénomènes restent mal connus. En effet, les effets constatés ne sont pas toujours les

mêmes d'un type cellulaire à un autre. Il est cependant admis que le phénomène de réponse à des contraintes mécaniques se déroulent en 3 étapes [16], [17]:

- **la mécano-intégration** des signaux physiques externes. Cela peut induire des modifications de la conformation des récepteurs membranaires, initier ou inhiber l'adhérence de la cellule, modifier les tensions internes du cytosquelette de la cellule.

- **la mécano-transduction** : les forces externes à la cellule se propagent et ont une influence sur des structures spécifiques. Le signal mécanique est traduit en signal physiologique à l'intérieur de la cellule. La structuration et l'orientation du cytosquelette en fonction de contraintes mécaniques externes ont été mises en évidence. L'existence de récepteurs mécano-sensibles est aussi un exemple qui montre que les forces externes sont traduites à l'intérieur de la cellule.

- **la réponse cellulaire**, comme par exemple la régulation d'un gène, la libération de facteurs autocrines³ ou paracrines, l'expression de récepteurs spécifiques.

b. L'adhérence cellulaire

La majorité des cellules sont des cellules qui doivent s'ancrer et qui nécessitent d'adhérer soit à la matrice extracellulaire⁴ soit à d'autres cellules [18]. Pour adhérer, les cellules sont équipées de récepteurs d'adhésion. Ce sont des protéines transmembranaires qui lient le milieu extra-cellulaire au cytosquelette.

La famille des « cadhérines » est impliquée dans les adhésions entre cellules. Les « intégrines » sont un autre type de récepteurs membranaires d'adhésion, impliquées dans le contact « cellule-matrice extra-cellulaire » [19], [20]. Ils font notamment partie du complexe supra-moléculaire appelé adhésion focale. Ces sites adhésifs localisés permettent l'équilibre mécanique entre les forces de contact issues du milieu extracellulaire et les forces générées par les cellules. Les intégrines réagissent aux signaux mécaniques et chimiques, provenant de l'intérieur ou de l'extérieur de la cellule, qui leur commandent de maintenir leurs liaisons à d'autres molécules ou au contraire de les lâcher [21], [22], [23]. Les intégrines créent des liens et puis les suppriment lorsque la cellule se déplace (voir paragraphe suivant c).

Afin d'étudier le comportement des cellules, et en apprendre davantage sur leur mode de fonctionnement, les cellules sont cultivées in vitro, sur des surfaces. In vitro, avant l'attachement des cellules à la surface, une couche interfaciale de protéines ou de biomolécules du milieu de culture se forme par adsorption sur la surface et cela influence l'attachement des cellules [24]. De plus, comme nous l'avons expliqué précédemment, les propriétés physiques et chimiques de la surface peuvent modifier le développement des cellules. Nous verrons par la suite que l'utilisation de surfaces ayant des propriétés déterminées a permis de mieux décrire et comprendre le fonctionnement des cellules.

³ Signalisation autocrine : en réponse à des facteurs sécrétés par la cellule elle-même

⁴ La matrice extracellulaire est un réseau complexe de polysaccharides ou de protéines (par exemple le collagène) sécrétés par les cellules. C'est une composante structurale des tissus qui influence aussi leur développement et leur physiologie. Elle donne par exemple la force aux tissus de soutien comme les os. Les cellules peuvent être reliées entre elles par l'intermédiaire de la matrice extracellulaire ou bien s'attacher l'une à l'autre directement.

c. La migration cellulaire

La migration cellulaire est une fonction biologique fondamentale car elle est impliquée dans un grand nombre de processus, autant physiologiques (embryogénèse, réponse immunitaire ou encore cicatrisation) que pathologiques (cancer, arthrose, ostéoporose) [25].

De nombreuses cellules migrent en rampant sur une surface [26], selon un procédé qui comporte quatre phases (voir Figure 9):

a. La cellule émet des extensions vers son « front », ces extensions sont les lamellipodes. La polymérisation de l'actine au niveau du front pousse la membrane plasmique vers l'avant (il se crée ainsi une protrusion) puis de nouvelles régions d'actine sont formées (au niveau du front de poussée). De nombreuses cellules émettent aussi des filopodes, notamment au bout du lamellipode.

b. Quand les lamellipodes et les filopodes atteignent une partie de surface favorable, ils s'y attachent et y adhèrent, puis, grâce aux protéines transmembranaires « intégrines », de nouveaux points d'ancrage sont créés entre les filaments d'actine et la surface.

c. Le reste de la cellule se tire vers l'avant en s'appuyant sur ces points d'ancrage. Une contraction à l'arrière de la cellule pousse le corps cellulaire vers l'avant. De nouveaux points d'ancrage sont créés à l'avant, et les anciens à l'arrière de la cellule sont libérés au fur et à mesure que la cellule rampe.

Pour tirer son corps cellulaire en avant, la cellule utilise des contractions internes. Ces contractions dépendent de l'actine et de son interaction avec des protéines motrices, appelée myosines. Les myosines utilisent l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour se déplacer le long des filaments d'actine. Elles servent entre autres à faire glisser des filaments d'actine adjacents les uns par-dessus les autres, créant ainsi une contraction. Il a été montré que les myosines peuvent développer une force de 1.3 à 3.7pN [27], ce qui est environ un ordre de grandeur inférieur à la force développée par un filopode en migration (19pN) [28].

d. Un nouveau lamellipode se forme à l'avant de la cellule et le même cycle se répète, déplaçant la cellule vers l'avant.

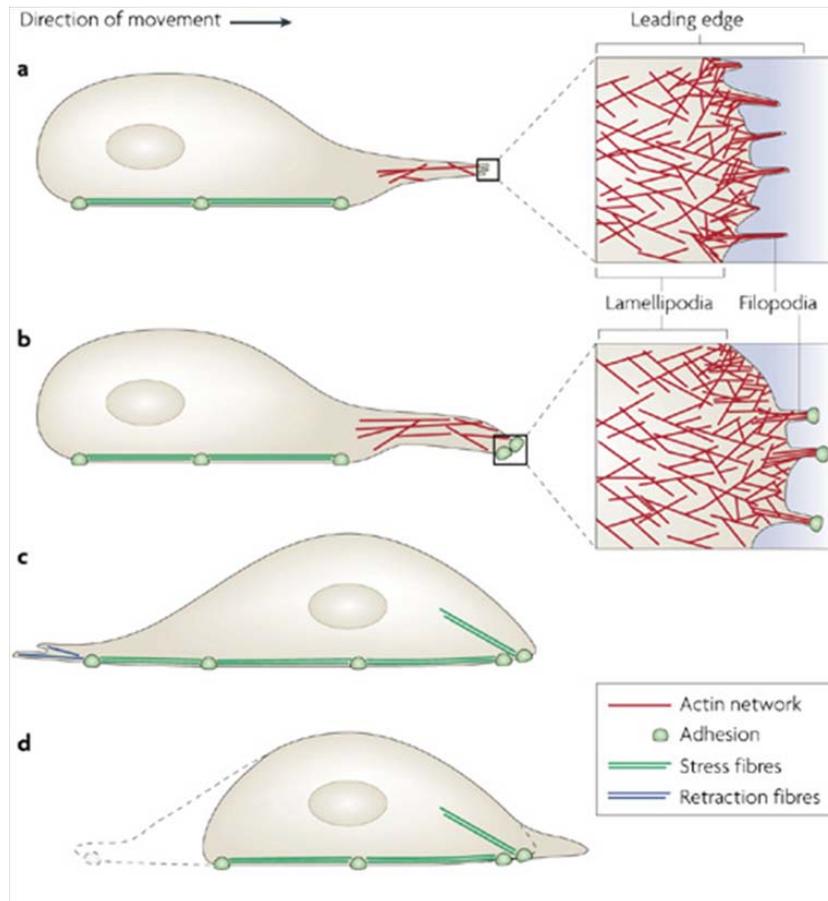


Figure 9: **Principales étapes de la migration d'une cellule sur une surface.** **a.** La cellule émet des extensions d'actine appelées lamellipodes. **b.** Lorsque la surface est jugée « favorable » pour l'adhésion par la cellule, des points d'ancrage se créent au niveau du lamellipode. **c.** Le reste de la cellule se tire vers l'avant, à partir de ces points d'ancrage. Les anciens points d'ancrage à l'arrière de la cellule sont libérés et la cellule rampe vers l'avant. **d.** La cellule émet un nouveau filopode et le cycle recommence, permettant le déplacement progressif de la cellule. Schéma d'après [29].

d. Théorie de la tenségrité

Comme nous venons de le voir à travers les exemples du phénomène d'adhérence et de migration cellulaire, le cytosquelette joue un rôle essentiel dans l'action et la réaction de la cellule vis-à-vis des stimuli mécaniques externes. Plusieurs équipes de chercheurs ont développé des modèles pour décrire comment le cytosquelette agit pour traduire les stimuli mécaniques de l'environnement cellulaire. La théorie la plus souvent retenue est celle de la tenségrité. Le modèle de la tenségrité explique comment la structure du cytosquelette cellulaire est modifiée géométriquement par les forces transmises à travers la surface de la cellule. Ingber propose un modèle où les microfilaments et les microtubules forment une structure de « tenségrité »⁵ dans la cellule, les microtubules travaillant en compression et les microfilaments étant en tension [30], [31].

⁵ Le mot tenségrité vient de la contraction de « tensile integrity ». Il est utilisé à l'origine en architecture, pour décrire la capacité d'une structure à se stabiliser par le jeu des forces de tension et de compression qui s'y répartissent et s'y équilibrent. Les structures établies par la tenségrité sont donc stabilisées, non par la résistance de chacun de leurs constituants, mais par la répartition et l'équilibre des contraintes mécaniques dans la totalité de la structure.

Cette théorie est importante, car en effet, on sait qu'un grand nombre d'enzymes et d'autres substances commandant la synthèse des protéines, la conversion de l'énergie et la croissance sont solidaires du cytosquelette et donc une modification des caractéristiques géométriques et mécaniques du cytosquelette aura une influence sur les réactions biochimiques, modifiera les gènes activés, et donc les protéines fabriquées par la cellule.

e. Le développement du neurone

Nous décrivons ici le développement d'un neurone mis en culture *in vitro*, à partir de neurones primaires⁶. Les phases du développement sont semblables pour les cultures de lignées neuronales. Celles-ci ont été bien décrites, notamment lors d'études menées sur des neurones d'hippocampe de rats [32], [33].

La Figure 10 présente la morphologie du neurone en développement. Au départ, les cellules sont plutôt sphériques. Quelques heures après avoir déposé les cellules en culture sur des surfaces (boîte de pétri, lamelle de verre), celles-ci développent des lamellipodes tout autour de leur corps cellulaire (*phase 1*).

La dynamique de l'actine joue un rôle crucial dans le développement du neurone et de ses neurites [34]. Certains lamellipodes vont subsister et se renforcer, d'autres vont subir des effondrements, leur croissance va s'arrêter et ils se rétractent. Les lamellipodes qui au contraire sont maintenus vont être consolidés, et deviennent les cônes de croissance des jeunes neurites (*phase 2*). Les causes de ces effondrements ou au contraire renforcement sont complexes et multiples. Des molécules trophiques⁷ qui facilitent la subsistance des cellules sont mises en jeu. Au cours de ce stade de développement, les molécules trophiques influencent aussi la survie et la différenciation des cellules. Par la suite, aucun nouveau lamellipode ne s'étendra. Le nombre de neurites restera le même dans les phases de développement suivantes.

Puis, progressivement, les neurites se développent. Parmi eux, un neurite va se développer plus vite. A partir de ce stade, on dit que le neurone est polarisé (*phase 3*). Ce neurite constituera plus tard l'axone du neurone et on parle de polarisation axonale.

Quelques jours plus tard, les neurites se différencient en dendrites ou en axone. A ce stade, la population de neurones adultes est mise en place et les signaux trophiques régissent maintenant la formation des connexions nerveuses et tout particulièrement l'étendue des arborisations axonales et dendritiques (*phase 4*). Le stade dans lequel les neurones sont capables d'établir des connexions fonctionnelles entre eux n'arrive que quelques jours plus tard (10 à 12 jours) (*phase 5*).

⁶ On appelle cellule primaire une cellule qui provient directement de tissus d'une biopsie ou d'un prélèvement.

⁷ Les facteurs trophiques (du grec trophè, nourriture) sont des molécules qui régulent la survie, la croissance et la différenciation des cellules.

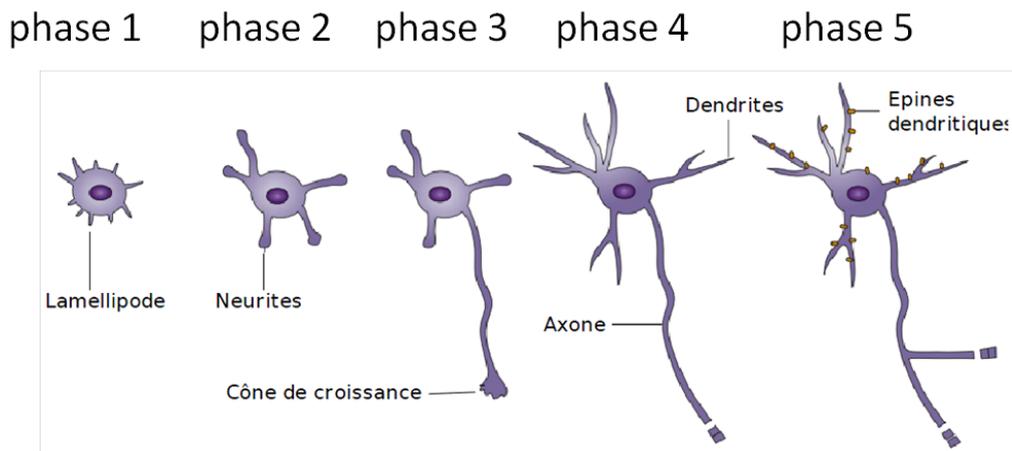


Figure 10 : Schématisation des étapes du développement d'un neurone *in vitro*. 1. Au début, la cellule est sphérique et émet des lamellipodes dans toutes les directions. 2. Certains lamellipodes sont inhibés et d'autres se développent, donnant des neurites. 3. Un neurite se développe plus vite et sera le futur axone. 4. Les neurites se spécialisent et deviennent soit des neurites, soit un axone. 5. Le neurone devient mature au bout de plusieurs jours. Les épines dendritiques apparaissent. D'après [8].

- Le cône de croissance, une structure exploratrice

Le cône de croissance est une structure particulière que l'on ne trouve que dans les neurones et plus particulièrement à l'extrémité de l'axone en développement. Il a globalement le même rôle que le lamellipode des neurites en formation. Il s'agit d'une structure extrêmement mobile qui explore l'environnement extracellulaire, en fonction duquel il définit la direction de croissance et il guide ensuite l'allongement de l'axone dans cette direction. Il comporte également de fins prolongements (les filopodes). Ces filopodes se forment et se rétractent comme des doigts qui se déploieraient pour aller sonder leur environnement. Ainsi, le cône de croissance cherche activement les indices susceptibles de guider les étapes suivantes de la croissance de l'axone.

Les forces mises en jeu par les filopodes d'un cône de croissance sont de l'ordre de 3pN lorsqu'il est en croissance et de 100pN lorsqu'il adhère à une surface [35], [36]. Pour d'autres types cellulaires, comme les fibroblastes ou les cellules épithéliales, ces forces sont 1 à 2 ordres de grandeurs plus grandes.

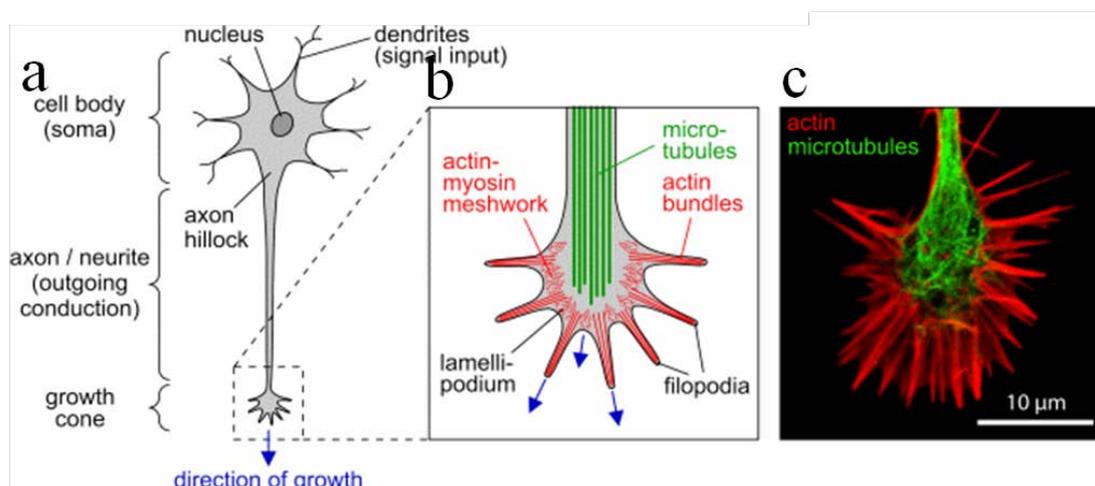


Figure 11 : Structure du cône de croissance d'un neurone. a. schéma du neurone. b. schéma du cône de croissance, de son lamellipode et des filopodes, fines extensions d'actine. c. image en fluorescence du cône de croissance.

Le comportement complexe du cône de croissance durant l’allongement de l’axone suggère la présence d’indices spécifiques de différentes natures (chimiques, mécaniques) conduisant le cône de croissance à se déplacer dans telle ou telle direction [37], [38], [39] (voir Figure 12 et Figure 13). Ces indices comprennent un grand nombre de molécules intervenant dans les contacts de cellule à cellule et de la motilité. On peut par exemple citer le groupe des molécules d’adhérence cellulaire. Elles constituent un excellent substrat pour les cônes de croissance. Les plus notables sont les laminines, les collagènes et la fibronectine. Les intégrines, qui sont des récepteurs d’adhésion (que nous avons déjà décrits au paragraphe 1.3b) que l’on retrouve sur les cônes de croissance se lient spécifiquement à ces molécules. Ces molécules ont largement été utilisées pour orienter *in vitro* la croissance des neurites et des axones [40], en les déposant sélectivement à certains endroits d’une surface, en utilisant la technique de micro-contact printing notamment. (Voir paragraphe 2).

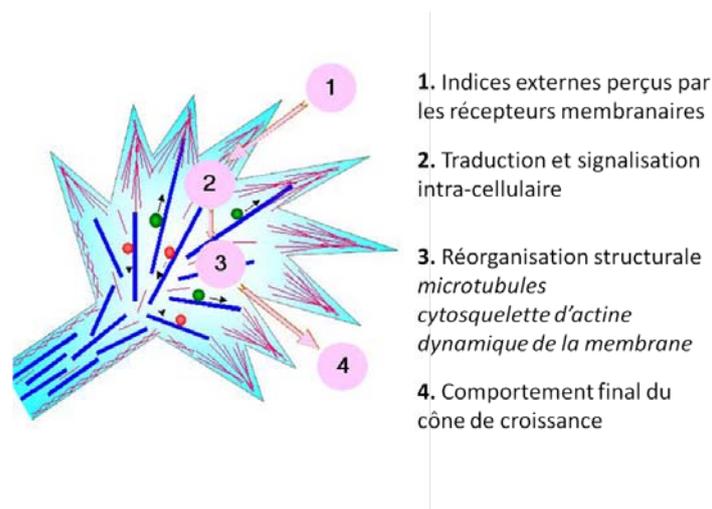


Figure 12 : Schéma illustrant les étapes qui déterminent le comportement du cône de croissance en fonction de la perception d’indices externes.

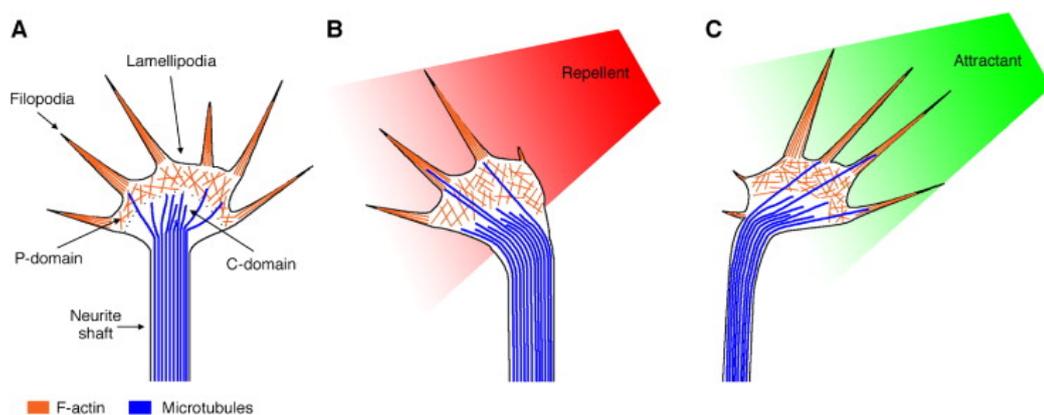


Figure 13 : Schémas représentant le comportement du cône de croissance en fonction de facteurs externes. **A.** Structure du cône de croissance. **B.** Réorientation du cône de croissance en présence de facteurs répulsifs. **C.** Réorientation du cône de croissance en présence de facteurs attractifs. D’après [41].

2. La croissance du neurone sur une surface ingénierée

En biologie, de nombreux composants de l'environnement cellulaire et de la cellule elle-même présentent des dimensions couvrant les échelles micro et nanométriques. Par exemple, le diamètre d'une fibre de collagène est de 0.5-3 μ m et la longueur des cellules est comprise entre 1 et 100 μ m. Ainsi, il est apparu pertinent d'intégrer des facteurs aux échelles micrométrique et nanométriques sur les surfaces servant de supports de culture aux cellules afin d'étudier les interactions cellule/surface. Depuis une vingtaine d'années, les techniques de microfabrication se sont développées et perfectionnées. Elles sont devenues de plus en plus performantes afin de créer des surfaces aux géométries micro et nanométriques bien définies pour des utilisations en interaction avec le vivant [42], [43], [44].

Les surfaces ingénierées ont montré leur intérêt pour trois types d'utilisation :

- en imposant aux cellules des conditions précises et reproductibles, elles ont permis de mieux comprendre certains phénomènes fondamentaux du fonctionnement des cellules.

Par exemple, la technique de lithographie douce « micro-contact printing » [45] est couramment employée pour créer des micro-patrons adhésifs pour les cellules [46], [47]. Elle permet de créer des motifs « chimiques » en deux dimensions, avec des molécules issues le plus souvent de la matrice extracellulaire. La variation de la géométrie et de la surface de ces micro-patrons a permis de moduler le comportement cellulaire [48], de mieux le décrire et de mieux comprendre le fonctionnement et la migration des cellules [49], [50] ou encore a aidé à réaliser des modèles prédictifs du comportement cellulaire [51]. Il est même possible d'acheter directement des surfaces comportant des micromotifs afin de réaliser des expériences de culture cellulaire [52].

- l'utilisation de surfaces ingénierées rend possible le contrôle de la localisation des cellules en croissance, de leur nombre et aussi de leur forme, permettant ainsi de les intégrer à des systèmes plus complexes, comme par exemple des puces électroniques.

Par exemple, l'équipe de Peter Fromherz a créé une microtopographie sur des puces comportant des transistors. Cette topographie joue un rôle de « cages » pour des neurones qui sont mis en culture sur les puces afin de maintenir en place les corps cellulaires des neurones au dessus des composants actifs de la puce [53].

- l'ingénierie de surface est aussi utilisée pour améliorer les performances de biomatériaux, qui peuvent être implantés in vivo [54], [55].

Par exemple, McKenzie et al ont montré que la nanostructuration de la surface de polymères composites a pour effet de diminuer la formation de la cicatrice gliale qui se développe habituellement

autour de tels matériaux lorsqu'ils sont insérés dans des tissus cérébraux. En effet, ils ont montré que l'adhésion des astrocytes pouvait être diminuée grâce à cette ingénierie d'échelle nanométrique [56].

De nombreuses techniques ont été et sont mises en œuvre pour fournir aux cellules des surfaces de croissance ingénierées. L'ingénierie de surface développée peut comporter des indices de différentes natures : chimique, physique, biologique ou encore une combinaison des trois [57], [58], [59].

Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés spécifiquement aux interactions entre des cellules neuronales et des facteurs physiques topographiques. Toutefois, il convient de garder à l'esprit que les facteurs physiques sont souvent associés à des facteurs chimiques, même si cela n'est pas toujours apparent. En effet, par exemple, le milieu de culture des cellules comporte une multitude de molécules, qui interagissent avec la surface. De plus, la plupart du temps, les surfaces sont recouvertes de protéines de la matrice extracellulaire pour favoriser l'adhérence des cellules. Ainsi, la surface qui comporte des facteurs physiques comporte aussi souvent des facteurs chimiques.

Le fait que les cellules répondent à des facteurs physiques de leur environnement a été observé par de nombreuses équipes de recherche. Déjà en 1912, Harison observait que lorsque les cellules étaient mises en culture sur une toile d'araignée, celles-ci adaptaient leurs formes et leurs mouvements en fonction de la géométrie de la toile d'araignée. Il montrait ainsi que le matériau solide sur lequel poussaient les cellules avait une grande influence sur la morphogénèse et le mouvement des cellules [60]. En 1945, Paul Weiss, de l'université de Chicago, décrivait que le « guidage par contact » est une méthode basique que les cellules utilisent pour migrer de leur point de départ (leur source), jusqu'à leur destination [61]. Quelques années plus tard, en 1964, Curtis et Varde de l'université de Glasgow ont utilisé la topographie pour contrôler le comportement cellulaire [62]. En 1987, dans cette même université, le professeur C. Wilkinson a l'idée d'utiliser la photolithographie pour créer des microsillons sur des surfaces de plastique et puis filme la croissance de fibroblastes sur cette topographie [63], [64].

Tous ces travaux démontrent l'existence d'interactions entre la topographie et les cellules et que le phénomène de guidage par contact peut avoir aussi un effet sur l'adhésion, la morphologie, la migration et la différenciation des cellules [65]. Depuis, ce phénomène a été largement repris et analysé de manière plus détaillée par la communauté scientifique et les différents articles font toujours référence à des questions d'interactions entre la topographie et les cellules.

Cependant, près de 50 ans après ces premiers articles, un certain nombre de questions restent toujours ouvertes, notamment en raison de la grande variabilité des réponses cellulaires.

Dans cette partie d'étude bibliographique, nous nous intéressons prioritairement aux résultats obtenus avec des cellules neuronales. Néanmoins, nous prêtons aussi intérêt à des recherches qui ont été effectuées sur d'autres types cellulaires afin de prendre en compte la complexité et la variabilité des réactions biologiques.

De nombreux travaux documentent les effets de substrats comportant une microtopographie, et relèvent l'importance des dimensions de la topographie et des revêtements des surfaces réalisés avant la mise en culture des cellules. Ces études s'intéressent notamment au comportement de cellules qui n'étendent pas de prolongements, comme les fibroblastes ou les ostéoblastes mais qui fournissent une réponse de la cellule dans sa globalité. Ces travaux ont pu montrer que généralement ces cellules s'alignent selon l'axe des motifs géométriques de la surface du substrat.

Dans les paragraphes suivants, nous allons voir que la réponse des neurones à la topographie apparaît plus complexe que celle-ci. Nous avons vu au paragraphe 1 que les neurones sont des cellules particulières qui étendent de longs prolongements, les neurites, depuis le corps cellulaire et aussi que les neurones sont par essence des cellules qui communiquent entre elles. De plus, le corps cellulaire et les neurites n'ont pas forcément le même comportement. Ces spécificités laissent d'ores et déjà envisager que les neurones, ne vont pas réagir comme les autres types cellulaires à une topographie de surface.

2.1 Interactions entre les neurones et la microtopographie

Dans le système nerveux aussi bien en développement que mature, les neurones ont une grande capacité à explorer leur environnement et à répondre à ses caractéristiques. Cette faculté est possible grâce notamment au cône de croissance, que nous avons décrit dans les paragraphes précédents.

Face à la multitude de travaux menés sur les interactions entre les neurones et des indices microtopographiques, nous avons souhaité ici nous concentrer essentiellement sur des travaux menés en utilisant des surfaces qui comportent des topographies anisotropes, avec une forte directionnalité. En effet, certainement en raison de l'importance de guider la croissance des neurones pour des stratégies de réparation de moelle épinière ou de nerfs périphériques endommagés, un grand nombre de recherches s'est intéressé à cultiver des neurones sur des substrats comportant des microsillons linéaires, qui présentent une forte anisotropie. Ces structures alternent des zones que l'on appellera des « plateaux » qui sont en relief, avec des zones en creux, que l'on appellera des « sillons ».

En plus du guidage de la croissance des cellules neuronales dans une direction établie, un grand nombre d'autres effets a été montré, comme par exemple la diminution de l'architecture neuritique, un nombre réduit de neurites, une longueur de neurites augmentée, et une polarisation accrue en fonction des différents paramètres géométriques des structures. Pour qualifier la réaction des cellules à ces structures, les neurites ont principalement été observés. Pour cela, le développement des neurites a été étudié en considérant les critères suivants :

- le nombre de cellules développant des neurites ou des axones [66], [67]
- le nombre moyen de neurites par cellule [68]

- la longueur moyenne des neurites d'une cellule [69], ou bien la longueur du plus grand neurite ou axone [67] ou bien encore la longueur totale des neurites [70].

Toutes ces études laissent penser que l'on pourrait, grâce à la conception d'un substrat approprié, influencer voire prédire leur développement.

a. La microtopographie affecte l'adhésion et la morphologie cellulaires

Parce que la morphologie est étroitement liée à la fonction, la détermination de l'effet de l'ingénierie de surface sur la croissance et la morphologie cellulaires indique l'efficacité d'un matériau et de sa géométrie pour promouvoir une réponse spécifique ou désirée.

Pour qualifier l'orientation des neurites, l'alignement de ces derniers avec la direction de la topographie est observé et quantifié. Là encore, les méthodes d'analyse utilisées sont variables :

- Miller et al par exemple ont simplement fait une analyse binaire des neurites « aligné » ou « non-aligné » [59].
- Sørensen et al ont présenté à 6 observateurs volontaires des images optiques de neurites ayant poussé sur des substrats comportant des microsillons [71]. Ces observateurs ont noté l'alignement sur une échelle de 1 à 5.
- D'autres analyses, plus poussées ont par exemple mesuré systématiquement l'angle entre la direction du motif topographique et le neurite au niveau de son émergence du corps cellulaire [68].
- Les données angulaires des neurites peuvent aussi être quantifiées par une méthode circulaire statistique [72].
- Johansson et al ont évalué l'alignement global d'un champ entier d'observation en utilisant la méthode de la transformée de Fourier, qui indique l'angle qui est le plus représenté sur l'image [73].

Ces différentes méthodes ne facilitent pas les comparaisons directes entre les différents travaux. Elles permettent cependant d'évaluer d'une manière quantitative comment les neurones réagissent à la topographie.

Ainsi, plusieurs études ont montré que lorsque des neurones sont cultivés sur des surfaces comportant des microsillons, la réponse des neurites est d'autant plus marquée que les sillons sont profonds (ordre de grandeur des profondeurs : de 0,2 μ m à 4 μ m) [59], [74], [64], alors qu'aucun effet de la microstructuration n'est observé lorsque les sillons ont une profondeur inférieure à 0,2 μ m. Dans les études qui utilisent des sillons ayant une profondeur submicronique (plusieurs centaines de nanomètres), les neurones issus de noyaux de la racine postérieure interagissent aussi bien avec les plateaux qu'avec les sillons. Il a été montré que l'augmentation de la profondeur des sillons améliore l'alignement des neurites [59]. L'angle avec lequel un neurite en croissance approche une structure

anisotrope (plateau ou sillon) dicte si le neurite tourne pour suivre l'indice topographique ou bien passe au-dessus de l'indice topographique pour garder sa direction de croissance initiale. Par exemple, Li et al [75] ont utilisé des sillons de différentes profondeurs, allant de 2,5 à 69 μm . Les largeurs des sillons sont comprises entre 50 μm et 350 μm . Ils ont montré que lorsque les neurones corticaux embryonnaires de murins sont mis en culture sur les sillons les moins profonds (2,5 et 4,6 μm), les axones passent au dessus des structures et ne sont pas orientés. En revanche, pour des profondeurs de 22 ou 69 μm , les axones se développent dans la direction des structures, après être entrés en contact avec elles. Cependant, pour une profondeur intermédiaire de 11 μm , environ la moitié des axones traverse les structures en passant au-dessus alors que l'autre moitié répond à la topographie en s'alignant dans la direction des microsillons.

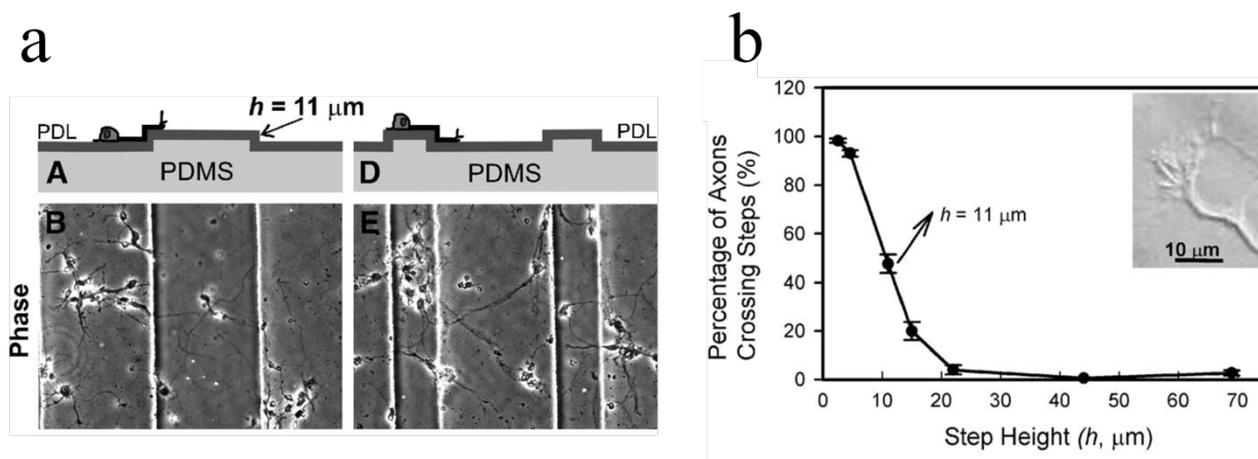


Figure 14 : **Influence de la profondeur des sillons sur le nombre d'axones qui traversent les sillons.** **a** : images des cultures de neurones de rats sur un substrat de PDMS comportant des microsillons de 11 μm de profondeur. **b** : Evolution du pourcentage d'axones qui traversent un sillon en fonction de la hauteur du sillon. D'après [75].

Une autre étude, réalisée cette fois avec des cellules de la lignée PC-12 a montré que la réponse des cellules dépend aussi de la largeur des microsillons [68]. Mahoney et al ont utilisé des structures faites de polyimide (sur les « murs » des sillons) et de verre (sur le « fond » des sillons). La profondeur des sillons est toujours de 11 μm et leur largeur varie de 20 à 60 μm . Les auteurs montrent que les cellules s'alignent mieux à la topographie lorsque les sillons sont étroits. Ils ont aussi mis en évidence que les neurites étaient plus longs mais moins nombreux lorsque les neurones étaient cultivés sur ces surfaces microstructurées que lorsqu'ils l'étaient sur des surfaces non microstructurées (voir Figure 14).

Une interprétation de ces effets que l'on trouve dans de nombreux articles repose sur le fait que le lamellipode et le filopode sentent la présence et les propriétés du support et établissent des contacts avec sa surface. Des forces de traction sont générées par la cellule, elles dépendent de la formation des microtubules et des filaments d'actine qui forment le cytosquelette des cellules. Ces forces permettent la croissance des neurites. Plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que lorsqu'il y a un contact avec un relief de la surface tel que la paroi d'un microsillon, le développement du cône de croissance ainsi que

l'orientation des microtubules et des filaments d'actine sont limités, ce qui expliquerait l'orientation des neurites dans la direction des microsillons [38].

D'autres études complètent ces observations. La traduction des propriétés physiques de la surface se fait par l'intermédiaire des intégrines (voir Figure 15), qui, comme nous l'avons vu précédemment sont des récepteurs membranaires d'adhésion impliqués dans le contact « cellule-matrice extracellulaire ».

La topographie du substrat influence l'organisation, l'arrangement et la distribution des intégrines. A travers une série de signalements internes à la cellule, déclenchée par les interactions entre les intégrines et la surface, l'activité et l'organisation du cytosquelette sont modifiés, ce qui modifie enfin la morphologie et la fonction de la cellule [76], [77], [78].

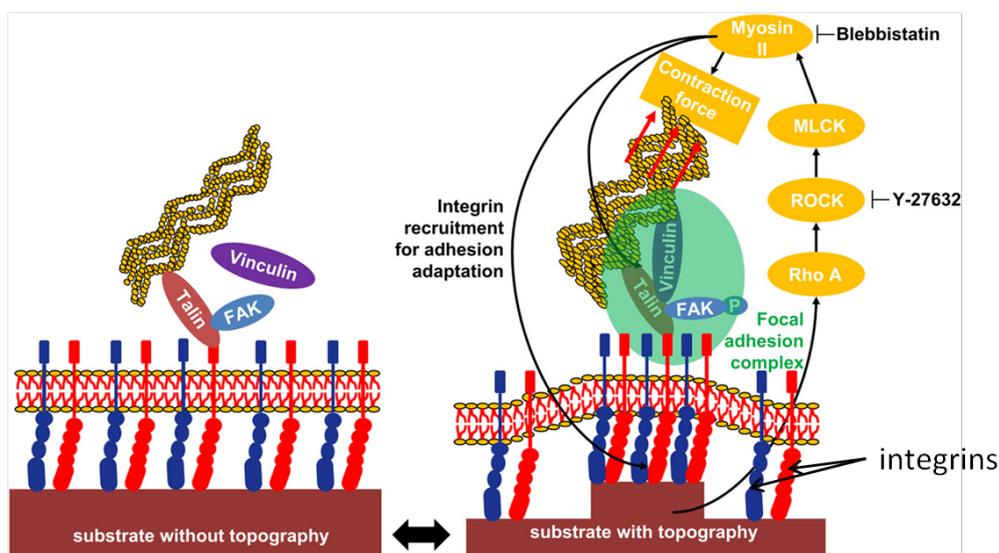


Figure 15 : schéma représentant le mécanisme d'implication des intégrines dans la réaction déclenchée par la topographie du substrat de culture. Comparaison entre un substrat sans topographie et avec un substrat comportant une microtopographie. D'après [79].

Bien que la grande majorité des travaux qui étudient l'organisation des cellules sur des surfaces comportant des microsillons montre que les neurones s'alignent aux structures, d'autres types de réactions ont été reportées.

En particulier, il a été montré que des sillons de dimensions submicrométriques peuvent générer une orientation des neurites qui est non plus parallèle aux structures mais perpendiculaire (cas de cellules neuroblastiques du système nerveux central du murin) [80]. Le même phénomène a été observé avec des cellules de l'hippocampe de rats [81]. Lorsque les cellules se trouvent face à une discontinuité topographique, elles peuvent soit passer au-dessus, soit la suivre. Il apparaît que ce choix dépende à la fois des dimensions de la microtopographie et du type cellulaire.

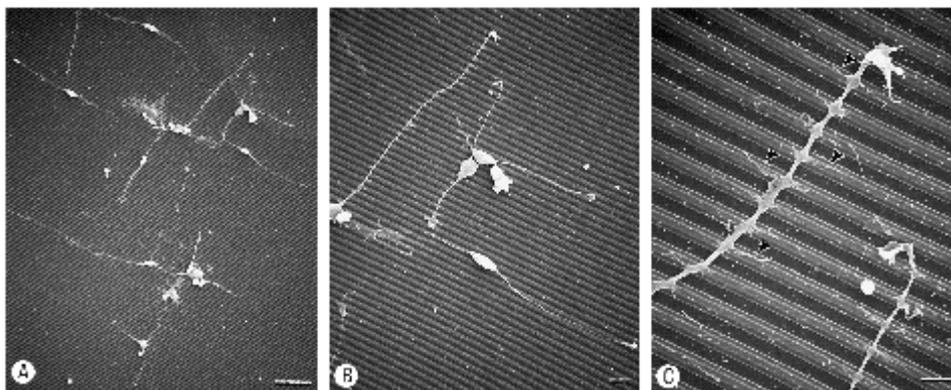


Figure 16 : Images MEB de **neuroblastes cultivés sur des sillons de 1 μ m de largeur et de 0,5 μ m de profondeur**. Les neurites de ces cellules neuronales s'orientent perpendiculairement à la direction des microsillons. D'après [80].

Les études décrites ci-avant montrent l'influence de la topographie sur la morphologie et l'adhésion des cellules et il apparaît que la réponse des cellules à la topographie dépend des dimensions, de la géométrie de celle-ci et de la nature des cellules. Des études complémentaires devront encore être menées pour mieux élucider le mécanisme biologique mis en jeu à l'échelle moléculaire dans ces interactions et essayer de dégager une compréhension générale de la réaction des cellules vis-à-vis de la topographie. Nous retenons toutefois de cette revue bibliographique qu'il sera important au cours de ce travail de s'interroger en permanence sur la généralité des comportements observés ou au contraire sur leur spécificité vis-à-vis de la lignée cellulaire étudiée.

b. La topographie affecte la différenciation des cellules souches

L'utilisation des cellules souches en médecine régénérative a un grand potentiel. Cependant, l'incapacité à contrôler de manière précise leur devenir cellulaire après leur différenciation est souvent une limitation pour leur utilisation thérapeutique. In vivo, le microenvironnement de ces cellules comporte des indices biochimiques et biophysiques qui déterminent leur différenciation. Pour tenter de diriger la différenciation des cellules souches in vitro, des facteurs de différenciation spécifiques à chaque type cellulaire sont utilisés. Pour apporter d'autres indices que ces indices chimiques aux cellules, certains auteurs se sont attachés à mimer l'environnement extracellulaire que l'on trouve in vivo [82]. Dans cet objectif, la microstructuration de biomatériaux a été utilisée pour fournir des indices physiques aux cellules souches. De nombreux brevets argumentant des protocoles de fabrication de surfaces, permettant de stimuler la différenciation de cellules souches neurales progénitrices ou mésenchymateuses en tel ou tel autre type de cellules ont été déposés (voir par exemple [83], [84]).

Une autre approche ne consiste pas à mimer l'environnement extracellulaire mais à essayer de comprendre comment les cellules souches réagissent à une microtopographie de surface, afin ensuite de l'utiliser pour optimiser la différenciation de cellules souches en un type de cellule particulier [85].

Peu de travaux reportent l'étude de l'influence de la microtopographie sur le comportement de cellules souches neurales adultes humaines, certainement car il est difficile d'avoir accès à ce type de cellules primaires. Wang et al ont étudié l'effet de la porosité de différents films de chitosan sur la différenciation de cellules souches neurales. Ils ont montré que cette dernière peut moduler la différenciation et la prolifération des cellules souches [86].

Il sera donc important au cours de ce travail d'étudier le comportement de cellules souches confrontées à une topographie de surface contrôlée et d'évaluer si leur comportement est similaire ou très différent de celui de lignées cellulaires.

c. La topographie affecte la migration cellulaire

Etant donné que la motilité cellulaire joue un rôle important dans des processus comme la morphogénèse [87], le développement embryonnaire ou le développement de cancers [88], la découverte des phénomènes qui la régulent représente un grand enjeu. De nombreux travaux ont utilisé des surfaces micro-ingénierées avec des topographies asymétriques pour tenter d'apporter de nouvelles données expérimentales sur ce phénomène [89].

Il a par exemple été montré pour de nombreux types cellulaires, dont les fibroblastes, les cellules épithéliales ou encore les neurones, que la migration a lieu le long des microsillons [90], [91], [92]. La migration de cellules épithéliales serait même plus rapide sur les surfaces comportant des microsillons que sur des surfaces planes [93].

d. La topographie affecte l'expression des gènes

Il a été montré que la topographie peut influencer l'expression des gènes dans certains types cellulaires [94]. Cela a été observé pour des fibroblastes mis en culture sur des surfaces comportant des microsillons. En effet, sur ces surfaces, certains gènes sont moins exprimés que lorsque la surface de culture est plane [95]. Les gènes concernés seraient ceux impliqués dans la machinerie transcriptionnelle, dans la régulation de la sécrétion de protéines Rho [96]. L'activation de la sécrétion des protéines Rho peut à son tour déclencher la polymérisation de l'actine ainsi que la formation de faisceaux et donner des filopodes. Cela peut aussi amener à la formation d'intégrines.

2.2 Ingénierie combinant des indices physiques et chimiques

Les interactions entre les cellules et leur environnement sont multiples. In vitro, les cellules ne répondent pas seulement à des indices de nature physique, mais sont également influencées par des facteurs chimiques, pouvant avoir une origine biologique (molécules sécrétées par d'autres cellules par exemple). Nous venons de voir qu'un grand nombre d'études s'intéressent aux interactions entre la topographie et les cellules, mais peu de travaux reportent les effets combinés de la topographie et d'indices chimiques. Pourtant, in vivo, ces différentes sources d'information pour la cellule sont indissociables.

Par exemple, des signaux biochimiques, comme le facteur de croissance NGF (nerve growth factor) et la laminine ont montré qu'ils exacerbent les effets de la topographie [67]. En effet, les neurones répondent plus fortement à la topographie en présence de ces composés. Par exemple, la présence de laminine sur une surface comportant une microtopographie augmente l'adhésion et l'alignement de cellules de ganglion spinal. Une autre étude s'est intéressée à diminuer la quantité de NGF en dessous de la concentration optimale lors de la culture de cellules de la lignée PC12 sur des surfaces microstructurées. Alors que les auteurs n'observaient aucun effet de la topographie sur les cellules lorsque la concentration en NGF était élevée, la diminution de la concentration a laissé apparaître des effets de la topographie (orientation des cellules dans la direction des microsillons) [59]. Britland et al ont par ailleurs montré pour des cellules nerveuses que les facteurs chimiques sont plus efficaces que des microsillons lorsque ceux-ci mesurent moins de 500nm de profondeur [97]. En revanche, lorsque les microsillons sont plus profonds, c'est la topographie qui dicte le comportement des cellules. Ces exemples mettent en évidence une sorte de compétition entre la présence de facteurs biochimiques et la topographie.

D'autres travaux suggèrent que les indices topographiques et biochimiques jouent différents rôles dans la direction de la croissance cellulaire, et que ces différents moyens pourront amener à adapter les propriétés des matériaux pour créer des réseaux neuronaux. Gomez et al ont cultivé des neurones embryonnaires de l'hippocampe de rats sur une surface comportant des microsillons de 2 μ m de large et 0.4 μ m de profondeur sur laquelle a été fixé du NGF [98]. Ils ont pu montrer que la topographie a un effet dominant sur la polarisation des neurones (détermination de l'axone parmi les neurites) et que le NGF a un effet prépondérant sur la longueur de l'axone (il est plus long en présence de NGF). Combinés, ces deux types d'indices amènent à une forte polarisation et à un axone plus long.

- **Situation de co-cultures de plusieurs types cellulaires**

Certaines études se sont intéressées à des situations de co-cultures, où plusieurs types cellulaires sont cultivés sur la même surface [99], [100]. Ces études sont particulièrement intéressantes car elles créent une situation dans laquelle les cellules interagissent particulièrement entre elles, ce qui est plus proche de ce que l'on peut trouver in vivo.

Par exemple, Sorensen et al ont d'abord mis en culture des astrocytes sur une surface de polycaprolactone comportant des microsillons de quelques micromètres de profondeur [71]. Ils ont obtenu une monocouche d'astrocytes sur laquelle ils ont ensuite mis en culture des neurones. Ils montrent que l'alignement des neurones est moins rigoureux lorsque la surface comporte cette couche de cellules que lorsque la culture des neurones est réalisée directement sur la surface de polycaprolactone.

2.3 Interactions entre les neurones et des facteurs à l'échelle nanométrique

Nous venons de voir que les cellules réagissent à une microtopographie d'échelle micrométrique, dont les dimensions sont comparables à leur taille, et que leur cytosquelette joue un rôle primordial dans ce phénomène. Nous avons également décrit les composants du cytosquelette qui perçoivent, intègrent les signaux extérieurs à la cellule. Ces composants ont une échelle nanométrique et il apparaît donc pertinent d'étudier comment ces composants réagissent et intègrent des signaux topographiques ayant le même ordre de grandeur qu'eux et comment le comportement de la cellule en est modifié.

Une topographie est définie comme une topographie nanométrique lorsqu'au moins une de ses trois dimensions (largeur, hauteur, longueur) est de dimension nanométrique. Les travaux réalisés en utilisant une topographie submicrométrique de quelques centaines de nm ne sont pas considérés ici comme étant des travaux réalisés avec une topographie à l'échelle nanométrique.

Il existe plusieurs méthodes pour fabriquer des surfaces ingénierées à l'échelle nanométrique [101]. Cependant, pour étudier les interactions entre les cellules et la nanotopographie, les techniques mises en œuvre doivent permettre de structurer des grandes surfaces (au moins plusieurs mm^2) à faible coût. Cet aspect est d'autant plus important si l'on doit équiper des surfaces de biomatériaux constituant des bioprothèses de grande taille [102]. La grande majorité des travaux qui étudient les interactions entre les cellules et des facteurs nanotopographiques utilisent des surfaces présentant une nanorugosité qu'il est aisé de produire sur une grande surface. Depuis quelques années, la compréhension des mécanismes qui conduisent une cellule à réagir face à des indices nanométriques fait l'objet d'une intense recherche.

Pour pouvoir générer une nanotopographie sur de grandes surfaces, Spatz et al ont développé une approche basée sur l'auto-assemblage de micelles de copolymères dibloc contenant de l'or, permettant de créer des surfaces recouvertes de plots d'or avec différents espacements sans avoir besoin d'utiliser la technique de lithographie électronique [103](voir Figure 17).

L'utilisation de telles surfaces a plus tard permis à l'équipe de Spatz d'étudier le réarrangement des intégrines lors de l'adhésion cellulaire. Comme nous l'avons vu précédemment, les intégrines et les points focaux d'adhésion sont des acteurs de premier plan pour la traduction d'évènements extérieurs à la cellule vers la mécanique interne de la cellule. Ils font le lien entre ces indices et le cytosquelette de la cellule, qui en conséquent réagit et se réarrange. Spatz et al ont notamment montré qu'il existe une distance maximale entre des plots adhésifs à ne pas dépasser pour permettre la formation de regroupements d'intégrines (clusters) et leur activation. Cette distance se trouve entre 58nm et 73nm [104](voir Figure 17).

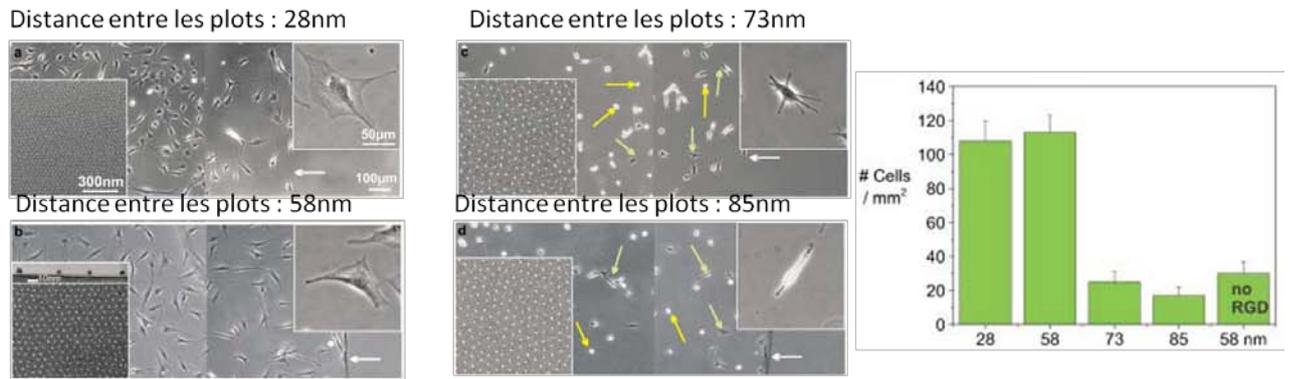


Figure 17 : **Images de cultures de cellules ostéoblastes de la lignée MC3T3 sur des surfaces comportant des plots d'or à différents intervalles de distance.** Le nombre de cellules ayant adhéré sur les surfaces est important tant que la distance entre les plots ne dépasse pas 58nm. D'après [104].

D'autres travaux plus récents ont également mis en évidence que l'adhésion des cellules qui se fait par l'intermédiaire des intégrines est influencée par des facteurs nanotopographiques [101], [23], [105].

Les processus mis en jeu dans les interactions entre les cellules et les structures nanométriques peuvent être directs (résultat direct de l'influence de la topographie) ou indirect (résultat de l'interaction entre la nanotopographie et les éléments du milieu de culture). Les travaux de Brunetti et al reportent que les cellules neuronales sont sensibles à la rugosité d'une surface d'or à l'échelle nanométrique, créée par gravure chimique humide [106]. Les auteurs ont montré que l'adhésion et le développement des cellules neuronales de la lignée SH-SY5Y sont influencés par la nanostructuration. En effet, la désorganisation des points d'adhésion serait la cause d'une cascade de signalisation moléculaire à l'intérieur de la cellule amenant même à la mort des cellules. D'autres travaux ont montré au contraire que la rugosité d'une surface peut améliorer l'adhérence de cellules neuronales [107], [108] et même influencer le phénotype de cellules souches [109], [110] [111].

Toutefois, il apparaît délicat de distinguer les effets de la topographie de ceux dus à une adsorption de molécules chimiques contenues dans le milieu de culture. De nombreux travaux reportent l'influence de la nanotopographie ou de la nanorugosité sur l'adsorption de molécules, telles que l'albumine de serum bovin [112], ou la fibronectine [113].

Parmi les différentes techniques mises en œuvre pour réaliser une nanotopographie sur des surfaces, l'utilisation de nanotubes de carbone (NTCs) est apparue comme présentant de nombreux avantages. En effet, ces objets de diamètre nanométrique et de forme allongée possèdent une grande surface spécifique. Ils sont aussi de très bons conducteurs, ce qui peut avoir un intérêt pour stimuler électriquement les réseaux de neurones in vitro ou in vivo s'ils sont intégrés à des électrodes de stimulation ou d'enregistrements intracrâniens [114]. Ils peuvent également être fonctionnalisés chimiquement, en leur greffant différentes molécules.

Dans la suite de ce paragraphe, nous examinons comment les nanotubes de carbone peuvent être utilisés comme substrat de culture pour l'étude de l'adhérence et la fonctionnalité des neurones.

a. Les nanotubes de carbone et leurs différentes configurations

Les nanotubes de carbone sont constitués d'un ou plusieurs feuillets de graphène enroulés de façon à former un tube. Ils peuvent comporter une seule paroi (on les dit « monoparoi »), deux parois (deux feuillets enroulés sur eux-mêmes, on les nomme « double-parois ») ou encore plusieurs parois (plus de deux feuillets enroulés sur eux-mêmes, on les nomme « multiparois ») (voir Figure 18).

Leurs propriétés électriques dépendent de leur structure et ils peuvent avoir un comportement métallique ou semi-conducteur. Les propriétés physiques des nanotubes de carbone (conductivité, propriétés chimiques, solubilité ...) dépendent également de leur chimie de surface (modifiée ou intrinsèque, liée à la méthode de synthèse). Après leur synthèse, les nanotubes de carbone peuvent être fonctionnalisés, soit de manière covalente, soit de manière non-covalente pour obtenir des réponses cellulaires particulières [115], [116] [117] (voir Figure 19).

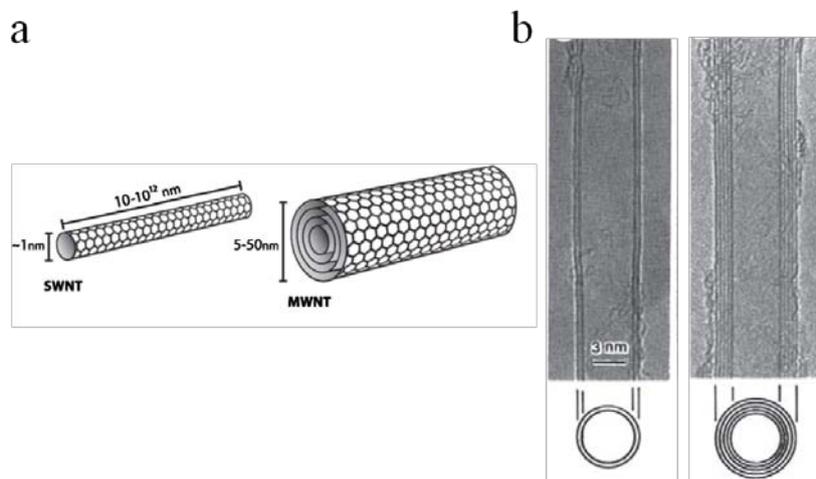


Figure 18 : Le nanotube de carbone est une structure tubulaire, obtenue à partir d'un feuillet de graphène enroulé dans le sens de la longueur. Les nanotubes de carbone monoparoi ont un diamètre proche de 1nm et une longueur micrométrique, voire sub-millimétrique. Les nanotubes multiparois comportent plusieurs tubes concentriques et leur diamètre varie en fonction du nombre de tubes qu'ils comportent (soit entre 5 et 50nm). **a.** Représentation schématique de la structure de nanotubes monoparoi et multiparois. **b.** Images prises au microscope électronique à transmission de nanotubes biparoi et mutliparois.

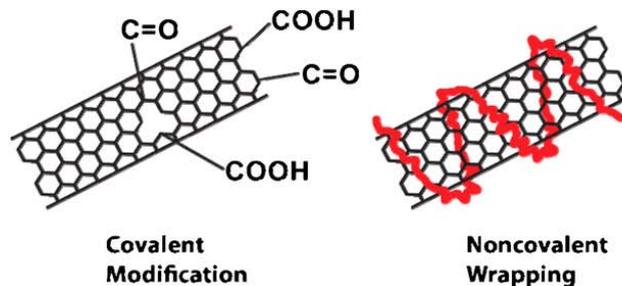


Figure 19 : La fonctionnalisation des nanotubes de carbone est utilisée pour améliorer leur dispersion dans une suspension, changer la charge de surface, ou délivrer des molécules spécifiques. La fonctionnalisation covalente implique une modification chimique du tube, en attachant spécifiquement des groupes chimiques sur des sites de défauts de la structure atomique du tube. La fonctionnalisation non-covalente repose sur des interactions hydrophobes et un recouvrement des tubes avec des polymères ou des surfactants appropriés.

▪ Influence des NTCs sur l'adhésion et la morphologie des neurones

La première étude qui reporte la culture de cellules neuronales sur des nanotubes de carbone a été réalisée par Mattson et al, en 2000 [118]. Cette équipe a cultivé des cellules de l'hippocampe d'embryons de rats sur des nanotubes multi parois bruts (sans purification préalable) non fonctionnalisés. Les nanotubes ont été déposés sur des lamelles de verre comportant un dépôt préalable de polyéthylène immine (PEI). Sur ces substrats, les neurones sont restés en vie pendant 8 jours. Ils n'ont pas développé d'arborisation neuritique aussi complexe que sur la surface contrôle (une lamelle couverte de PEI). Quelques années plus tard, Hu et al ont démontré que la croissance des neurites était moins développée sur les surfaces comportant des NTCs fonctionnalisés par rapport aux surfaces contrôles (boîtes de pétri en polystyrène) [115]. Cependant, en modifiant la charge portée par les nanotubes en les fonctionnalisant avec différents radicaux (-COOH, PABS, EN), ils ont montré qu'il est possible d'obtenir différentes arborisations neuritiques. L'arborisation est particulièrement développée lorsque les NTCs ont été fonctionnalisés avec des molécules chargées positivement (voir Figure 20).

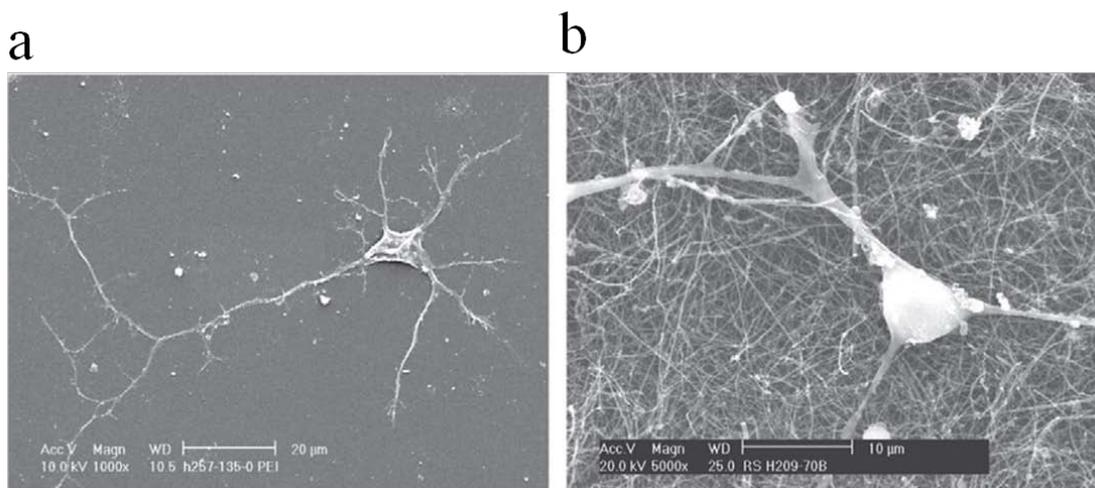


Figure 20 : Les nanotubes de carbone multiparois s'avèrent être des surfaces permissives pour la culture de neurones issues de l'hippocampe de rats (a), même si l'arborisation des neurites n'y est pas aussi complexe que sur le contrôle (b), qui est une lamelle de verre recouverte de PEI (polyéthylène immine). Images prises au microscope électronique à balayage. D'après [115].

Galvan-Garcia et al ont obtenu des résultats différents de Hu et al en utilisant des nanotubes purifiés [119]. En effet, dans leur cas, les NTCs se sont avérés favorables pour l'adhésion des neurones et les extensions neuritiques obtenues sont comparables à celles obtenues sur des substrats contrôles. Une hypothèse pour expliquer ces différences est que les NTCs ne sont pas préparés de la même manière dans ces différentes études (degré de purification, fonctionnalisation chimique, configuration sur la surface, ...).

Ainsi, ces travaux ont ouvert la voie à de nombreuses autres études visant à mieux comprendre les effets des différents types de NTCs sur les types cellulaires neuronaux d'une part pour ensuite les intégrer à des biomatériaux ou à des systèmes de mesure électrophysiologiques d'autre part.

La compatibilité des NTCs pour la croissance des neurones a été démontrée par plusieurs groupes [120], [121], [122]. Les NTCs représentent un substrat efficace pour l'attachement et le développement des neurones [123], [124]. Dans certains cas, les NTCs sont présentés aux cellules sous forme de tapis denses, dans lesquels les NTCs sont désorganisés (Figure 21 et Figure 22).

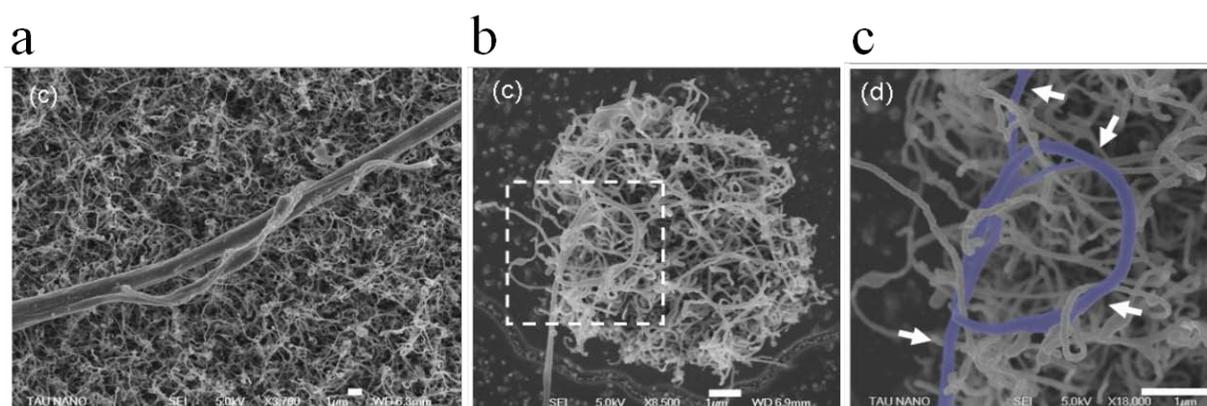


Figure 21 : **Illustration des contacts étroits existants entre les neurites et les faisceaux de nanotubes de carbone.** a. Image MEB d'un neurite sur un tapis de NTCs. b. Image MEB d'un neurite qui est « ancré » dans le réseau de NTCs (filaments blancs). c. Zoom sur le carré en pointillés. Le neurite a été colorisé artificiellement en violet, après la comparaison avec une image prise au microscope à fluorescence. Les filaments blancs sont les NTCs. D'après [124].

Des travaux postérieurs ont fonctionnalisé des nanotubes multiparois avec du NGF et des facteurs neurotrophiques en utilisant une fonctionnalisation chimique du type amine. La nature carbonée des nanotubes est alors « écrantée » par cette fonctionnalisation. La méthode de fonctionnalisation covalente assure une meilleure stabilité dans le temps que la simple incubation sur les NTCs. Les neurones ont montré un développement correct, comparable à celui obtenu sur une surface contrôlée [125]. Dans d'autres études, la configuration topographique des NTCs est encore différente : les NTCs sont synthétisés in situ, verticalement au plan du substrat, à partir de précurseurs déposés sur la surface [126] (voir Figure 22). Dans la majorité des cas, cette configuration « en brosse » des NTCs semble favorable pour l'adhérence des cellules.

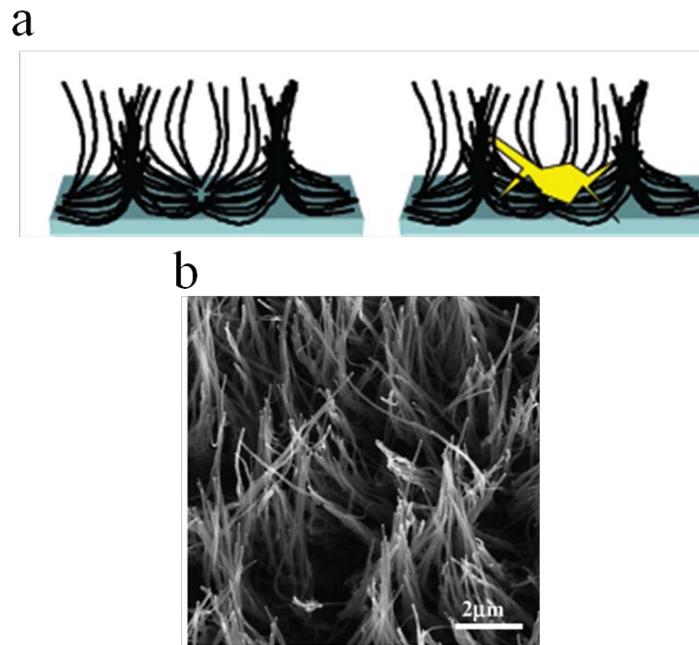


Figure 22 : **Substrats de croissance pour la culture de cellules comportant des « borsses » de nanotubes.** **a.** Schéma de la configuration des nanotubes, qui ont été synthétisés in situ, par croissance par CVD (Chemical Vapor Deposition, dépôt chimique en phase vapeur) et qui ont ensuite reçu un traitement chimique pour former un réseau à trois dimensions. **b.** Image prise au MEB des substrats obtenus. D'après [126].

Certains groupes de recherche ont développé des méthodes pour créer des motifs de NTCs sur des surfaces non favorables pour la croissance des neurones. Ces surfaces, présentant donc des zones anti-adhésives et des zones avec des NTCs, favorables pour l'adhérence des cellules, ont permis d'organiser la construction de réseaux neuronaux in vitro [127], [123] (voir Figure 23).

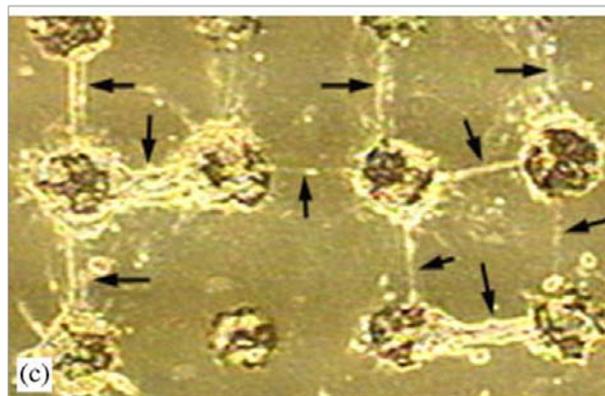


Figure 23 : **Image optique de neurones primaires de rats cultivés sur des surfaces comportant des motifs de NTCs en forme de disque,** réalisés par dépôt sélectif du catalyseur de NTCs et par croissance in situ. Les neurones sont sur les disques de NTCs et les neurites s'étendent d'un disque à un autre (flèches noires). D'après [127].

Nous pouvons retenir de ces différentes études que les NTCs peuvent interagir avec les cellules en culture de manière très diverse en fonction de leur configuration (tapis ou brosse), de leur fonctionnalisation de surface (vierge, chargé, aminé...), voir même de leur conductivité électrique. Cependant, certains mécanismes restent encore non élucidés.

- **Influence des NTCs sur la culture de cellules souches neurales**

Les cellules souches neurales sont des cellules multipotentes qui peuvent se différencier en neurones et en cellules gliales. Elles représentent un grand intérêt pour l'ingénierie tissulaire, leurs interactions avec les NTCs ont été peu étudiées.

La croissance et la différenciation de cellules souches neurales de souris sur des substrats de NTCs a été démontrée par Jan et Kotov en 2007 [128]. Dans cette étude, les cellules souches sont ensemencées sous forme de neurosphères. Les neurosphères ont adhéré aussi bien aux substrats de NTCs qu'aux substrats contrôles (lamelles de verres recouvertes d'une couche de poly-L-ornithine) et la différenciation ainsi que le développement neuritique obtenus sur les deux types de surfaces étaient comparables. Lorsque les NTCs sont recouverts de laminine, ceux-ci s'avèrent également favorables pour la différenciation des cellules souches neurales.

- **Influence des NTCs sur les propriétés électrophysiologiques des neurones**

Les propriétés de conduction intrinsèques des NTCs ont conduit un certain nombre de chercheurs à étudier l'impact des NTCs sur les échanges électrophysiologiques des neurones, puis, à utiliser les NTCs pour améliorer les interfaces entre les neurones et les outils de mesure de leur activité électrophysiologique.

Lovat et al ont étudié le comportement de neurones de l'hippocampe de rats sur des surfaces comportant une couche de NTCs multiparois. Ils ont obtenu des cultures stables et les neurones avaient la même morphologie et la même activité électrique sur les NTCs que sur une surface de verre, servant de contrôle. Pourtant, comme le montre la Figure 24, pour les neurones qui ont poussé sur les NTCs, la fréquence d'émission de courants post-synaptiques spontanée s'est avérée supérieure [129]. La cause de cette observation n'est pas élucidée mais des résultats similaires ont été obtenus par d'autres auteurs, qui cette fois ont stimulé les neurones en utilisant la couche de NTCs conductrice. Des modèles du couplage résistif qui existe entre les neurones et les NTCs ont été développés [130].

Certaines études ont analysé l'influence de la conductivité des NTCs sur le développement des neurites, en faisant varier la conductivité des films de NTCs (par la variation de l'épaisseur des films) sur lesquels sont mises en culture les cellules neuronales. Malarkey et al ont par exemple montré que la conductivité de films de NTCs monoparois a une influence positive sur le développement neuritique, en comparaison à un substrat de référence qui ne comporte pas de NTCs [131].

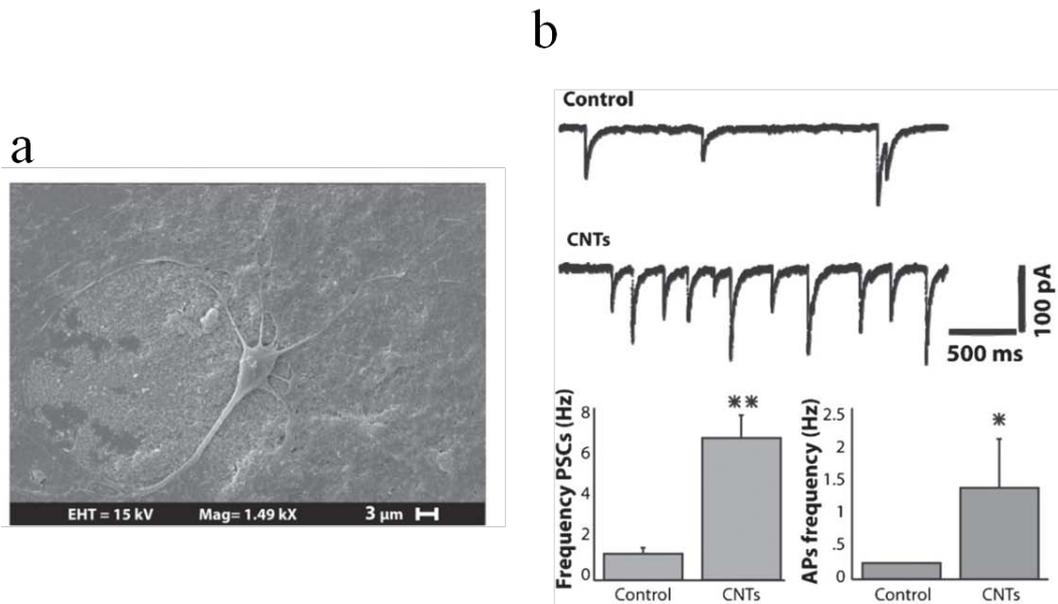


Figure 24 : a. Image MEB d'un neurone sur des NTCs. b. Effet des NTCs sur la fréquence d'émission de courants post-synaptiques spontanée. Sur les NTCs, celle-ci est environ 4 fois supérieure à celle relevée sur le contrôle, comme on peut le voir sur les deux graphiques du bas. D'après [129].

c. Les NTCs en tant que revêtement pour faciliter l'enregistrement et la stimulation des signaux neuronaux

L'utilisation des NTCs comme interface entre des dispositifs d'enregistrement ou de stimulation électrophysiologiques s'est avéré très efficace. Cela permet d'améliorer la transmission des signaux [132], la stimulation des réseaux neuronaux [133] ainsi que l'amélioration du rapport signal sur bruit [121]. Les NTCs sont en particulier utilisés pour modifier la surface active de puces de Multi-Electrode Array (MEA) qui servent à stimuler et à enregistrer in vitro l'activité électrophysiologique de réseaux de neurones [120], [134].

Récemment, les NTCs ont été intégrés à des électrodes d'enregistrement ou de stimulation pour une utilisation in vivo. Keefer et al ont été les premiers en 2008, à montrer que des électrodes faites d'or et de tungstène et comportant des NTCs multiparois ont pu enregistrer des potentiels de champ local [121]. Ces potentiels résultent de l'activité d'un groupe de neurones. Les électrodes comportant des NTCs ont montré une meilleure sensibilité globale pour la détection de l'activité neuronale.

Plus récemment, des MEAs (Multi-Electrode Array, réseau multi-électrodes) flexibles comportant des NTCs déposés par CVD (dépôt en phase vapeur) ont été implantés dans la région motrice de primates [135]. Des enregistrements par électrocorticographie ont été réalisés sur une période de 1 an, à la fois avec des électrodes standard en nitrure de titane et avec des électrodes à base de NTCs. Les auteurs de cette étude montrent que les électrodes à base de NTCs perçoivent une plus grande quantité de signal que les autres électrodes.

3. Positionnement des travaux de thèse

L'analyse bibliographique présentée précédemment a montré la grande efficacité de sillons topographiques afin d'aligner les neurites des cellules neuronales en croissance. Toutefois, nous avons souligné la rareté des études de ce type consacrées à des cellules souches neurales d'intérêt thérapeutique. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier en détail ce point particulier. De même, cette analyse de la bibliographie a montré le vif intérêt suscité par les interactions entre les cellules neuronales et les NTCs. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier ces phénomènes en essayant de réaliser des motifs micrométriques à base de NTCs de manière à faire apparaître des comportements invisibles sur couche homogène et de manière à élucider les mécanismes d'interaction entre les cellules en culture et les NTCs. Ces différentes études de nature assez fondamentales se sont combinées avec un contexte applicatif très motivant, qui, en « filigrane », a servi de fil conducteur à ces différents travaux, celui de l'ingénierie tissulaire appliquée au cerveau.

Chapitre 2 - Interactions entre des cellules neuronales et des surfaces ingénierées à l'échelle micrométrique

Le chapitre précédent a montré que l'utilisation de surfaces ingénierées chimiquement et/ou physiquement aux échelles micrométriques et nanométriques permet de découvrir de nouvelles propriétés des cellules, voire même de déterminer leur devenir (mort ou survie, différenciation en tel ou tel type de cellules dans le cas de cellules souches). On sait que l'intégration de signaux externes par les cellules amène à différentes réponses, en fonction de leur type et de leur origine.

En particulier, la création d'une topographie définie sur une surface permet de modifier le comportement cellulaire, en favorisant ou en inhibant leur adhérence, leur étalement ou encore leur alignement. L'étude et la compréhension des interactions entre des cellules d'intérêt et des surfaces comportant une microtopographie constituent un premier pas pour améliorer les propriétés de surface de biomatériaux qui doivent répondre à un objectif bien défini.

Pour ce travail de thèse, nous avons pour objectif la création d'une bioprothèse capable d'aider à régénérer des tissus neuraux lésés. La prothèse devra constituer un support pour la croissance et la différenciation de cellules souches neurales en neurones et aussi en astrocytes et en oligodendrocytes. Pour élaborer cette bioprothèse, nous allons étudier la possibilité d'utiliser le PDMS (PolyDiMéthylSiloxane), sur la surface duquel nous créons une microtopographie. L'objectif de cette surface est double : elle devra fournir aux cellules neurales un environnement permissif pour leur croissance et aussi guider leur développement dans une direction pré-établie.

Pour cela, nous générons des microsillons de différentes largeurs sur des surfaces de PDMS et étudions la réaction de différentes lignées neuronales mais aussi de cellules souches à cette microtopographie. En particulier, cette étude est menée afin de répondre aux questions suivantes :

- Lorsque les cellules neuronales sont cultivées sur une surface microstructurée, où vont se localiser les cellules ? Existe-t-il une zone préférentielle ?
- Qu'en est-il de leur viabilité si cette surface les contraint ?
- Comment l'adhérence cellulaire va-t-elle être influencée par la topographie ?
- La topographie peut-elle affecter la différenciation des cellules souches ?
- Quels effets vont avoir les microsillons de différentes largeurs sur le développement neuritique des neurones ?
- L'interaction cellule/cellule entre-t-elle en compétition avec l'interaction cellule/surface ?
- Les phénomènes observés sont-ils génériques à plusieurs types de cellules neurales ou bien sont-ils dépendants du type cellulaire ?

Dans ce chapitre, nous expliquons dans un premier temps les méthodes que nous avons mises en œuvre pour fabriquer des surfaces comportant une microtopographie. Puis, nous présentons les trois types de cellules neuronales cultivés sur ces surfaces ainsi que les méthodes développées pour décrire et analyser le comportement des cellules.

Dans un second temps, nous détaillons les résultats obtenus avec les trois types de cellules. Ils sont ensuite synthétisés puis discutés afin de tirer des conclusions, notamment sur la généralité des effets observés.

Enfin, nous présentons deux exemples d'application des phénomènes observés lors de ces études.

1. Matériel et méthodes

1.1. Réalisation de microstructures sur la surface d'un matériau biocompatible

Pour générer une microtopographie sur la surface du matériau polymère biocompatible que nous utiliserons pour la culture de neurones, nous avons choisi d'utiliser la technique de moulage. Elle consiste à placer le matériau choisi (qui peut se présenter sous différentes formes, par exemple liquide, feuille, pâte, granulés...) dans un moule dont il prendra la forme. La fabrication du moule microstructuré nécessite l'utilisation d'équipements lourds et onéreux. En revanche, une fois que le moule est réalisé, on peut l'utiliser de nombreuses fois. Cette technique permet ainsi de fabriquer rapidement et à faible coût un grand nombre d'échantillons permettant la mise en œuvre d'études systématiques.

a. Fabrication d'un moule en silicium

Pour fabriquer le moule, nous avons utilisé les équipements de lithographie et de gravure de la salle blanche du LAAS, en suivant un ensemble de procédés très conventionnels. Ces équipements permettent de travailler avec des plaquettes de silicium mesurant 4 pouces de diamètre et donc d'obtenir un moule de cette dimension (4pouces=10,16cm).

La Figure 25 présente de manière schématique les étapes de la fabrication d'un moule de silicium. Celles-ci sont :

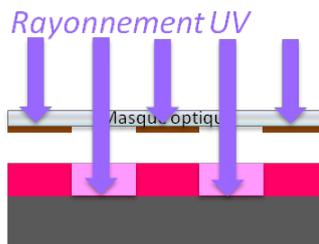
- la photolithographie qui permet d'inscrire les motifs désirés dans une couche de résine photosensible
- la gravure ionique réactive du silicium qui permet de graver la surface du silicium en utilisant la résine comme masque de gravure
- le traitement de surface du silicium pour le rendre antiadhésif, ce qui permettra de réaliser un très grand nombre d'opérations de moulage

1. Photolithographie

a. Enduction de la plaquette de silicium avec la résine photosensible



b. Exposition de la résine à travers le masque optique

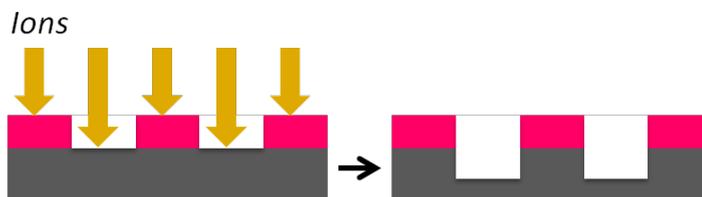


c. Développement



2. Gravure ionique réactive

a. Attaque du silicium



b. Dissolution de la résine restante



3. Traitement anti-adhésif

Fonctionnalisation en milieu liquide

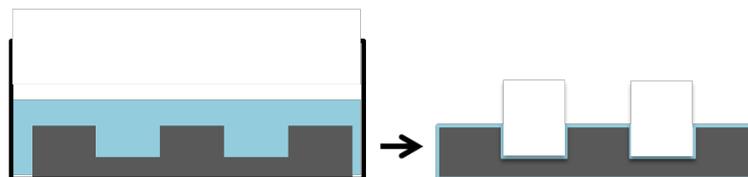


Figure 25 : schéma représentant les différentes étapes pour la fabrication d'un moule en silicium comportant des micromotifs sur sa surface. L'utilisation d'une résine positive est représentée.

- la photolithographie

La technique de lithographie la plus adaptée pour structurer de larges surfaces avec une résolution de l'ordre du micromètre est la photolithographie. En effet, elle permet de traiter l'ensemble de la surface en quelques secondes (technique de lithographie « en parallèle ») et de générer des motifs ayant une dimension latérale minimale de 1 à 2 micromètres.

La photolithographie consiste à exposer pendant quelques secondes une résine photosensible, déposée au préalable sur une plaquette de silicium, à une radiation d'ultra-violet (UV, longueur d'onde de 405nm) au travers d'un masque comportant les motifs à reproduire.

La résine est déposée sur la plaquette en utilisant la technique d'enduction centrifuge⁸. Pour obtenir des motifs sur la résine, on l'expose à un rayonnement UV à travers un « masque optique ». Il s'agit d'une plaque de quartz transparente sur laquelle les motifs de notre choix ont été réalisés. Ces motifs sont de minces couches de chrome, ils sont donc opaques et ne laissent pas passer les rayons UV (voir un exemple de dessin sur la Figure 26).

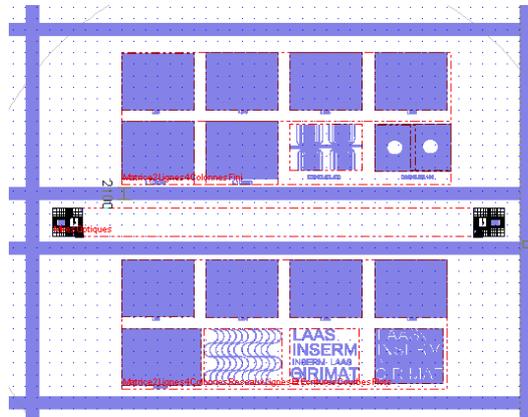


Figure 26: exemple de dessin réalisé avec le logiciel "Clewain" pour la génération d'un masque optique de photolithographie. Les parties violettes correspondent aux motifs du masque, qui seront en chrome. Nous avons organisé les motifs à l'intérieur de grands rectangles, dont les dimensions correspondent à celles d'un puits de culture de type « Labtek 8 puits » utilisé pour la culture des neurones. Le masque est fabriqué par lithographie laser.

Lors de l'exposition de la résine au rayonnement UV à travers le masque optique, certaines zones de la résine vont être exposées, et d'autres non. L'exposition engendre des modifications chimiques au sein de la résine photosensible et modifie sa capacité à se dissoudre dans un solvant particulier, dit « solvant de développement ».

Après l'exposition de la résine au rayonnement UV, la plaquette de silicium comportant la résine est plongée dans ce solvant. Ce faisant, on met le silicium à nu sur certaines zones et on obtient finalement une image des motifs souhaités (voir Figure 25, étape 1). Il existe deux principaux types de résines :

- les résines dites « négatives », pour lesquelles le rayonnement UV entraîne une polymérisation des zones exposées, leur donnant une tenue particulière au solvant de développement. Les zones non exposées sont solubles dans ce solvant et disparaissent sélectivement. On obtient alors un motif de résine qui est le négatif de celui constitué par le chrome du masque.

- les résines dites « positives », pour lesquelles le rayonnement UV entraîne une solubilité accrue de la résine dans le solvant de développement. Les parties exposées se dissolvent dans le solvant de développement et on obtient finalement le même motif que celui constitué par le chrome du masque (cas représenté sur le schéma de la Figure 25).

⁸ L'enduction centrifuge est une technique qui permet le dépôt de couches minces sur des surfaces planes. Le substrat est posé et maintenu par aspiration sur un plateau qui tourne à grande vitesse, afin d'étaler le matériau liquide déposé de façon uniforme. L'épaisseur de la couche générée dépend de plusieurs paramètres, dont la vitesse de rotation du plateau, son accélération, la durée de rotation, ou encore la viscosité du matériau, la quantité de matériau déposée.

- la gravure sèche ionique réactive

La deuxième étape consiste en une gravure sèche ionique réactive, réalisée dans un bâti RIE (Reactive Ion Etching). Elle permet d'attaquer le silicium à la fois chimiquement (par une réaction chimique entre des radicaux générés au sein du plasma et la surface de silicium) et physiquement (par bombardement des ions générés au sein du plasma sur le silicium). En adaptant les paramètres expérimentaux du procédé de gravure (puissance et nature des ions, durée du procédé...), il est possible de graver une profondeur plus ou moins importante de silicium (de l'ordre de quelques centaines de nanomètres à plusieurs dizaines de micromètres).

La résine restante à la surface de la plaquette de silicium est ensuite dissoute à l'aide d'un solvant adapté (acétone par exemple). On obtient ainsi une plaquette de silicium qui comporte une microtopographie en surface ayant la géométrie souhaitée. On l'appellera par la suite « moule de silicium » (voir Figure 25, étape 2).

Les protocoles et paramètres expérimentaux que nous avons utilisés pour réaliser nos moules de silicium sont détaillés en annexe.

La troisième étape est un traitement de surface du moule (voir Figure 25, étape 3). Pour pouvoir utiliser ce moule de silicium et rendre possible le démoulage des matériaux, il faut lui appliquer un traitement de surface. Ce traitement a pour but de rendre la surface du moule hydrophobe, en déposant à sa surface un matériau moléculaire ayant une très faible énergie libre de surface. Sans ce traitement, les polymères moulés ne se désolidariseraient pas du moule.

Il consiste à greffer à la surface du silicium une couche moléculaire présentant une forte accroche à la surface du silicium et exposant vers l'extérieur un groupement inerte chimiquement (alkyl par exemple). De nombreux silanes sont utilisés à cet effet mais les trichlorosilanes sont les plus réactifs [136], [137]. Nous utilisons en particulier l'octadécyltrichlorosilane (OTS). Cette étape de silanisation se fait en milieu liquide, en plongeant le moule de silicium pendant 5 minutes dans un mélange trichloroéthylène-OTS (concentration 1% en volume). Pour obtenir un traitement de bonne qualité, il faut au préalable activer la surface du moule de silicium, en utilisant un plasma oxygène (durée du plasma : 5 minutes, puissance : 800W, pression de l'oxygène : 1,5mBars). Cela permet de générer en surface des groupes silanols Si-OH qui vont réagir avec la partie réactive (trichloro) de la molécule d'OTS. La Figure 27 montre une photographie d'un moule de silicium qui a reçu ce traitement. L'eau ruisselle sur le moule hydrophobe.

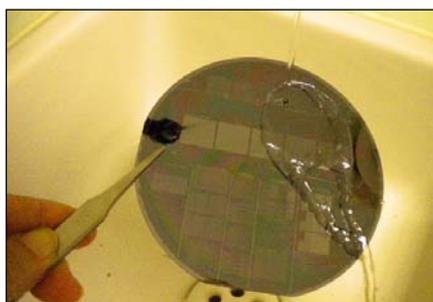


Figure 27 : photographie d'un moule sous un filet d'eau, ayant reçu un traitement de surface le rendant hydrophobe.

b. Fabrication d'un substrat biocompatible microstructuré pour la culture cellulaire

Nous avons choisi de réaliser et d'utiliser des substrats en polydiméthylsiloxane (PDMS) microstructurés pour étudier les réactions et les comportements de cellules neuronales vis-à-vis de la topographie à l'échelle micrométrique.

Ce choix est argumenté par le fait que le PDMS est un matériau biocompatible et couramment utilisé pour des réalisations microfluidiques impliquant des cellules [138], [139], [140], [141]. De plus, il est facile de le microstructurer par moulage.

▪ Présentation du PDMS

Le PDMS est un polymère et plus particulièrement un élastomère. Il appartient à la famille des silicones, qui ont une structure chimique basée sur l'alternance d'atomes de silicium et d'oxygène⁹ (voir Figure 28). Les liaisons covalentes que le silicium crée avec l'oxygène pour former le squelette des macromolécules sont très stables. Cela conduit pour le PDMS à des propriétés de résistance à haute température, aux rayons ultra-violets et infrarouges. Il est inerte, naturellement hydrophobe (angle de contact avec l'eau autour de 110°). De plus, la faible tension superficielle confère au PDMS un très bon pouvoir d'étalement.

Le PDMS que nous utilisons est le Sylgard® 184. Il doit être préparé en mélangeant dans un rapport 10 :1 une base contenant l'oligomère PDMS et un agent de réticulation. L'agent de réticulation se compose d'un catalyseur au platine et d'un oligomère hydrogéné.

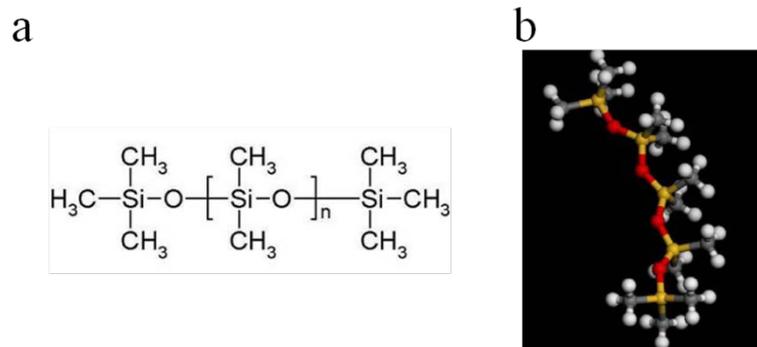


Figure 28 : **Structure chimique de l'élément de base du PDMS (polydiméthylsiloxane).** a : structure chimique b : représentation spatiale pour n=4, les fins de chaîne sont des groupes méthyle.

- réalisation du substrat microstructuré

A température ambiante, le PDMS liquide est étalé sur le moule de silicium que nous avons fabriqué. Le tout est placé dans une étuve à 80°C pendant 3 heures minimum. Le PDMS réticule et on obtient finalement un matériau solide, souple, transparent [142]. Nous découpons manuellement un bout de PDMS à l'aide d'un scalpel et le démoulons en le soulevant de la surface du moule avec une

⁹ La liaison entre le silicium et l'oxygène Si-O est à l'origine du nom des silicones, contraction de silicon et ketones.

pince, comme illustré sur la Figure 29a. L'échantillon de PDMS comporte sur une face le négatif des microstructures du moule. La Figure 29c montre une image MEB de la surface d'un échantillon de PDMS qui comporte des microstructures, obtenues par moulage.

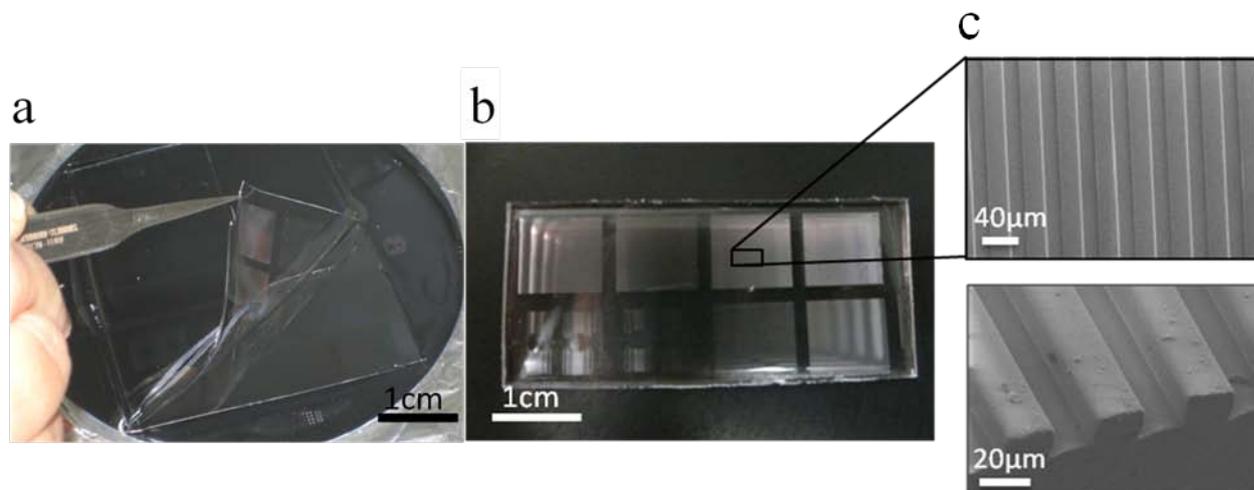


Figure 29 : **PDMS microstructuré obtenu après moulage contre un moule de silicium.** **a** : photographie du démoulage manuel du PDMS réticulé. **b** : photographie d'un échantillon de PDMS obtenu après découpe et démoulage manuel. A l'intérieur de chaque rectangle visible se trouve un réseau de sillons verticaux parallèles, de dimensions différentes dans chaque rectangle. **c** : images MEB de la topographie créée à la surface du PDMS.

L'étude de la bibliographie nous a amenés à créer et utiliser des échantillons dont la surface comporte des sillons mesurant quelques micromètres de profondeur et de largeur (on les appellera par la suite « microsillons »).

Nous avons fait varier la largeur et l'espacement de ces microsillons ainsi que leur profondeur afin d'étudier l'influence de leurs dimensions sur l'adhérence et le développement cellulaires. La Figure 30 présente de manière schématique les différentes géométries des motifs. Chaque échantillon comporte une même géométrie de motifs sur toute sa surface. Nous nommons les géométries des motifs comme suit : « **x-y** » : la largeur des « **bosses** » est de $x \mu\text{m}$; la largeur des « **microsillons** » est de $y \mu\text{m}$. Sauf indication contraire, la profondeur des microsillons est de $25 \mu\text{m}$. Un échantillon qui ne comporte aucune microstructuration de surface nous sert de surface référence (ou « contrôle »). Nous le nommons échantillon « plat ».

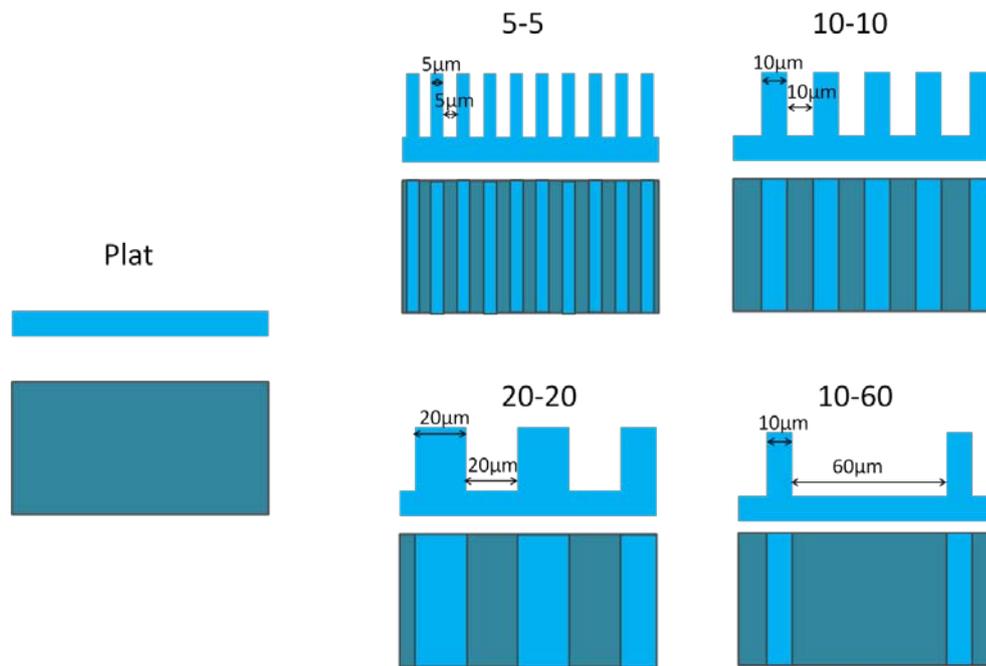


Figure 30 : **Représentation schématique de la géométrie des microstructures réalisées sur la surface des échantillons de PDMS.** La largeur des microsillons varie entre 5 et 60µm. La profondeur est de 25µm. Un échantillon de PDMS sans microstructures sert de surface référence. Il est nommé échantillon « plat ».

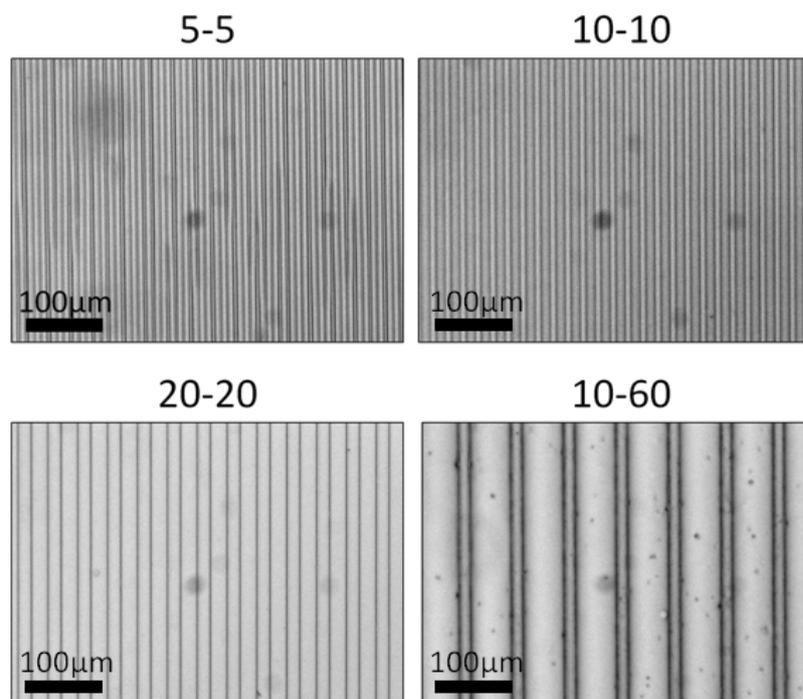


Figure 31 : **Images prises au microscope optique des structures utilisées.** La profondeur des microsillons est de 25µm.

- Mise en place des substrats de PDMS dans les puits de culture

Pour la culture des neurones sur les échantillons de PDMS, nous avons découpé à l'aide d'un scalpel les échantillons à la dimension des puits de culture. La majorité des expériences a été réalisée en utilisant des puits de culture de type « labtek 8 puits » en plastique (disponible dans le commerce), chacun mesurant 8mmx6mm.

Les échantillons de PDMS doivent être fixés au fond des puits pour éviter qu'ils ne flottent à la surface du milieu de culture pendant l'expérience. Pour cela, nous étalons manuellement, en guise de « colle biocompatible », une fine couche de PDMS non réticulé au fond des puits, puis nous déposons dans chaque puits un échantillon de PDMS. Nous plaçons ensuite le tout à l'étuve à 37°C pendant 3 heures¹⁰ afin de réticuler la fine couche de PDMS. Nous obtenons finalement des puits de culture au fond desquels se trouvent collées les surfaces de PDMS microstructurées (voir Figure 32, étape b).

- **Rendre le PDMS hydrophile par traitement oxydatif au plasma oxygène**

Pour permettre l'adhérence des cellules neuronales mises en culture sur l'échantillon de PDMS, il est nécessaire de rendre au préalable sa surface hydrophile. Pour cela, on réalise un traitement oxydatif au plasma oxygène. Ce traitement a pour effet de créer en surface du PDMS une fine couche de SiO₂ de quelques nanomètres d'épaisseur et des fonctions silanols Si-OH, le rendant hydrophile. Ce caractère hydrophile n'est pas durable dans le temps [143], [144].

Les paramètres de réglage du plasma ont été choisis après avoir réalisé une étude complète que nous ne détaillerons pas dans ce mémoire, de sorte à obtenir une hydrophilie maximale tout en préservant l'intégrité des propriétés de la surface de PDMS, notamment en termes de rugosité¹¹. Ils sont détaillés dans le Tableau 1. L'équipement utilisé est un modèle « pico μW UHP », du constructeur Diener Electronics.

Puissance du plasma	300W
Pression d'entrée de l'oxygène	1,5mbars
Durée du traitement	2 minutes

Tableau 1: **paramètres expérimentaux utilisés pour réaliser le traitement oxydatif des surfaces de PDMS.**

Il est aussi parfois préconisé de déposer sur la surface des protéines de la matrice extracellulaire ou d'autres molécules, avant la culture afin de favoriser l'adhérence des cellules sur la surface de culture. Dans notre cas, nous utilisons la polylysine et la laminine (voir Figure 32d). La polylysine est un peptide polycationique couramment déposé sur des surfaces de culture. Il favorise les interactions électrostatiques entre les ions chargés négativement de la membrane des cellules et la surface de culture. La laminine est un constituant protéique de la matrice extracellulaire qui intervient aussi dans les mécanismes d'adhésion cellulaire et qui est couramment utilisé comme substrat pour la culture cellulaire, notamment de lignées neuronales.

¹⁰ Le plastique qui constitue les puits de culture ne supporte pas d'être chauffé à une température supérieure à 50°C. De plus, la couche de PDMS qui doit réticuler étant très fine, ces paramètres suffisent pour obtenir la réticulation.

¹¹ Il a été montré dans la littérature que l'utilisation d'un plasma oxygène à une puissance élevée entraîne une augmentation de la rugosité de la surface de PDMS [144], [145].

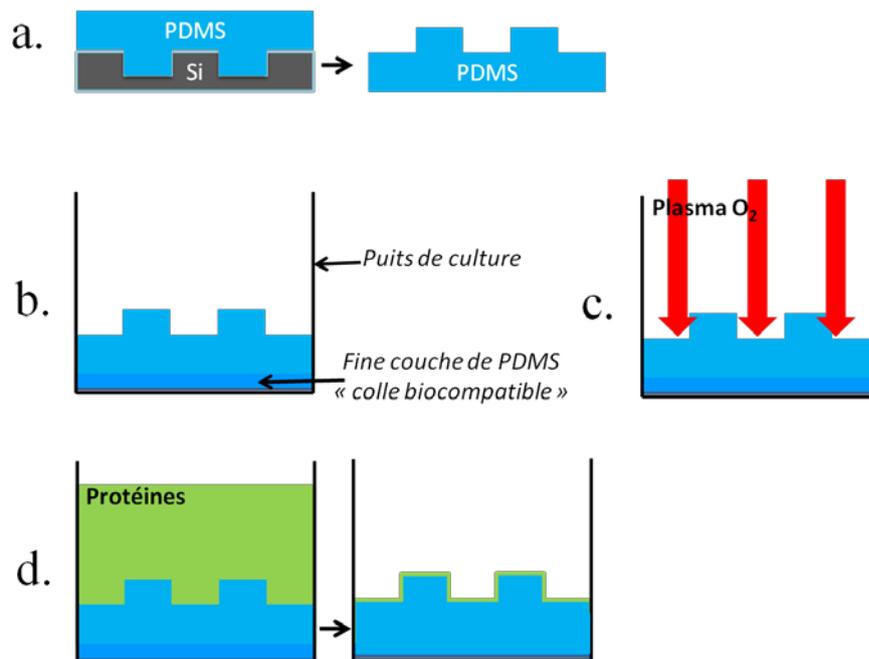


Figure 32 : schéma représentant les différentes étapes pour la fabrication d'un substrat de PDMS microstructuré pour la culture de cellules. **a** : moulage du PDMS contre un moule de silicium. **b** : collage du substrat de PDMS au fond d'un puits de culture, en utilisant une fine couche de PDMS non réticulé comme « colle biocompatible ». L'ensemble est placé à 37°C pendant au moins 3 heures pour que cette fine couche réticule. **c** : traitement oxydatif au plasma oxygène de l'ensemble. **d** : incubation de protéines favorisant l'adhérence des cellules. On obtient finalement une couche de protéines à la surface du substrat de PDMS microstructuré.

Afin d'examiner si la polylysine s'adsorbe bien sur nos surfaces de PDMS, nous avons incubé de la polylysine marquée avec un fluorophore puis observé les surfaces. La Figure 33 montre une surface de PDMS microstructurée (lignes parallèles de 10µm de large) sur laquelle on a incubé pendant 4 heures un volume de 500µL de polylysine marquée en fluorescence par la fluorescéine FITC (fluorescein isothiocyanate, vert). La polylysine est déposée soit sur le PDMS utilisé tel quel, après l'étape de démoulage (image a), soit sur le PDMS ayant reçu un traitement oxydatif au plasma, ce qui le rend hydrophile. La polylysine apparaît en vert sur les images prises au microscope en fluorescence. Pour prendre ces images, nous avons fait la mise au point sur le sommet des microstructures. On observe que lorsque le PDMS est hydrophobe (utilisé tel quel), la polylysine n'est pas répartie de façon homogène. On observe même de larges zones sans aucune fluorescence. En revanche, lorsque le PDMS est hydrophile, on observe une fluorescence homogène sur toute la surface des microstructures indiquant que la polylysine s'est adsorbée sur toute la surface.

Nous avons ensuite vérifié que la couche de polylysine déposée reste bien accrochée sur la surface du PDMS pendant la durée de la culture. Nous avons donc conservé nos surfaces de PDMS hydrophile recouvertes de polylysine dans du milieu de culture à 37°C pendant plusieurs semaines, pour simuler les conditions de culture. On observe que la fluorescence est toujours présente, signe que la polylysine est encore sur la surface. Nous avons donc validé ce protocole pour préparer les surfaces de PDMS pour la culture de neurones.

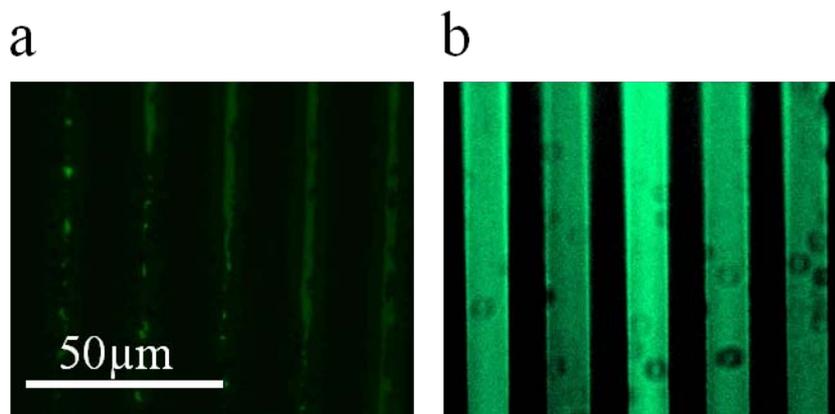


Figure 33 : Images prises au microscope optique à fluorescence de surfaces de PDMS microstructuré ayant reçu une incubation de polylysine marquée par le fluorophore FITC (fluorescein isothiocyanate, vert) pendant 4 heures (concentration=40μg/mL). **a** : cas d'un échantillon de PDMS utilisé tel quel, après le démoulage. **b** : cas d'un échantillon de PDMS rendu hydrophile par traitement oxydatif au plasma. Les images ont été prises en faisant la mise au point sur le sommet des structures.

- **Considérations supplémentaires sur le retour à l'hydrophobicité du PDMS après le traitement oxydatif au plasma**

Nous avons mentionné précédemment que le traitement oxydatif du PDMS le rendant hydrophile a une durée de vie limitée dans le temps. Cela peut s'avérer problématique pour certaines applications. Dans notre cas, il est nécessaire de déposer sur la surface du PDMS les protéines d'adhérence ou les cellules tant que le PDMS est encore hydrophile. Pour déterminer la plage de temps durant laquelle nous pourrions réaliser le dépôt de protéines ou de cellules, nous avons effectué à intervalles réguliers des mesures d'angle de goutte afin de suivre dans le temps l'évolution de l'hydrophilie de la surface du PDMS. Les résultats de ces mesures sont détaillés en annexe 2. Nous avons pu déterminer qu'un angle de goutte de 20° est une valeur correspondant à une hydrophilie suffisante pour permettre l'adhérence des cellules ou de la couche de polylysine. Nos mesures nous ont permis d'estimer à 1 heure le délai dont nous disposons pour déposer les cellules ou la polylysine sur les surfaces de PDMS. Nous avons également testé différents paramètres de réglage du plasma et mis en œuvre différentes idées pour conserver plus longtemps l'effet du traitement plasma et ainsi disposer d'une plus grande liberté en temps au moment des expériences (voir annexe 2).

- **Précautions de stérilisation des substrats de culture**

Toutes les surfaces qui sont en contact avec les éléments biologiques (cellules, milieu de culture) doivent être parfaitement stérilisées pour éviter la contamination des cultures. Pour cela, nous rinçons les puits de culture avec de l'éthanol à 70%, avant et après le traitement oxydatif au plasma. Dès que les surfaces ont été traitées au plasma, nous les manipulons dans un poste de sécurité microbiologique (PSM). Nous plaçons ensuite les puits de culture sous un rayonnement UV, pendant 40 minutes. Nous utilisons pour cela une lampe UV qui est intégrée dans la PSM. Ce rayonnement constitue un moyen de stérilisation supplémentaire.

1.2. Culture de cellules neuronales

Nous avons travaillé avec des lignées neuronales et des cellules souches neurales adultes primaires. Les lignées sont des cellules que l'on a rendues volontairement « immortelles » pour pouvoir les maintenir en culture indéfiniment. Ainsi, elles sont un outil de laboratoire permettant de réaliser un grand nombre d'expériences. Cependant, elles sont un modèle limité de ce qu'il se passe *in vivo*. C'est pourquoi il est important de valider les résultats obtenus avec des cellules primaires, dont l'accès est par contre plus limité (dans notre cas : 10 prélèvements par an).

Lors de la culture des cellules de lignées, les cellules se divisent et progressivement, elles peuvent occuper toute la surface de la boîte de culture. On parle alors de confluence. Cette situation n'est pas favorable pour les cellules et perturbe leur développement. Il faut donc « passer » les cellules avant d'atteindre la situation de confluence. Cette technique consiste à les détacher du support, à en récupérer un certain nombre, et remettre ce nombre de cellules en culture dans une nouvelle boîte. Le milieu de culture est propre à chaque type cellulaire car les différents types de cellules n'ont pas besoin des mêmes éléments pour vivre. Il doit être d'une composition la plus proche possible des conditions de l'environnement des cellules *in vivo*. Il sert à la fois d'élément nutritif et à maintenir les conditions physicochimiques de l'environnement stable (pH, osmolarité). Il consiste le plus souvent en l'association d'un milieu synthétique de base et d'un sérum. Le milieu synthétique de base peut avoir une composition plus ou moins riche, en fonction du type cellulaire cultivé. Il contient entre autres des sels minéraux, des acides aminés, du glucose. Le sérum est un mélange de composition complexe, qui contient notamment un grand nombre de substances libérées par différents types de cellules de l'organisme donneur. Le sérum le plus performant et le plus utilisé est le sérum de veau foetal. Il contient des facteurs de croissance, des hormones, des facteurs d'adhérence, et de nombreux oligoéléments nutritifs.

a. La lignée neuronale de souris « neuro2a »

Nos premières expériences de culture cellulaire ont été réalisées avec la lignée neuronale de souris « neuro2a », issue de neuroblastomes¹². Cette lignée neuronale présente notamment l'avantage d'être relativement simple à cultiver. Le Tableau 2 résume les avantages et inconvénients du modèle cellulaire « neuro2a ». Cette lignée, facile à cultiver a également permis dans un premier temps de découvrir et de prendre en main les techniques de culture cellulaire.

Par souci de synthèse, nous ne détaillons pas le protocole de culture ici. Toutefois, ces informations sont disponibles en détails dans la référence [146] et en annexe 3. Le Tableau 2 résume les grandes étapes du protocole de culture que nous avons suivi pour nos expériences.

¹² Un neuroblastome est une tumeur d'origine embryonnaire qui se développe à partir du système nerveux sympathique.

CELLULES « Neuro2a »	
AVANTAGES	INCONVENIENTS
<ul style="list-style-type: none"> - Protocole de culture simple, approprié pour apprendre à maîtriser les techniques de culture cellulaire. - Possibilité de réaliser un cycle d'expériences entier en une semaine. 	<ul style="list-style-type: none"> - Modèle cellulaire simple, originaire de la souris, donc éloigné de l'homme. - Extensions neuritiques immatures (non fonctionnelles)
ETAPES DU PROTOCOLE DE CULTURE	
Traitement des surfaces de culture	Dépôt de protéines d'adhérence (polylysine, laminine) facultatif.
Densité d'ensemencement	12 000 cellules/cm ²
Différenciation	Différenciation provoquée 24h après l'ensemencement, par changement de milieu. Le nouveau milieu contient de la BSA à la concentration de 0,1% en masse.
Durée de culture en phase de différenciation	2 jours
Marquages immunofluorescents réalisés	<ul style="list-style-type: none"> - Marquage nucléaire, en utilisant le 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) - Marquage des filaments d'actine, en utilisant la phalloïdine - Marquage des microtubules, en utilisant un anticorps anti-tubuline

Tableau 2 : Avantages et inconvénients de l'utilisation de la lignée « neuro2a », et principales étapes du protocole de culture de ces cellules.

Il est important de définir ce que l'on nomme ici « différenciation ». Avec cette lignée, nous avons considéré que les cellules étaient différenciées quand elles développaient des neurites ayant une longueur supérieure à 20µm. Ce terme ne correspond pas ici au processus de différenciation mis en jeu pour des cellules souches.

La Figure 34 présente des images prises au microscope optique en fluorescence de cellules neuro2a avant et après avoir induit la différenciation (2 jours de culture en phase de différenciation). Les marquages décrits dans le Tableau 2 ont été réalisés. On observe que les cellules neuro2a différenciées ont développé de longs filaments, appelés neurites.

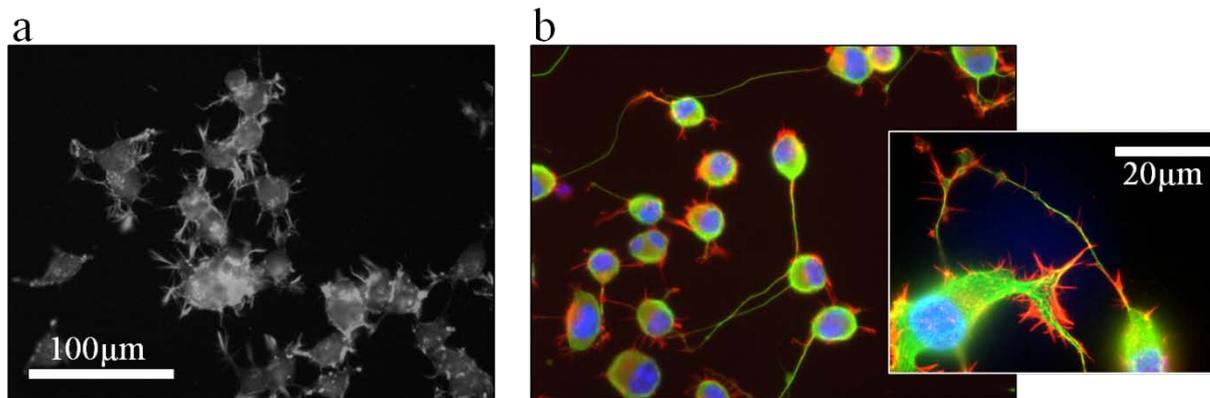


Figure 34 : images prises au microscope optique à fluorescence de cellules neuro2a cultivées sur une lamelle de verre. **a** : cellules avant la différenciation. Les filaments d'actine ont été marqués en utilisant la phalloïdine, image en niveau de gris. **b**: cellules après deux jours de différenciation, induite par l'ajout de BSA à 0,1% dans le milieu de culture. Les

filaments d'actine ont été marqués en utilisant de la phalloïdine FITC (marquage vert), les microtubules en utilisant un anticorps anti-tubuline et un anticorps secondaire TRITC (marquage rouge) et les noyaux en DAPI (marquage bleu). L'encart est une vue à plus fort grossissement.

b. La lignée neuronale humaine « Luhmes »

Dans ce travail de thèse, nous avons également utilisé la lignée humaine « Luhmes », que nous nous sommes procurée auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection). Nous avons utilisé cette lignée car elle est d'origine humaine, et peut être maintenue en culture plusieurs semaines [147]. Les cellules de cette lignée proviennent de l'encéphale humain. Leur différenciation est provoquée par l'ajout de tétracycline dans le milieu de culture. On obtient alors des neurones dopaminergiques qui développent de longs neurites. Il s'agit d'un modèle plus proche des cellules souches neurales que la lignée neuro2a.

Les avantages et inconvénients de l'utilisation de cette lignée ainsi que les principales étapes du protocole de culture sont présentés dans le Tableau 3.

CELLULES « Luhmes »	
AVANTAGES	INCONVENIENTS
-Modèle cellulaire d'origine humaine -Longues extensions neuritiques -Protocole de culture assez simple -Possibilité de maintenir les cellules en culture pendant plusieurs semaines	Nécessité de recouvrir toutes les surfaces de culture de polylysine et de laminine pour permettre l'adhérence des cellules.
ETAPES DU PROTOCOLE DE CULTURE	
Traitement des surfaces de culture	Dépôt de protéines d'adhérence (polylysine, laminine) nécessaire.
Pré-différenciation	Pré-différenciation dans les flasques de culture en ajoutant de la tétracycline au milieu de culture, pendant 2 jours Détachement des cellules puis ensemencement des surfaces
Différenciation	Traitement à la tétracycline. Obtention de neurones.
Durée de culture, en phase de différenciation	5 jours
Marquages immunofluorescents réalisés	Marquage nucléaire, en utilisant le DAPI Marquage des filaments d'actine, en utilisant la phalloïdine Marquage des neurofilaments, en utilisant le marqueur Tuj-I

Tableau 3 : Avantages et inconvénients de l'utilisation de la lignée Luhmes, et principales étapes du protocole de culture de ces cellules et de leurs marquages.

La Figure 35 présente des images prises au microscope optique en fluorescence de cellules Luhmes avant et après avoir induit la différenciation (3 et 5 jours de culture en phase de différenciation). Les marquages décrits dans le Tableau 3 ont été réalisés. On observe qu'après 3 jours de différenciation, les neurites sont courts ($30\pm 20\mu\text{m}$ de longueur). Après 5 jours de différenciation, on observe de nombreux réseaux de neurites, ces derniers mesurant en moyenne $300\pm 50\mu\text{m}$ de longueur.

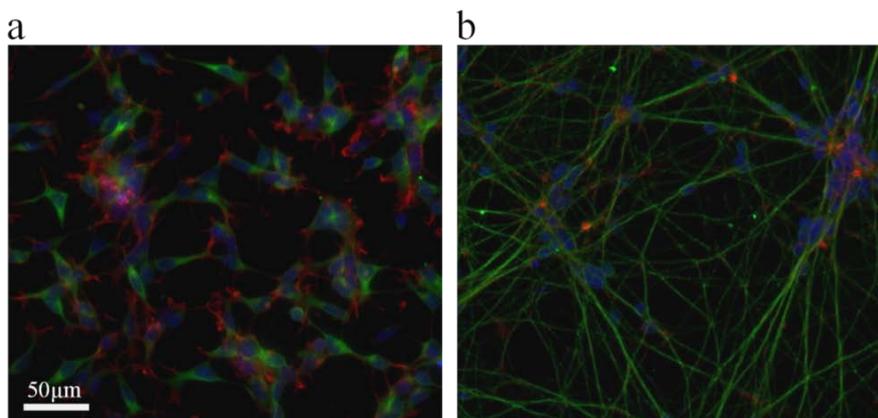


Figure 35 : Images prises au microscope optique à fluorescence de cellules Luhmes cultivées sur un substrat de PDMS plat après 3 jours de différenciation (a) et après 5 jours de différenciation (b). Le marquage bleu correspond aux noyaux cellulaires (DAPI). Les neurofilaments ont été marqués en utilisant le marqueur Tuj-I (fluorophore alexa 488nm, vert) et le cytosquelette d'actine a été marqué par la phalloïdine (fluorophore Alexa 546nm, rouge).

c. Les cellules souches adultes humaines

Les cellules souches neurales adultes que nous avons utilisées sont issues de biopsies provenant du lobe temporel et de la zone sous-ventriculaire de cerveaux de patients atteints d'épilepsie. Ces patients souffrent d'épilepsie résistante aux traitements médicamenteux et de ce fait, doivent subir une hippocampectomie. Or, pour accéder à l'hippocampe, le neurochirurgien doit d'abord enlever une partie du lobe temporel et de la zone sous-ventriculaire. C'est à partir de ces déchets opératoires que sont isolées les cellules souches neurales. Au préalable de tout prélèvement, les patients doivent donner leur accord et ils restent anonymes.

Pour pouvoir travailler avec du matériel d'origine humaine, il est nécessaire d'avoir une accréditation délivrée par le Comité de Protection des Personnes et une autorisation du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (DC-2009-203). La culture des cellules souches humaines à partir de ces biopsies a été réalisée par Laurence Vaysse, post-doctorante à l'INSERM, dans l'unité 825 « imagerie cérébrale et handicaps neurologiques ». L'unité dispose de toutes les accréditations nécessaires.

Dans ce travail de thèse, nous avons étudié comment les cellules souches neurales adultes humaines se comportent sur des surfaces ingénierées à l'échelle micrométrique. Il est très rare d'avoir accès à ces

cellules et leur étude est très récente. A notre connaissance, les interactions entre ce type de cellules et des surfaces comportant une microtopographie n’avaient jamais été étudiées.

Au cours de ces trois années, nous avons pu travailler sur 15 prélèvements, issus de patients. La culture de cellules neuronales issues de lignées (cellules « neuro2a » et cellules « Luhmes ») nous a permis de réaliser un grand nombre d’études préliminaires et de ne réaliser avec les cellules souches neurales adultes humaines que les études qui nous sont apparues comme les plus pertinentes.

Le Tableau 4 présente les avantages et inconvénients des cellules souches adultes humaines neurales.

CELLULES SOUCHES NEURALES ADULTES HUMAINES	
AVANTAGES	INCONVENIENTS
-Cellules humaines primaires ayant un intérêt thérapeutique	- peu de matériel biologique disponible - protocole de culture long et complexe
ETAPES DU PROTOCOLE DE CULTURE	
Traitement des surfaces de culture	Dépôt de protéines d’adhérence (polylysine, laminine) nécessaire.
Différenciation	culture dans un milieu sans mitogène et contenant du NGF (nerve growth factor). La différenciation des cellules souches donne trois types de cellules différents : neurones, astrocytes et oligodendrocytes.
Durée de culture, en phase de différenciation	5 jours
Marquages immunofluorescents réalisés	- marquage nucléaire, en utilisant le DAPI (apparaît en bleu sur les images) - les neurones sont repérés s’ils expriment la bêta-III tubuline, qui est une protéine structurelle des microtubules neuronaux. Le fluorophore utilisé est Alexa-546nm (apparaît en rouge sur les images). - les astrocytes sont repérés si les cellules expriment la protéine GFAP (glial fibrillary acidic protein), un des composants de leurs filaments intermédiaires. Le fluorophore utilisé est Alexa-488nm (apparaît en vert sur les images)

Tableau 4 : Avantages et inconvénients de l’utilisation des cellules souches neurales adultes humaines et principales étapes du protocole de culture de ces cellules.

Le procédé permettant d’obtenir des cellules souches dissociées à partir des déchets de biopsie comporte plusieurs étapes, comme illustré sur la Figure 36. Il est réalisé par Laurence Vaysse.

- La première étape consiste à dissocier mécaniquement et enzymatiquement les tissus. On obtient des cellules non adhérentes dissociées en suspension.

- La deuxième étape consiste à amplifier ces cellules souches. Pour cela, ces cellules dissociées sont mises en culture dans des conditions non-adhérentes, à une faible densité. Cette étape pendant

laquelle les cellules prolifèrent, dure entre 2 et 3 semaines et se fait en présence de facteurs mitogènes et de facteurs de croissance (tels que le FGF (facteur de croissance fibroblastique) ou le EGF (facteur de croissance épidermique) et de nutriments. On obtient alors des neurosphères, structures en 3D de cellules souches en train de se diviser, pouvant mesurer jusqu'à 1mm de diamètre (voir Figure 37).

- La troisième étape correspond à l'étape de différenciation. Pour cela, les neurosphères obtenues sont dissociées mécaniquement afin d'obtenir une suspension de cellules souches isolées. Les cellules dissociées sont ensuite ensemencées sur les substrats de culture (qui seront les substrats de PDMS). Elles sont ensuite maintenues en culture pendant 7 jours dans un milieu de culture ne contenant pas de mitogènes et auquel on a ajouté du NGF (nerve growth factor) pour favoriser la différenciation en neurones.

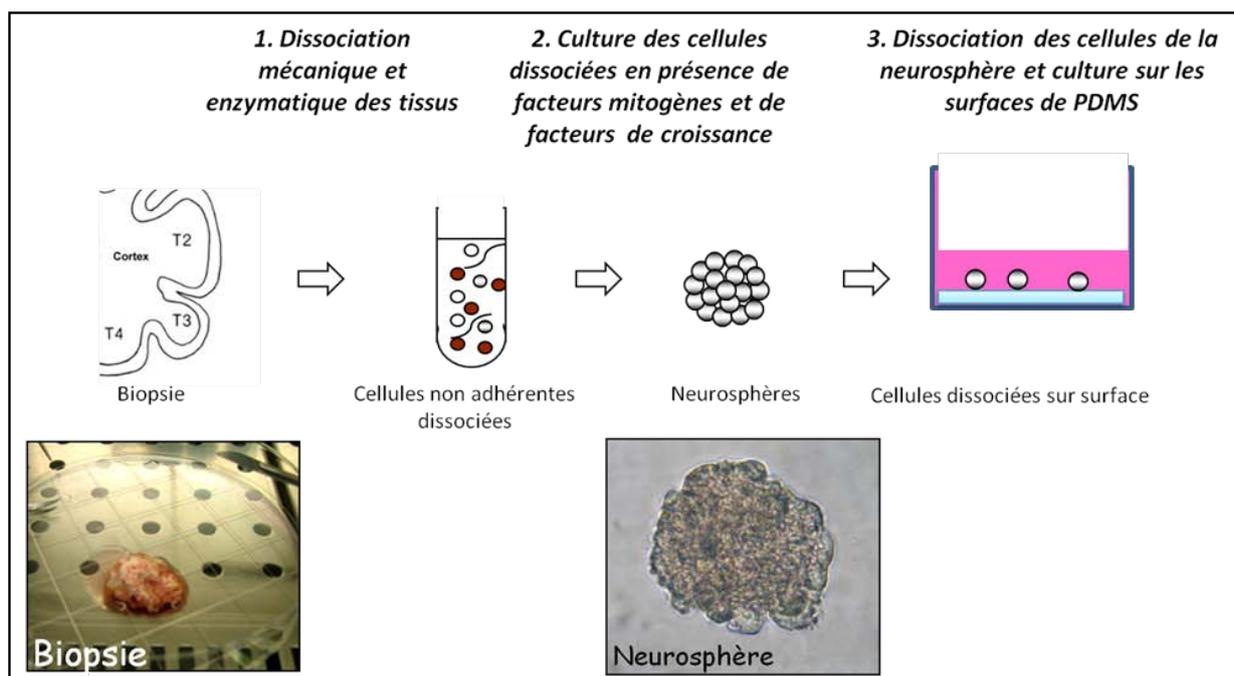


Figure 36 : Principales étapes pour obtenir des cellules souches dissociées à partir d'une biopsie cérébrale.

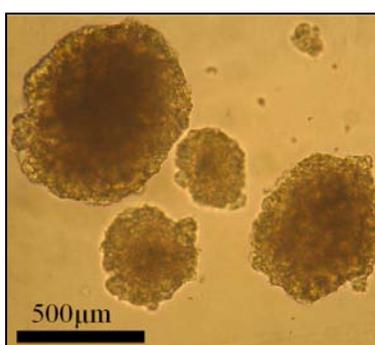


Figure 37 : image prise au microscope optique de neurosphères obtenues après avoir mis en culture des cellules souches adultes humaines pendant 5 semaines dans un milieu de culture contenant des mitogènes et des nutriments.

Dans nos expériences, les cellules sont maintenues en culture en phase de différenciation pendant 5 jours, sauf mention contraire. Pour caractériser leur développement, nous avons effectué des marquages immunofluorescents, présentés dans le Tableau 4.

1.3. Méthode de quantification des résultats

Pour pouvoir décrire et comparer avec précision les réponses cellulaires dans les conditions imposées, il est nécessaire de réaliser un nombre significatif de mesures et donc d'observer un grand nombre de cellules. Pour permettre la visualisation et la reconnaissance des cellules, nous avons réalisé des marquages immunofluorescents sur celles-ci (ils sont indiqués dans le Tableau 2, Tableau 3, Tableau 4). Nous avons mis en place un protocole d'observation au microscope optique à fluorescence rigoureux, qui consiste à observer 5 zones ($0,6\text{mm}^2$) de chaque échantillon. Le choix de ces zones est fait de sorte à imaginer des zones assez éloignées les unes des autres, comme représenté sur la Figure 38. Nous avons identifié et défini quatre critères pour pouvoir décrire et analyser le comportement des cellules neuronales dans les différentes conditions de culture :

- l'adhérence
- la différenciation
- le développement des neurites
- l'alignement des neurites

Le grand nombre de mesures (5 zones observées par échantillon) et la répétition des expériences dans les mêmes conditions expérimentales ($n=3$) nous permettent de faire des études statistiques afin de comparer les réponses cellulaires dans les différentes conditions imposées.

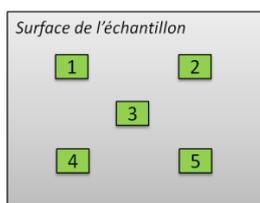


Figure 38 : **Schéma représentant la surface d'un échantillon et les 5 zones qui ont été systématiquement imagées et analysées.** Chaque échantillon mesure $8\text{mm} \times 6\text{mm}$. La somme des 5 zones mesure 3mm^2 . Un échantillon comporte la même géométrie de motifs sur toute sa surface.

a. Définition des critères mesurables et pertinents pour notre étude

▪ Adhérence

L'ensemencement de cellules sur une surface consiste à déposer, à l'aide d'une pipette, dans le puits de culture, au fond duquel se trouve l'échantillon, un volume de suspension de cellules. Ce volume est déterminé par la densité de la suspension cellulaire en fonction du nombre de cellules que l'on souhaite déposer. Les cellules entrent alors en contact avec la surface au fond du puits. Si les cellules ont une grande affinité pour la surface, un grand nombre d'entre elles adhère à la surface et y poursuivent leur développement. Si au contraire, les cellules ont une faible affinité pour la surface qui se trouve au fond du puits, elles n'adhèrent pas et restent en suspension dans le milieu. Lors du changement de milieu, les cellules n'ayant pas adhéré sont retirées du puits.

Pour quantifier l'adhérence des cellules sur les différentes surfaces, nous dénombrons les noyaux cellulaires dans les cinq zones. Cela nous donne la densité moyenne de cellules ayant adhéré sur la surface et donc une information sur l'adhérence des cellules sur ces surfaces.

▪ Différenciation

Afin de quantifier la différenciation des cellules, nous dénombrons les cellules différenciées et rapportons ce résultat au nombre total de cellules ayant adhéré.

Nous considérons que les cellules « neuro2a » et les cellules « Luhmes » sont différenciées lorsque celles-ci ont au moins un neurite mesurant plus de 20 μ m de longueur (longueur correspondant environ à la taille du corps cellulaire).

Pour les cellules souches neurales adultes humaines, nous les considérons différenciées :

- *en neurones* : lorsqu'elles expriment la β -III tubuline, qui est une protéine des neurofilaments exprimée uniquement par les cellules neuronales, marquée par immunofluorescence, et que ces neurofilaments mesurent au moins 10 μ m (longueur correspondant environ à la taille du corps cellulaire).

- *en astrocytes* : lorsqu'elles expriment des protéines GFAP (glial fibrillary acidic protein), un des composants de leurs filaments intermédiaires.

▪ Développement des neurites

- *Nombre moyen de neurites par neurone*

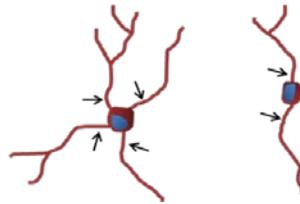


Figure 39: schéma pour la quantification du nombre moyen de neurites et de la polarité des neurones. Les flèches indiquent les éléments dénombrés.

Le nombre moyen de neurites par neurone s'obtient en divisant le nombre de neurites présent sur une zone par le nombre de neurones dénombré sur cette même zone. Les neurites sont dénombrés si leur longueur est supérieure à 20 μ m.

- *Polarité*

Dans ce manuscrit, la « polarité » des neurones est employée pour désigner le nombre de neurites par cellule. Les neurites sont dénombrés si leur longueur est supérieure ou égale au diamètre du corps cellulaire. Le dénombrement des neurones ayant 1 seul neurite, 2 neurites ou au moins 3 neurites permet d'obtenir une information sur le développement des cellules, plus proche de la réalité que le calcul du nombre moyen de neurites par neurone, qui « lisse » les résultats.

- *Longueur moyenne des neurites*

La longueur moyenne des neurites est calculée en faisant la somme des longueurs des neurites présents sur une zone et en la divisant par le nombre de neurites présents sur cette zone.

▪ Alignement des neurites par rapport à la direction des microsillons.

Pour déterminer l'influence de la microtopographie sur le comportement cellulaire, nous mesurons l'alignement des neurites par rapport à la direction des microsillons. Dans la littérature, la

quantification de l'alignement de la croissance cellulaire à des motifs n'est pas toujours méticuleuse. Nous nous sommes attachés à mettre en place un protocole rigoureux pour comparer nos résultats d'alignement des neurites aux microsillons.

Pour cela, nous calculons le pourcentage de longueur de neurites faisant un angle de X° avec cette direction. Nous ne sélectionnons d'abord que les pixels qui correspondent aux neurites. En effet, nous ne souhaitons pas inclure les pixels des corps cellulaires dans cette quantification. Pour cela, nous utilisons le logiciel « ImageJ » et les plugins « OrientationJ » [148] et « NeuronJ » [149]. Ce dernier plugin permet de détecter et de retracer les neurites présents sur une image. La Figure 40 présente une image des neurofilaments de neurones « Luhmes » prise au microscope optique à fluorescence avant et après le traitement des images. On observe qu'après le traitement, seuls les neurites apparaissent sur l'image. De plus, chaque portion de neurite est représentée par le même nombre de pixels, quelle que soit son intensité. Cela nous permet de nous affranchir du fait qu'un neurite peut apparaître plus ou moins intensément en fonction de la prise d'image (en particulier pour des surfaces microstructurées, en fonction du choix du plan focal). Le plugin « NeuronJ » nous fournit le nombre de neurites ainsi que toutes les coordonnées des pixels des neurites. A partir de ces données, on réalise les calculs suivants :

- calcul de la proportion de pixels de l'image occupée par les neurites, ce qui permet de comparer les densités de neurites entre les images.
- calcul de la proportion de pixels qui sont dans la direction établie à $\pm X^\circ$ en utilisant le plugin « OrientationJ » pour quantifier l'alignement des neurites par rapport à la direction des microsillons.
- calcul de la longueur moyenne des neurites

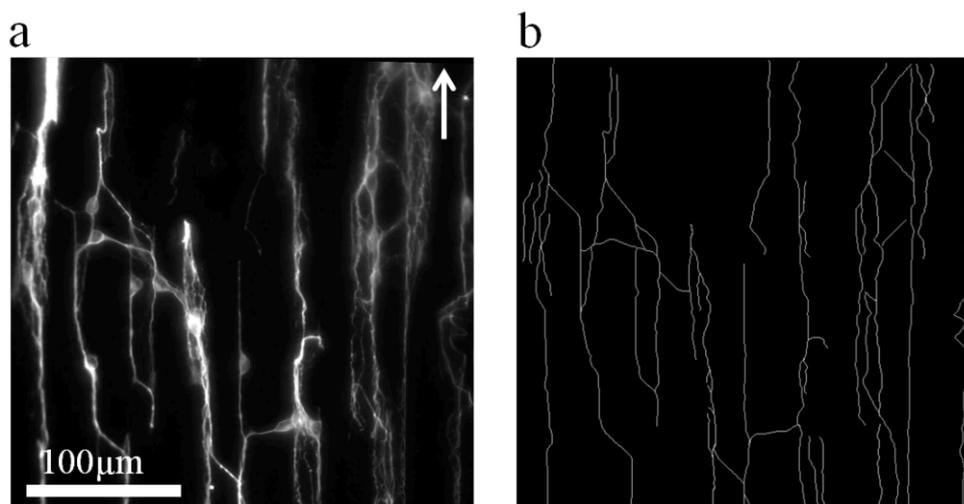


Figure 40 : **Illustration du traitement réalisé pour sélectionner uniquement les neurites de l'image fluorescente et s'affranchir des effets « d'intensité ».** La flèche blanche indique la direction des microsillons, constituant la topographie de surface. **a** : image originale prise au microscope optique à fluorescence de la protéine bêta-III tubuline, qui compose les neurofilaments. **b** : image après le traitement avec le plugin « NeuronJ », les neurites ont été retracés. L'image est binaire (noir et blanc).

A partir de ces données, nous retraçons et recentrons l'ensemble des neurites présents sur un ou plusieurs champs d'observation. La Figure 41 montre deux exemples de réalisation. Pour ces représentations, les neurites de 7 neurones ont été retracés et recentrés en un même point. On obtient ainsi une représentation globale de l'orientation des neurites.

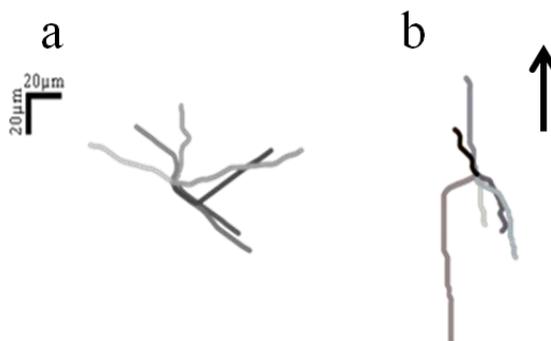


Figure 41 : **Représentation de l'ensemble des neurites de 7 neurones pour une culture réalisée sur un substrat de PDMS. a :** cas d'un substrat de PDMS plat. **b :** cas d'un substrat de PDMS comportant des microsillons verticaux et parallèles. La flèche noire indique la direction des microsillons.

- Diamètre et déformation du noyau cellulaire

Le logiciel Image J permet notamment d'obtenir des mesures sur des formes géométriques, à partir d'une image. Nous utilisons ce logiciel pour mesurer le périmètre et l'aire des noyaux, à partir d'images binarisées des noyaux prises au microscope à fluorescence. La Figure 42 montre les résultats de mesures des périmètres et des aires de noyaux réalisées avec le logiciel Image J.

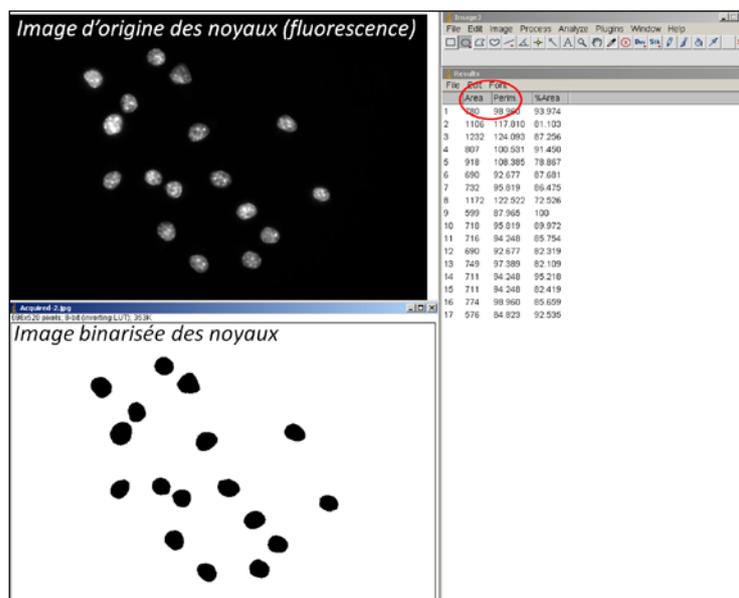


Figure 42 : **Traitement d'image et mesures réalisées avec le logiciel Image J pour la quantification de la déformation des noyaux cellulaires.**

La Figure 43 illustre la méthode employée pour quantifier la déformation des noyaux en fonction de la topographie de surface (exemple pris pour les sillons de 5µm de largeur). Dans un premier temps, on calcule le rapport entre l'aire du noyau et son périmètre. Pour obtenir un facteur numérique représentant la déformation du noyau sur les surfaces comportant une microtopographie, on compare les rapports obtenus pour les différentes géométries de topographie au rapport obtenu pour une surface

plate (référence), sur laquelle les noyaux ne sont pas déformés car il n'y a pas de contraintes dues à la topographie.

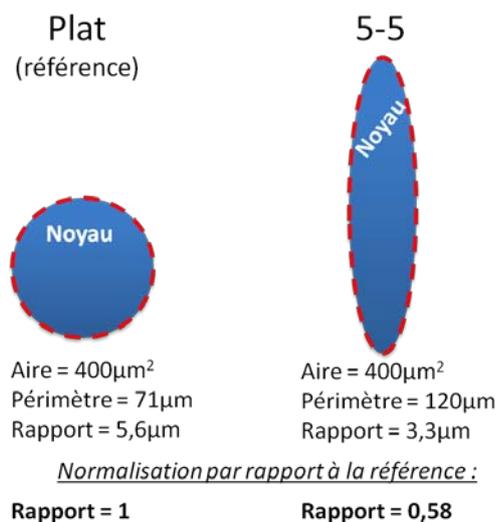


Figure 43 : Schéma illustrant la méthode employée pour calculer la déformation des noyaux cellulaires en fonction de la topographie de surface. La surface plate est prise comme référence. Le rapport normalisé par rapport à cette situation référence sera utilisé pour les analyses.

b. Comparaison des techniques de traitement des images automatiques et techniques semi-automatiques

Pour un traitement rapide et fiable des données, nous avons étudié les possibilités d'automatiser ces différentes quantifications. Pour cela, nous avons comparé des logiciels d'analyse d'images, dont Imaris®, Amira® et image J et ses différents « plugin ». Certaines fonctions de ces logiciels permettent de détecter les formes, les contours des cellules et même parfois les neurites des neurones. Les fonctions de ces logiciels peuvent être selon le cas, automatiques, semi-automatiques ou manuelles. Pour comparer les résultats d'analyses automatiques, semi-automatiques et manuelles, nous avons étudié le cas où l'on cherche à dénombrer sur une image les neurites de neurones issus de la différenciation de cellules souches. Les résultats obtenus en fonction des analyses sont présentés en détails dans l'annexe 4.

Suite à ces essais, nous avons défini la méthode la plus fiable permettant un traitement rapide des données. Cette méthode semi-automatique comporte les étapes suivantes :

- acquisition des images au microscope optique à fluorescence (1 minute)
- tracé semi-automatique des neurites grâce au plugin « NeuronJ » du logiciel « imageJ » (voir paragraphe précédent). Ce plugin détecte les neurites et les retrace. L'utilisateur doit cependant guider avec la souris pour que la détection soit optimale (3-5 minutes)
- dénombrement automatique des neurites (quelques secondes)

En plus d'être fiable et rapide (4-6 minutes au total), ce protocole nous permet, une fois que le tracé des neurites a été fait, de réaliser d'autres quantifications. Nous pouvons par exemple calculer la longueur moyenne des neurites ou le pourcentage de leur orientation dans une direction établie.

2. Résultats

2.1. Effet de la microtopographie sur le comportement des cellules de la lignée de souris « neuro2a »

a. Adhérence des neuro2a sur des surfaces de PDMS comportant des microstructures

Nous avons ensemencé les différents échantillons de PDMS avec la même densité de cellules en suspension (12 000 cellules/mL). La densité cellulaire obtenue après 3 jours de culture sur les surfaces de PDMS comportant différents motifs a été quantifiée à partir d'images des cultures prises au microscope optique en fluorescence. Les résultats sont présentés sur la Figure 44a. La ligne en pointillés noirs représente la densité cellulaire que l'on obtiendrait si toutes les cellules présentes dans le volume de la suspension lors de l'ensemencement adhéraient sur la surface. On observe que les cellules adhèrent moins sur les surfaces comportant les microsillons les plus étroits que sur les microsillons les plus larges. Pour les microsillons les plus larges (20 μ m et 50 μ m), on obtient une densité cellulaire comparable à celle obtenue pour l'échantillon de PDMS plat.

La Figure 44b montre la distribution en taille des corps cellulaires sur un échantillon de PDMS plat. On relève que celle-ci suit une distribution gaussienne, centrée autour de 15 μ m. Nous avons également étudié la localisation des cellules. La Figure 44c présente les résultats de nos observations. On constate que les cellules sont localisées préférentiellement dans les microsillons et non pas sur les « bosses » voisines. Cet effet est d'autant plus marqué que la largeur des microsillons est de l'ordre de grandeur du diamètre des corps cellulaires.

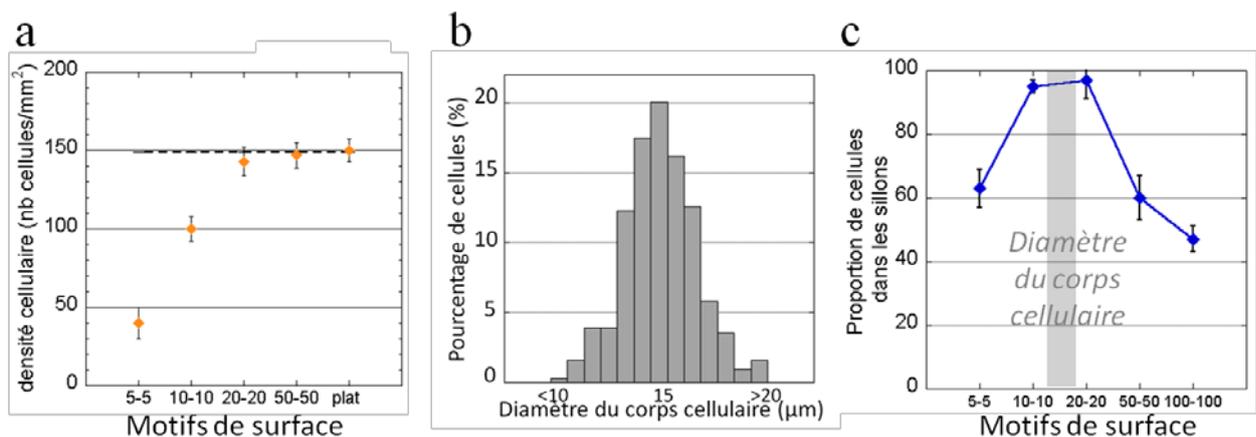


Figure 44 : **Résultats de quantifications effectuées sur l'adhérence et la localisation des cellules en fonction de la largeur des microsillons présents sur les surfaces de PDMS.** **a** : densité cellulaire. La ligne en pointillés représente la densité cellulaire que l'on obtiendrait si toutes les cellules adhéraient sur la surface. **b** : distribution des cellules en fonction de la taille de leur corps cellulaire sur un échantillon de PDMS plat. **c** : proportion des cellules localisées dans les microsillons en fonction de la largeur des microsillons. Le rectangle gris permet de visualiser la plage du diamètre des corps cellulaires de la majorité des cellules.

La Figure 45 montre des images prises au microscope optique à fluorescence des cultures sur des échantillons de PDMS microstructurés (microsillons de 5 μ m, 20 μ m et 50 μ m de largeur). Les noyaux cellulaires ont été marqués par le DAPI (bleu) et les filaments d'actine ont été marqués par la phalloïdine couplée à un fluorophore (Alexa 546nm, rouge). Ces images illustrent l'effet de localisation des corps cellulaires en fonction de la largeur des microsillons. On observe que les noyaux sont déformés lorsque les surfaces de PDMS comportent des microsillons de 5 μ m de largeur. Les noyaux ne sont plus ronds, comme c'est le cas sur une surface plane ou comportant de larges microsillons (voir image du cas 50 μ m-50 μ m) mais sont étirés dans la direction des microsillons. Cette déformation a été quantifiée en calculant le rapport aire du noyau / périmètre du noyau (voir méthode définie dans le paragraphe 1.3, page 66). Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 5. Le cas du PDMS plat a été pris comme référence pour ces calculs. Les valeurs obtenues pour les surfaces de PDMS comportant des microsillons ont été normalisées par rapport à cette référence. On relève que la déformation est d'autant plus prononcée que les microsillons sont étroits.

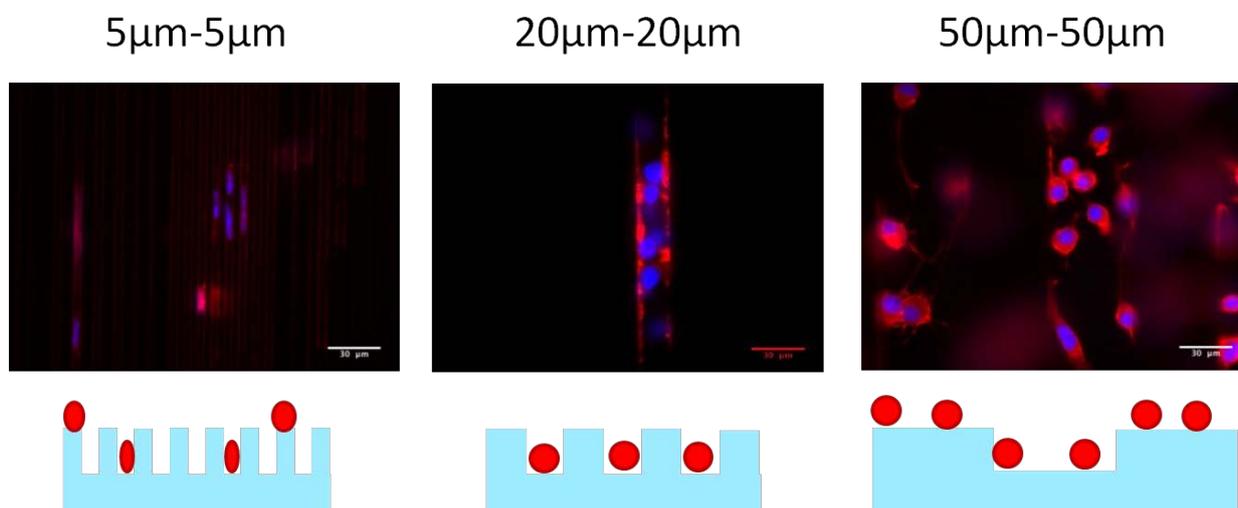


Figure 45 : Images prises au microscope optique à fluorescence des cultures de cellules « neuro2a » sur des échantillons de PDMS comportant en surface des microsillons de 5 μ m, 20 μ m ou 50 μ m de largeur et schématisation des observations en vue de profil. Les noyaux cellulaires ont été marqués en DAPI (bleu) et les microfilaments d'actine ont été marqués avec la phalloïdine couplée à un fluorophore (Alexa 546nm, rouge).

	5 μ m-5 μ m	10 μ m-10 μ m	20 μ m-20 μ m	50 μ m-50 μ m	Plat
Facteur numérique représentant la déformation du noyau	0,5	0,76	0,93	0,91	1

Tableau 5 : Résultats des quantifications réalisées pour mesurer la déformation des noyaux cellulaires en fonction de la largeur des microsillons. Le rapport entre l'aire du noyau et de son périmètre a été calculé pour chaque condition de topographie (valeurs moyennes calculées issues de l'analyse de 50 cellules). Pour avoir une idée de la déformation engendrée par les différentes conditions de topographie, les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport au cas du PDMS plat, pris comme référence. Plus le facteur numérique est bas, plus la déformation est grande.

b. Différenciation

La Figure 46 présente les pourcentages de différenciation des cellules neuro2a obtenus pour les différentes conditions de topographie. On observe que pour les microsillons de 5 μ m de largeur, seulement 4 \pm 5% des cellules se sont différenciées. Cette proportion augmente très fortement avec la largeur des microsillons. Elle est de 75 \pm 9% pour des microsillons de 10 μ m et atteint 100% pour les microsillons plus larges. Sur le PDMS plat, la différenciation est également de 100%.

Cette évolution du pourcentage de différenciation avec la largeur des microsillons est corrélée à l'évolution de la déformation du noyau observée précédemment. Le calcul du coefficient de corrélation donne 0,98. La déformation du noyau cellulaire, relevée pour les microsillons plus petits que le diamètre moyen du corps cellulaire affecterait donc la différenciation.

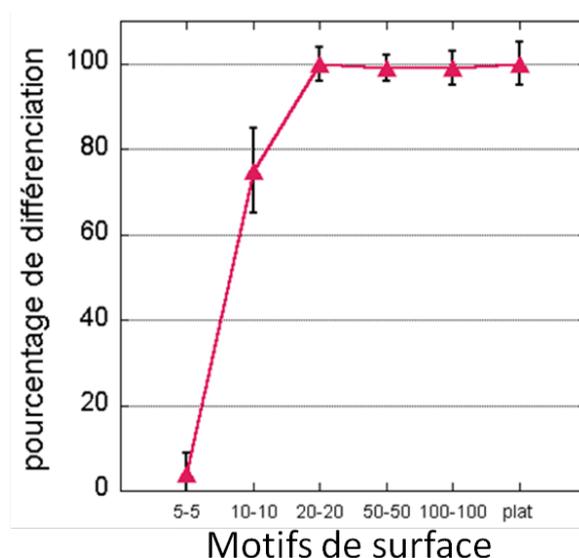


Figure 46 : **Pourcentage de différenciation des neuro2a obtenu sur des surfaces de PDMS comportant des microsillons de différentes largeurs** (calcul de la proportion de cellules ayant au moins un neurite mesurant au moins 20 μ m de long, quantifications réalisées pour 5 champs d'observation, pour trois expériences indépendantes).

c. Interactions entre les cellules « neuro2a » et des substrats de PDMS comportant des microstructures

Pour évaluer les interactions entre les cellules et la surface, nous étudions l'influence de la microstructuration sur la croissance et l'orientation des neurites. La Figure 47 compare les résultats de culture obtenus sur un substrat de PDMS plat (A) et sur un substrat de PDMS comportant des microsillons mesurant 20 μ m de large et 25 μ m de profondeur (B).

On observe clairement que les microsillons ont une forte influence sur le développement des neurites. Sur le PDMS plat, les neurites n'ont pas de direction de croissance préférentielle alors qu'ils sont alignés dans la direction des microsillons de l'échantillon de PDMS microstructuré. Afin d'avoir sur une même présentation l'information sur la quantité de neurites développée, leur nombre et leur

direction, nous avons rassemblé et retracé à partir d'un même point les neurites de 7 neurones (ce chiffre a été retenu car il permet d'obtenir des représentations lisibles et non surchargées. En effet si on retrace les neurites d'un trop grand nombre de neurones, le nombre trop important de neurites nuit à la lisibilité). Cette représentation est présentée sur la partie basse de la Figure 47.

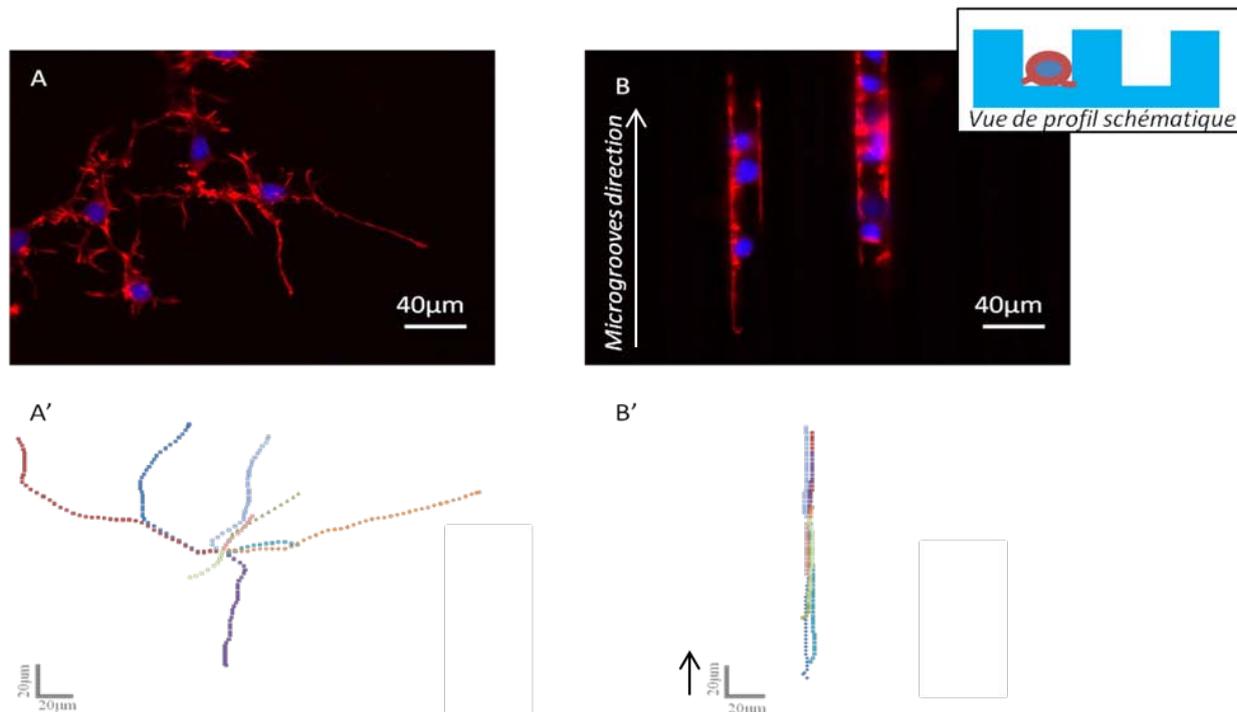


Figure 47 : Effet de la microstructuration de surface du PDMS sur la croissance des cellules neuro2a. Haut : Images prises au microscope optique à fluorescence des cultures obtenues. **A** : culture sur PDMS plat. **B** : culture sur PDMS microstructuré. La flèche indique l'axe des microgrooves. En encart : vue schématique de la localisation des cellules et de leurs neurites. Bas : représentation des cultures obtenues après avoir retracé et recentré les neurites de 7 neurones. **A'** : culture sur PDMS plat. **B'** : culture sur PDMS microstructuré. Largeur des microgrooves : 20µm espacés de 20µm. Profondeur=25µm. La flèche indique l'axe des microgrooves.

La Figure 48 montre les représentations obtenues pour les différentes largeurs de microgrooves. Le cas des microgrooves de 5µm de largeur n'est pas représenté car très peu de cellules ont développé des neurites (seulement 4% de différenciation).

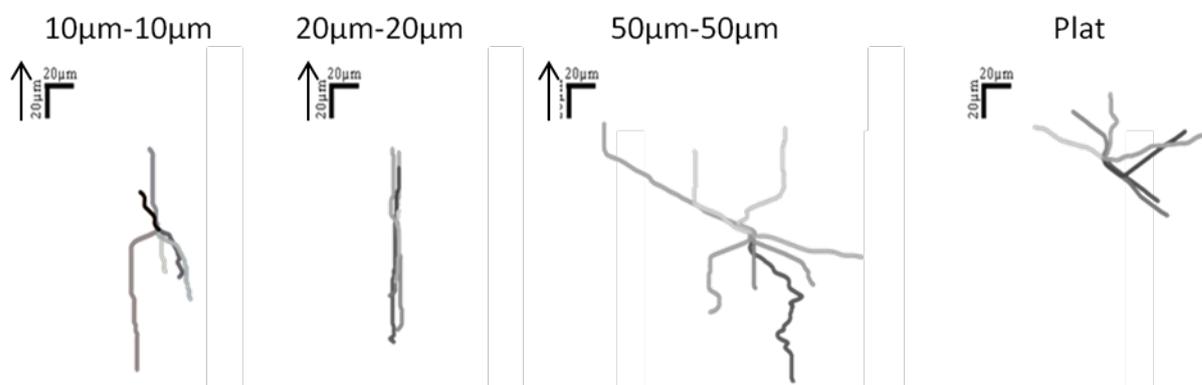


Figure 48 : Effet de la largeur des microgrooves présents sur la surface du PDMS sur la croissance des cellules neuro2a. Les flèches indiquent l'axe des microgrooves.

L'observation de la Figure 47B, complétée par des observations au microscope confocal (voir Figure 49) montrent que lorsque les neurites sont alignés, ceux-ci se développent majoritairement dans le sillon, le long de l'arête interne. L'alignement le plus rigoureux est obtenu pour le cas des microsillons de 20 μm . En effet, dans ce cas, toutes les cellules sont au fond des microsillons et les neurites se développent dans le même microsillon (voir image B de la Figure 47), en suivant les arêtes. Ils ne naviguent pas entre les microsillons voisins (ou sur la « bosse » de séparation des microsillons), comme nous l'avons relevé pour des microsillons de 10 μm ou 50 μm de largeur (voir Figure 48 et Figure 49).

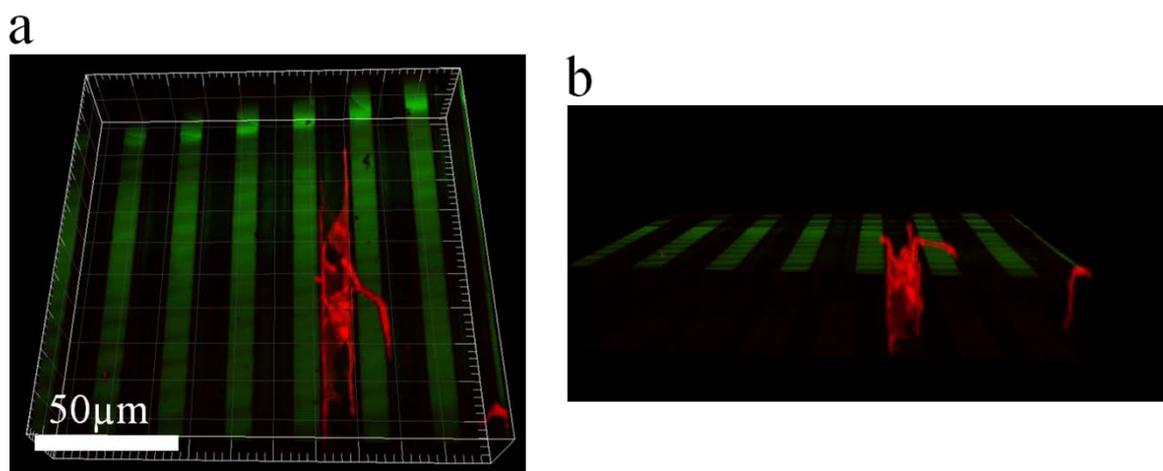


Figure 49 : Observation au microscope confocal de cellules neuro2a cultivées sur une surface de PDMS comportant des microsillons de 10 μm de largeur espacés de 10 μm . Les « bosses » des structures apparaissent en vert (acquisition en champ clair puis colorisation artificielle) et l'actine des cellules neuro2a a été marquée en utilisant la phalloïdine couplée à un fluorophore Alexa 546nm, rouge. **a.** Reconstitution en trois dimensions. **b.** Vue de profil. L'actine est dans le microsillon, sauf à l'endroit où un neurite passe au-dessus d'une structure.

2.2. Effet de la microtopographie sur le comportement des cellules de la lignée humaine « Luhmes »

a. Adhérence des cellules Luhmes sur des surfaces de PDMS comportant des microstructures

Nous avonsensemencé les différents échantillons de PDMS, sur lesquels on a au préalable déposé de la laminine et de la polylysine, avec la même densité de cellules en suspension (30 000 cellules/mL). Nous avons réalisé les mêmes analyses que pour la lignée «neuro2a » et les résultats sont présentés sur la Figure 50a. On observe qu'environ 35% des cellules Luhmes adhèrent sur les surfaces de PDMS microstructurées, ce qui est comparable au cas d'une surface de verre couverte de laminine et de polylysine. Ce score était de 100% pour les cellules neuro2a, ce qui montre que la lignée humaine Luhmes est plus sensible et plus fragile que les neuro2a. Cela se rapproche du comportement cellules souches. La largeur des microsillons n'a pas d'influence significative sur la densité cellulaire, contrairement à ce que l'on avait observé pour les neuro2a. Les corps cellulaires des Luhmes sont plus petits que ceux des neuro2a, et leur diamètre est du même ordre de grandeur que les plus petits microsillons utilisés.

En effet, la Figure 50b montre que le corps cellulaire des Lhymes mesure entre $5\mu\text{m}$ et $10\mu\text{m}$ de diamètre et la Figure 50c montre que la grande majorité des cellules est localisée dans les microsillons. Leur largeur a seulement une légère influence sur ce score.

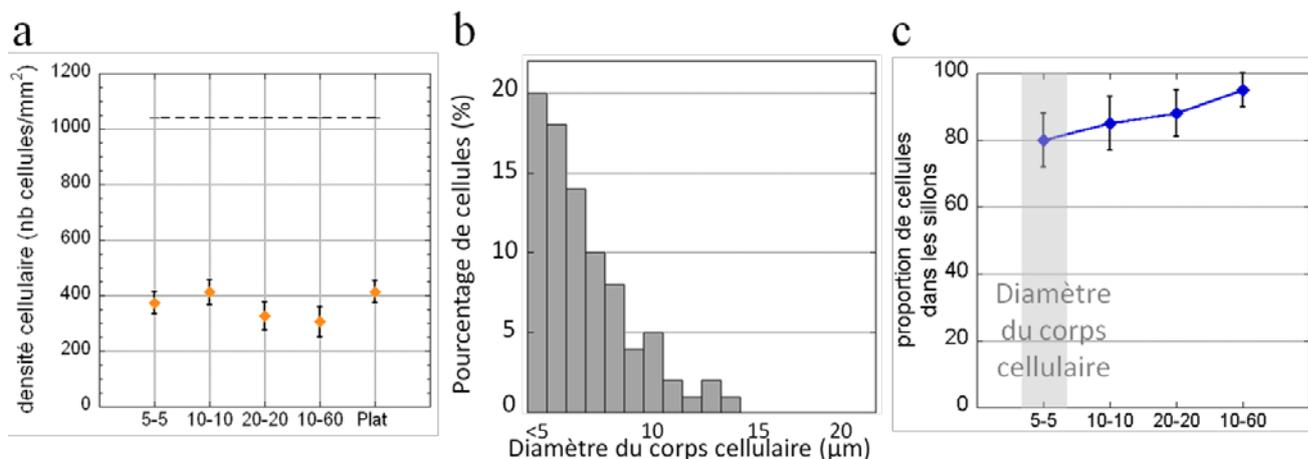


Figure 50 : Résultats de quantifications effectuées sur l'adhérence et la localisation des cellules Lhymes en fonction de la largeur des microsillons présents sur les surfaces de PDMS. **a** : densité cellulaire. La ligne en pointillés représente la densité cellulaire que l'on obtiendrait si toutes les cellules adhéraient sur la surface. **b** : distribution des cellules en fonction de la taille de leur corps cellulaire sur un échantillon de PDMS plat. **c** : proportion des cellules localisées dans les microsillons en fonction de la largeur des microsillons. Le rectangle gris permet de visualiser la plage du diamètre des corps cellulaires de la majorité des cellules.

b. Différenciation

La Figure 51 présente les pourcentages de différenciation des cellules Lhymes obtenus pour les différentes conditions de topographie.

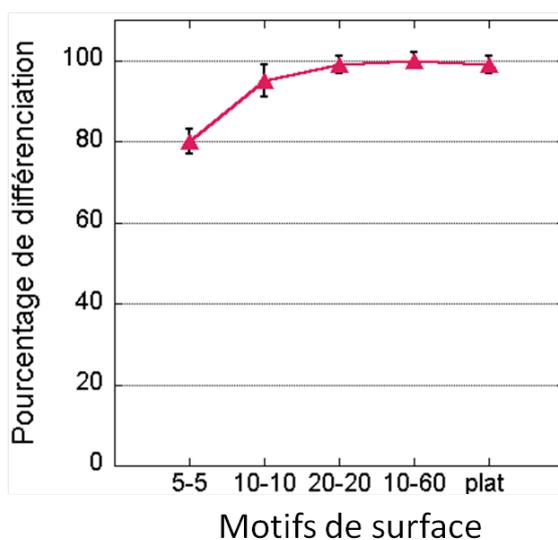


Figure 51 : Pourcentage de différenciation des Lhymes obtenu sur des surfaces de PDMS comportant des microsillons de différentes largeurs (calcul de la proportion de cellules ayant au moins un neurite mesurant au moins $20\mu\text{m}$ de long).

On observe que pour les microsillons de $5\mu\text{m}$ de largeur, seulement $80\pm 4\%$ des cellules se sont différenciées. Cette proportion augmente avec la largeur des microsillons. Elle atteint 100% pour les microsillons plus larges, score comparable à la condition contrôle, dans laquelle le PDMS est plat. De plus, on constate que l'évolution de la proportion de cellules dans les microsillons et le score de différenciation sont corrélés (coefficient de corrélation de 0,97).

c. Interactions entre les cellules « Luhmes » et des surfaces de PDMS comportant des microstructures

Comme les cellules Luhmes développent un réseau complexe de longs neurites, on peut observer plus clairement l'effet de leur interaction avec la surface qu'avec les cellules neuro2a. La Figure 52 montre l'influence des microsillons sur le développement et l'organisation des neurites. Dans le cas de l'image a, la surface de PDMS ne comporte pas de microsillons, la direction de croissance des neurites paraît aléatoire et désorganisée. Sur l'image b, la surface de PDMS comporte des microsillons parallèles, ils mesurent $10\mu\text{m}$ de large, $25\mu\text{m}$ de profondeur et sont espacés de $10\mu\text{m}$. On note une forte directionnalité de la croissance des neurites sur cette surface microstructurée.

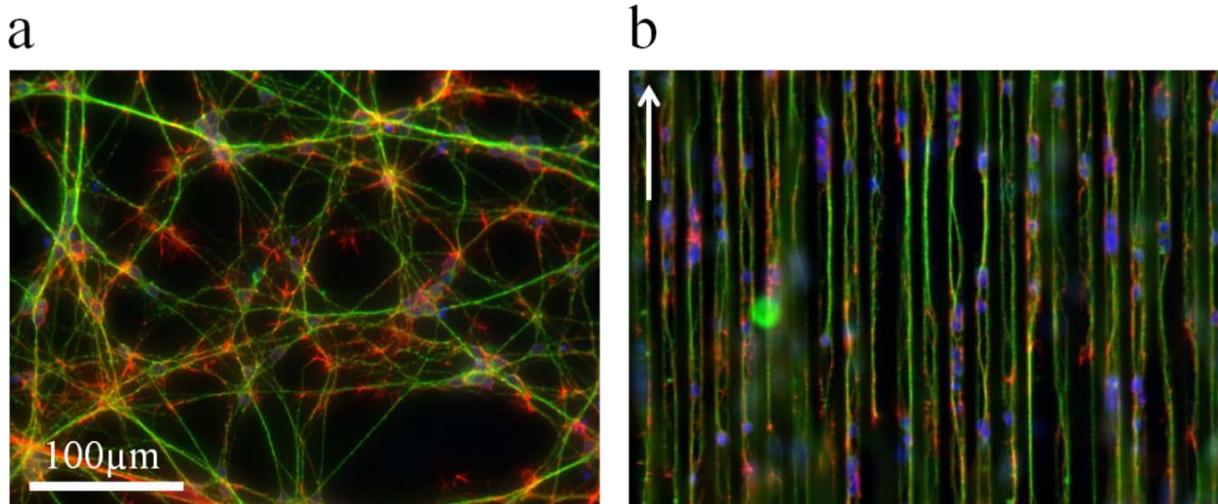


Figure 52 : Effet de la microstructuration de surface du PDMS sur la croissance des cellules Luhmes. Images prises au microscope optique à fluorescence. Les neurofilaments ont été marqués en utilisant le marqueur Tuj-I et un anticorps secondaire fluorescent (Alexa 488nm, vert). Les filaments d'actine ont été marqués en utilisant la phalloïdine, couplée à un fluorophore (Alexa 546nm, rouge). Les noyaux ont été marqués avec le DAPI (bleu). **a** : culture sur PDMS plat. **b** : culture sur PDMS microstructuré. La flèche indique la direction axiale des microsillons. Largeur des microsillons : $10\mu\text{m}$, espacés de $10\mu\text{m}$. Profondeur = $25\mu\text{m}$.

La Figure 53 montre une image prise au microscope bi-photon de cellules cultivées sur une surface de PDMS microstructurée. On observe en particulier sur la vue en coupe présentée sur l'image b que les cellules (et en particulier leurs noyaux) se trouvent au fond des microsillons et que la quasi-totalité des neurites est guidée par les arêtes internes des microsillons.

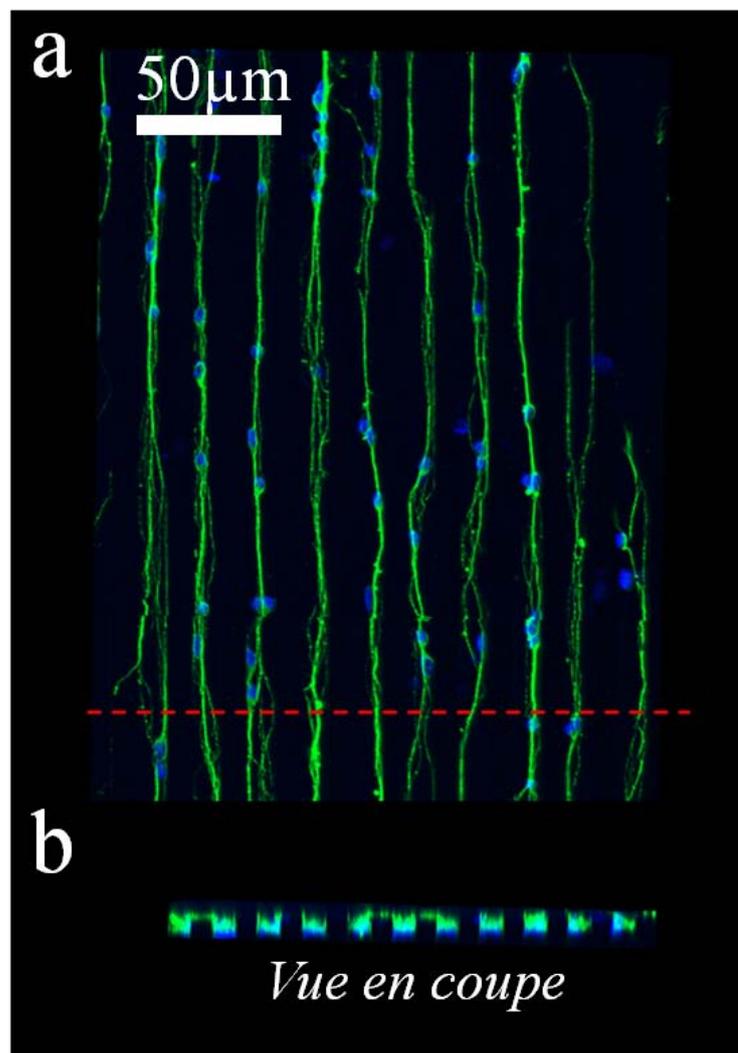


Figure 53 : **Image prise au microscope bi-photon de cellules L9 cultivées sur une surface de PDMS microstructurée.** Les microsillons mesurent $10\mu\text{m}$ de largeur et sont espacés de $10\mu\text{m}$. La profondeur des sillons est de $10\mu\text{m}$. La densité d'ensemencement est de 30 000 cellules/mL. Les neurofilaments sont marqués en utilisant le marqueur Tuj-I couplé à un anticorps secondaire fluorescent (Alexa 488nm, vert). Les noyaux ont été marqués en DAPI (bleu). L'échantillon est imagé sur toute son épaisseur (direction z). Une image est acquise tous les 500nm sur l'axe vertical z de l'échantillon. Nous superposons ensuite toutes ces images pour avoir une vue de l'échantillon sur toute son épaisseur. **a** : image représentant la superposition des intensités maximales de chaque plan focal de l'échantillon. **b** : vue en coupe de la section au niveau de la ligne en pointillés rouge représenté sur l'image a.

Pour évaluer l'influence de la largeur des microsillons sur l'alignement des neurites, nous avons utilisé le protocole de quantification de l'alignement décrit dans le paragraphe 1.3 page 66. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 54.

On observe que la variation de la largeur des microsillons a un effet sur le pourcentage d'alignement des neurites. De manière logique, sur une surface plate, il n'y a pas d'alignement. De plus, on relève que plus la topographie contraint les cellules (c'est-à-dire plus la largeur diminue), plus le pourcentage d'alignement est élevé. On obtient un pourcentage d'alignement de presque 100% pour les microsillons de $10\mu\text{m}$ et $20\mu\text{m}$ de largeur. Pour les sillons de $5\mu\text{m}$ de largeur, la contrainte est trop importante. Les cellules ne se développent pas toutes au fond des microsillons (comme montré sur la

Figure 50c) et l'alignement des neurites est moins bon. Des cellules restent sur les « bosses » et leurs neurites ne pouvant pas être guidés par les arêtes internes des sillons, elles « naviguent » de sillon en bosse, comme on peut le voir sur la Figure 55 (voir flèches).

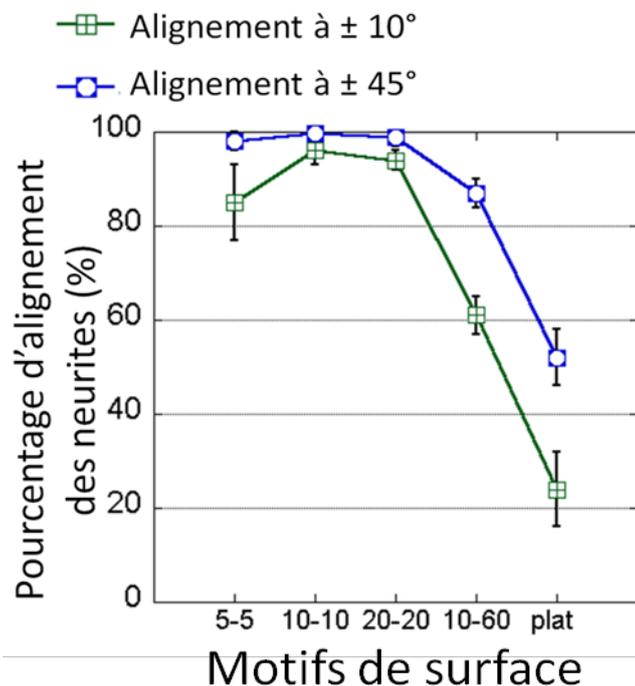


Figure 54 : Résultats de l'analyse de l'alignement des neurites par rapport à la direction des microsillons, pour différentes largeurs de microsillons. Leur profondeur est de $25\mu\text{m}$. Les résultats sont le calcul du pourcentage de longueur de neurites orienté entre -10° et $+10^\circ$ ou entre -45° et $+45^\circ$ par rapport à la direction des microsillons. Pour chaque motif de surface, les neurites de 100 neurones ont été analysés. Voir 1.3 pour les détails sur la méthode de quantification.

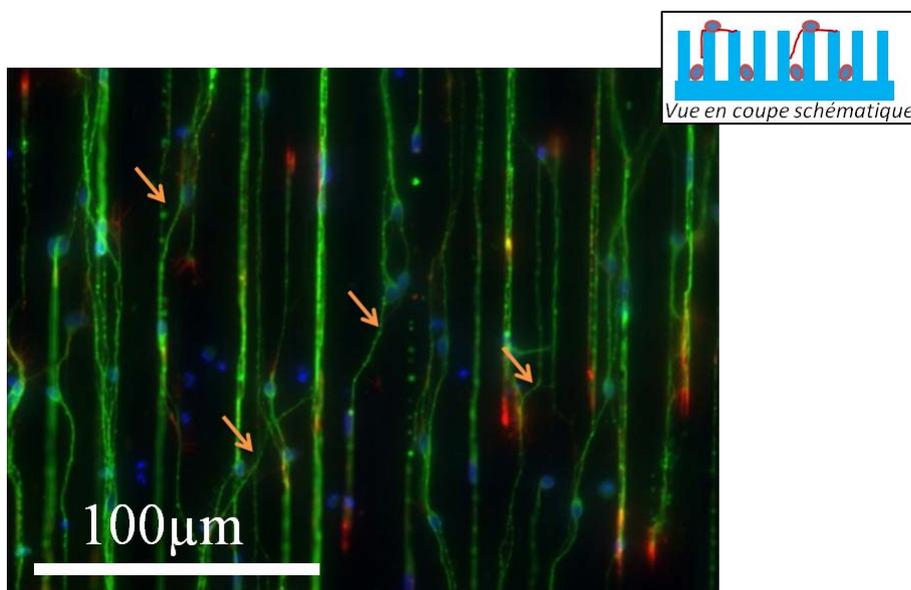
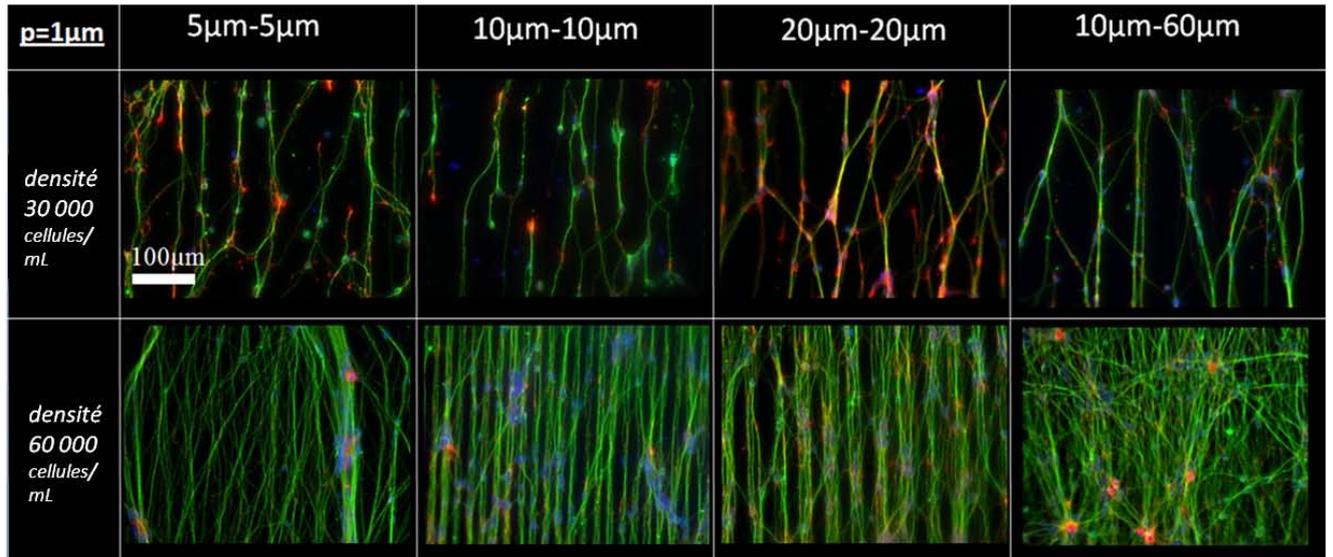


Figure 55 : Image prise au microscope optique à fluorescence de cellules Luhmes cultivées sur un échantillon de PDMS comportant des microsillons de $5\mu\text{m}$ de largeur, espacés de $5\mu\text{m}$ et de $25\mu\text{m}$ de profondeur. Les neurofilaments ont été marqués en utilisant le marqueur Tuj-I et un anticorps secondaire fluorescent (Alexa 488nm, vert), les filaments d'actine ont été marqués en utilisant la phalloïdine, couplée à un fluorophore (Alexa 546nm, rouge). Les noyaux ont été marqués avec le DAPI (bleu). Les flèches orange mettent en évidence des neurites qui naviguent de sillon en sillon en passant au-dessus d'une microstructure. En encart : coupe schématisée de la localisation des cellules et de leurs neurites.

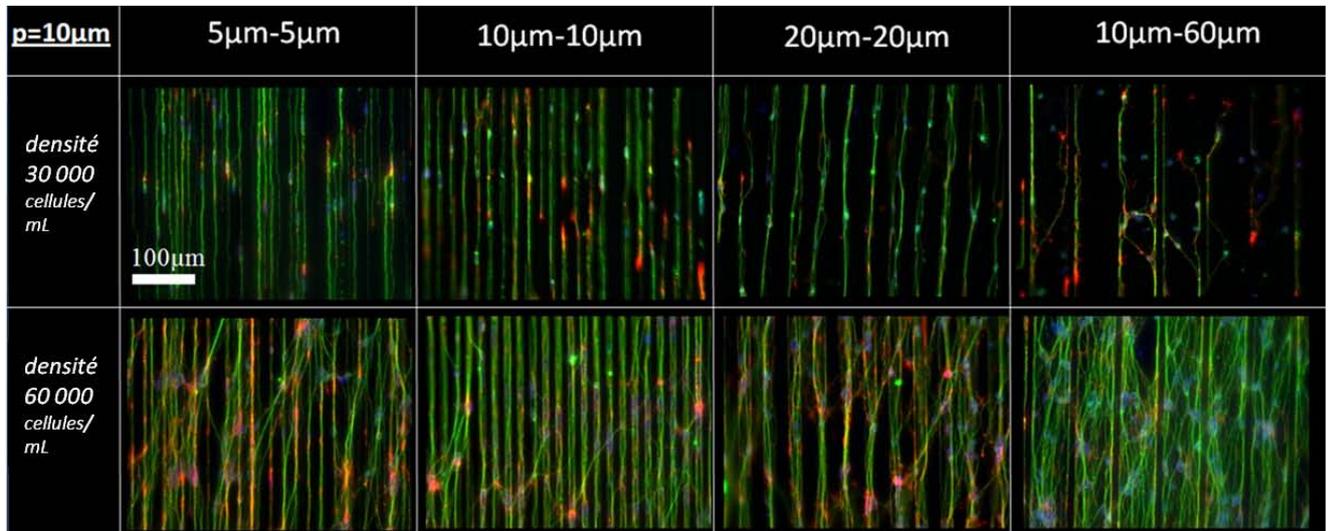
Les réseaux de neurites formés sont des connexions entre neurones. Les cellules interagissent entre elles et échangent des signaux chimiques. Nous avons souhaité étudier plus précisément les interactions entre les cellules neuronales et la microstructuration de surface et voir s'il y a une « compétition » entre les interactions entre cellules et les interactions entre les cellules et la topographie. Pour cela, nous avons fait varier la profondeur des microsillons ainsi que la densité d'ensemencement. Nous avons utilisé des profondeurs de 25 μ m, 10 μ m et 1 μ m. Les densités utilisées sont de 30 000 cellules/mL (comme sur les expériences déjà réalisées précédemment) et 60 000 cellules/mL. Les résultats obtenus pour la variation de la densité seront commentés dans le paragraphe d) suivant, page 84.

La Figure 56 montre, pour chaque condition de topographie, et pour les deux densités d'ensemencement, des images représentatives des cultures obtenues. Cette figure permet de comparer l'effet de la profondeur des sillons, pour une largeur de sillon donnée (colonnes) et de voir l'effet de la largeur des microsillons, pour une profondeur donnée (lignes) et ceci pour deux densités d'ensemencement.

a



b



c

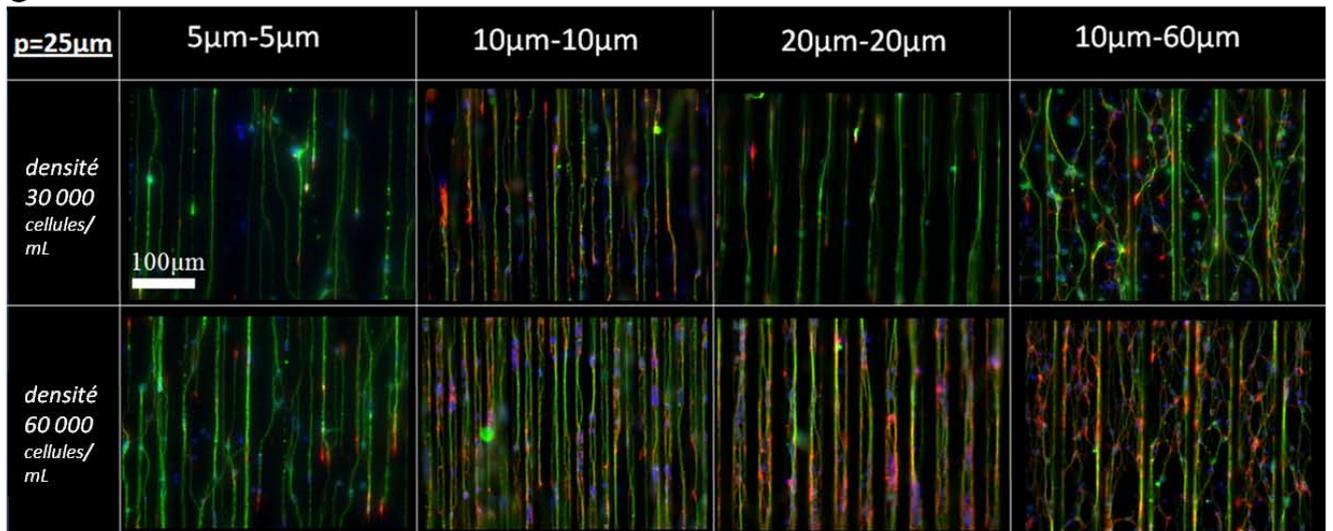


Figure 56 : Comparaison de l'effet de la largeur des sillons, de l'effet de la profondeur des sillons et de la densité d'ensemencement sur le développement des cellules LHMes. Images prises au microscope optique à fluorescence des

cultures réalisées sur des surfaces de PDMS comportant des microsillons parallèles de différentes dimensions, après 5 jours de culture en phase de différenciation. Les ensemencements ont été réalisés en utilisant deux densités : 30 000 cellules/mL et 60 000 cellules/mL. Les neurofilaments ont été marqués en utilisant le marqueur Tuj-I et un anticorps secondaire fluorescent (Alexa 488nm, vert), les filaments d'actine ont été marqués en utilisant la phalloïdine, couplée à un fluorophore (Alexa 546nm, rouge). Les noyaux ont été marqués avec le DAPI (bleu). **a** : images de cellules sur une surface comportant des sillons mesurant 1µm de profondeur. **b** : images de cellules sur une surface comportant des sillons mesurant 10µm de profondeur. **c** : images de cellules sur une surface comportant des sillons mesurant 25µm de profondeur.

L'examen visuel de ces images met clairement en évidence que :

- les cellules et les neurites interagissent toujours avec la topographie de la surface. Quelles que soient les conditions, les neurites ont tendance à se développer dans la direction des sillons.
- l'augmentation de la densité d'ensemencement se traduit toujours par une augmentation du nombre de cellules ayant adhéré et du nombre de neurites développé.
- l'alignement diminue quand la densité en cellules augmente.
- l'alignement diminue quand la largeur des sillons augmente.
- la profondeur de 1µm ne permet pas un alignement rigoureux, comme c'est le cas pour certaines conditions avec des sillons plus profonds.

De manière plus quantitative, nous pouvons découvrir sur la Figure 57 comment la profondeur des microsillons influence l'alignement des neurites et la densité neuritique (pourcentage de l'aire de l'échantillon recouverte de neurites) obtenue pour les différentes conditions de culture. Par exemple, pour un échantillon comportant des microsillons de 5µm de largeur, de 1µm de profondeur, 55% des neurites sont alignés et les neurites représentent 10% de l'aire de l'échantillon.

On relève la tendance suivante : la densité en neurites augmente lorsque la profondeur des sillons diminue. Cette tendance est commune à toutes les largeurs de microsillons. On note également que la densité neuritique apparaît plus élevée dans le cas de microsillons de 1µm de profondeur que sur le contrôle plat, mais cette différence n'est pas statistiquement significative.

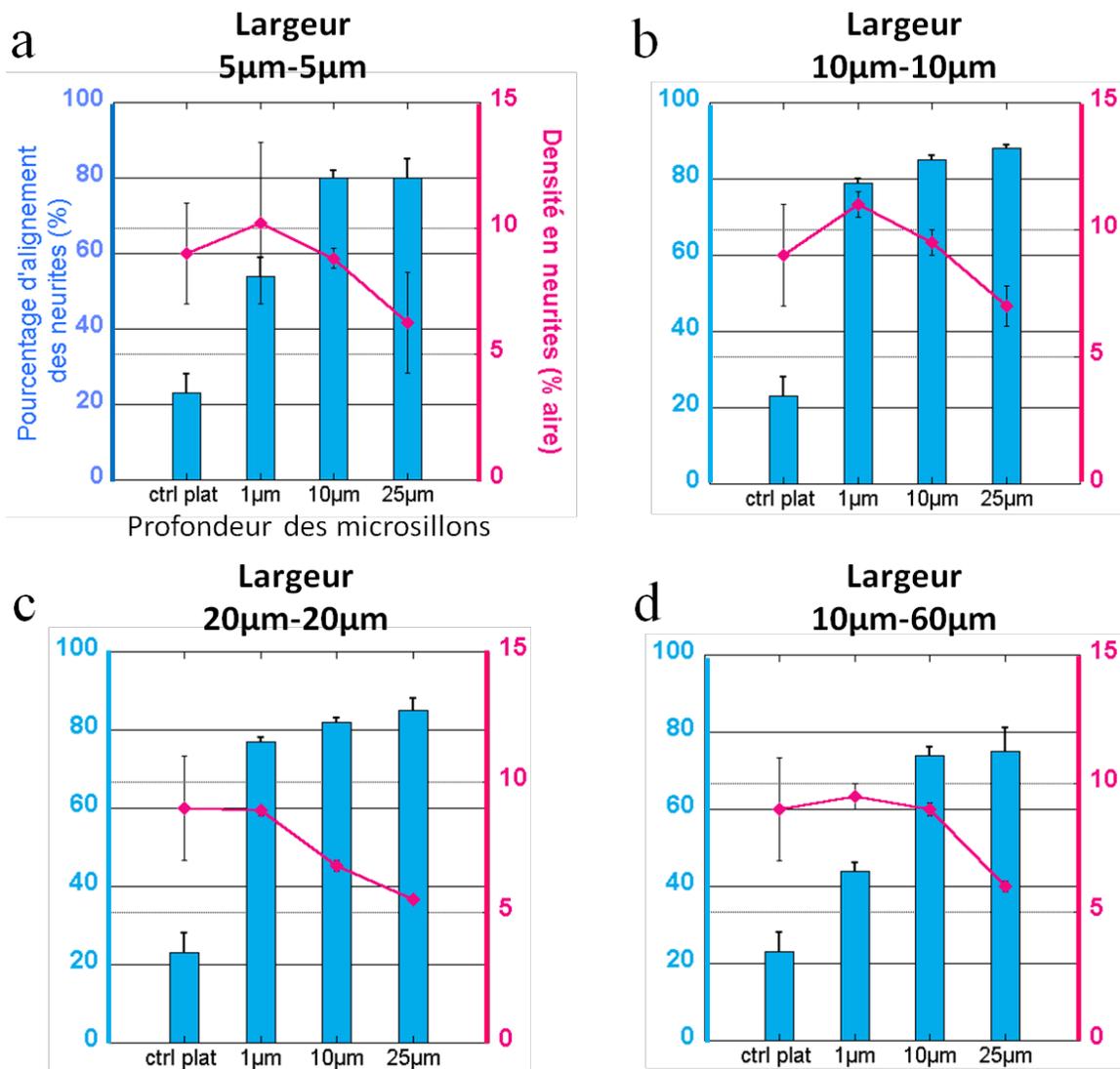


Figure 57 : Evolution de l'alignement des neurites et de la densité en neurites en fonction de la profondeur des microsillons, pour différentes largeurs de microsillons. Les quantifications résultent de l'analyse d'environ 200 neurones, pour chaque condition, pour une densité d'ensemencement de 60 000 cellules/mL. La surface notée « ctrl plat » est la surface de PDMS qui ne comporte pas de microsillons (surface plate).

Cette étude systématique permet d'identifier les meilleures conditions de topographie à générer sur une surface pour obtenir un guidage rigoureux des neurites tout en préservant leur développement neuritique. La Figure 58 montre un exemple d'une telle optimisation. Il s'agit d'une image prise au microscope bi-photon de cellules sur une surface comportant des sillons de 10µm de largeur et de 10µm de profondeur, espacés de 10µm.

On observe que les noyaux et les neurites sont dans les microsillons, que les neurites sont nombreux et très bien guidés par la topographie. Cette géométrie de microsillons ne frustre pas le développement des cellules. L'ensemble forme un véritable réseau de « câbles » de neurites disposés de manière définie et maîtrisée. L'ingénierie de surface utilisée de manière sélective permet ainsi de créer « à façon » des structures neuritiques et des réseaux neuronaux. Par le contrôle des paramètres de largeur et de profondeur des microsillons, il est ainsi possible d'ajuster la morphologie des réseaux et de

favoriser des connexions axiales sans connexions horizontales (cas de la Figure 58) ou bien d'autoriser des connexions latérales, par exemple en diminuant la profondeur ou la largeur des sillons.

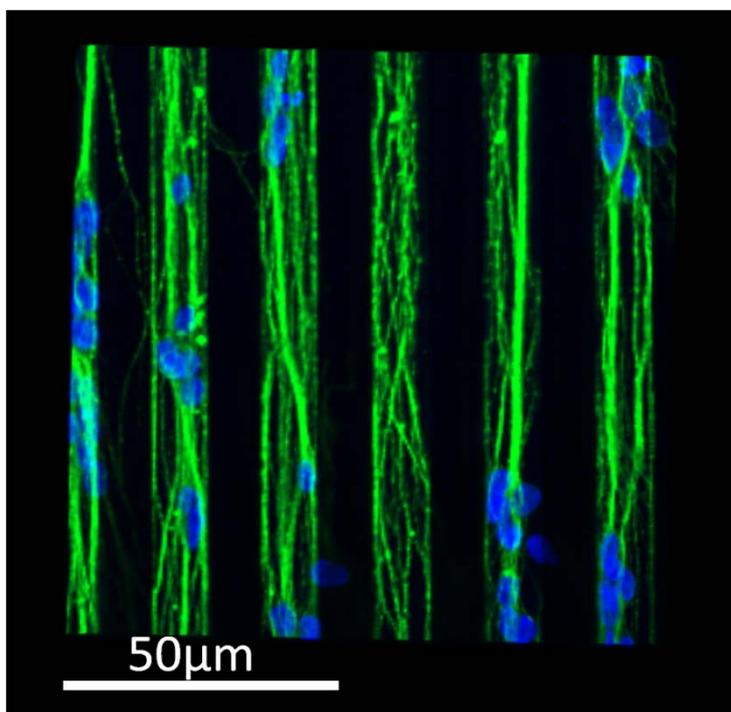


Figure 58 : image prise au microscope bi-photon de cellules Luminescentes cultivées sur une surface de PDMS comportant des microsillons mesurant 10µm de largeur et 10µm de profondeur, espacés de 10µm. Ensemencement à 60 000 cellules/mL. L'échantillon est imagé sur toute son épaisseur (direction z). Une image est acquise tous les 500nm sur l'axe vertical z. Nous superposons ensuite toutes ces images pour avoir une vue de l'échantillon sur toute son épaisseur.

d. Compétition entre les interactions cellules-surface et les interactions entre cellules

Lors de la culture des cellules, celles-ci sécrètent des enzymes, des molécules et échangent ainsi des signaux chimiques. Ces interactions entre cellules peuvent modifier leur comportement et il nous a paru intéressant d'étudier l'effet des interactions entre les cellules et d'étudier la « compétition » avec l'effet de la topographie de surface. Pour cela, nous avons fait varier la densité d'ensemencement. Les résultats des cultures sont présentés dans la Figure 56. Nous observons visuellement que lorsque l'on double la densité d'ensemencement, la quantité de cellules ayant effectivement adhéré sur la surface est augmentée.

On constate également que l'augmentation du nombre de cellules et aussi de neurites atténue l'alignement des neurites par rapport à la topographie. Cet effet est d'autant plus marqué que les profondeurs des sillons sont faibles.

La Figure 59 montre une image de cellules Luminescentes cultivées sur une surface comportant des microsillons de 60µm de largeur espacés de 10µm et mesurant 1µm de profondeur. L'ensemencement est réalisé en utilisant la forte densité (60 000 cellules/mL).

On observe que les neurites sont majoritairement alignés dans la direction des microsillons. Cependant, un grand nombre de neurites traverse la surface (neurites obliques sur l'image, voir flèches oranges) sans interagir avec la topographie. Les neurones se regroupent en paquets (voir cercles en pointillés orange). Ces observations montrent que pour une faible profondeur de sillon ($1\mu\text{m}$), les cellules interagissent plus entre elles que dans des conditions de topographie où les sillons sont plus profonds (voir Figure 56 et Figure 59).

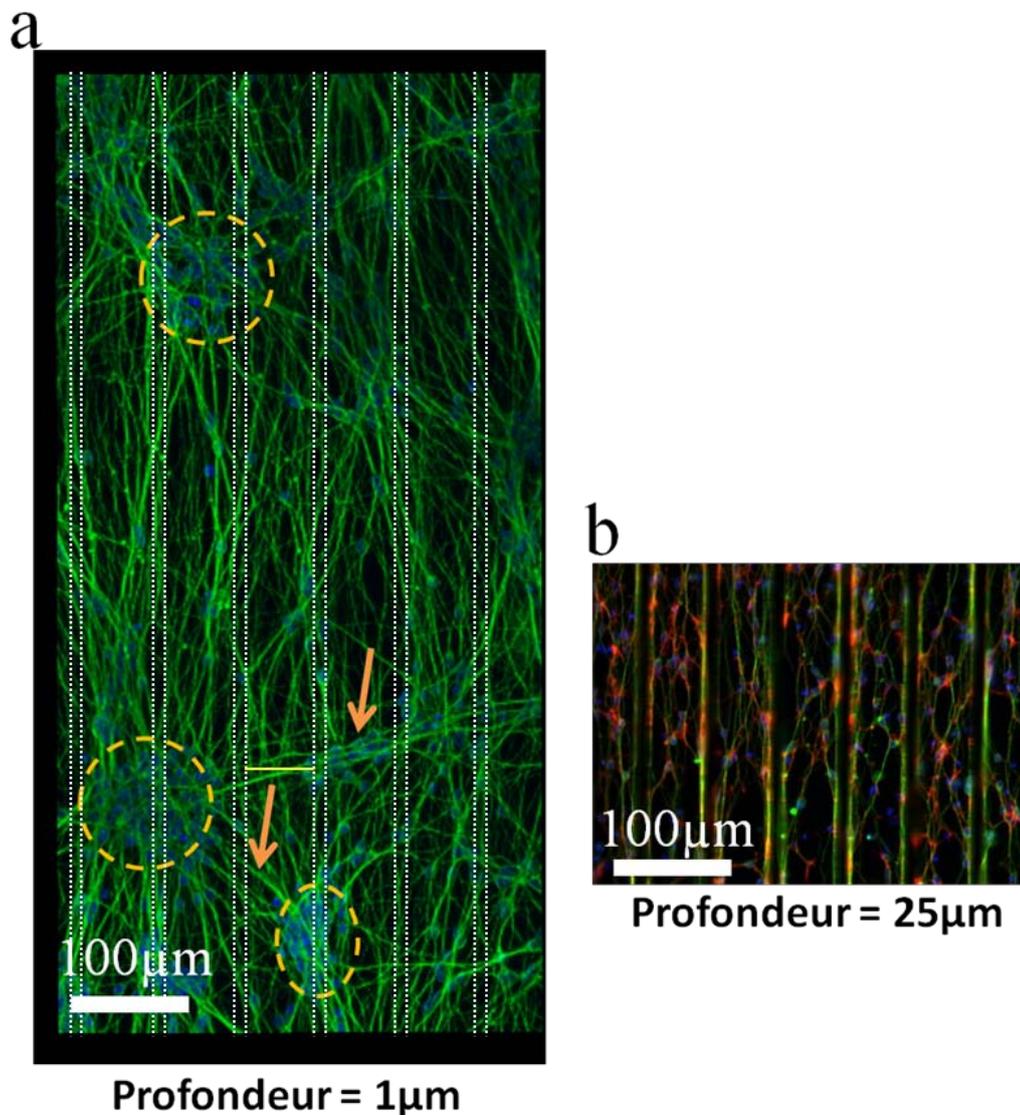


Figure 59 : **a** : image prise au microscope bi-photon de cellules L9 cultivées à forte densité (60 000 cellules/mL) sur une surface de PDMS comportant des microsillons mesurant $60\mu\text{m}$ de largeur et $1\mu\text{m}$ de profondeur, espacés de $10\mu\text{m}$ (symbolisés par les lignes en pointillés blancs). L'échantillon est imagé sur toute son épaisseur (direction z). Une image est acquise tous les 500nm sur l'axe vertical z. Nous superposons ensuite toutes ces images pour avoir une vue de l'échantillon sur toute son épaisseur. Les cercles orange en pointillés mettent en évidence des zones où les cellules se sont regroupées en paquet. Les flèches orange montrent des groupes de neurites n'interagissant pas avec la topographie de surface. **b** : image prise au microscope optique à fluorescence de cellules L9 cultivées à forte densité (60 000 cellules/mL) sur une surface de PDMS comportant des microsillons mesurant $60\mu\text{m}$ de largeur et $25\mu\text{m}$ de profondeur, espacés de $10\mu\text{m}$.

2.3. Effet de la microtopographie sur le comportement des cellules souches neurales adultes humaines

Les résultats obtenus avec des cellules neuronales issues de lignées nous ont permis de voir que les surfaces de PDMS étaient bien compatibles avec la culture de neurones et que la géométrie des microsillons créés sur le PDMS a une grande influence sur le comportement des cellules. Cependant, pour ces études, les populations de cellules étaient homogènes (il n'y avait qu'un seul type de cellule neuronale sur une même surface). Ce n'est pas le cas dans les tissus cérébraux, qui comprennent différents types cellulaires.

Les cellules souches neurales adultes humaines sont des cellules primaires, qui peuvent se différencier en trois types cellulaires : les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes. D'un point de vue thérapeutique, une meilleure compréhension des mécanismes et des conditions qui favorisent leur différenciation ouvrirait la voie à de nouvelles stratégies pour utiliser au maximum la capacité de ces cellules à régénérer des lésions par exemple.

C'est pourquoi, après l'étude du comportement de modèles de cellules neuronales qui nous a donné une connaissance des paramètres topographiques qui influencent la croissance et la différenciation cellulaire, nous avons voulu confirmer ces résultats avec des cellules souches neurales adultes humaines.

Les cellules souches que nous utilisons proviennent de prélèvements de patients (biopsies), il peut donc exister une variabilité du comportement des cellules d'un patient à un autre. Cette variabilité est plus importante que dans le cas de lignées cellulaires, populations homogènes et stables, donnant un seul type cellulaire. Pour prendre en compte cette variabilité, nous avons réalisé nos expériences avec 4 prélèvements de 4 patients différents.

a. Adhérence des cellules souches neurales adultes humaines sur des surfaces de PDMS comportant des microstructures

Nous avonsensemencé les différents échantillons de PDMS, sur lesquels on a au préalable déposé une couche de polylysine et de laminine, avec une densité de cellules souches en suspension constante (30 000 cellules/mL). La Figure 60 montre une image représentative des cultures obtenues pour chaque type de microsillon. Tous les noyaux cellulaires ont été marqués avec le DAPI (bleu). Les cellules souches qui se sont différenciées en neurones sont visualisées grâce au marquage immunofluorescent de la bêta-III tubuline, protéine constituant les neurofilaments et que l'on trouve chez les neurones immatures. Pour cela, nous avons utilisé le marqueur Tuj-I couplé à un anticorps secondaire fluorescent (Alexa 546nm, rouge). On constate que les cellules souches ont adhéré sur tous les types de surfaces et que certaines d'entre elles se sont différenciées en neurones. Ceux-ci étendent des neurites dans la direction des microsillons. Les cellules dont les noyaux ne sont pas entourés de

neurofilaments sont des cellules souches qui ont adhéré sur la surface mais qui ne se sont pas différenciées en neurones.

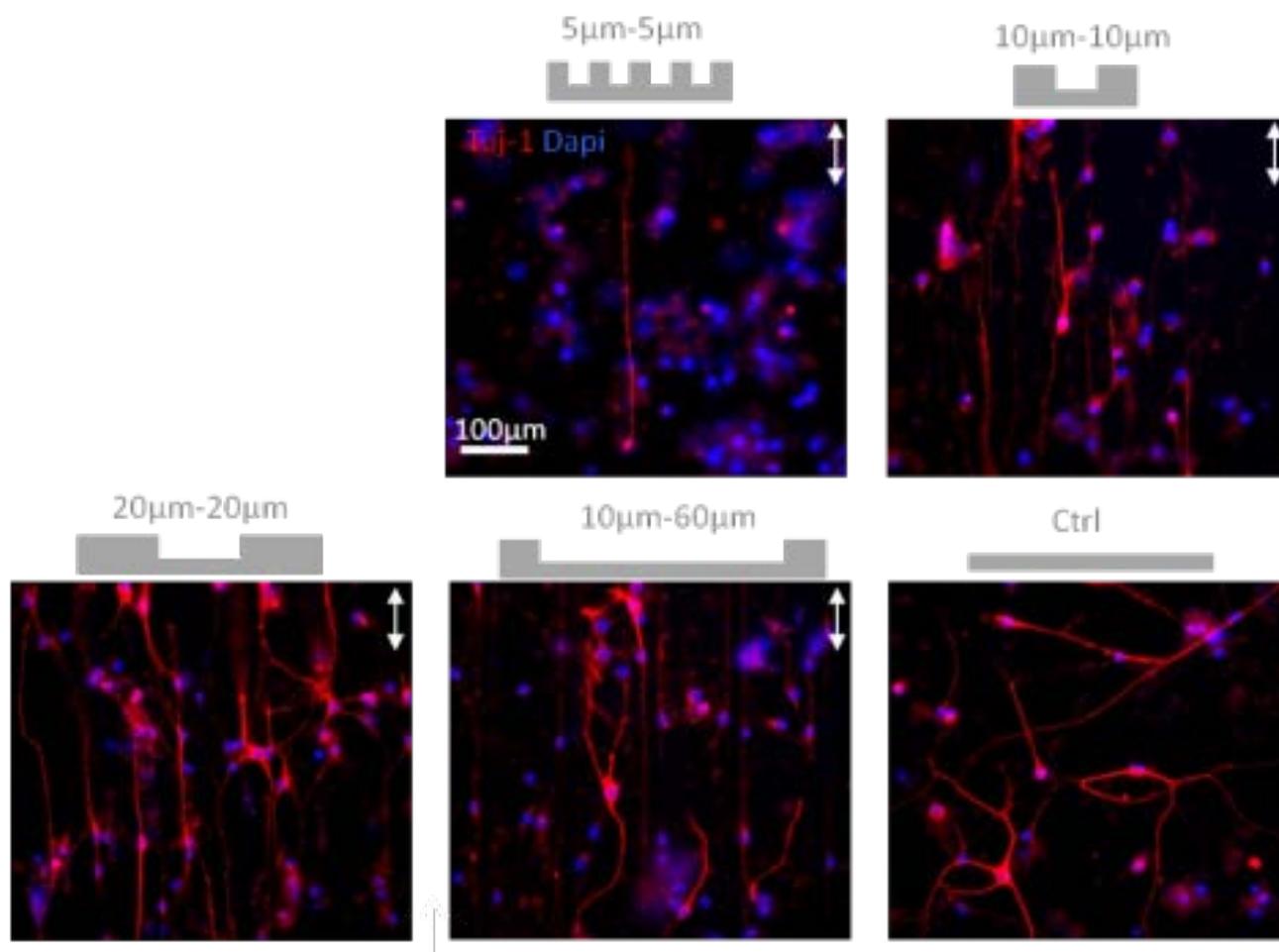


Figure 60 : Images représentatives des cultures de cellules souches réalisées sur des surfaces de PDMS comportant des microsillons de différentes largeurs. La profondeur est de 25µm. Les cellules souches ont été maintenues pendant 5 jours dans la phase de différenciation en neurones. La protéine bêta-III tubuline des neurofilaments que l'on trouve chez les neurones immatures a été marquée avec le marqueur Tuj-I couplé à un anticorps secondaire fluorescent (Alexa 546nm, rouge). Les noyaux de toutes les cellules ont été marqués en DAPI (bleu). Les flèches représentent la direction des microsillons.

A partir de ce type d'images, nous avons quantifié les mêmes paramètres que pour les précédents types de cellules. La Figure 61 montre les résultats obtenus pour 4 biopsies.

On relève d'après la Figure 61a qu'environ un tiers des cellules adhère sur les surfaces de PDMS. Ce résultat est comparable à celui obtenu pour une culture réalisée sur une lamelle de verre couverte de polylysine et de laminine, qui est la surface habituellement utilisée pour la culture de ces cellules. On constate que la largeur des microsillons n'a pas d'influence significative sur la densité de cellules ayant adhéré.

La Figure 61b montre que le corps cellulaire des cellules souches mesure entre 5µm et 10µm de diamètre et la Figure 61c montre que la grande majorité des cellules est localisée dans les microsillons. Cela dépend peu de la largeur des microsillons. Ces résultats sont donc très semblables à ceux obtenus avec les cellules de la lignée humaine (Luhmes).

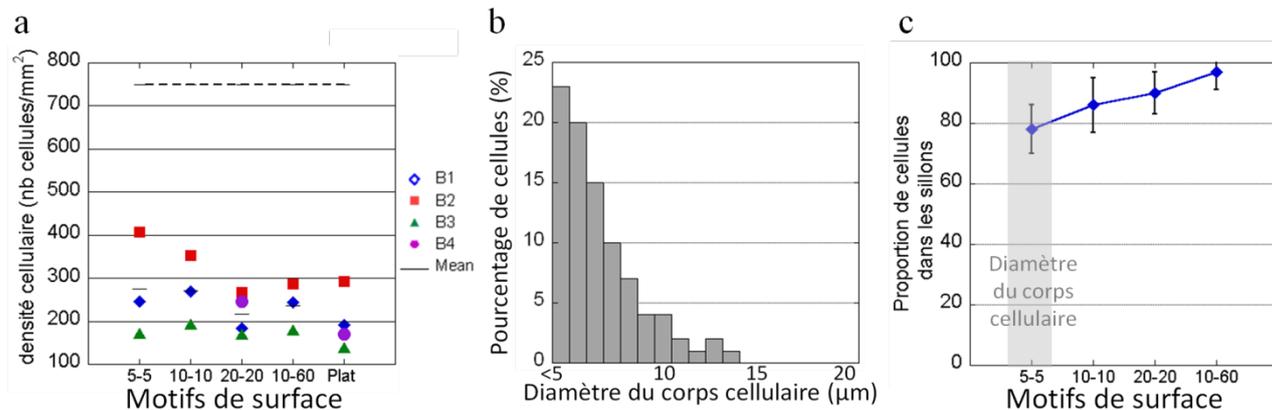


Figure 61 : Résultats de quantifications effectuées sur l'adhérence et la localisation des cellules souches adultes humaines en fonction de la largeur des microsillons présents sur les surfaces de PDMS. La profondeur des microsillons est de 25µm. **a** : densité cellulaire. La ligne en pointillés noirs représente la densité cellulaire que l'on obtiendrait si toutes les cellules adhéraient sur la surface. Les différents symboles correspondent aux expériences réalisées avec les différentes biopsies. Les expériences ont été menées avec 4 biopsies humaines, notées B1, B2, B3 et B4. **b** : répartition des cellules en fonction de la taille de leur corps cellulaire. **c** : proportion des cellules (différenciées ou non) localisées dans les microsillons en fonction de la largeur des microsillons.

b. Différenciation et développement des neurones

La Figure 62 présente les pourcentages de différenciation des cellules souches neurales adultes humaines obtenus pour les différentes conditions de topographie, pour des cellules provenant de 4 biopsies. Nous avons réalisé un test de student¹³ pour comparer les valeurs obtenues sur les surfaces avec des microstructures avec la valeur obtenue sur le PDMS plat (valeur de référence). Les p-valeurs¹⁴ résultant de la comparaison sont indiquées. Ici, nous ne fixons pas de valeur seuil pour indiquer la significativité obtenue mais indiquons l'évolution des valeurs de p.

Contrairement aux modèles cellulaires constitués par les lignées, comme les neuro2a et les Luhmes, les pourcentages de différenciation des cellules souches obtenus sont très éloignés des 100%. Les lignées sont des cellules qui ont été sélectionnées et sont d'un seul type. Ce n'est pas le cas pour les cellules souches, dont le processus de différenciation est plus complexe. Ainsi in vitro, même avec des milieux contenant des facteurs de différenciation, une partie de ces cellules va rester au stade de cellule progénitrice et ces cellules ne donneront jamais naissance à des cellules différenciées.

Le graphe de la Figure 62 indique que le pourcentage de cellules différenciées en neurones augmente avec la largeur des microsillons. Pour les microsillons les plus étroits, dont la largeur est proche du diamètre du corps cellulaire des cellules souches (5µm et 10µm), le pourcentage de différenciation est plus faible que sur la surface référence qui ne comporte pas de microtopographie.

¹³ Le test de Student est couramment utilisé pour comparer la moyenne observée d'un échantillon statistique à une valeur fixée, ou bien pour comparer les moyennes de deux échantillons gaussiens.

¹⁴ La p-valeur est la probabilité de se tromper en rejetant l'hypothèse nulle du test de student. On fixe une valeur de p seuil à partir duquel on considère que la différence observée dans une comparaison est statistiquement significative, c'est-à-dire avec une faible chance d'être due au hasard.

En revanche, pour les microsillons les plus larges (20µm et 60µm), le pourcentage de différenciation est comparable à celui obtenu sur la surface référence.

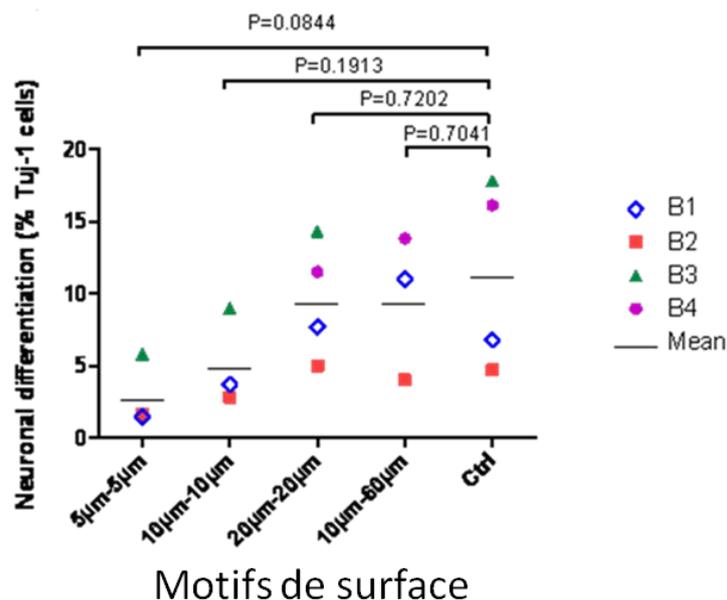


Figure 62 : Pourcentage de différenciation des cellules souches neurales adultes humaines obtenu sur des surfaces de PDMS comportant des microsillons de différentes largeurs (calcul de la proportion de cellules ayant au moins un neurite mesurant au moins 20µm de long, repéré par marquage immunofluorescent de la beta-III tubuline). Les valeurs de p résultent d'un test de student.

c. Interactions entre les cellules souches neurales adultes humaines et des surfaces de PDMS comportant des microstructures

La microtopographie influence également fortement le développement des neurites. Pour étudier les influences et les interactions entre les cellules en développement et la microtopographie, nous avons étudié le nombre de neurites, leur longueur et leur orientation.

La Figure 63a montre l'évolution du nombre moyen de neurites par neurone en fonction de la largeur des microsillons. On constate que celui-ci augmente avec la largeur des microsillons. Les contraintes imposées par les microsillons de 5µm, 10µm et 20µm ont une influence significative sur le nombre moyen de neurites par neurone (respectivement 1,2-1,6 et 1,9 neurites par neurone) en comparaison à la surface référence de PDMS plate (2,4 neurites par neurone). Pour les sillons de 60µm espacés de 10µm, le nombre moyen de neurites par neurone est de 2,3, ce qui est comparable au score obtenu sur la surface de référence (2,4).

Plus particulièrement, comme la Figure 63b le présente, les microsillons ont une influence sur la polarité des neurones. Nous appelons polarité¹⁵ d'un neurone le nombre de neurites qu'il possède.

Sur une surface de PDMS plate, les populations ayant un, deux, ou au moins trois neurites sont en proportions sensiblement équivalentes. En revanche, pour les microsillons les plus étroits (5µm de largeur), une très grande majorité des neurones (83%) ne possède qu'un seul neurite. Les contraintes

¹⁵ voir paragraphe 1.3 pour la définition du terme « polarité » dans ces travaux.

imposées par les microsillons étroits frustrant le développement neuritique alors que les cellules qui sont sur une surface plate, sans aucun confinement latéral, développent davantage de neurites. La proportion de neurones ayant un seul neurite décroît progressivement lorsque les largeurs de sillons augmentent. Cette proportion atteint 27% pour les sillons de 60µm de largeur, score comparable à celui relevé pour la surface de référence (25%). Simultanément, la proportion de neurones ayant au moins trois neurites augmente avec la largeur des sillons.

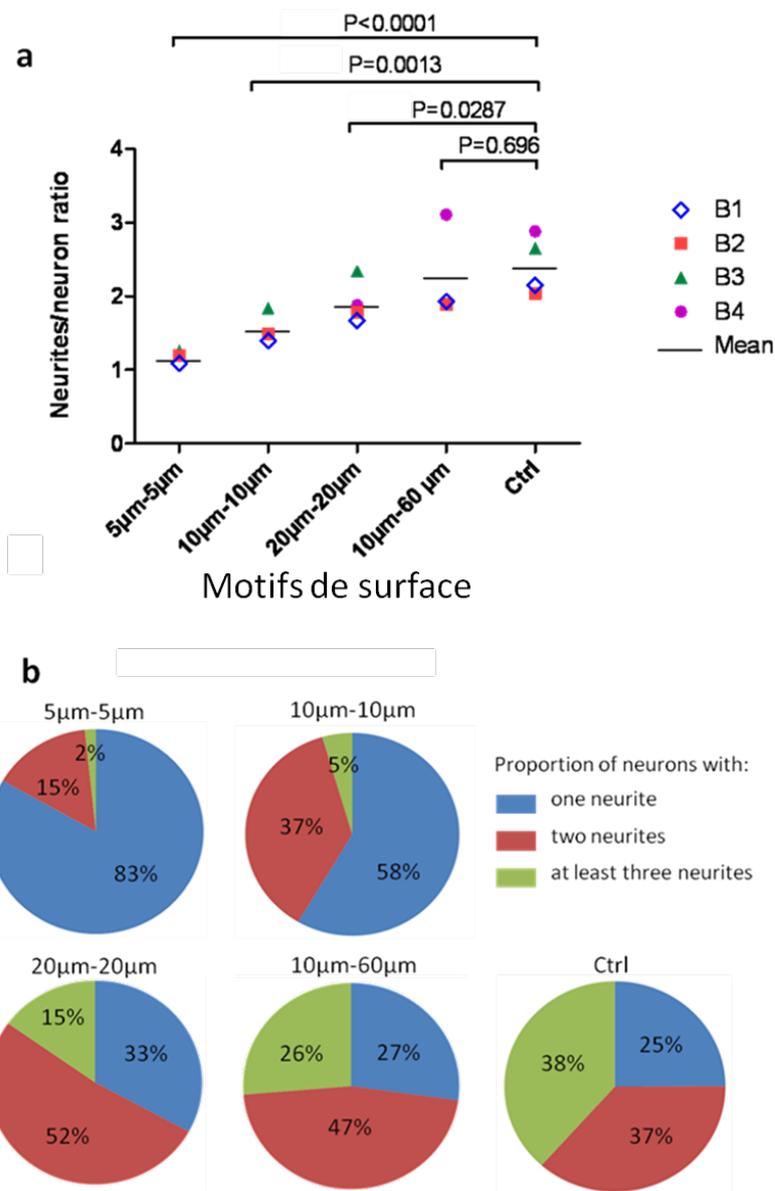


Figure 63 : **Influence de la microtopographie sur le développement des neurites de neurones issus de la différenciation de cellules souche.** **a** : Moyenne du nombre de neurites par neurone pour différentes largeurs de microsillons. Pour chaque condition, et pour chaque biopsie, environ 250 neurones ont été observés. Les valeurs obtenues pour chaque biopsie, la moyenne de ces 4 biopsies et les p-valeurs obtenues après le test de student sont indiquées. **b** : diagrammes représentant la proportion de neurones possédant un seul neurite, deux neurites ou au moins trois neurites pour les différentes conditions de topographie. La profondeur des sillons est de 25µm.

- étude de la longueur des neurites

Nous avons étudié l'influence de la largeur des sillons sur la longueur des neurites. La Figure 64 résume les résultats obtenus. De nouveau, on relève que les sillons les plus étroits limitent le développement des neurites. Leur longueur est significativement plus petite pour des sillons de 5 μ m et 10 μ m de largeur (respectivement 234 μ m et 256 μ m) par rapport à la surface plate (309 μ m, $p < 0,05$). En revanche, les longueurs des neurites développés sur les sillons plus larges sont comparables à celles mesurées sur la surface plate. Nous avons observé la même tendance avec les cellules de la lignée Luhmes.

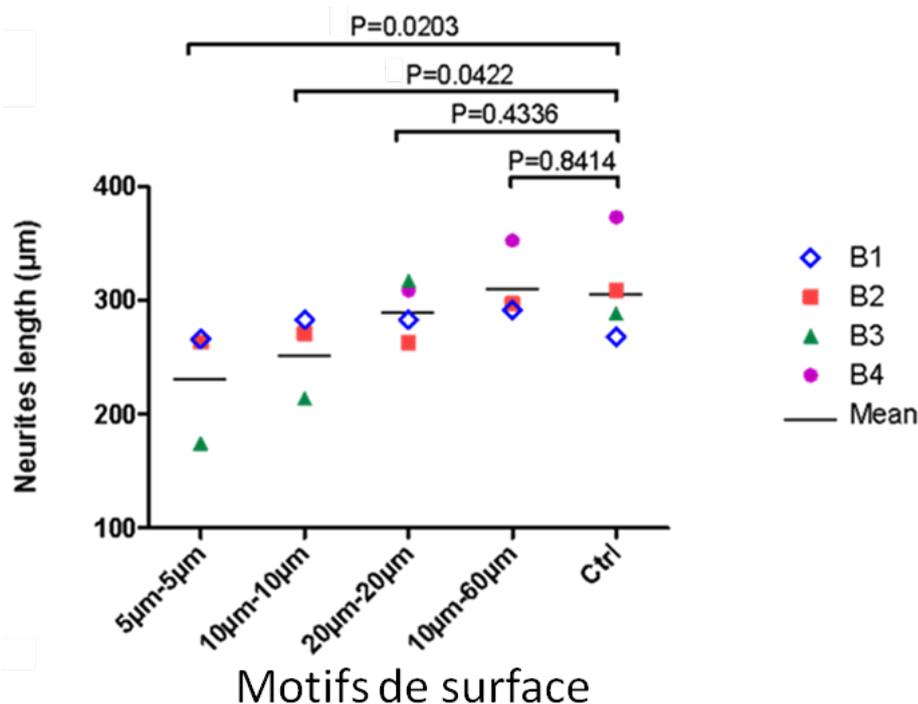


Figure 64 : **Influence de la topographie sur la longueur des neurites.** Le calcul de la longueur moyenne des neurites résulte de la mesure d'au moins 500 neurites pour chaque biopsie et pour chaque condition. L'effet des microsillons est analysé en réalisant un test de student, dont les p-valeurs sont indiquées au-dessus du graphe.

- étude de l'alignement des neurites

Enfin, nous avons étudié l'influence de la largeur des microsillons sur l'alignement des neurites. La Figure 65 présente les résultats que nous avons obtenus. Les observations au microscope à fluorescence montrent que les neurites se développent préférentiellement dans les sillons, contre les parois. La Figure 65a représente pour chaque condition de topographie les neurites présents sur un champ d'observation (surface du champ = 0,16mm²). Ils ont été retracés et recentrés à partir des images optiques fluorescentes. Cela nous donne une visualisation directe du nombre de neurites, de leur longueur et de leur orientation.

On voit que l'orientation des neurites sur la surface contrôle paraît aléatoire. Cela n'est plus le cas lorsque l'on impose une topographie aux cellules. L'alignement des neurites le long des microsillons est très prononcé pour les sillons les plus étroits. La proportion des segments de neurites formant un

angle inférieur à 10° avec la direction des sillons est de 95% pour les sillons de $5\mu\text{m}$ (voir Figure 65b). Cette proportion passe à 75% pour les sillons de $20\mu\text{m}$ et diminue à 44% pour ceux de $60\mu\text{m}$.

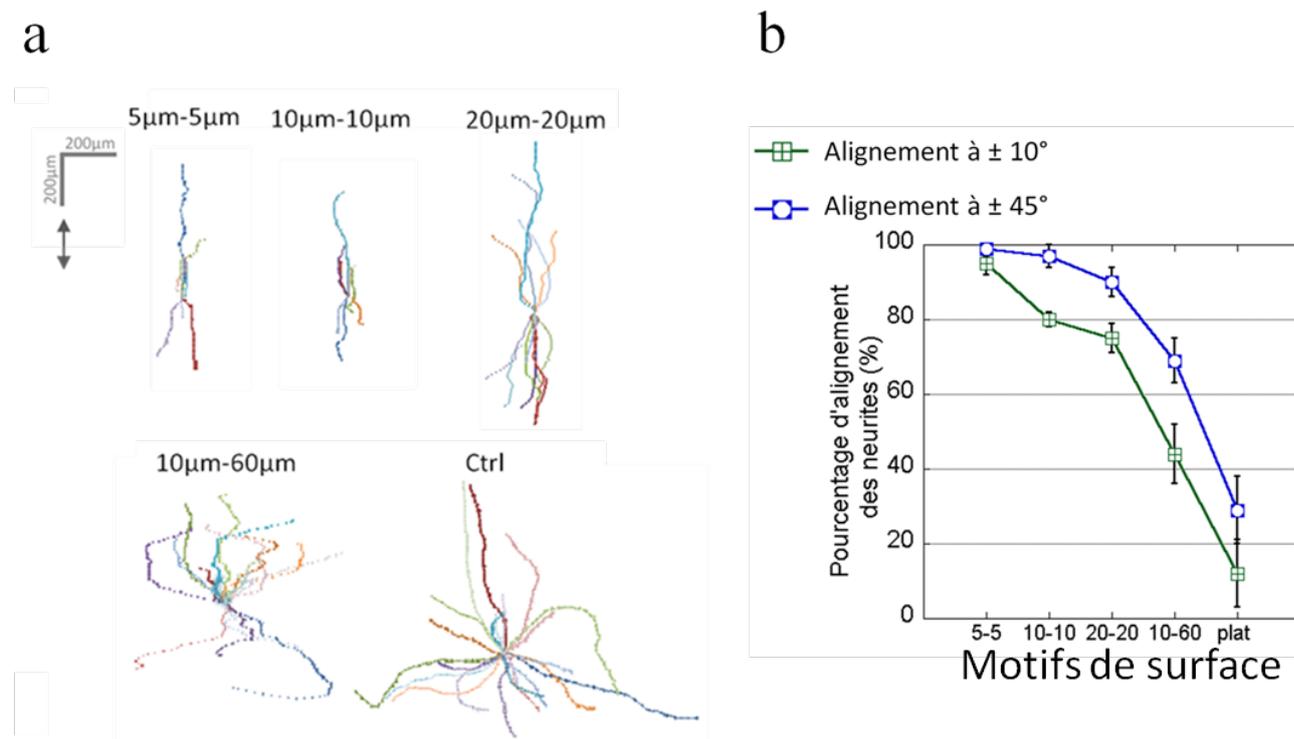


Figure 65 : **Influence de la topographie sur l'alignement des neurites dans la direction des microsillons, en fonction de leur largeur.** **a:** représentation de l'orientation des neurites. Tous les neurites présents sur un champ d'observation (surface = $0,16\text{mm}^2$) ont été retracés et recentrés. La direction des microsillons est indiquée par la flèche. **b:** effet de la topographie sur la proportion de segments de neurites alignés avec les microsillons à $\pm 10^\circ$ et à $\pm 45^\circ$.

Ces analyses du développement des neurites nous apprennent que les sillons qui induisent un alignement parfait (cas des sillons de $10\mu\text{m}$ de largeur, espacés de $10\mu\text{m}$) ont aussi pour effet de réduire considérablement le score de différenciation ainsi que le nombre et la longueur des neurites. Les sillons les plus larges (cas des sillons de $60\mu\text{m}$ de largeur espacés de $10\mu\text{m}$) au contraire, ne frustrant pas le développement des neurones et permettent tout de même d'obtenir un alignement de la croissance.

d. Compétition entre les interactions cellules-surface et les interactions entre cellules

Nous avons observé avec les cellules de la lignée Luhmes que des neurites en croissance étaient parfois capables de passer au-dessus d'une structure et d'être guidés par un sillon voisin. Ce genre d'échappement est plus fréquent quand la densité en neurones est importante. Cela a également été observé dans le cas des cellules souches différenciées en neurones.

Ce cas est illustré sur la Figure 66a1 et b1. La comparaison des alignements obtenus pour ces deux cas est présentée sur la Figure 66 a2-b2. On observe que pour une faible densité en neurones, l'alignement obtenu est parfait. Il est perturbé dans le cas d'une forte densité en neurones.

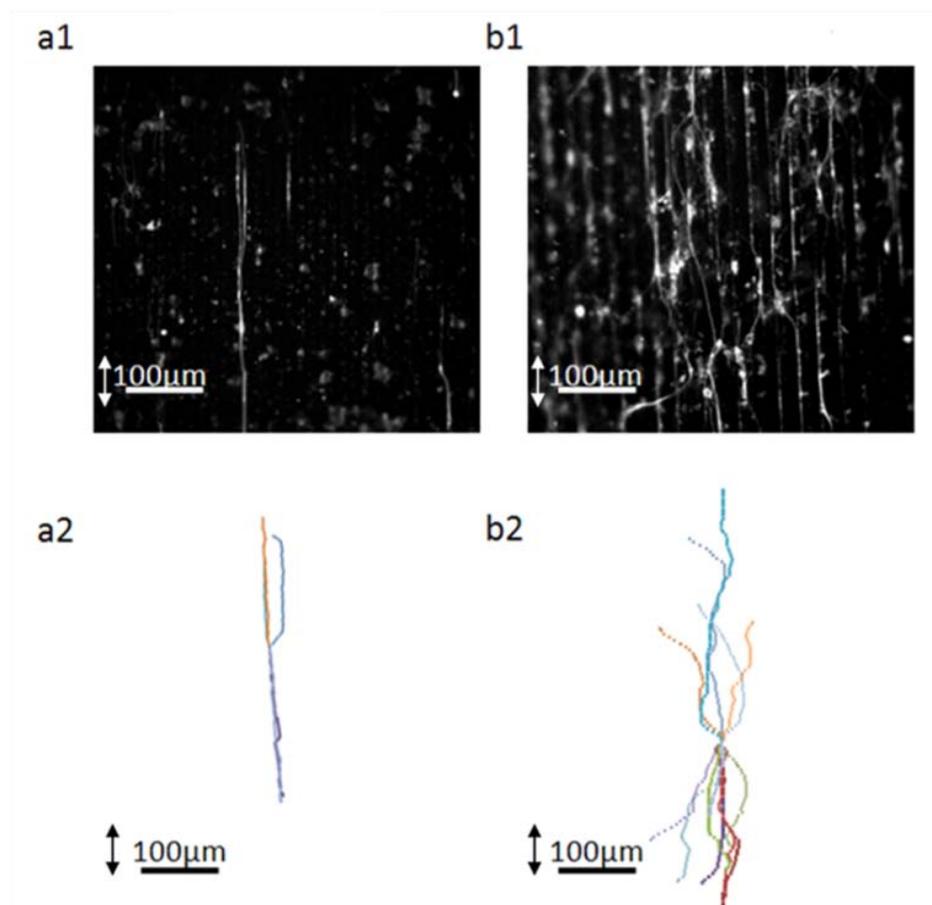


Figure 66 : effet des interactions entre cellules sur le guidage des neurites pour des microsillons de 20µm de largeur. **a1-b1** : images prises au microscope optique à fluorescence des neurofilaments des neurones (marquage immunofluorescent de la beta-III tubuline) pour une faible densité (moins de 10 neurones/mm²) (a1) et pour une forte densité (plus de 70 neurones/mm²) (b1). **a2-b2** : tracé de tous les neurites présents sur un champ d'observation (0,16mm²), pour une faible densité (a2) et pour une forte densité (b2). La direction des microsillons est indiquée par les flèches.

Pour approfondir cette analyse, nous avonsensemencé les surfaces de PDMS avec trois densités différentes de cellules souches, respectivement 30 000, 60 000 et 90 000 cellules/mL. Les résultats de culture obtenus sont présentés dans la Figure 67. Nous avons réalisé les marquages des cellules souches différenciées en neurones mais aussi des cellules souches différenciées en astrocytes.

On observe que la densité de cellules ayant adhéré sur les différentes surfaces est proportionnelle à la densité d'ensemencement. Les microsillons ont pour effet d'aligner les deux types de cellules observés, les neurones et les astrocytes. L'alignement est meilleur lorsque la densité d'ensemencement est la plus faible.

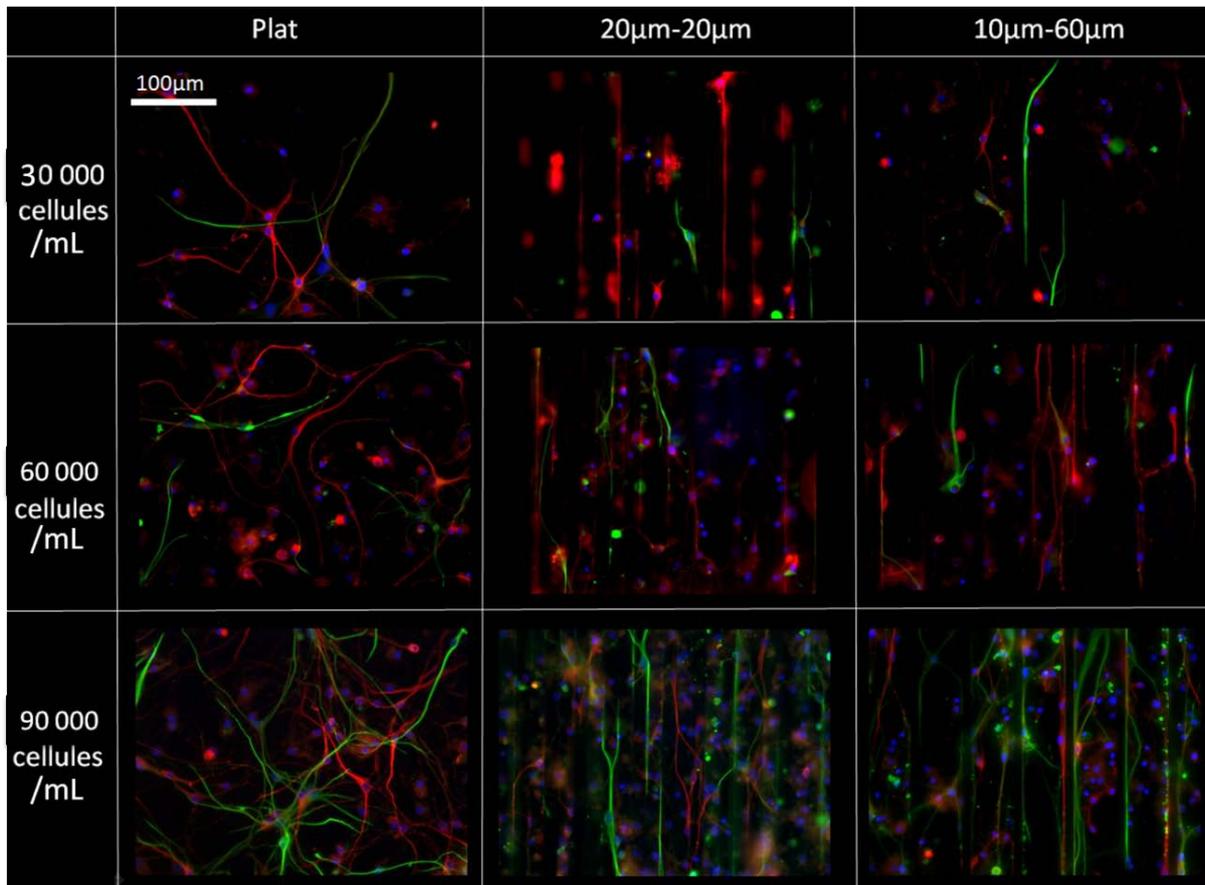


Figure 67 : Images représentatives de cultures de cellules souches réalisées avec différentes densités d'ensemencement (30 000, 60 000 ou 90 000 cellules/mL) sur des surfaces de PDMS comportant différentes topographies (surface plate, microsillons de 20 μ m et de 60 μ m de large). Profondeur des microsillons = 25 μ m. Les cellules souches ont été maintenues pendant 5 jours dans la phase de différenciation en neurones. La protéine bêta-III tubuline des neurofilaments que l'on trouve chez les neurones immatures a été marquée avec le marqueur Tuj-I couplé à un anticorps secondaire fluorescent (Alexa 546nm, rouge). Les astrocytes issus de la différenciation des cellules souches sont repérés en vert (fluorophore alexa 488nm), par le marquage de la GFAP. Les noyaux de toutes les cellules ont été marqués en DAPI (bleu).

La Figure 68 montre l'évolution du pourcentage de différenciation des cellules souches en neurones en fonction de la densité en cellules souches. Il apparaît que plus la densité d'ensemencement est élevée, plus le pourcentage de différenciation en neurones est élevé. Il y a donc un effet bénéfique de l'augmentation de la densité d'ensemencement pour la différenciation en neurones ce qui montre encore l'importance de l'interaction entre cellules, notamment dans le cas de cellules primaires. Dans le cas d'une surface comportant des microsillons de 20 μ m de large, cet effet bénéfique est atténué. En effet, le pourcentage de différenciation en neurones obtenu est comparable pour les densités d'ensemencement de 60 000 et 90 000 cellules/mL. Cela montre certainement que cette topographie limite les interactions entre cellules. On relève également que la différenciation est légèrement meilleure sur la surface de PDMS plate que sur les surfaces comportant des microsillons.

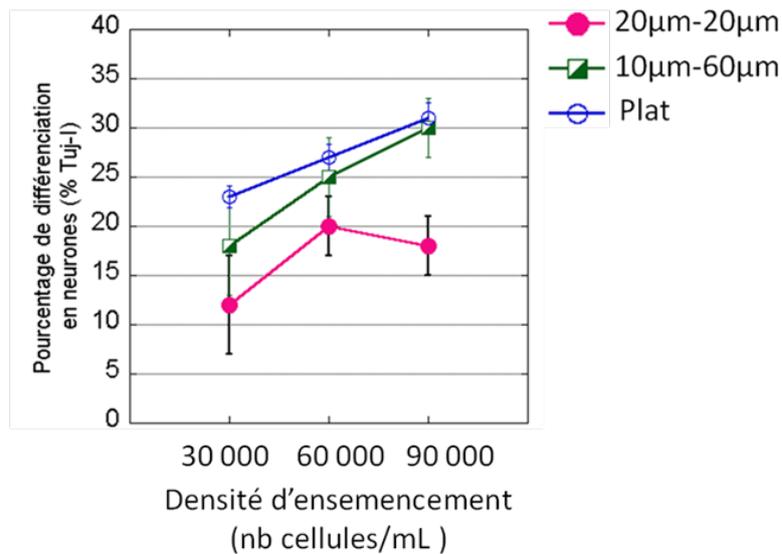


Figure 68 : Evolution du pourcentage de différenciation des cellules souches en neurones en fonction de la densité d'ensemencement, pour des surfaces comportant différentes topographies. Profondeur des microsillons = 25µm.

L'observation des images optiques présentées sur la Figure 67 montre encore une fois que le fait d'augmenter la densité d'ensemencement altère l'alignement des neurites. Cela est confirmé par l'analyse quantitative du pourcentage d'alignement des neurites présenté dans le Tableau 6.

Densité d'ensemencement (nb cellules/mL)	30 000	60 000	90 000
20µm-20µm	77±3%	70±1%	60±2%
10µm-60µm	62±4%	60±3%	42±4%

Tableau 6 : Effet de la densité en cellules souches sur l'alignement des neurites (pourcentage de segments de neurites formant un angle de $\pm 10^\circ$ avec la direction des microsillons) pour des cellules cultivées sur des surfaces de PDMS avec des microsillons de 20µm de large espacés de 20µm ou bien des sillons de 60µm de large espacés de 10µm. La profondeur des sillons est toujours de 25µm.

e. Compatibilité du PDMS avec une culture à long terme

Pour tester la viabilité des cellules souches neurales adultes humaines à long terme sur les surfaces de PDMS, nous avons cultivé des cellules souches provenant d'une même biopsie pendant 7 jours pour une partie d'entre elles et pendant une durée plus longue que celle pratiquée habituellement, soit 25 jours pour la partie restante. Comme le pourcentage de différenciation est fortement atténué pour les microsillons de 5µm et 10µm de largeur, nous nous sommes concentrés sur l'utilisation des microsillons de 20µm et 60µm de large.

La Figure 69a montre des images des cellules cultivées pendant 25 jours sur les différentes surfaces de PDMS. Nous avons réalisé les mêmes marquages immunofluorescents que précédemment (voir Figure 67) nous permettant de repérer les neurones et les astrocytes issus de la différenciation des cellules souches.

Pour qualifier la viabilité des cellules souches sur les surfaces de PDMS, nous avons quantifié les mêmes paramètres que précédemment, à savoir : l'adhérence cellulaire, le pourcentage de différenciation en neurones, le développement neuritique. Les résultats obtenus pour une culture de 7 jours et pour une culture de 25 jours sont comparables pour tous ces paramètres. Seule la longueur moyenne des neurites a significativement évolué. La Figure 69b compare les longueurs moyennes des neurites mesurées sur une culture de 7 jours et sur une culture de 25 jours. On voit qu'après 25 jours de culture, les neurites des cellules sont deux fois plus longs que celles des cellules qui n'ont été cultivées que pendant 7 jours. Cela montre que les neurones continuent leur développement sur les surfaces de PDMS et donc que le PDMS est un matériau adapté pour la culture organisée de ces cellules sur des longues durées.

En plus de permettre le guidage des neurites à long terme, nous montrons sur la figure Figure 69c que les neurites sont guidés sur une longue distance (pour améliorer la lisibilité, nous avons retracé les neurites en rose, en utilisant le logiciel NeuronJ). Un réseau continu et aligné de neurones peut être suivi sur une distance supérieure à 2mm.

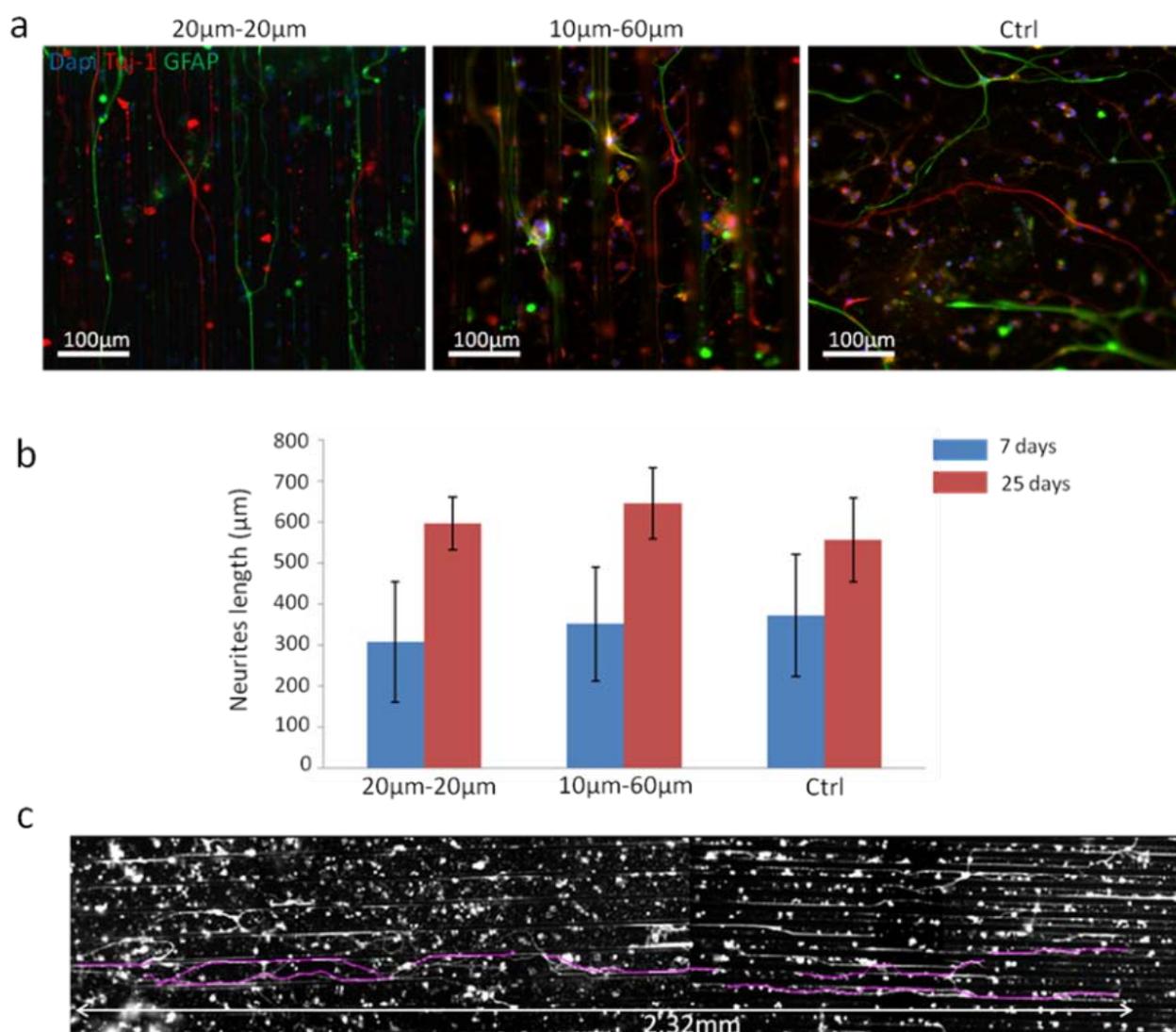


Figure 69 : Culture à long terme de cellules souches différenciées en neurones et en astrocytes et guidage sur une longue distance sur une surface de PDMS microstructurée. Les cellules souches neurales adultes humaines sont

maintenues en phase de différenciation pendant 7 jours ou 25 jours. a : images représentatives des cultures obtenues après 25 jours de différenciation. La bêta-III tubuline a été marquée par immunofluorescence en utilisant le marqueur Tuj-I (couplé à un fluorophore alexa 546nm, rouge). Les astrocytes ont été marqués par la GFAP (lié à un fluorophore Alexa 488nm, vert). Les noyaux ont été marqués avec le DAPI (bleu). **b :** longueur moyenne des neurites mesurée après 7 jours et 25 jours de culture en phase de différenciation. **c :** image prise au microscope optique à fluorescence du guidage de neurones sur une longue distance. La direction des microsillons est indiquée par la flèche. Quelques neurites ont été retracés en rose afin d'améliorer la lisibilité de l'image.

3. Discussion de l'influence de la géométrie des microsillons sur le comportement de trois types de cellules neuronales

Comme support et point de départ à notre discussion, nous avons rassemblé sur un même graphe les résultats obtenus pour les trois types de cellules et pour chaque largeur de microsillons. La profondeur des microsillons considérés est de 25 μ m.

Ce graphe comporte 4 axes, chaque axe représente un critère étudié :

- adhérence
- différenciation
- développement neuritique
- alignement des neurites

En utilisant les résultats des études décrits précédemment, à chaque type de cellules et pour chacun de ces critères, nous attribuons des notes comprises entre 0 et 10. La surface ne comportant pas de microsillons (surface plate) sert de référence pour l'attribution des notes pour les critères d'adhérence, de différenciation et de développement neuritique. Ainsi, on attribue à cette surface plate les notes de 10/10 pour ces critères. Pour le calcul des notes dans les autres conditions de topographie, nous normalisons les valeurs obtenues pour les différents critères observés par rapport à la cette surface plate référence. Cette surface ne comportant pas de topographie, on lui attribue la note de 0/10 en ce qui concerne l'alignement des neurites. Ces notes ont une **valeur qualitative** afin d'orienter la discussion. Pour les aspects plus détaillés, **le lecteur intéressé se reportera aux figures et aux courbes antérieures.**

La Figure 70 présente le graphe tracé pour le cas de l'échantillon plat (surface référence). L'évolution relevée lorsque l'on augmente la densité cellulaire pour la lignée Luhmes (densité d'ensemencement doublée) est tracée en pointillés pour les surfaces comportant des microsillons. La même tendance a été observée pour les cellules de la lignée neuro2a et les cellules souches différenciées en neurones.

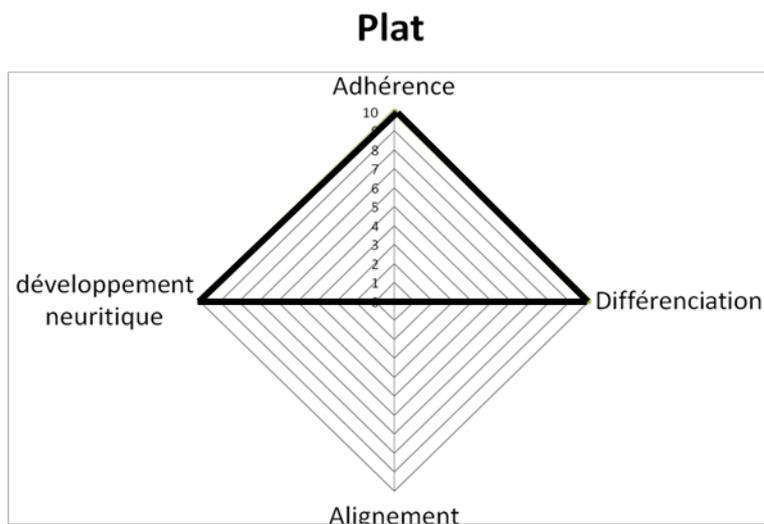


Figure 70 : **Graphe résumant le comportement des cellules neuronales étudiées sur un substrat de PDMS plat.** Les notes entre 0 et 10 ont été attribuées en considérant les études présentées précédemment. Le substrat plat sert de référence par rapport aux autres surfaces, comportant des microsillons.

Cas des microsillons de 5 μ m de largeur, espacés de 5 μ m

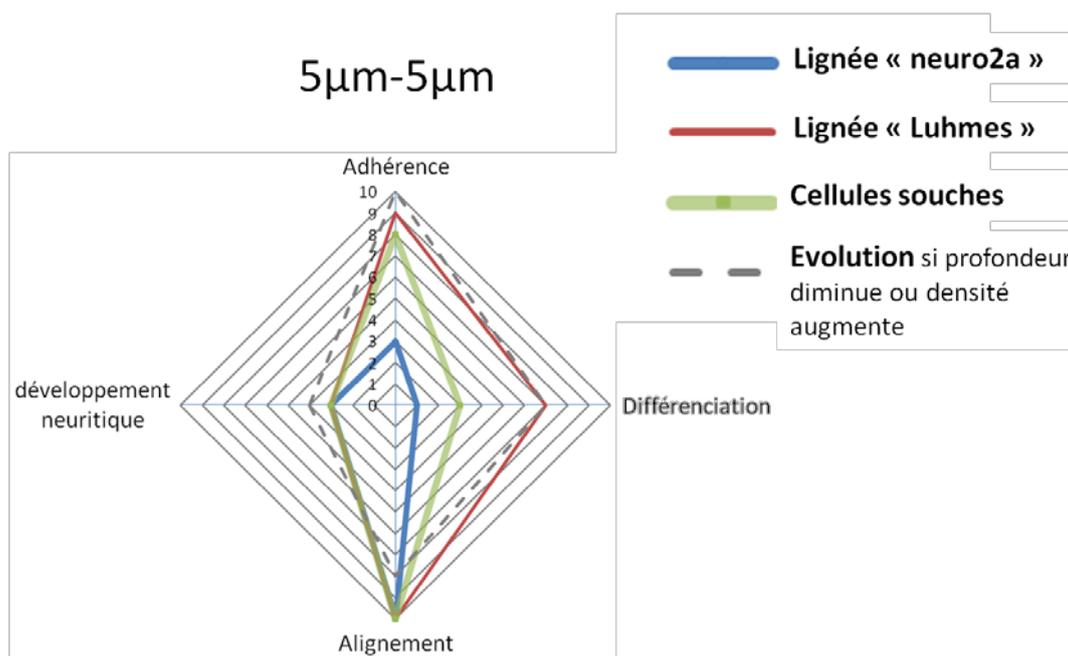


Figure 71 : **Graphe résumant le comportement des trois types de cellules neuronales étudiées sur un substrat de PDMS comportant des microsillons de 5 μ m de largeur, espacés de 5 μ m.** Les notes entre 0 et 10 ont été attribuées en considérant les études présentées précédemment.

- l'adhérence des cellules Luhmes et des cellules souches est bonne. Les cellules sont majoritairement localisées dans les sillons. En revanche, l'adhérence des cellules neuro2a est moins importante. Nous pensons que pour ces cellules, cette faible adhérence relevée est liée à la taille des corps cellulaires. Les neuro2a ont un corps cellulaire mesurant plus de 10 μ m de diamètre (12 \pm 3 μ m),

alors que les cellules Luhmes et les cellules souches sont plus petites ($7\pm 2\mu\text{m}$). Les neuro2a n'entrent pas « complètement » en contact avec le fond des sillons. Pour y arriver, elles doivent se déformer (ainsi que leur noyau) pour se développer au fond des microsillons, ce qui rend difficile leur développement.

- la différenciation et le développement neuritique des trois types de cellules sont inhibés par les sillons de $5\mu\text{m}$ de large. Le pourcentage de différenciation est encore plus faible pour les cellules neuro2a. Leur déformation ainsi que celle de leur noyau pourrait expliquer cette observation. On s'aperçoit que les fortes contraintes imposées par la topographie affectent le développement des neurones.

- les neurites sont rigoureusement alignés le long des arrêtes internes des microsillons. L'alignement obtenu est parfait. Les interactions entre la topographie et les cellules sont importantes mais les contraintes imposées affectent le développement cellulaire.

Lorsque l'on double la densité en cellules, on relève que les neurites sont sensiblement plus nombreux et leur alignement est légèrement perturbé. Lorsque la densité en neurones est très élevée, les cellules adhèrent aussi sur les bosses de la topographie. Les neurites de ces cellules interagissent moins avec la topographie que les cellules qui sont localisées dans les sillons et il en résulte une diminution de l'alignement global des neurites et les neurites semblent davantage interagir entre eux.

Cas des microsillons de $10\mu\text{m}$ de largeur, espacés de $10\mu\text{m}$

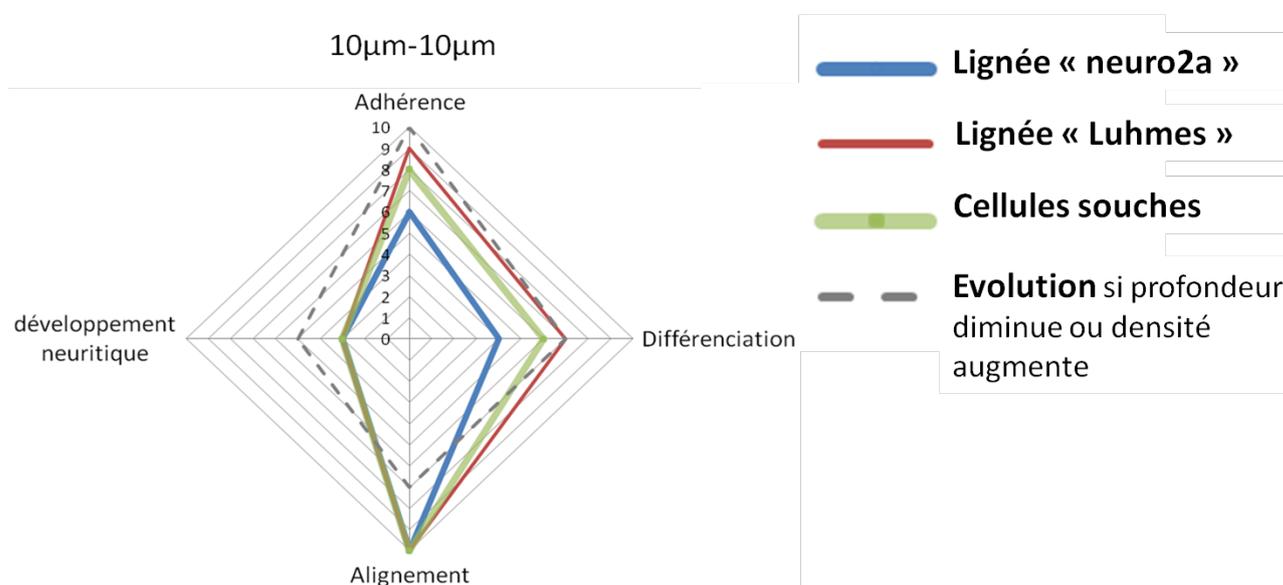


Figure 72 : **Graphique résumant le comportement des trois types de cellules neuronales étudiées sur un substrat de PDMS comportant des microsillons de $10\mu\text{m}$ de largeur, espacés de $10\mu\text{m}$.**

- l'adhérence des cellules Luhmes et des cellules souches est bonne. L'adhérence des cellules neuro2a est meilleure que dans le cas des sillons plus étroits. Les cellules de tous les types sont très majoritairement localisées dans les microsillons. Compte-tenu de la largeur de $10\mu\text{m}$ des sillons, les

cellules neuro2a n'ont pas à se déformer ou que très légèrement pour pénétrer et croître dans les sillons. Cela explique le meilleur score obtenu pour l'adhérence.

- l'augmentation de la largeur des microsillons améliore le score de différenciation de l'ensemble des cellules. Cette augmentation est moins importante pour les cellules neuro2a, certainement du fait que leur corps cellulaire et leur noyau sont encore légèrement déformés à cause de la topographie.

- le développement des neurites est sensiblement supérieur, et ce pour toutes les cellules, certainement encore du fait que les contraintes imposées par la topographie sont moins importantes.

- l'alignement des neurites est excellent pour les trois types de cellules, ce qui montre que les interactions entre les cellules et la topographie sont fortes.

Lorsque l'on augmente la densité en cellules, le développement neuritique est plus important mais l'alignement des neurites diminue.

Cas des microsillons de 20µm de largeur, espacés de 20µm

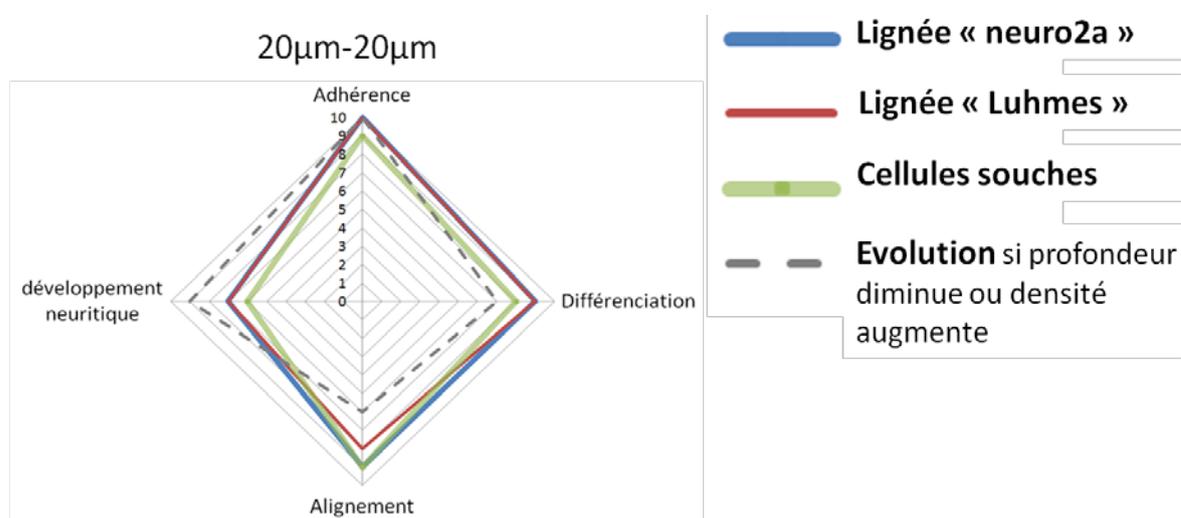


Figure 73: **Graphique résumant le comportement des trois types de cellules neuronales étudiées sur un substrat de PDMS comportant des microsillons de 20µm de largeur, espacés de 20µm.**

Les trois types de cellules adhèrent aussi bien sur cette surface que sur la surface plate. Les neuro2a n'ont plus à se déformer pour croître dans les sillons.

Les contraintes imposées par la topographie sont moins importantes, ce qui s'observe au niveau du taux de différenciation, qui est comparable à celui obtenu pour la surface plate pour les trois types de cellules. Les contraintes étant relâchées, le développement des neurites augmente aussi. Les cellules interagissent cependant toujours fortement avec la topographie, car on obtient un bon alignement des neurites aux microsillons.

Lorsque la densité en cellules double, les interactions entre les cellules augmentent. En conséquence, l'alignement diminue, d'autant plus que les contraintes imposées par la topographie, à savoir les largeurs des microsillons, sont moins importantes.

Cas des microsillons de 60 μ m de largeur, espacés de 10 μ m

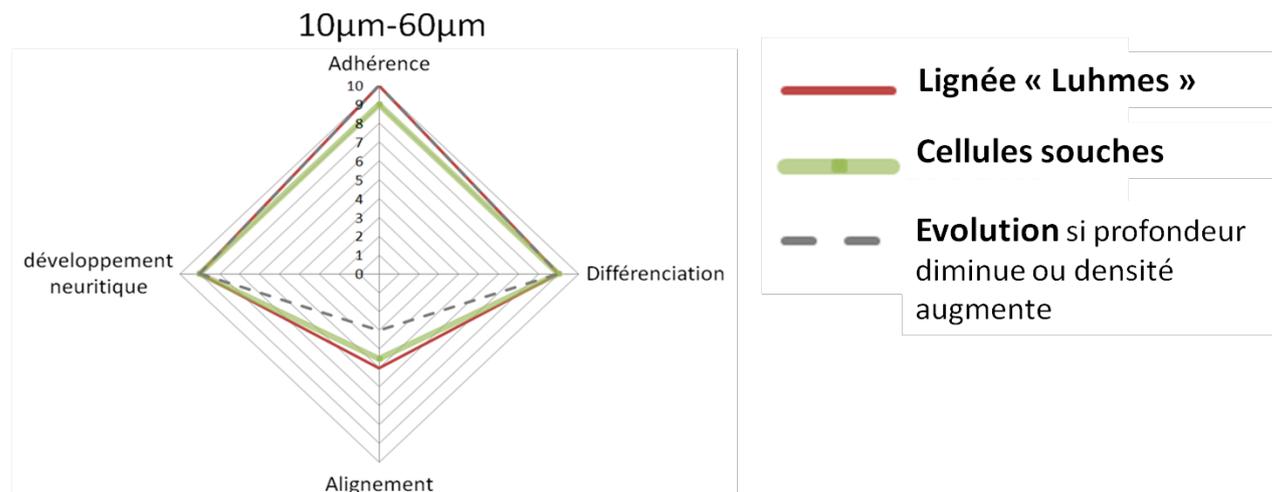


Figure 74 : Graphique résumant le comportement des deux types de cellules neuronales étudiées sur un substrat de PDMS comportant des microsillons de 60 μ m de largeur, espacés de 10 μ m.

- L'adhérence, la différenciation et le développement neuritique obtenus sont comparables à ceux observés sur une surface ne comportant pas de microsillons. Les microsillons de 60 μ m de largeur permettent pourtant d'orienter la croissance cellulaire. L'alignement des neurites reste cependant moyen, en comparaison à celui observé pour les microsillons plus étroits (60% des neurites des Luhmes alignés contre plus de 90% pour des microsillons de 10 μ m de large). Effectivement, dans ces conditions, les contraintes imposées par la topographie sont moins importantes et les neurites peuvent naviguer au sein d'un même sillon, entre une paroi et l'autre.

Si l'on double la densité cellulaire, l'alignement des neurites diminue encore. Dans le cas des cellules souches, cela a en plus pour effet d'augmenter le pourcentage de différenciation en neurones.

Finalement, nos études montrent que **les cellules neuronales adhèrent préférentiellement au fond des microsillons, et ce quelles que soient leur largeur**. Cela a déjà été observé pour d'autres cellules, comme les fibroblastes. Pour expliquer ces observations, certains auteurs mettent en avant le fait que les protéines (laminine, polylysine) que l'on utilise pour favoriser l'adhérence des cellules sur la surface de culture s'accumuleraient davantage dans les microsillons que sur les bosses voisines [99], [150], [68]. Les cellules adhèrent préférentiellement à ces régions. De plus, nous pensons qu'en adhérant et en se développant dans les microsillons, les cellules maximisent leur surface de contact avec le substrat. En effet, elles adhèrent au fond du sillon et également à ses parois, ce qui serait favorable pour leur développement.

Nous avons également observé que dans certains cas, les cellules se déforment pour adhérer au fond des microsillons. Cette déformation se produit quand les cellules ont un diamètre plus grand que la largeur des microsillons. Ainsi, la taille de la cellule par rapport à la largeur des microsillons

apparaît, d'après nos résultats, comme un paramètre crucial pour comprendre les interactions entre la topographie et les cellules.

Nous avons aussi observé que le noyau de ces cellules est déformé lorsque la contrainte topographique est élevée. Cette déformation du noyau semble avoir pour conséquence une diminution du taux de différenciation et du développement neuritique. Il a été montré dans la littérature que la déformation mécanique du noyau peut entraîner une réorganisation intra-nucléaire, en particulier une modification du positionnement des chromosomes et une régulation des gènes [151], [95], [152].

Lorsque la largeur des microsillons est égale ou supérieure au diamètre des cellules, tous les types cellulaires étudiés ont le même comportement. Les effets observés sont génériques aux trois types de cellules neuronales étudiés. Les cellules sont majoritairement au fond des sillons et ces derniers créent une situation de confinement. Le degré de confinement des cellules dépend de la largeur et de la profondeur des microsillons. Ce confinement influence le développement neuritique. Le nombre de neurites développé augmente quand la largeur des microsillons augmente (ou quand la profondeur des microsillons diminue) donc quand le confinement diminue. Ces observations sont en accord avec les résultats de Mahoney et al [68], qui ont montré que le nombre de neurites développé augmente avec l'amplitude d'angle disponible pour l'émergence depuis le corps cellulaire des neurites. Cela suggère que les neurites ont besoin d'un certain espace pour protruder du corps cellulaire. En fait, il semble que les germinations de futurs neurites explorent une plage de directions et que cette plage de direction est plus ou moins grande en fonction du confinement et donc de la largeur des sillons.

Cependant, pour appréhender comment la microtopographie agit sur la morphologie des neurones, il est nécessaire de prendre en compte le rôle du cône de croissance. Ce cône est situé à l'extrémité des neurites. Il est extrêmement mobile et explore l'environnement extra-cellulaire pour déterminer la direction de la croissance des neurites. L'intégration par la cellule et le cône de croissance de signaux physiques et chimiques de l'environnement est un phénomène très complexe, faisant intervenir les concepts de mécano-sensibilité. Ils s'intéressent à la capacité des cellules à s'accrocher au substrat et à en traduire les caractéristiques physiques (par exemple la taille, la rigidité) et chimiques (nature des molécules présentes en surface, ligands) en une série d'activations de différentes voies de signalisations intracellulaires.

Lorsqu'un neurite en croissance envoie pour la première fois un prolongement dans une nouvelle direction ou quand il atteint un endroit où il faut choisir la direction à prendre, le cône de croissance émet de nombreux filopodes. Il cherche activement des indices chimiques et physiques susceptibles de guider les étapes suivantes de sa croissance.

La Figure 75 montre des images prises au microscope optique à fluorescence de cônes de croissance des neurones de la lignée humaine Luhmes cultivée sur une surface de PDMS comportant des microsillons de 5 μ m de largeur et 25 μ m de profondeur. Nous avons sélectionné des zones de l'échantillon où les neurites n'étaient pas guidés (images a) (quelques neurites seulement), et des zones de l'échantillon où les neurites sont bien guidés (images b). Les filaments d'actine du cône de croissance sont marqués en utilisant la phalloïdine couplée à un fluorophore (Alexa 546nm, rouge). Les

neurofilaments, qui ne sont pas présents dans le cône de croissance, sont marqués grâce au marqueur Tuj-I (fluorophore Alexa 488nm, vert). Sur la Figure 75a, on observe que quand les neurites ne sont pas alignés aux microsillons, les cônes de croissance sont étalés sans direction préférentielle de manière isotrope. Ils sont d'une forme arrondie et comportent de nombreuses extensions d'actine (filopodes). Ils ont la même forme que les cônes de croissance de neurones cultivés sur une surface plane. Ces quelques cônes de croissance (que nous avons dû chercher car ils étaient rares pour ce cas de culture avec microsillons de 5 μ m de large) ne semblent pas interagir avec les microsillons et « échappent » à la contrainte. En revanche, lorsque les neurites sont alignés le long des microsillons, les cônes de croissance sont allongés. Ils interagissent fortement avec les microsillons, qui les contraignent et les confinent dans une direction. Sur ces surfaces, la majorité des neurones ne possède que 1 ou deux neurites.

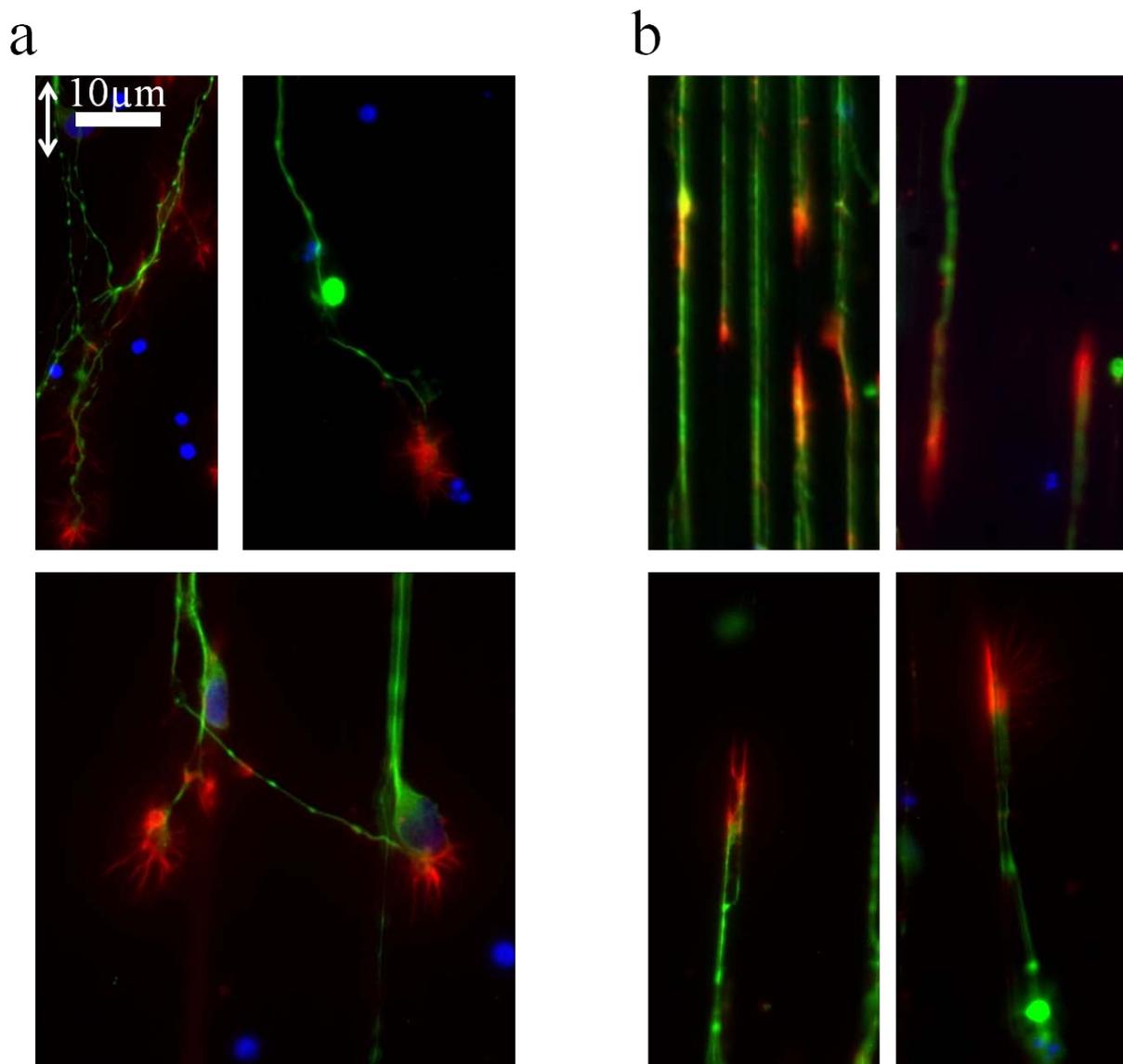


Figure 75 : Evolution de la forme du cône de croissance des neurones LHMes en fonction de l'interaction avec la microtopographie de surface. La culture a été réalisée sur une surface de PDMS comportant des microsillons de 5 μ m de largeur, espacés de 5 μ m et de 25 μ m de profondeur. La flèche blanche indique la direction des microsillons. Images prises au microscope optique à fluorescence après 5 jours de culture en phase de différenciation. Les ensemencements ont été réalisés en utilisant la densité de 30 000 cellules/mL. Les neurofilaments ont été marqués en utilisant le marqueur Tuj-I et un

anticorps secondaire fluorescent (Alexa 488nm, vert), les filaments d'actine ont été marqués en utilisant la phalloïdine, couplée à un fluorophore (Alexa 546nm, rouge). Les noyaux ont été marqués avec le DAPI (bleu). **a** : Les neurites n'ont pas interagi avec la topographie, ils ne sont pas alignés et les cônes de croissance sont étalés de manière isotrope. **b** : les neurites ont interagi avec la surface, ils sont alignés aux microsillons. Les cônes de croissance sont allongés dans la direction des microsillons.

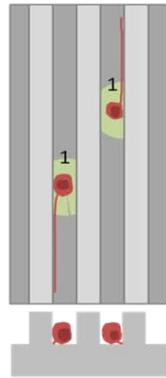
Les microtubules et les filaments d'actine du cône de croissance génèrent des forces qui poussent et tirent le neurite en avant¹⁶. La direction de l'extension neuritique est déterminée par la force exercée par le filopode. Cette force dépend de la capacité de ces filaments à s'accumuler et à s'assembler. Des répartitions asymétriques de filaments d'actine ont été observées dans les cônes de croissance de neurones, réagissant à des facteurs directionnels [154]. Sur un substrat plat, comme les filopodes sont étalés autour du cône dans toutes les directions, la force de traction exercée par les filopodes est la même dans toutes ces directions (le neurite prend alors une direction qui semble aléatoire, mais qui définie en fonction de la perception de facteurs chimiques pouvant provenir d'autres cellules [155], [156]). La Figure 76 résume de manière schématique notre analyse. Quand la culture est réalisée sur une surface avec des microsillons, les neurites émergent du corps cellulaire ne peuvent s'orienter que dans la plage de direction que leur laisse la largeur du microsillon. Les neurites se développent donc parallèlement aux parois des sillons (voir Figure 76b1). Il a été proposé que les microtubules et les filaments d'actine du cône de croissance auraient une flexibilité limitée qui ne leur permettrait pas une courbure des filopodes pour s'adapter (suivre) à la topographie [157]. De plus, les filopodes de neurites qui émergent perpendiculairement à une paroi de sillons exerceraient une force de traction faible et seraient inhibés par la présence de la paroi qui les oblige à un brusque changement de directions lors du contact avec la paroi (voir Figure 76b2). Par contre, les filopodes de neurites qui émergent parallèlement à la direction des sillons ont plus de place pour se développer (ils ne rencontrent pas la paroi, voir Figure 76b). Etant plus longs (entre 5 μ m et 20 μ m), ces filopodes exercent une force de traction plus importante et cela permet le développement du neurite parallèlement au microsillon.

Finalement, si le sillon est très étroit, le nombre de filopodes se trouvant dans la direction où il y a assez de place pour protruder est très réduit. Cela explique pourquoi la majorité des neurones cultivés sur des microsillons de 5 μ m de largeur n'a qu'un seul neurite (voir cas n°1 de la Figure 76a et b). De même, sur les sillons plus larges, les cellules sont plus éloignées des parois et les filopodes peuvent se développer avant de rencontrer la paroi. Cela permet le développement de populations neuronales avec de nombreux neurites (voir cas n°2 et 3 de la Figure 76a et b 1', 2' et 3').

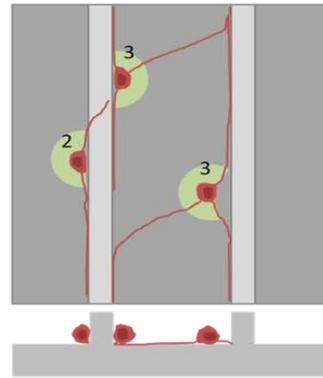
¹⁶ Il a été montré que ces structures peuvent générer des forces de 2 à 60pN [153].

a

Motifs
10 μ m-10 μ m



Motifs
10 μ m-60 μ m



b

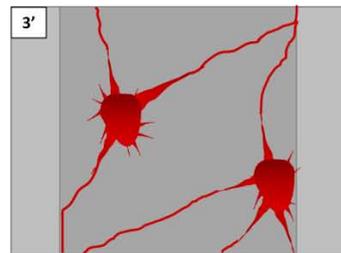
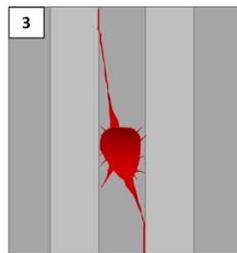
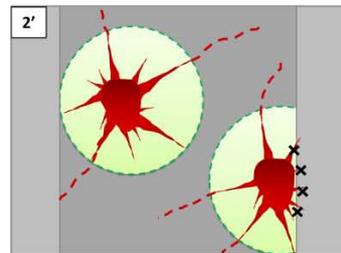
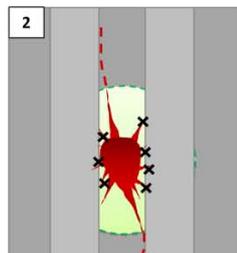
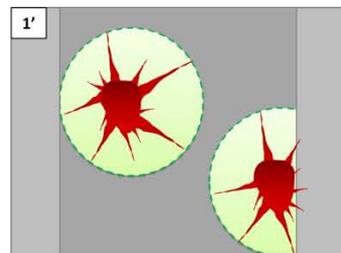
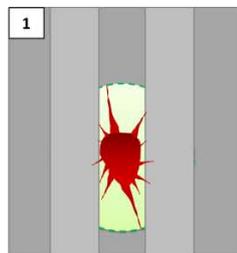


Figure 76 : représentation schématique du comportement des cellules neuronales sur des surfaces microstructurées, avec des microsillons étroits (exemple : 10 μ m-10 μ m) et des microsillons larges (10 μ m-60 μ m). **a** : haut : vue de dessus, bas : vue en coupe. Les disques verts représentent les plages d'angles accessibles pour le développement des neurites. **b** : zoom sur ce qui se passe au niveau du corps cellulaire des neurones, dans des microsillons étroits (gauche) et sur des microsillons larges (droite). **1 et 1'** : la cellule neuronale qui se différencie lance des filopodes depuis son corps cellulaire dans toutes les directions. Dans certaines directions, les filopodes peuvent se déployer et atteindre une certaine taille (disques verts). Dans d'autres directions, ceux-ci rencontrent les parois du microsillon et leur développement est inhibé (**2 et 2'**, croix noires). **3 et 3'** : les neurites se développent dans les directions pour lesquelles les filopodes ont pu croître suffisamment sans être inhibés. On obtient un petit nombre de neurites très alignés dans le cas de microsillons étroits et des neurites plus nombreux mais moins alignés dans le cas de microsillons plus larges. Les neurites parcourent une distance plus grande avant de « rencontrer » une paroi de sillon.

Nos études montrent également que **les neurites se développent préférentiellement le long des sillons, plus particulièrement au niveau de l'arrête interne**. Une fois que le neurite se trouve au niveau de l'arrête interne du sillon, il ne la quitte plus et croît en son long. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces observations. La première est que l'adsorption des protéines qui sont utilisées pour favoriser l'adhérence et le développement des neurones serait répartie de manière non homogène et se concentrerait plutôt le long de l'arrête. Une autre hypothèse plus récente est basée sur la probabilité que les cellules pourraient développer des points focaux d'adhérence¹⁷. Selon CH. Seo, il apparaît que la topographie et en particulier la zone interne de sillons favorise l'apparition et la maturation de points focaux d'adhérence et la polymérisation du cytosquelette d'actine [158].

Par ailleurs, sur les microsillons les plus larges, les neurites parcourent une distance plus grande avant d'atteindre une paroi. Ceci explique pourquoi l'alignement des neurites est moins rigoureux que dans le cas des sillons les plus étroits (voir cas n°3 de la Figure 76b).

De plus, **dans les sillons les plus larges, les neurites sont plus nombreux** et nous pensons que **cela a aussi pour effet de diminuer l'alignement global des neurites**. En effet, les neurites s'échappent plus souvent des sillons qui les guident et cet échappement est corrélé à la présence d'un neurite voisin (voir cas n°2 de la Figure 76b). Ce résultat paraît tout à fait logique car les cellules neuronales sont par nature destinées à communiquer et à réaliser des interconnexions entre elles. Pour cela, elles sécrètent des molécules qui se diffusent librement dans le milieu environnant. Il se forme ainsi un gradient qui influence à distance le cône de croissance qui est capable de les détecter et d'infléchir la direction à suivre.

Ces observations nous ont amené à nous interroger sur le rôle de la densité cellulaire sur l'alignement des neurites. Nous avons montré que l'alignement est moins prononcé lorsque les neurones sont plus nombreux. Les neurites étant également plus nombreux, ils ont plus de possibilités pour faire des interconnexions entre eux et donc logiquement, ils échappent davantage à la contrainte imposée par la topographie et se désalignent.

L'étude de l'influence de la densité d'ensemencement cellulaire sur le comportement des cellules a montré d'autres résultats marquants avec les cellules souches. Les cultures de cellules souches sont particulièrement intéressantes pour aborder ces aspects car il y a plusieurs types de cellules sur nos surfaces (astrocytes, oligodendrocytes et neurones). Cette situation in vitro se rapproche de ce que l'on rencontre dans le cerveau en termes de population cellulaire et de sécrétions.

Nous avons montré que la densité d'ensemencement en cellules souches a un effet sur le pourcentage de différenciation en neurone. En effet, **le pourcentage de différenciation des cellules souches en neurones** (ici, nous rappelons qu'il s'agit du rapport entre le nombre de neurones sur le nombre total de cellules) **augmente avec la densité d'ensemencement**. Par ailleurs, nous savons que les cellules

¹⁷ Les points focaux d'adhérence sont des amas d'intégrines, qui interagissent avec l'environnement de la cellule. Les intégrines sont des protéines qui forment la liaison entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette (« intégration » entre les deux).

sécrètent (entre autres) des molécules de signalisation intercellulaire (cytokines par exemple) ainsi que des facteurs trophiques (sécrétion paracrine, voir chapitre1).

Ainsi, il apparait de manière logique que puisque les cellules souches sont plus nombreuses sur la surface, les sécrétions trophiques sont également plus importantes, ce qui favorise la survie et la différenciation des cellules souches et explique ainsi l'augmentation de la différenciation constatée. Cette augmentation a été relevée pour les cultures réalisées sur PDMS plat et sur une surface de PDMS comportant des microsillons de 60 μ m espacés de 10 μ m. En revanche, sur les surfaces avec des microsillons de 20 μ m espacés de 20 μ m, l'effet de l'augmentation de la densité cellulaire n'est pas si bénéfique. Les microsillons plus étroits représentant une plus forte contrainte pour la croissance des cellules pourraient ils atténuer la détection des facteurs trophiques par les cellules qui sont dans les sillons ? Cette question met le doigt sur la problématique de la compétition entre les interactions entre (i) les cellules et la surface et (ii) les cellules entre elles. Nos résultats nous ont permis de mettre en évidence des premiers effets mais nous devons compléter ces études pour élaborer des hypothèses plus solides.

4. Exploitation des effets d'alignement des neurites dans une perspective d'ingénierie cellulaire

4.1. Etude de la limite de courbure des neurites

Les études précédentes nous ont montré que les filaments d'actine constituant les filopodes émis par le cône de croissance manifestaient une difficulté à se courber face aux parois des microsillons. En effet, les filopodes qui explorent leur environnement ne peuvent pas s'adapter à cette topographie qui leur demande un brusque changement de direction et leur croissance est inhibée, arrêtant ainsi l'allongement du neurite.

A partir de ces constatations, nous avons voulu étudier les facultés d'adaptation des neurites à la topographie. Pour cela, nous avons cultivé les neurones non plus sur des motifs linéaires mais sur des motifs en lignes brisées ayant différents angles, à savoir 30°, 45°, 90° et 135°. Ces motifs sont représentés sur la Figure 77. Les microsillons mesurent 20 μ m de large et 10 μ m de profondeur et sont espacés de 20 μ m. Nous avons choisi cette géométrie car elle nous a permis, pour le cas des sillons linéaires de nos études précédentes, d'avoir un bon alignement et un bon développement des cellules. Pour ces expériences, nous avons utilisé les cellules Luhmes car elles sont issues d'une lignée et développent de longs neurites. Nous avons suivi le même protocole de culture et de marquage immunofluorescent que pour les expériences décrites dans les paragraphes précédents (page 77).

La Figure 77 présente des images représentatives des cultures réalisées pour chaque géométrie étudiée. Nous avons en particulier observé l'apparence générale des neurites (sont-ils guidés par la

structure ?) dont nous avons mesuré la longueur moyenne. Nous avons réalisé deux expériences pour chacun des motifs.

Sur ces images, on remarque que :

- pour les lignes brisées avec des angles de 30° , les neurites suivent rigoureusement la géométrie imposée par les lignes. On peut reconnaître le motif des lignes en regardant les neurites marqués en fluorescence. La longueur moyenne des neurites est de $300 \pm 22 \mu\text{m}$ (30 neurites analysés). Par comparaison, sur une surface de PDMS plate, la longueur moyenne mesurée est de $290 \pm 50 \mu\text{m}$ (100 neurites analysés).

- pour les lignes brisées avec des angles de 45° , les neurites sont alignés avec les parties rectilignes de la topographie mais lorsque les lignes changent de direction en faisant un angle de 45° , les neurites ne suivent pas ce changement mais continuent leur développement dans la direction initialement prise. La longueur moyenne des neurites calculée est de $280 \pm 56 \mu\text{m}$ (20 neurites analysés). Cette valeur est également comparable à celle obtenue pour une surface de PDMS plate.

- pour les lignes brisées avec des angles de 90° , la majorité des neurites suit les parties rectilignes de la topographie mais lorsque le changement de direction se présente, la majorité de ceux-ci ne suit pas la topographie mais continue dans la direction initiale, même en l'absence de parois latérales (voir flèche orange). La longueur moyenne des neurites est de $305 \pm 25 \mu\text{m}$, ce qui est comparable au cas de la surface plate.

- pour les lignes brisées avec des angles de 135° , la géométrie est un peu différente. En effet, les changements de direction se succèdent rapidement, ils sont plus brusques et resserrés. Une majorité de neurites suit la topographie très contraignante. On observe en effet des neurites faisant un angle de 135° . En revanche, la longueur moyenne est seulement de $107 \pm 38 \mu\text{m}$ (50 neurites analysés), ce qui est significativement inférieur à la longueur obtenue dans toutes les autres conditions. Les neurites devant se déformer pour croître semblent donc moins se développer ou se développer plus lentement.

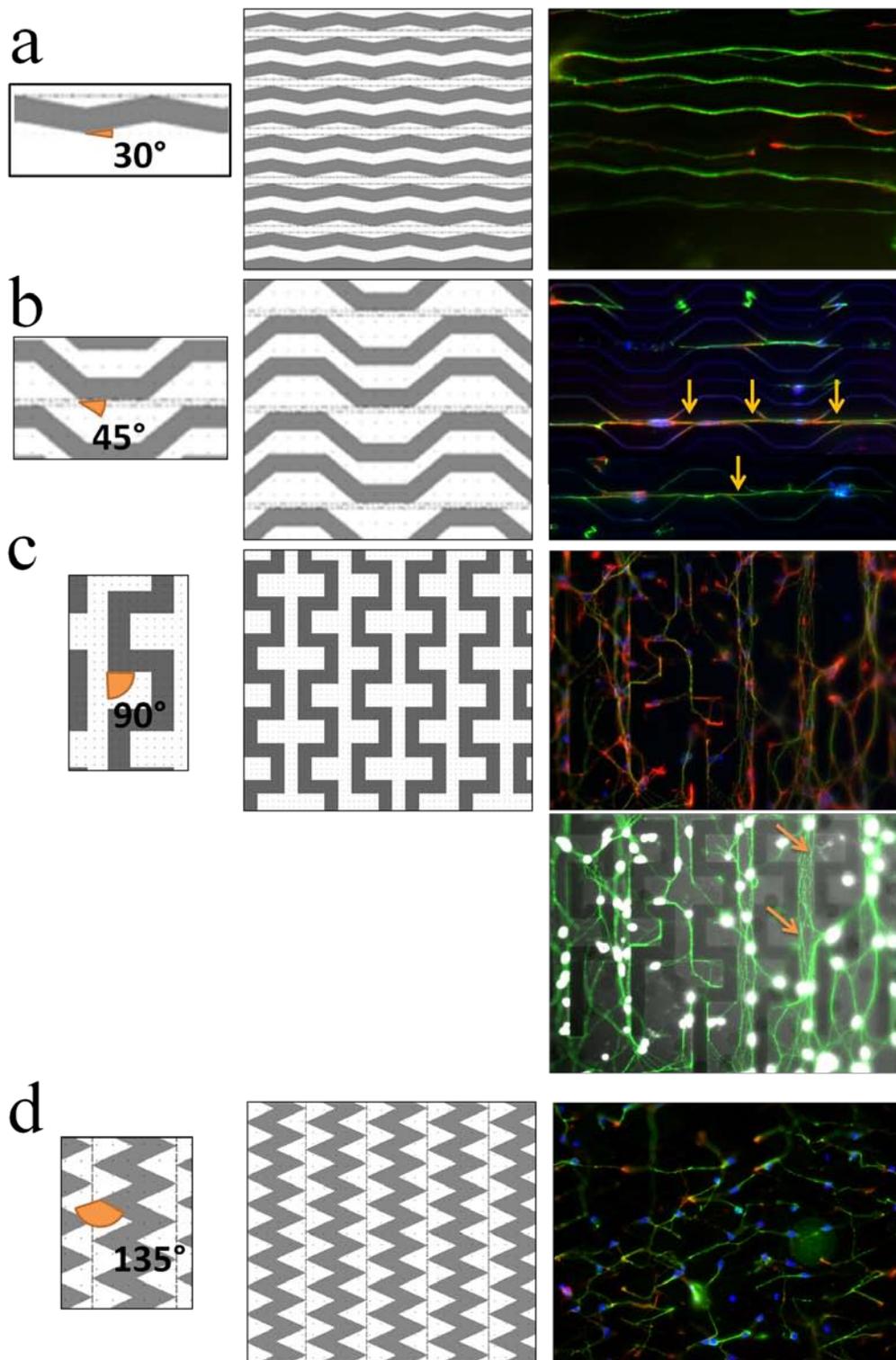


Figure 77 : Culture de cellules de la lignée humaine « Luhmes » sur des motifs topographiques comportant des variations de direction (angles de 30°, 45°, 90° et 135°). La largeur des microsillons est toujours de 20µm, espacement de 20µm. La profondeur est de 10µm. Schémas représentant les motifs et images des cultures obtenues prises au microscope optique à fluorescence. Marquage immunofluorescent de l'actine (phallopidine alexa 488nm, ver), des neurofilaments (Alexa 546nm, rouge et des noyaux, DAPI, bleu). a,b,d : ensemencement avec 15 000cellules/mL. c : 30 000 cellules/mL. En c, la deuxième image représente une superposition du canal de fluorescence montrant les filaments d'actine et du canal en lumière blanche. On voit les motifs de la surface. Les flèches orange indiquent un exemple où les neurites sont guidés, même en l'absence de contact avec une paroi latérale du PDMS.

En conclusion, cette étude montre que les neurites interagissent et s'adaptent à la topographie, qui a un effet non seulement sur leur forme mais aussi sur leur développement ou sur leur vitesse de croissance. Nous n'avons pas observé véritablement de « limite » de déformation mais on constate une forte diminution du développement des neurites lorsque ceux-ci doivent changer brutalement de direction.

4.2. Vers une architecture neuronale tissulaire ?

Nous avons montré dans les paragraphes précédents comment et pourquoi la topographie influence fortement le comportement des cellules neuronales. Ces effets sont génériques aux trois types de cellules que nous avons étudiés, même si certaines cellules y sont plus sensibles. La largeur des microsillons influence fortement le nombre de neurites développé par les neurones.

Ainsi, en maîtrisant le développement des neurones, et en adaptant les paramètres géométriques de la microtopographie de la surface sur laquelle les cellules sont cultivées, il nous est maintenant possible de créer des architectures neuronales « à façon ». C'est un premier pas vers l'ingénierie tissulaire. Nous savons que dans le cerveau, les neurones n'ont pas le même nombre de neurites en fonction de leur rôle, ce qui permet d'ajuster leur degré d'interaction dans le fonctionnement des réseaux neuronaux [159].

La Figure 77 montre un exemple de culture réalisée sur une surface présentant différentes géométries de microsillons linéaires. Le long de la hauteur de l'image, nous observons une alternance de zones où les neurites sont rigoureusement alignés verticalement (et moins nombreux) avec des zones où l'alignement est moins prononcé mais où les neurites sont plus nombreux. Pour arriver à ce résultat, nous avons réalisé un substrat de PDMS et avons microstructuré sa surface par zones, avec des motifs différents. Des zones comportent des microsillons de 10 μ m de largeur espacés de 60 μ m, des zones comportent des microsillons de 20 μ m de largeur espacés de 20 μ m et des zones comportent des microsillons de 60 μ m de largeur espacés de 10 μ m. La profondeur des sillons est de 10 μ m. Les neurites réagissent à la variation de la géométrie de manière très abrupte.

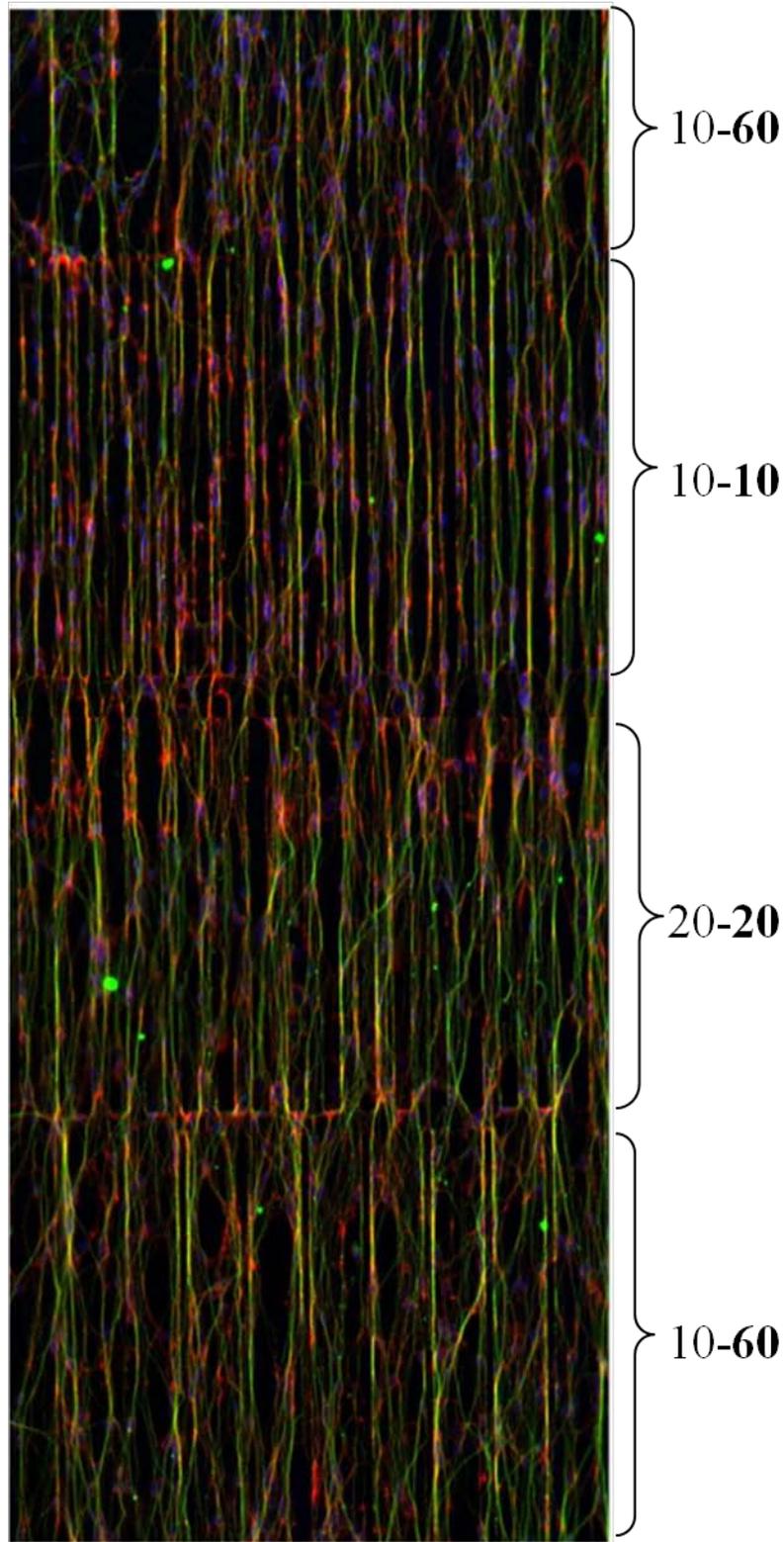


Figure 78 : Cellules neuronales de la lignée Luhmes cultivées sur une surface de PDMS comportant des microsillons de différents largeurs (sillons de 60 μ m de large, espacés de 10 μ m ; sillons de 20 μ m de large, espacés de 20 μ m ; sillons de 10 μ m de large, espacés de 10 μ m). La géométrie des sillons est indiquée. Le nombre en gras indique la largeur du sillon, le nombre qui n'est pas en gras indique l'espacement entre les sillons. Images prises au microscope optique à fluorescence après 5 jours de culture en phase de différenciation. Les ensemencements ont été réalisés en utilisant la densité de 60 000 cellules/mL. Les neurofilaments ont été marqués en utilisant le marqueur Tuj-I et un anticorps secondaire fluorescent (Alexa 488nm, vert), les filaments d'actine ont été marqués en utilisant la phalloïdine, couplée à un fluorophore (Alexa 546nm, rouge). Les noyaux ont été marqués avec le DAPI (bleu).

L'ingénierie cellulaire que nous avons développée dans ces travaux pourrait servir à isoler et à étudier *in vitro* des phénomènes intéressants pour les neurobiologistes, à condition de coupler cette technique à des mesures d'enregistrement de l'activité de ces neurones.

La compréhension de la communication des réseaux neuronaux en fonction de leur architecture (structure) nous paraît être un aspect particulièrement intéressant à étudier. Pour cela, on pourrait comparer l'activité neuronale d'un réseau qui n'est pas ingénieré avec celle d'un réseau construit grâce à l'ingénierie de surface.

C'est dans ce but que nous avons développé une collaboration avec l'unité de recherche exploratoire de l'entreprise pharmaceutique Sanofi, et plus particulièrement avec le docteur Christophe Lanneau de l'équipe « pharmacologie *in vitro* ». Nous avons réalisé des premières expériences de mesure de l'activité électrophysiologique de neurones primaires de rats en utilisant la technique du patch clamp. Cette technique est une technique très sensible de voltage imposé qui permet de mesurer l'activité directe des canaux ioniques des neurones [160], [161], [162]. Nos premiers résultats nous permettent d'affirmer que ces neurones cultivés sur des surfaces plates de PDMS ont une activité électrophysiologique normale, comparable à celle observée sur des surfaces de culture classiques (plastique de boîtes de pétri ou lamelle de verre). Ces études devront être approfondies et complétées en utilisant la technique de MEA ou la technique d'imagerie calcique [163] pour permettre la mesure de l'activité électrophysiologique non plus de quelques cellules comme dans le cas de la technique du patch clamp, mais d'un réseau de neurones et ce, pour des réseaux neuronaux ingénierés ou non.

5. Conclusion

Pour décrire le comportement des cellules sur les différentes surfaces de culture, nous nous sommes appliqués à développer des méthodes rigoureuses, à définir des critères objectifs quantifiables et à mettre au point des protocoles de quantification reproductibles. Nous avons reproduit toutes les expériences plusieurs fois et les analyses ont porté sur un grand nombre de cellules. Cela était d'autant plus nécessaire et important que certaines expériences ont impliqué du matériel biologique primaire humain, qui peut présenter une variabilité biologique.

A partir de nos nombreuses expériences, nous avons pu dégager des lignes fortes caractérisant la culture des cellules sur des surfaces ingénierées.

Nos études confirment que le PDMS est un matériau adapté pour la culture de cellules neuronales et pour la première fois à notre connaissance il a été utilisé pour la culture de cellules souches neurales adultes humaines. Nous avons aussi constaté que les cellules adhéraient préférentiellement au fond des microsillons. Nous avons montré que la taille des corps cellulaires est un paramètre crucial pour prévoir le comportement des cellules sur une surface ingénierée.

En effet, lorsque les cellules ont un diamètre supérieur à la largeur des microsillons, celles-ci se déforment pour pénétrer et croître dans les sillons. Cette situation de forte contrainte limite, voire empêche le bon développement des cellules, en termes de différenciation et de développement

neuritique. Les interactions entre les cellules et la surface sont fortes et en conséquence, les neurites sont parfaitement alignés aux microsillons. Nous avons aussi montré qu'à l'opposé, lorsque les sillons sont plus larges que les cellules, les contraintes sont moins importantes et qu'en conséquence, les cellules développent un plus grand nombre de neurites mais par contre l'alignement des neurites diminue (en comparaison avec le cas des sillons étroits). Ainsi, la géométrie des microsillons permet de déterminer l'arborisation neuritique qui sera développée par les neurones.

Nous avons également mis en évidence, par la variation de la densité d'ensemencement, que les cellules interagissent non seulement avec la surface mais également entre elles. Cela a été particulièrement relevé dans le cas des cellules souches, qui permettent d'obtenir, après la différenciation, des populations de différentes cellules neurales. Effectivement, les neurones issus de la différenciation de ces cellules ont vocation à créer des interconnexions avec les autres neurones et à échanger des signaux avec les autres types cellulaires présents dans la culture.

Nous avons noté que la majorité des études *in vitro* présentées dans la littérature se déroulent sur des périodes plutôt courtes de l'ordre de 5 à 7 jours. Pour notre part, en effectuant des cultures de cellules souches pendant 25 jours sur des substrats de PDMS et cela sans que leur développement en ait été affecté, nous avons démontré que le PDMS est un bon candidat pour la culture de cellules souches neurales adultes humaines pendant une longue période. Ce travail établit également que le guidage des neurites obtenu grâce à la microstructuration de surface n'est pas altéré avec le temps, contrairement à certains guidages obtenus grâce à des micromotifs chimiques.

De nombreuses études décrivent le comportement de neurones sur des surfaces ingénierées à l'échelle micrométrique mais la plupart d'entre elles décrivent l'effet de la microtopographie pour une lignée neuronale particulière. Nous avons été plus loin en montrant que les effets que nous observons sont génériques à trois types cellulaires, dont l'un étant des cellules souches neurales adultes humaines pouvant avoir un réel intérêt thérapeutique.

Pour expliquer les phénomènes de guidage des neurites que nous avons mis à jour, nous proposons un scénario mettant en jeu le cône de croissance et la plasticité de ses filopodes. Nous avons mené une étude complémentaire pour étudier plus particulièrement la plasticité des neurites. Pour cela, nous avons créé des motifs non plus linéaires mais présentant des changements de directions rapides et prononcés et montré que les contraintes de courbure peuvent effectivement ralentir le développement neuritique.

Ainsi, nos résultats fournissent à la communauté scientifique des éléments transposables pour créer à façon des architectures neuronales avec différents types de cellules. Nous présentons un exemple d'architecture obtenue en utilisant des microsillons, se rapprochant d'une architecture que l'on trouve *in vivo* dans les tissus du cerveau. Ne pouvant bien sûr atteindre et reproduire l'environnement complexe du cerveau, l'ingénierie cellulaire que nous avons élaborée est un outil pour aborder *in vitro* la problématique de l'efficacité de la communication au sein d'un réseau neuronal en fonction de son architecture.

Chapitre 3 - Interactions entre des cellules neuronales et des nanotubes de carbone

1. Pourquoi s'intéresser aux interactions entre les cellules neuronales et les nanotubes de carbone ?

Dans le chapitre 2, nous avons étudié l'effet de substrats présentant en surface une microtopographie sur le développement de cellules neuronales. Nous avons observé que cette topographie a une influence sur l'adhérence, le développement, la prolifération, et la migration des cellules neuronales et que les dimensions de la microtopographie y jouent un rôle majeur. Pour compléter ces résultats, nous souhaitons explorer les interactions entre ces mêmes cellules neuronales et des facteurs topographiques d'échelle nanométrique, afin de guider la croissance des cellules sans contraindre leur développement. Que se passe-t-il lorsque l'on cultive ces mêmes cellules sur des surfaces présentant une topographie d'échelle nanométrique? Quelles stratégies adopter pour générer une nano-topographie adaptée au développement cellulaire?

Dans la littérature, on peut relever différentes stratégies mises en œuvre pour créer une nanotopographie de surface et étudier son influence sur le développement de cellules [164], [165], [105]. L'une de ces stratégies consiste à utiliser des nanotubes de carbone. La nanotopographie des couches de nanotubes de carbone apparaît dans de nombreuses études comme un facteur améliorant l'adhérence des cellules et influençant leur développement, en particulier dans le cas de cellules neuronales [166], [115], [118], [106]. Les NTCs ont également une grande rigidité, une surface spécifique élevée, une excellente conductivité électrique et une bonne biocompatibilité, bien que la question de leur toxicité ne soit pas encore tranchée [167], [168]. Ces propriétés sont très intéressantes et recherchées pour la réalisation de neuroprothèses [169]. De plus, il a été mis en évidence que, lorsque les cellules neuronales sont cultivées sur des couches de NTCs, les signaux électrophysiologiques sont supérieurs (fréquence d'occurrence plus élevée) à ceux obtenus pour une culture sur une surface classique de verre par exemple [121], [133], [170]. Des études ont pu mettre en évidence une augmentation de l'émission de courants post-synaptiques spontanés et des potentiels d'action pour les neurones cultivés sur des couches de NTCs. Sur la base de ces observations, de nombreux travaux rapportent l'intérêt d'intégrer des nanotubes de carbone sur des dispositifs de stimulation et d'enregistrements de signaux neuronaux, tels que les multi-electrode arrays (MEA) [171], [127], [172], [173].

Cependant, les phénomènes mis en jeu dans le couplage « nanotubes de carbone-cellules neuronales » ne sont pas totalement compris, certainement en partie à cause des nombreuses et

complexes propriétés des nanotubes de carbone, telles que la conductivité électrique, la topographie, la fonctionnalisation chimique, l'hydrophobicité, les propriétés mécaniques (module d'Young)... De plus, la plupart des travaux étudient la croissance des neurones en cultivant des cellules en parallèle sur différents types de surface, par exemple sur une surface ne comportant pas de nanotubes de carbone et une surface comportant des nanotubes de carbone. Ces études ne montrent en fait que l'adaptabilité des cellules à ces différentes surfaces.

Suite à cette analyse, nous avons pensé qu'en juxtaposant ces deux types de surface, il serait possible d'observer de nouveaux comportements cellulaires. La création d'une situation de compétition directe entre les deux types de surface permettrait de mettre à jour de nouveaux phénomènes notamment sur l'affinité des neurones avec les nanotubes de carbone. Que se passe-t-il quand les cellules neuronales ont le choix entre deux types de surface, l'une étant des nanotubes de carbone ? Pour répondre à cette question, nous avons développé une méthode expérimentale simple permettant la création de motifs de nanotubes de carbone sur des surfaces. Grâce à cette méthode, nous avons mis en concurrence deux types de surfaces pour la croissance des cellules neuronales : d'une part le dioxyde de silicium (SiO_2), qui, dans notre cas, est une surface permissive pour la croissance des neurones et d'autre part les nanotubes de carbone. L'utilisation de ces surfaces mixtes nous a permis de mettre en évidence des phénomènes mis en jeu dans les interactions « cellules neuronales-nanotubes de carbone », qui n'avaient jamais été décelés lors de la culture de cellules neuronales sur des surfaces homogènes.

Les NTCs utilisés ainsi que les méthodes développées pour générer des couches de NTCs et des surfaces comportant des motifs de NTCs sont détaillées en **annexe 5**. Ces travaux ont fait l'objet d'un dépôt de brevet et d'une publication¹⁸.

Dans la suite de ce chapitre, nous présentons les résultats obtenus après avoir cultivé des neurones sur ces deux types de surface. Puis, nous présentons une hypothèse originale nous permettant d'élucider le rôle des NTCs lors de la culture de neurones et de mieux comprendre les interactions entre les cellules neuronales et les NTCs. Enfin, nous montrons des exemples d'utilisation des NTCs, basés sur notre hypothèse et tirant profit des phénomènes mis en évidence grâce à cette ingénierie de surface.

¹⁸ **Brevet :** « Procédé de formation de motifs d'objets sur la surface d'un substrat », A. Bédier, F. Seichepine, C. Vieu, E. Flahaut, PCT/IB2012/051567

Publication : A. Bédier et al, A simple and versatile micro-contact printing method for generating carbon nanotubes patterns on various substrates, *Microelectronic Engineering*, in press, disponible en ligne (2012).

2. Résultats de surfaces comportant des NTCs pour la culture cellulaire

Les procédés développés pour obtenir ces résultats sont détaillés dans l'annexe 5.

2.1. Caractérisation de couches homogènes obtenues par pulvérisation

Les couches de NTCs ont été générées par pulvérisation. Le procédé mis au point pour cela est expliqué en annexe 5. La Figure 79 est une image prise au microscope électronique à balayage de la surface d'une couche de NTCs. La Figure 80 est une image prise au microscope à force atomique de cette même surface, montrant le signal de déflexion latérale. L'image a été réalisée en mode contact, à l'air. On observe que les couches de NTCs sont denses et continues. Les NTCs sont désorganisés et forment un tapis ancré à la surface de l'échantillon. Ils se regroupent en faisceaux, sans direction préférentielle.

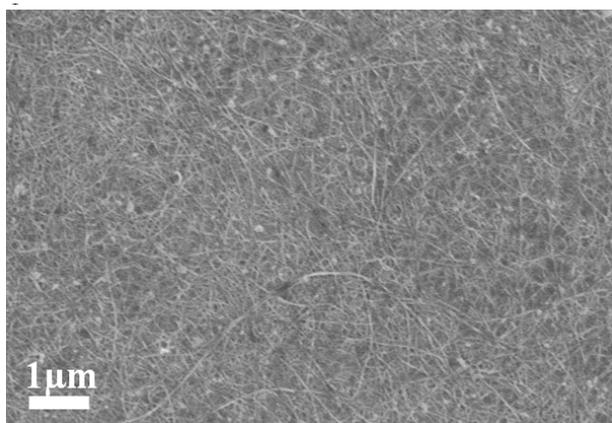


Figure 79: **Résultat de dépôt de NTCs par pulvérisation sur une surface de SiO₂.** Le dépôt forme un tapis continu et dense, les NTCs sont désorganisés. Image prise au microscope électronique à balayage.

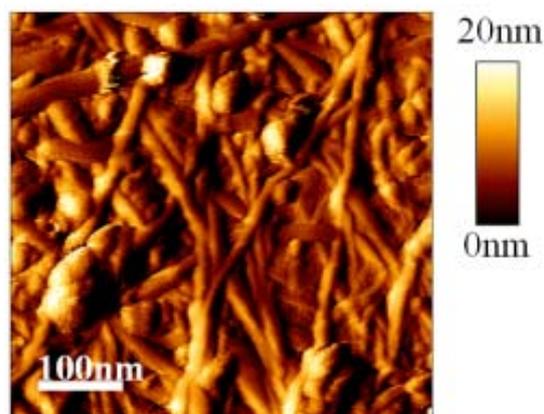


Figure 80: **Image AFM d'une couche de NTCs, signal de déflexion latérale.** Les NTCs sont regroupés en faisceaux (diamètre d'un NTC entre 1 et 3nm). Observation en mode contact, à l'air.

En comparaison à d'autres techniques, telles que la réalisation de films par filtration ou le dip-coating (dépôt par trempage), le dépôt par pulvérisation nous permet finalement d'obtenir des dépôts denses en une seule étape [174]. Ce procédé nous a permis de générer rapidement un grand nombre d'échantillons pour la culture cellulaire et sur de nombreux types de surfaces, comme par exemple le PDMS, l'or, le dioxyde de silicium, le silicium, le polyéthylène téréphtalate (PET), le verre.

- Rugosité des couches de NTCs

La rugosité d'une surface est une caractéristique qui est souvent décrite comme influente pour expliquer le comportement de cellules sur une surface [106], [175], [176], [177]. Afin de caractériser nos couches de NTCs le plus finement possible, nous avons mesuré la rugosité de plusieurs couches ayant des épaisseurs différentes. Les résultats de ces mesures sont présentés sur la Figure 81. Nous

avons pu établir que quelle que soit l'épaisseur totale des couches, celles-ci avaient quasiment toutes la même rugosité : $8.5\text{nm}\pm 2\text{nm}$.

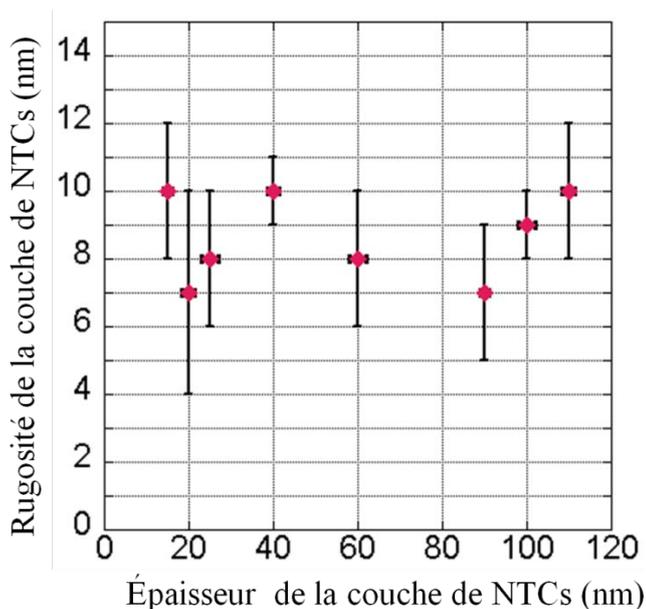


Figure 81 : Evolution de la rugosité des couches de NTCs déposées par pulvérisation sur des substrats de verre en fonction de leur épaisseur. La rugosité a été mesurée par AFM, en calculant la rugosité moyenne d'une surface de $50\mu\text{m}$ de côté. L'épaisseur des couches a été mesurée par AFM. Chaque point représente la moyenne de trois zones de la couche de NTCs. Les barres d'erreur représentent les écarts types standards.

2.2. Caractérisation de surfaces comportant des motifs de NTCs obtenus par pulvérisation et microcontact printing

Des motifs de NTCs de différentes géométries sont réalisés en combinant la technique de pulvérisation et le microcontact printing. Ces procédés développés dans ces travaux de thèse sont détaillés en annexe 5. Des images MEB des motifs de NTCs obtenus sur du SiO_2 sont présentées sur la Figure 82, les motifs de NTCs apparaissent en gris clair. On observe que :

- les motifs sont constitués de tapis de NTCs denses et désorganisés (image d)
- ils sont précisément définis, il n'y a pas de NTCs entre les motifs. Le transfert est fidèle aux motifs du timbre.
- ce procédé permet de traiter de grandes surfaces (image b)

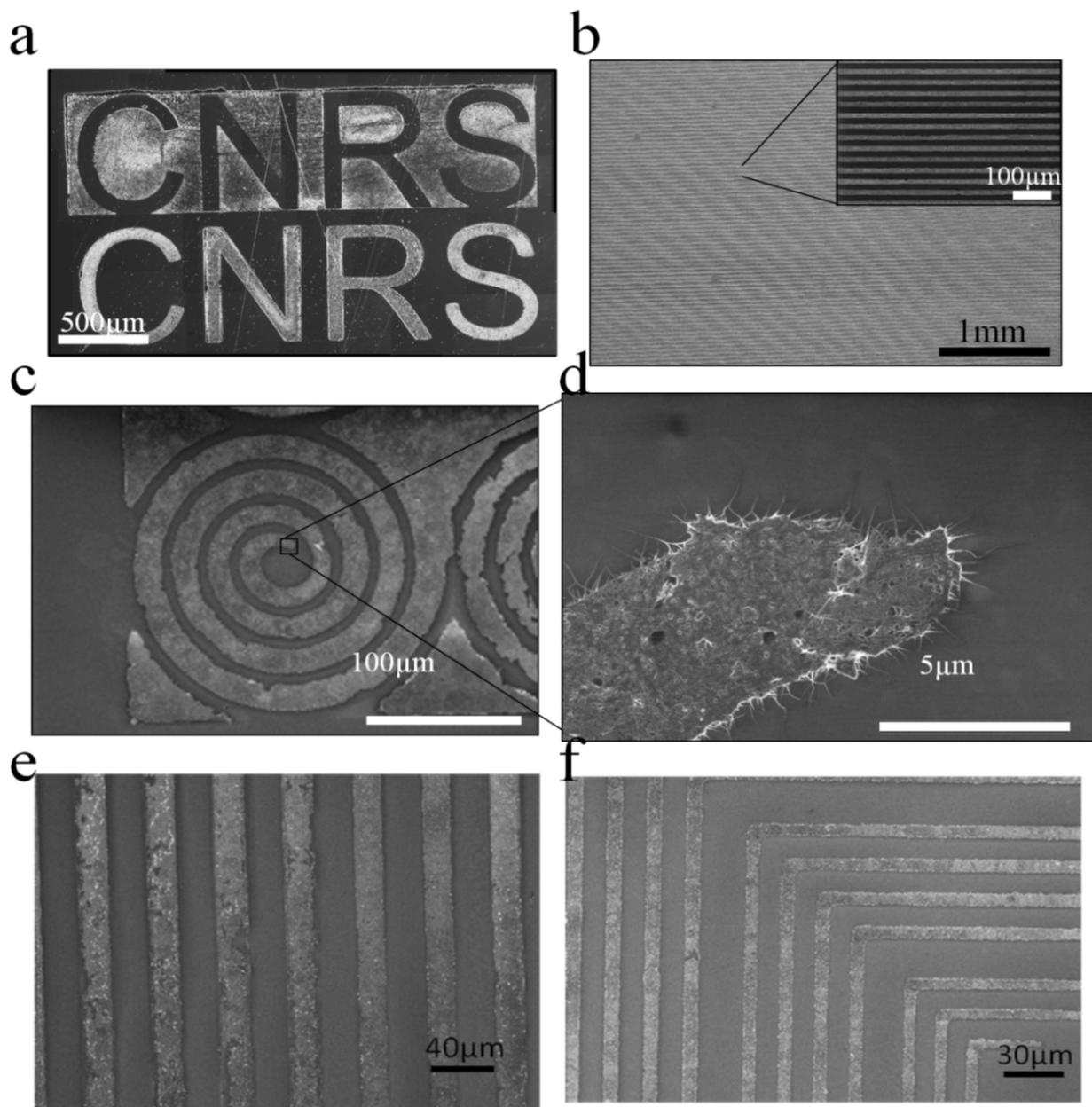


Figure 82: **Exemples de motifs de NTCs réalisés, sur des surfaces de SiO_2 .** a-b : motifs réalisés par micro-contact printing sur de grandes surfaces de SiO_2 . c-d : exemple de motifs en forme de spirale et zoom sur l'extrémité de la spirale. e-f : motifs utilisés dans la suite pour la culture de neurones.

La Figure 83 montre des images AFM qui permettent d'avoir des informations sur la topographie des motifs de NTCs. On observe par exemple que les motifs réalisés sur cet échantillon mesurent au maximum 40nm de hauteur.

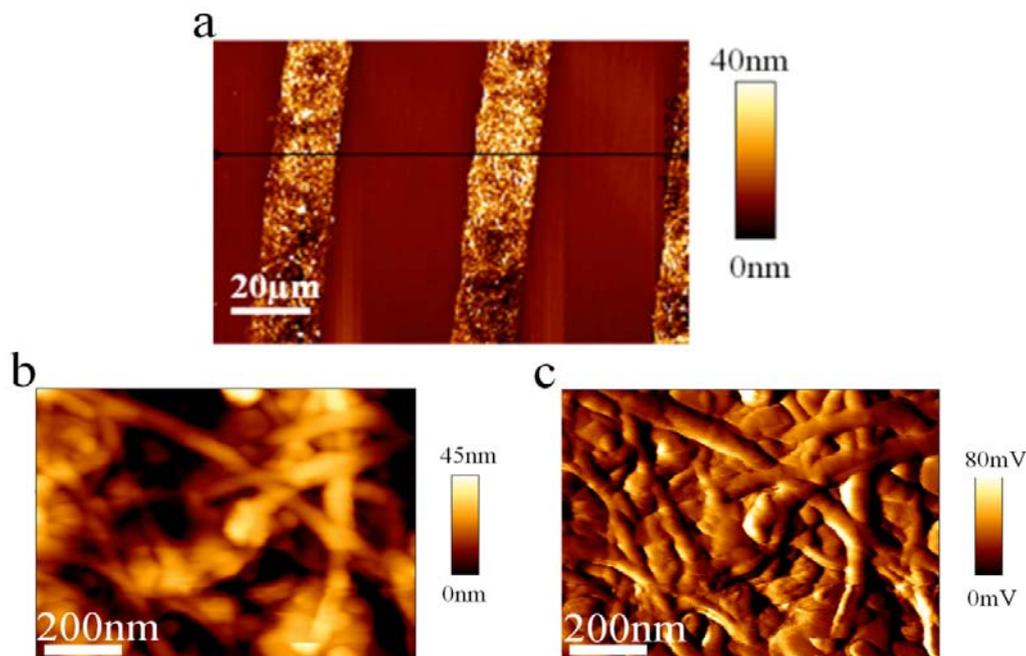


Figure 83: **Images AFM de motifs de NTCs sur une surface de SiO₂, réalisés par micro-contact printing.** Images acquises en mode contact, à l'air. **a**: signal de hauteur, image d'un motif de lignes de largeur micrométrique. **b-c** : zoom sur une zone de NTCs (b: signal de hauteur, c: signal d'erreur).

Dans la suite de ce travail de thèse, le même protocole (détaillé en annexe 5) a été employé pour générer toutes les surfaces utilisées pour la culture cellulaire. Ce point est important afin de pouvoir comparer les échantillons entre eux. Pour générer des couches planes de NTCs, un timbre de PDMS plat (sans structures) est utilisé. Pour générer des motifs de NTCs, un timbre microstructuré est employé.

2.3. Traitement des surfaces avant la mise en culture des neurones

Pour utiliser les échantillons qui comportent des NTCs pour la culture de cellules neuronale, nous avons dû :

- **Enlever les traces de carboxymethylcellulose, surfactant** que nous avons employé pour stabiliser les suspensions de NTCs. Ainsi, on s'assure que les résultats de culture que nous obtiendrons seront bien liés à la présence des NTCs et non de ce surfactant. La carboxymethylcellulose se dissout très bien dans de l'eau chaude. Pour la supprimer, nous immergeons donc les échantillons dans de l'eau à 60°C pendant deux heures.

- **Stériliser les surfaces.** Pour cela, nous immergeons les échantillons dans de l'éthanol à 70% pendant 15 minutes puis nous rinçons l'éthanol avec de l'eau stérilisée.

La culture des cellules neuro2a a été réalisée en suivant le même protocole que pour la culture sur des surfaces micro-structurées. Pour rappel, les échantillons ne reçoivent pas de dépôt de protéines de la matrice extracellulaire. Les cellules sont cultivées directement sur les surfaces de NTCs. Ce protocole dure 3 jours. Cela permet de réaliser une expérience entière par semaine, en comptant la fabrication des échantillons. Ce protocole comporte 4 étapes :

- ensemencement des cellules sur les échantillons, à une densité de 1.2×10^4 cellules/mm². Les cellules sont « incubées » pendant 24 h sur les échantillons.
- différenciation des cellules. Pour cette opération, le milieu initial de culture est remplacé par un milieu sans nutriments, complétement avec de la BSA à 1% en volume
- maintien en culture pendant 48 h, dans ce même milieu.
- fixation des cellules, par une solution de paraformaldéhyde (4% en volume), 30 min ; à température ambiante. On réalise ensuite des marquages fluorescents de l'actine et des noyaux des cellules.

3. Effet des NTCs sur la culture de cellules neuronales

3.1. Effet des couches de NTCs sur le développement de cellules neuronales issues de la lignée « neuro2a »

Pour étudier l'affinité des cellules neuro2a pour les couches de NTCs, nous avons cultivé les cellules sur des surfaces de SiO₂ recouvertes de couches continues (sans motifs) de NTCs et en parallèle sur des surfaces de SiO₂, permissives pour la croissance des cellules. Le SiO₂ constitue la surface de référence, sur laquelle les cellules se développent « normalement ». En effet, elle est similaire à une surface de verre, matériau communément utilisé pour la culture de ces cellules. Nous comparons ci-après les résultats obtenus sur ces deux types de surface pour les différents critères suivants : adhérence, différenciation, et développement des neurites.

a. Adhérence

La Figure 84 représente le nombre moyen de noyaux dénombré par mm² pour une culture réalisée sur une surface homogène de SiO₂ et pour une couche de NTCs. Après trois jours de culture, on s'aperçoit que le nombre moyen de noyaux relevé par mm² ne dépend pas la nature de la surface de culture.

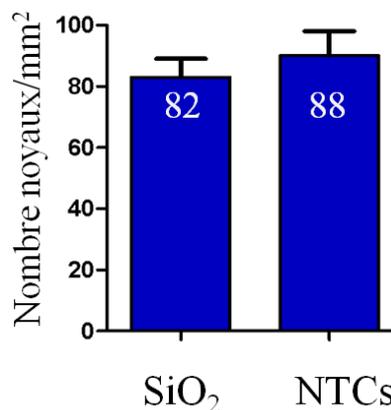


Figure 84: Comparaison du nombre de cellules neuronales ayant adhéré sur du SiO₂ et sur une couche de NTCs. Les barres d'erreur représentent les écarts types standards obtenus en analysant 3 expériences identiques et indépendantes. Pour chaque expérience, cinq zones de l'échantillon de dimension fixe ont été observées et analysées.

b. Différenciation

Les taux de différenciation obtenus sur une surface de SiO₂ et sur une couche de NTCs sont reportés sur la Figure 85. Ils s'élèvent à 92±4% et à 95±3% respectivement pour la surface de SiO₂ et pour la couche de NTCs. Ces scores ne sont pas statistiquement différents.

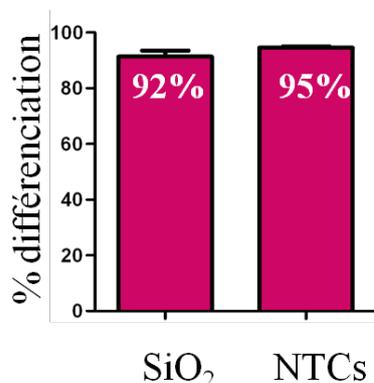


Figure 85 : Comparaison du pourcentage de différenciation des cellules sur du SiO₂ et sur une couche de NTCs. Les barres d'erreur représentent les écarts types obtenus en analysant 3 expériences identiques et indépendantes. Pour chaque expérience, cinq zones de l'échantillon de dimension fixe ont été observées et analysées.

On peut ainsi conclure que les cellules neuronales de la lignée neuro2a ont la même affinité pour les deux types de surfaces.

c. Développement des neurites

L'observation plus détaillée de nos échantillons nous a amenés à étudier la polarité des neurones. La Figure 86 compare les polarités des neurones sur les deux types de surface.

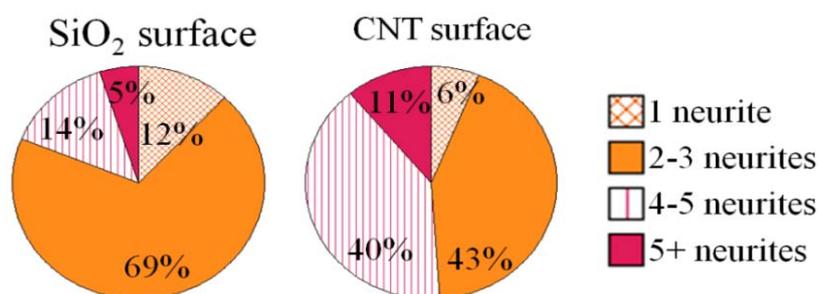


Figure 86 : analyse de la polarité des cellules neuronales cultivées sur SiO₂ et sur couches de NTCs planes. Résultats issus de l'analyse de 5 zones d'observations, pour 3 expériences indépendantes.

Sur la surface de SiO₂, une grande majorité (69±9%) des neurones possède 2 ou 3 neurites. Sur la couche de NTCs, 40±7% des neurones ont 4 ou 5 neurites, contre seulement 14±8% dans le cas de la surface de SiO₂. On constate que les neurones ont globalement plus de neurites sur la couche de NTCs. Les différences relevées sont significatives. Les études réalisées qui utilisent des NTCs ne

montrent pas toujours des résultats comparables. Par exemple, Mattson et al [118] ont trouvé que les nanotubes étaient favorables pour la croissance des neurites en termes de longueur, mais qu'ils ne permettaient pas d'obtenir de nombreux neurites, suggérant ainsi que l'adhérence des cônes de croissance que l'on trouve à l'extrémité des neurites était faible. Hu et al [115] ont montré des résultats similaires. En revanche, certaines études ont montré que lorsque l'on dépose des molécules bioactives ou bien des facteurs de croissance sur les NTCs, les neurones développent davantage de neurites [125], [131]. Dans notre cas, aucun dépôt de molécules n'a été réalisé avant la culture des cellules neuronales.

Les cellules neuronales semblent avoir la même affinité pour les deux types de surfaces étudiées, en termes d'adhérence et de différenciation. Cependant, des différences significatives sont apparues dans le développement neuritique, montrant une nette augmentation de la polarité des neurones sur les couches de NTCs. Ces résultats nous ont conduits à étudier plus profondément les interactions entre ces cellules et les NTCs. A cette fin, nous avons décidé de cultiver ces cellules en présence des deux types de surface, en fabriquant des motifs de NTCs sur des surfaces de SiO₂ par impression. Nous aurons donc sur un même échantillon, deux types de surfaces : l'une étant du SiO₂ et l'autre étant un tapis de NTCs. Les deux types de surfaces sont désormais en concurrence vis-à-vis des cellules.

3.2. Effet des motifs de NTCs sur le développement de cellules neuronales issues de la lignée « neuro2a »

Les échantillons que nous avons utilisés sont des échantillons de dioxyde de silicium sur lesquels nous avons imprimé des motifs de NTCs, en utilisant la méthode mise au point et décrite dans l'annexe 5. Un des motifs est constitué de réseaux de lignes mesurant 20µm de largeur avec une période de 20µm et plusieurs millimètres de longueur (voir image MEB sur la Figure 82e). L'autre type de motif se compose de lignes parallèles de largeurs différentes (largeur des lignes de 10µm espacées de 20µm ou lignes de 20µm de largeur espacées de 40µm) et qui tournent d'un angle de 90° (voir image MEB sur la Figure 82f). L'épaisseur des motifs de NTCs est de 70±10nm. Les espaces entre les lignes de NTCs sont constitués par les zones de SiO₂ non revêtues.

Les ensemencements ont été réalisés comme pour les surfaces sans motifs. Dès l'ensemencement des cellules sur les surfaces à motifs de NTCs, nous observons au microscope optique le comportement des cellules. Les cellules sont initialement dispersées aléatoirement sur la surface et elles se répartissent sur l'entière surface de l'échantillon, indépendamment de la présence des motifs de NTCs. Après trois jours de culture, nous quantifions, selon notre protocole déjà mis en place, les mêmes paramètres que précédemment : la densité et la différenciation cellulaires. Les résultats des ces quantifications sont présentés dans la Figure 87.

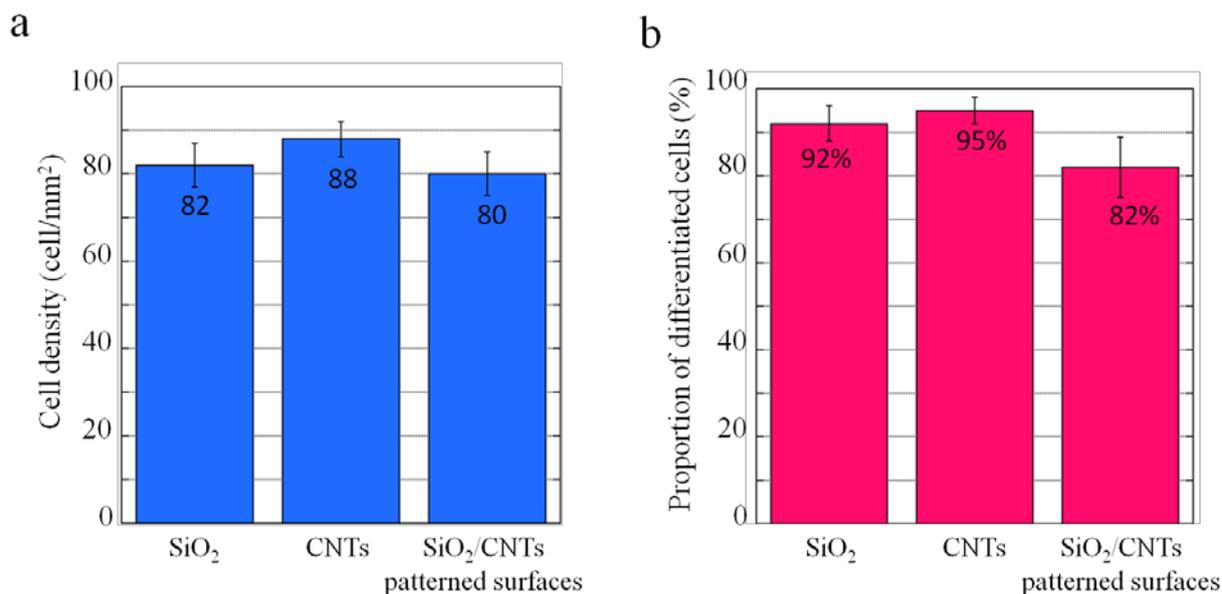


Figure 87 : **Influence des NTCs sur la densité et la différenciation cellulaires des neuro2a.** Les neuro2a ont été cultivées soit sur une surface de SiO₂, soit sur une couche de NTCs, soit sur une surface comportant des motifs de lignes de NTCs. **a** : Densité cellulaire (nombre de noyaux, marqués au dapi par mm²) sur les différentes surfaces. **b** : pourcentage de cellules différenciées (pourcentage de cellules présentant au moins un neurite, mesurant au moins 20µm) sur les différentes surfaces. Les données représentent les valeurs moyennes (±écart type) résultant de l'observation d'au moins 200 cellules, sur 4 champs choisis aléatoirement, pour 3 expériences indépendantes.

On constate que la densité cellulaire moyenne est comparable à celle relevée dans le cas des cultures réalisées sur SiO₂ ou sur les couches de NTCs. De même, la proportion de cellules différenciées moyenne obtenue sur les surfaces à motifs (82±9%) est semblable (écarts non significatifs) à celles relevées dans le cas des surfaces homogènes (92±4% sur le SiO₂ et 95±3% sur la couche de NTCs).

Cependant, lorsque l'on examine en détails les échantillons comportant des motifs, on découvre de nouveaux phénomènes. Des images de ces échantillons prises au MEB et au microscope optique à fluorescence sont présentées dans la Figure 88. De manière surprenante, on observe qu'une grande majorité des cellules s'est développée précisément sur les motifs de NTCs. Ces résultats sont d'autant plus remarquables que :

- les cellules semblaient avoir la même affinité pour le SiO₂ que pour les NTCs, d'après les résultats obtenus sur des surfaces homogènes
- les densités cellulaires obtenues sur les surfaces homogènes et sur les surfaces avec des motifs sont comparables
- les taux de différenciation cellulaires obtenus sur les surfaces homogènes et sur les surfaces avec des motifs sont comparables

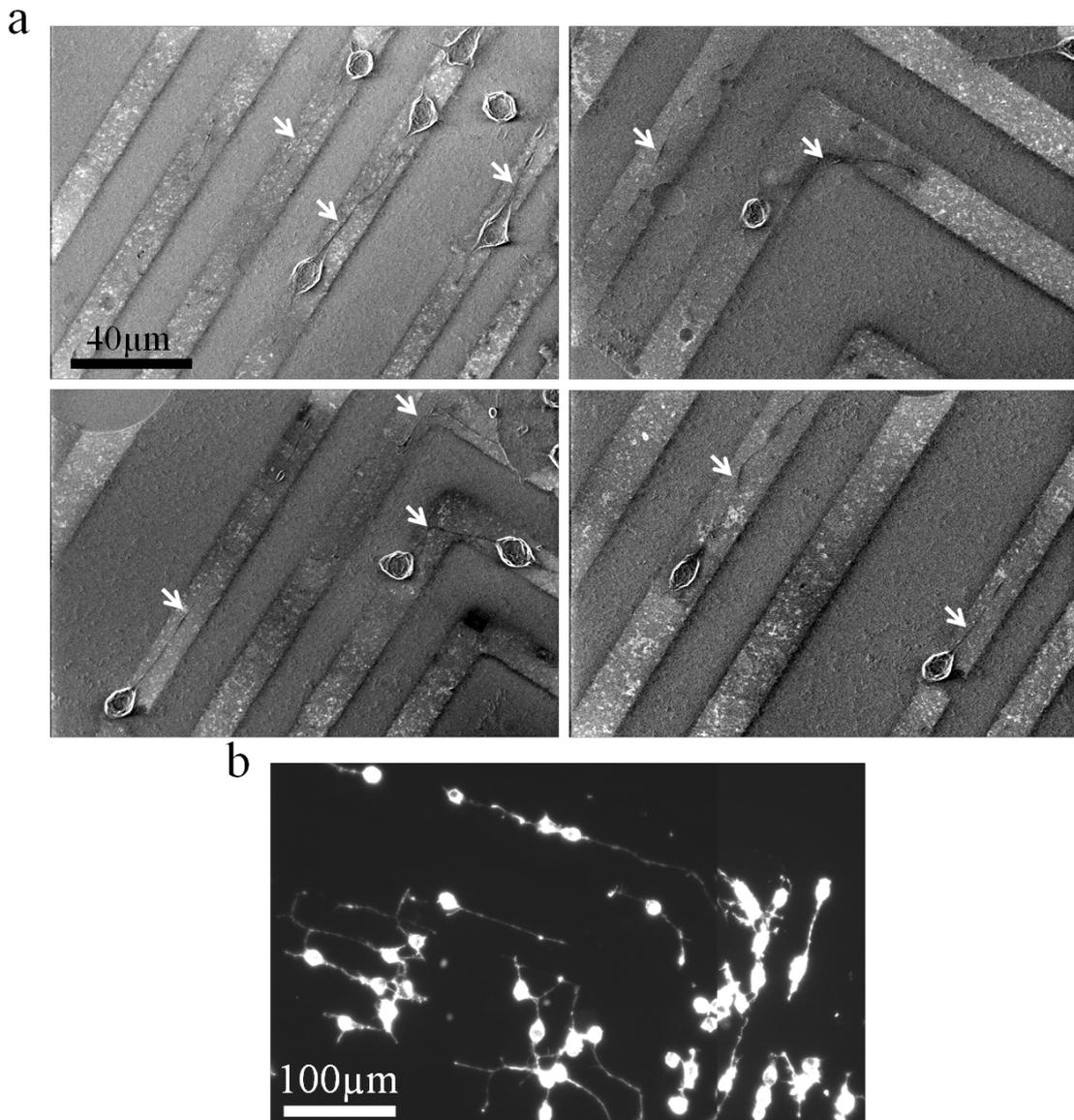


Figure 88: Cellules neuro2a après 3 jours de culture sur des surfaces de SiO₂ comportant des motifs de NTCs (épaisseur des motifs = 70 ± 10 nm), après 3 jours de culture. a : Images prises au MEB. Les motifs de NTCs sont visibles. Les flèches blanches montrent les neurites des neurones. b : image prise au microscope optique à fluorescence. L'actine des cellules neuro2a a été marquée par immunofluorescence. Les motifs de NTCs ne sont pas visibles.

L'observation de la Figure 88 nous montre plusieurs phénomènes, liés à la présence des deux types de surfaces, qui sont en compétition. Ces phénomènes ont été relevés pour de nombreuses cellules : nous avons observé le comportement de 300 cellules sur 4 champs d'observation différents, issus de trois expériences indépendantes. La Figure 89 expose les résultats quantitatifs de ces observations.

Nous découvrons que les cellules sont localisées préférentiellement ($84 \pm 5\%$) sur les motifs de NTCs (voir Figure 89a).

Nous voyons aussi que leur croissance est influencée par la forme des motifs de NTCs. En effet, les neurites sont guidés par les motifs de nanotubes de carbone (voir flèches blanches de la Figure 88a). Ils se développent sur la ligne de NTCs en suivant sa direction. Ils sont même capables de suivre une ligne de NTCs qui tourne avec un angle de 90° (voir Figure 88). La majorité des neurones observés sur

les motifs de NTCs ne développe que 1 ou 2 neurites, certainement à cause de la forme en lignes des motifs utilisés.

Le taux de différenciation des cellules qui se trouvent sur les motifs de NTCs est significativement plus grand que celui des cellules qui sont sur les zones voisines de SiO₂ (voir Figure 89b). Il s'élève à 86±4% sur les motifs de NTCs, ce qui est comparable au score obtenue sur une couche. En revanche, le taux de différenciation n'est que de 55±4% sur les zones de SiO₂ voisines des motifs de NTCs, alors qu'il était de 92% sur une surface homogène de SiO₂.

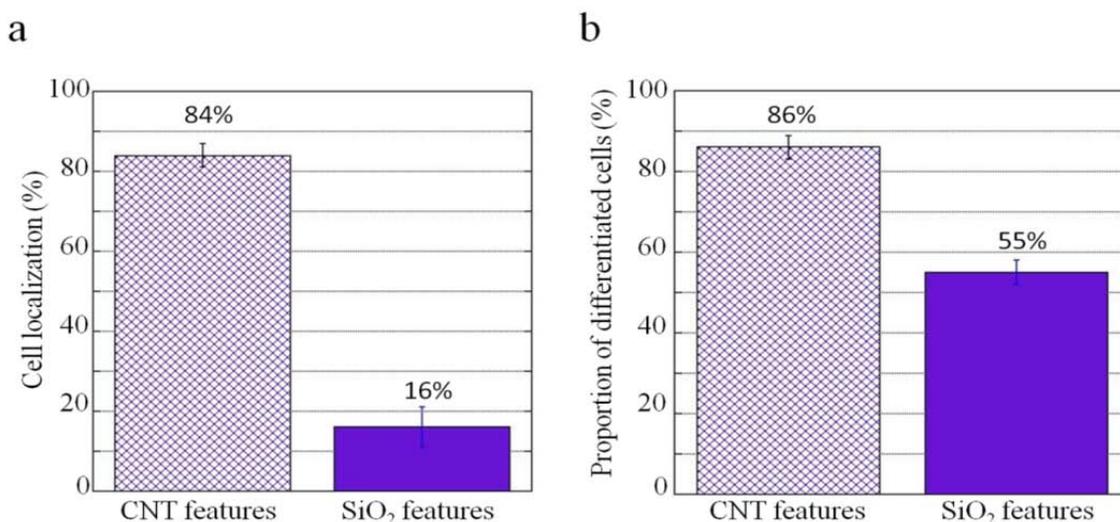


Figure 89: **Etude de la localisation des cellules neuro2a et de leur différenciation, sur des surfaces de SiO₂ comportant des motifs de NTCs, après 3 jours de culture.** Les données représentent les valeurs moyennes (±écart type) résultant de l'observation d'au moins 200 cellules, sur 4 champs choisis aléatoirement, pour 3 expériences indépendantes. **a : localisation des cellules.** Les cellules sont localisées soit sur les motifs de NTCs (84% des cellules) soit sur les zones de SiO₂ qui sont entre les motifs de NTCs (16% des cellules). **b : proportion de cellules différenciées en fonction de leur localisation.** Lorsque les cellules sont localisées sur les motifs de NTCs, 86% des cellules se sont différenciées. Lorsque les cellules sont localisées sur les zones de SiO₂, 55% des cellules se sont différenciées.

Ces observations démontrent que quand les cellules ont le choix entre le SiO₂ et les NTCs, elles ont un comportement différent de celui observé sur des surfaces homogènes de SiO₂ ou de NTCs. La densité cellulaire globale étant la même sur les surfaces comportant des motifs que sur les surfaces homogènes, cela signifie clairement que les cellules ont migré pour se développer préférentiellement sur les NTCs.

Par ailleurs, nous nous apercevons que la localisation du corps cellulaire d'un neurone (c'est à dire soit sur les motifs de NTCs, soit sur le SiO₂ voisin) a une influence sur la localisation de ses neurites. Le résultat de nos observations est présenté et résumé schématiquement dans la Figure 90.

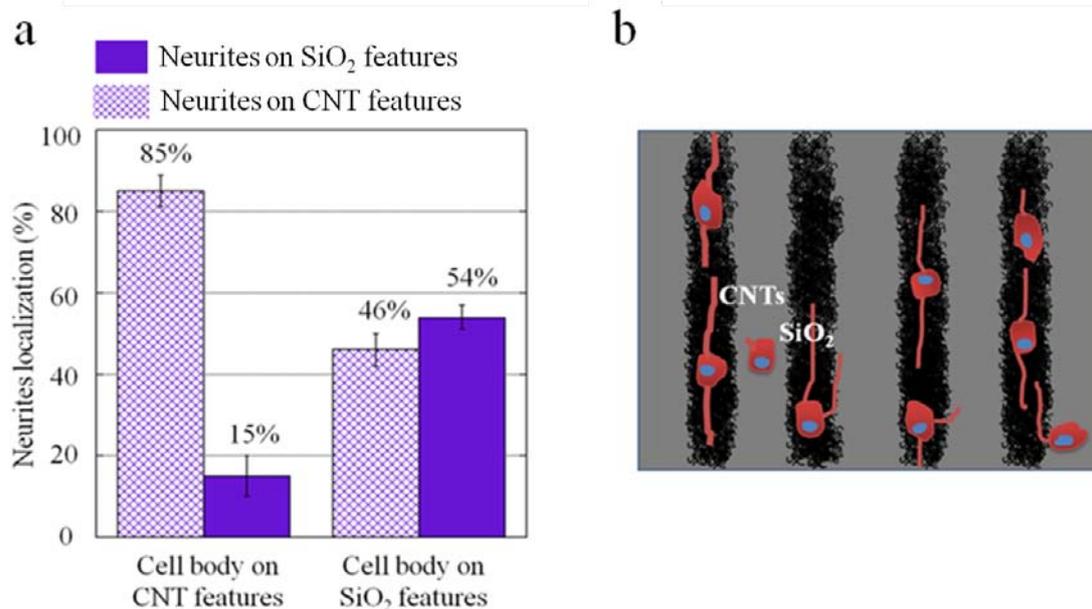


Figure 90 : Etude de la localisation des neurites en fonction de la localisation du corps cellulaire. Le corps cellulaire peut être soit sur les motifs de NTCs, soit sur le SiO₂ voisin. **a** : résultats des quantifications réalisées en observant les cultures (les données représentent les valeurs moyennes (\pm écart type) résultant de l'observation d'au moins 200 cellules, sur 4 champs choisis aléatoirement, pour 3 expériences indépendantes). **b** : schématisation des observations.

On constate que pour les neurones dont le corps cellulaire se trouve sur une ligne de NTCs, 85% des neurites de ces neurones se développent sur cette même ligne de NTCs. Dans seulement 15% des cas, les neurites se développent sur la surface de SiO₂ voisine. Par contre, lorsque les corps cellulaires des neurones se trouvent sur le SiO₂, 54% des neurites se développent sur le SiO₂ et donc près de la moitié (46%) des neurites se développent sur les motifs de NTCs voisins. Cela montre bien que les neurites, qui sont par nature capables d'explorer leur environnement par l'intermédiaire du cône de croissance [178], [179], [21] choisissent la surface la plus favorable pour leur développement, qui est en l'occurrence le tapis de NTCs.

4. Elucidation du rôle des NTCs sur la culture cellulaire

Les résultats obtenus dans les paragraphes 3.1 et 3.2 montrent bien qu'en juxtaposant deux types de surfaces favorables pour la culture cellulaire (SiO₂ et NTCs), les cellules neuronales sont capables de choisir la région la plus appropriée pour leur croissance et de migrer jusqu'à celle-ci.

Nous avons montré une grande sélectivité des neurones pour les motifs de NTCs. Les NTCs apparaissent comme étant la surface la plus appropriée pour la croissance des cellules neuronales « neuro2a ». Ces résultats soulèvent de nombreuses questions. Tout d'abord, pourquoi les NTCs constituent-ils une surface plus favorable que le SiO₂ pour le développement des cellules neuronales ? Nous nous interrogeons sur la nature des propriétés des NTCs qui contribuent à en faire une surface favorable pour la croissance des neurones. Les propriétés des NTCs susceptibles d'influencer le comportement des cellules sont nombreuses. Leur dureté, leur composition chimique, leur conductivité

électrique ou encore leur rugosité pourraient être en cause. Nous savons que les cellules sont sensibles à leur environnement et qu'elles ont besoin d'un certain nombre de protéines contenues dans le milieu de culture pour pouvoir se développer (nutriments, facteurs de croissance ...). En particulier, chez le neurone, le cône de croissance qui se trouve à l'extrémité des neurites est très mobile et explore activement les régions autour de lui. Nous nous demandons donc si les neurones sont sensibles aux propriétés intrinsèques des NTCs ou bien s'ils seraient sensibles aux NTCs de manière indirecte. Nous faisons aussi l'hypothèse qu'il y aurait plus de protéines du milieu de culture sur les motifs de NTCs qu'autour des motifs (c'est-à-dire que sur le SiO₂). Les cellules trouveraient ainsi sur les NTCs de meilleures conditions pour leur développement, menant à la sélectivité observée. Dans ce cas, les cellules seraient sensibles aux NTCs de manière indirecte.

Pour tester cette hypothèse, nous avons souhaité comparer les « affinités » de plusieurs protéines contenues dans le milieu de culture pour les couches de NTCs et pour le SiO₂. Dans ce but, nous avons pensé à utiliser la microbalance à quartz, qui est un instrument permettant d'analyser et de mesurer l'adsorption d'entités sur des surfaces.

4.1. Etude de l'adsorption de protéines sur des couches de NTCs par micro-balance à quartz

a. Principe de fonctionnement de la microbalance à quartz

La microbalance à cristal de quartz (QCM) est une méthode de détection basée sur les propriétés piézo-électriques du quartz. En mesurant la variation de la fréquence de résonance mécanique d'un quartz, la QCM permet la mesure de très faibles variations de masse (jusqu'à la fraction d'une monocouche moléculaire). Pour cela, le quartz est recouvert de deux électrodes, permettant de lui appliquer une différence de potentiel alternative afin de le maintenir en vibration mécanique. Le quartz est placé dans une chambre fluide, dans laquelle on fait passer un fluide contenant les éléments dont on souhaite étudier les interactions avec le quartz. La variation de masse (Δm) sur la surface du quartz se traduit alors par une variation de la fréquence de résonance mécanique du quartz (Δf_m). Dans le cas d'une prise de masse, cette fréquence diminue, tandis que dans le cas d'une perte de masse, cette fréquence augmente. Si les épaisseurs en jeu ne sont pas trop importantes (variation de 2 % de la fréquence initiale), la relation de Sauerbrey¹⁹ s'applique :

$$\Delta f_m = -N \frac{2f_0^2}{\sqrt{\rho_q \mu_q}} \frac{\Delta m}{S}$$

¹⁹ Sauerbrey fut le premier, en 1959, à développer le principe de l'utilisation de la microbalance à cristal de quartz pour la mesure de masse. Il a établi la loi reliant la variation de la masse à la surface du quartz et la variation de sa fréquence de résonance. Par la suite, cette méthode a été largement développée et utilisée pour la mesure de l'épaisseur de films déposés sous vide, puis plus récemment en milieu liquide pour l'étude des interactions spécifiques entre molécules [180].

avec :

- S : l'aire de l'électrode (en cm²)
- N : le rang de l'harmonique (avec N = 1, 3, 5, 7...)
- ρ_q : la masse volumique du quartz (en g × cm⁻³)
- μ_q : son module de cisaillement (en g × cm⁻¹ × s⁻¹)

Dans notre système expérimental, cette relation devient :

$$\Delta f \text{ (Hz)} = -395,48 \times 10^6 \times \Delta m \text{ (g)}$$

Ainsi, en suivant les variations de la fréquence de résonance mécanique, on peut donc suivre en temps réel l'adsorption et la désorption d'espèces contenues dans une solution sur la surface du quartz. La Figure 92 montre un exemple de courbe obtenue par QCM. Après l'injection de la solution contenant les entités dont on souhaite étudier l'adsorption sur le quartz, on observe une diminution de la fréquence de résonance. Cela signifie qu'une masse s'est adsorbée. On procède ensuite à un rinçage, afin d'enlever les entités qui sont faiblement liées à la surface. On peut alors observer une augmentation de la fréquence de résonance, témoignant d'une désorption des entités de la surface. La Figure 91 est une photographie de notre microbalance à quartz, instrument de marque Q-Sense. Les différentes parties qui la composent sont :

- les chambres fluidiques dans lesquelles on place les quartz et dans lesquelles on fait passer les solutions contenant les entités dont on souhaite étudier l'adsorption sur les quartz. Notre instrument est équipé de 4 chambres fluidiques, permettant de faire 4 études en parallèle.
- les tuyaux d'entrée et de sortie des solutions
- le système de pompage des solutions
- le module électronique qui traite le signal
- l'ordinateur. Le logiciel « Q-soft » nous permet de récupérer les signaux et de les analyser.

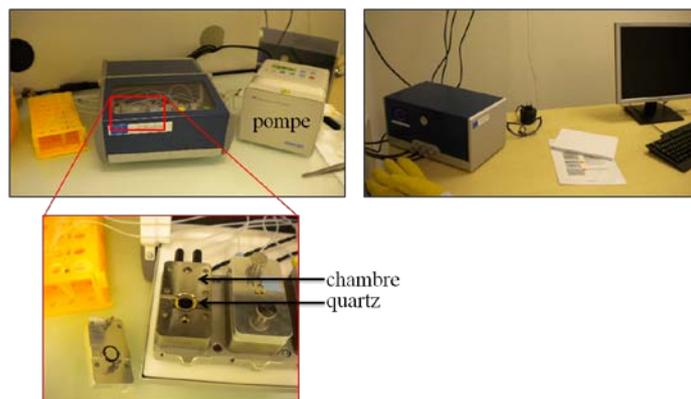


Figure 91 : **photographie de la microbalance utilisée pour ces travaux, de marque Q-sense. Bas** : vue d'une chambre fluidique ouverte et du quartz, placé à l'intérieur sur des connexions électriques.

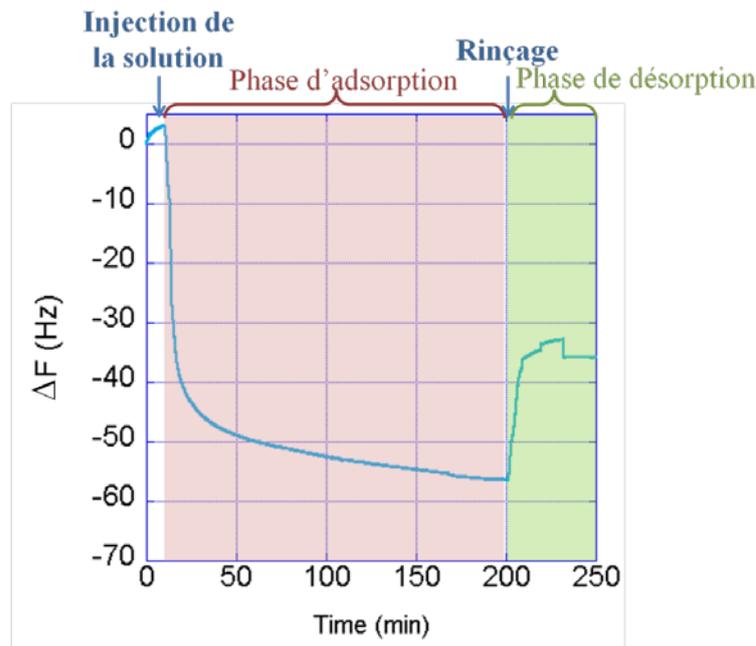


Figure 92: **courbe type d'adsorption et de désorption d'une protéine sur la surface d'un quartz, obtenue avec la QCM.** Le signal de fréquence doit être d'abord stabilisé en faisant passer dans la chambre du quartz une solution tampon, qui ne contient pas de protéines. La solution contenant la/les protéines est injectée ensuite. Peu de temps après, la fréquence de résonance diminue, ce qui signifie que des protéines ont été adsorbées sur la surface. Une solution tampon est ensuite injectée pour rincer la surface du quartz et enlever les protéines qui ne sont pas fortement attachées à la surface du quartz. On observe une augmentation de la fréquence de résonance, signe de désorption.

L'utilisation de la QCM nécessite cependant certaines précautions. Elles sont dues au principe de fonctionnement du capteur utilisé et à sa sensibilité à d'autres paramètres autres que l'ajout ou la perte de matière. Ces paramètres sont essentiellement : la température, la pression et les contraintes exercées sur le quartz. Pour réaliser des mesures de variations de masses fiables, il conviendra donc de parfaitement maîtriser tous ces autres paramètres, en régulant la température et en utilisant des quartz qui ont toujours été manipulés de la même manière.

b. Expériences réalisées

Pour étudier l'adsorption de protéines contenues dans le milieu de culture sur les NTCs et sur le SiO_2 , nous utilisons des quartz du commerce (Q-Sense) dont la surface est recouverte de SiO_2 . Nous déposons ensuite sur la face active de ces quartz une couche de NTCs en utilisant le protocole de micro-contact printing décrit dans l'annexe 5 à l'aide d'un timbre de PDMS plat. Après le dépôt, nous vérifions pour chaque quartz que la couche de NTCs est bien continue et homogène puis nous mesurons son épaisseur et sa rugosité à l'AFM. La bonne connaissance des propriétés de nos couches permet de mieux comprendre les phénomènes observés. Nous nous assurons également que les quartz n'ont pas été endommagés (vérification visuelle de l'état des électrodes et vérification que leur fréquence de résonance intrinsèque est bien restée dans la plage de fréquence normale d'utilisation).

Pour ces expériences de QCM, nous préparons des quartz avec des couches de NTCs d'épaisseurs différentes. Les couches ont cependant toutes la même rugosité ($rms=8.5nm$). Nous étudions l'adsorption de plusieurs protéines ou mélanges de protéines sur ces couches. Notre instrument étant équipé de 4 chambres fluidiques, nous pouvons donc comparer l'adsorption relevée en parallèle sur les couches de NTCs et sur le SiO_2 .

La première solution de protéines choisie est une solution d'albumine de sérum bovin (BSA). Cette protéine est utilisée pour stimuler la différenciation des cellules neuro2a. Nous l'utilisons à une concentration de $10\mu g/mL$ dans du tampon phosphate (PBS pour phosphate buffered saline en anglais). Le PBS sert de solution tampon, pour la stabilisation des signaux (c'est la solution « contrôle »). La Figure 93 montre les courbes d'enregistrement de la fréquence de résonance au cours du temps que nous avons obtenues, en incubant de la BSA sur une surface de SiO_2 et sur une couches de NTCs. On observe que rapidement après que la solution de BSA soit entrée dans les chambres fluidiques contenant les quartz, la fréquence de résonance diminue pour les deux types de quartz. Au bout d'un certain temps, on observe que cette diminution est stabilisée. Elle est de $-56Hz$ pour le SiO_2 et $-75Hz$ pour la couche de NTCs. En utilisant la relation de Sauerbrey, cela signifie que $139ng$ et $189ng$ de BSA se sont adsorbés respectivement sur le SiO_2 et sur les NTCs. Il y a donc une augmentation de l'adsorption de 36% de la BSA sur la couche de NTCs. Afin de vérifier que la BSA est bien adsorbée sur la surface, on procède ensuite au rinçage des surfaces, avec de la solution tampon. On observe que la fréquence de résonance augmente légèrement, signifiant une faible perte de masse. Cette perte de masse ne semble pas liée à la nature de la surface car elle est la même pour les deux types de surface. Cette tendance a été relevée lors de plusieurs expériences.

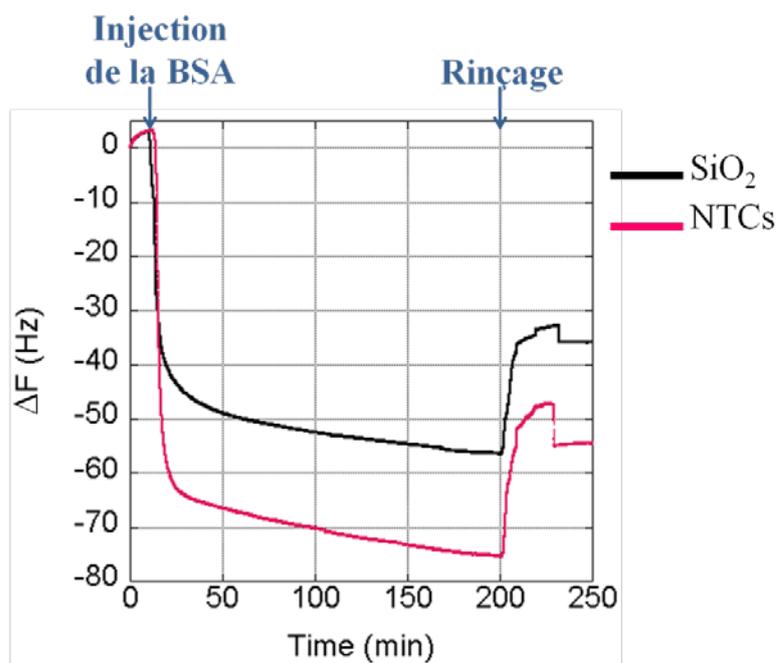


Figure 93: Courbe de QCM obtenue après incubation de BSA sur un quartz SiO_2 et un quartz couvert d'une couche continue de NTCs. L'épaisseur de la couche de NTCs est de 80nm. Après injection de la BSA (concentration= $10\mu g/ml$ dans du PBS), la fréquence de résonance diminue fortement, signe d'une forte adsorption de BSA sur la surface des quartz. Cette diminution est plus grande pour le quartz comportant une couche de NTCs, signifiant que plus de BSA s'est adsorbée sur les NTCs. On observe une légère augmentation de la fréquence de résonance lors du rinçage.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'influence de l'épaisseur de la couche de NTCs sur la quantité de masse de BSA adsorbée. Pour cela, nous avons généré des couches de NTCs de différentes épaisseurs et réalisé ensuite les mesures d'adsorption de BSA avec la QCM. Nous mesurons également systématiquement la rugosité des couches afin d'étudier le rôle possible de la rugosité dans les effets observés.

La Figure 94 présente les résultats obtenus. La rugosité mesurée des couches de NTCs est constante, quelle que soit l'épaisseur des couches. On observe que plus l'épaisseur de la couche de NTCs est grande, plus la masse adsorbée est grande. Pour des épaisseurs comprises entre 20nm et 70nm, il y a une relation de proportionnalité entre l'épaisseur et la masse adsorbée (le coefficient de corrélation est de 0.98). En revanche, dès que la couche mesure plus de 70nm d'épaisseur, la masse adsorbée n'augmente plus, comme si la couche de NTCs était saturée (voir Figure 94b) et que les entités ne pouvaient pas pénétrer plus profondément au sein de cette couche.

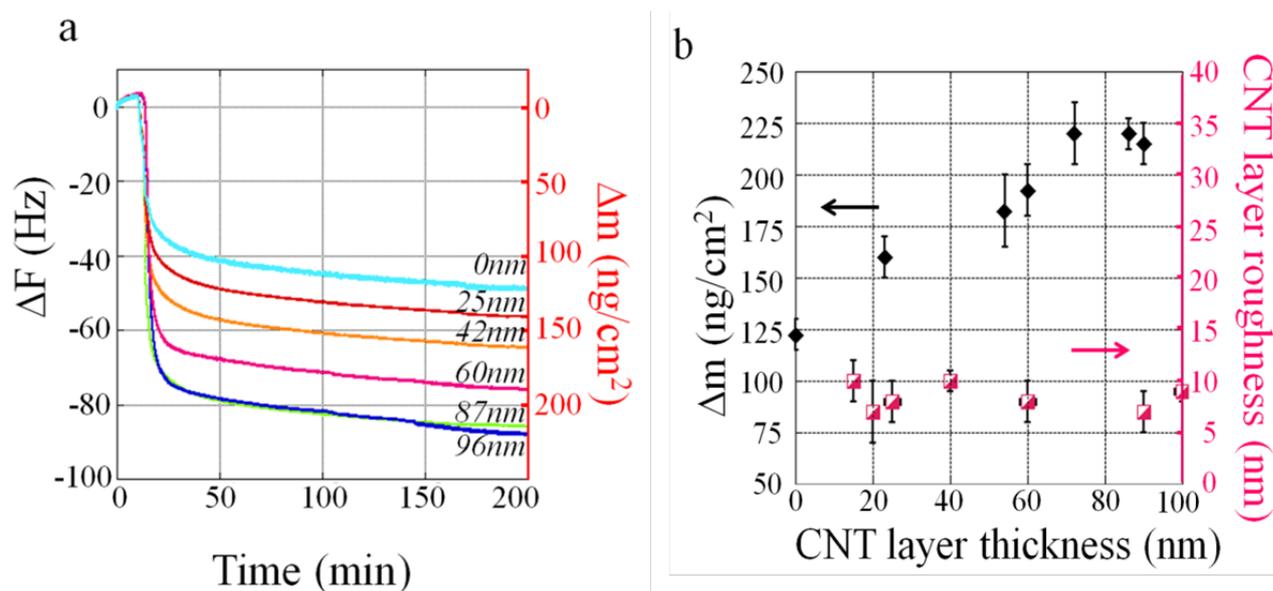


Figure 94 : Etude de l'adsorption de la BSA (concentration : 10 μ g/mL, dans du PBS) sur une surface de SiO₂ et sur des couches de NTCs, de différentes épaisseurs. **a** : enregistrements de la variation de fréquence de résonance au cours du temps. **b** : Evolution de la variation de masse adsorbée sur les couches de NTCs ainsi que de la rugosité des couches avec l'épaisseur de la couche de NTCs. Les valeurs présentées sont les valeurs moyennes \pm écart type résultant de mesures effectuées pour trois expériences indépendantes.

Afin de savoir si l'augmentation de l'adsorption de protéines sur les NTCs relevée est un effet générique, nous avons réalisé les mêmes expériences avec d'autres composés :

- la poly-l-lysine (PLL). Il s'agit d'un polymère synthétique, utilisé pour améliorer l'adhérence cellulaire. Elle est diluée à 40 μ g/mL dans la solution tampon de PBS.

- le sérum de veau fœtal (SVF). Il s'agit d'un mélange de protéines et de molécules, issu de fœtus de veaux. Il est ajouté au milieu de culture des cellules « neuro2a », à hauteur de 10% en volume. C'est le sérum le plus utilisé en culture cellulaire et l'importante variété de protéines qu'il contient permet aux cellules en culture de survivre, de se développer et de se multiplier. Pour l'étude de son adsorption sur le SiO₂ et sur la couche de NTCs, le SVF est dilué dans la solution tampon de PBS.

Les enregistrements de QCM obtenus en incubant la PLL, et le SVF sur un quartz SiO₂ et sur un quartz comportant une couche de NTCs de 80nm d'épaisseur sont présentés respectivement sur la Figure 95 et sur la Figure 96. Nous observons que l'incubation de PLL ou de sérum engendre une diminution de la fréquence de résonance (et donc une adsorption de masse) plus importante lorsque le quartz est recouvert d'une couche de NTCs que lorsque la surface du quartz est du SiO₂. Le rinçage n'a pas d'effet majeur, quelle que soit la nature de la surface.

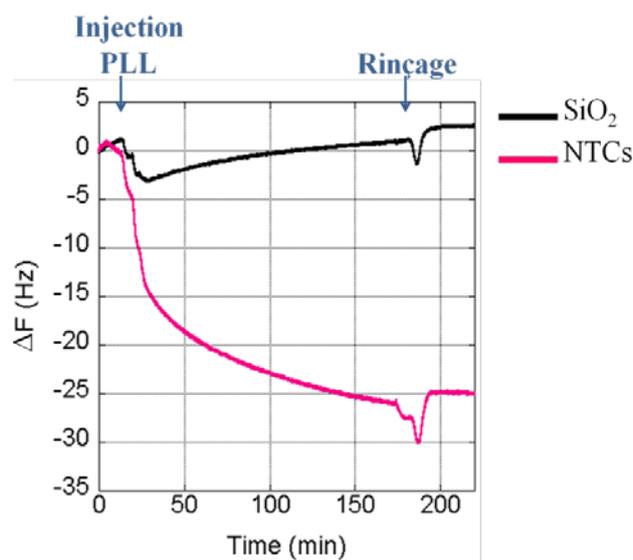


Figure 95 : Etude QCM de l'adsorption de la PLL sur une surface de SiO₂ et sur une couche de NTCs (épaisseur = 80nm). Enregistrement de la variation de fréquence de résonance au cours du temps après l'injection de PLL à 40μg/mL dans du PBS. Le rinçage est effectué avec du PBS.

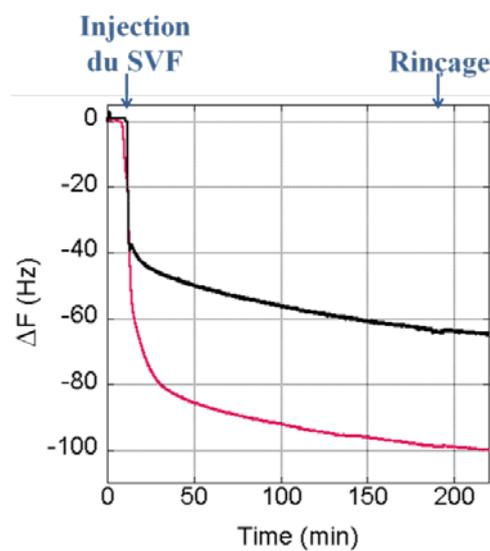


Figure 96 : Etude QCM de l'adsorption du SVF sur une surface de SiO₂ et sur une couche de NTCs (épaisseur = 80nm). Enregistrement de la variation de fréquence de résonance au cours du temps après l'injection de SVF à 10% en volume dans du PBS. Le rinçage est effectué avec du PBS.

Le Tableau 7 regroupe les résultats obtenus pour différentes entités dont nous avons étudié l'adsorption sur le SiO₂ et sur la couche de NTCs (épaisseur = 80 nm). Nous avons calculé le rapport entre la variation de fréquence obtenue avec le quartz recouvert d'une couche de NTCs et la variation de fréquence obtenue avec le quartz SiO₂. Ces rapports sont tous supérieurs à 1, ce qui signifie que les masses adsorbées sont toujours plus grandes sur les NTCs que sur le SiO₂, quelle que soit l'entité étudiée. En particulier, dans le cas des anticorps, ce rapport est très élevé (4.3). Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives d'utilisation pour nos couches de NTCs, comme par exemple leur intégration dans des biocapteurs afin d'améliorer leur sensibilité²⁰, ou encore leur utilisation comme « réservoir de nutriments » pour la culture cellulaire.

²⁰ Nous avons approfondi cette perspective, qui sort néanmoins de la problématique de ces travaux de thèse.

Entité	ΔF CNTs / ΔF SiO ₂
BSA (10 μ g/mL)	1.3
Poly-L-lysine (40 μ g/mL)	4
Serum de veau foetal (10% Vol.)	1.6
Anticorps (40 μ g/mL)	4.3

Tableau 7 : **Rapports entre la variation de fréquence de résonance obtenue avec le quartz équipé d'une couche de NTCs et la variation de fréquence obtenue avec le quartz SiO₂, après l'incubation de différentes entités.**

Grâce à l'utilisation de la QCM, nous avons montré que les NTCs favorisent l'adsorption de protéines du milieu de culture par rapport à une surface de SiO₂ et que ce phénomène n'est pas uniquement dû à une plus grande rugosité²¹ de la couche des NTCs. En effet, nous avons mis en évidence que pour des couches de NTCs de rugosités identiques, la masse de protéines adsorbée est proportionnelle à l'épaisseur de la couche de NTCs. Cependant, il existe une limite à ce phénomène. Au-delà d'une certaine épaisseur de couche, l'adsorption n'augmente plus, comme si les entités n'arrivaient plus à diffuser plus profondément dans la couche de NTCs, qui a atteint un état de saturation. Le comportement de la couche de NTCs vis-à-vis des différentes entités s'apparente à celui d'un réservoir poreux comparable à une éponge.

Nos résultats de culture cellulaire ont montré que le SiO₂ et les NTCs sont deux types de surface adaptés pour la croissance de cellules neuronales. Pourtant, en mettant en concurrence la surface de SiO₂ avec les NTCs, nous avons pu observer que les cellules ont une préférence pour les NTCs. Les propriétés mécaniques et électriques des NTCs, comme la rugosité, la dureté ou la conductivité électrique, sont souvent citées pour expliquer les interactions directes entre les NTCs et les cellules [106], [133], [129].

Nous avons montré qu'en plus de ces interactions directes, il existe une interaction indirecte entre les cellules et les NTCs, faisant intervenir les protéines contenues dans le milieu de culture. Les couches de NTCs peuvent servir d'éponge (de réservoir) pour des protéines du milieu de culture. Il y a donc davantage de protéines sur les motifs de NTCs que sur le SiO₂ voisin, créant ainsi un gradient de concentration de protéines sur les surfaces comportant des motifs de NTCs. Les cellules qui explorent leur environnement sont capables de percevoir ce gradient et sont capables de migrer pour se développer sur la surface la plus favorable, les NTCs.

Nous avons mis notre conclusion sur le rôle des NTCs sur les cellules « neuro2a » à l'épreuve en exploitant délibérément l'effet de réservoir poreux, assimilable à une « éponge » des NTCs. Pour cela,

²¹ La rugosité d'une surface est un paramètre qui influence l'adsorption de molécules sur cette surface. De nombreux auteurs ont étudié ce phénomène (voir pour revue [181], [182], [183]).

nous avons décidé de saturer au préalable le réservoir poreux constitué par la couche de NTCs avec des protéines dont ont besoin les cellules neuro2a pour se développer et observé la croissance des cellules. Cette étape a consisté en une incubation de sérum de veau fœtal. Ce sérum est un élément nutritif pour les cellules neuro2a. Cette incubation est réalisée avant de mettre les cellules en culture sur ces surfaces. Nous avons ensuite mis les cellules neuro2a en culture, en utilisant le protocole habituel. Rien n'est donc modifié, à part que certaines surfaces de culture ont été pré-incubées avec le sérum de veau fœtal et d'autres non (surfaces contrôles).

Nous avons décidé d'étudier le rôle que pouvait jouer cette incubation préalable sur la prolifération cellulaire. En effet, si les cellules ont davantage de nutriments disponibles, elles ont tendance à se multiplier davantage²² et il sera aisé de voir si le présumé « réservoir » de nutriments constitué par la couche de NTCs a bien joué son rôle.

Pour cette étude, nous utilisons une couche de NTCs épaisse de 100nm, afin d'avoir un effet « réservoir » optimal. Au cours de la culture, nous observons l'état de notre culture au microscope optique²³ et relevons chaque jour le nombre de cellules présentes sur une aire donnée de notre échantillon. Nous divisons ce nombre par le nombre de cellules présentes lorsque les cellules sont dans une situation de confluence. Cette situation particulière est atteinte lorsque toutes les cellules se touchent, la surface de l'échantillon n'étant alors plus visible (voir Figure 97). On obtient finalement le « pourcentage de confluence », qui donne une information sur la vitesse de prolifération des cellules.

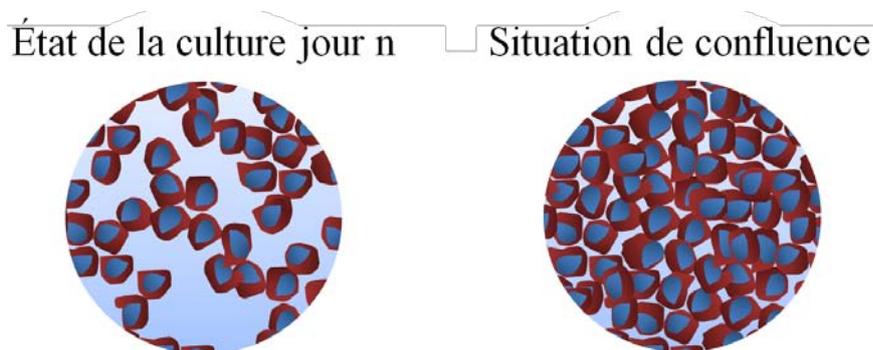


Figure 97 : **illustration schématique de la méthode de quantification du pourcentage de confluence des cellules neuro2a.** Le pourcentage de confluence pour le jour n représente le rapport entre le nombre de cellules présentes sur cette même aire au jour n et le nombre de cellules présentes sur une aire lorsque les cellules sont dans une situation de confluence. Par exemple sur ce schéma, le pourcentage de confluence est de 32/70 soit 46%.

La Figure 98 présente l'évolution du pourcentage de confluence obtenu dans différentes conditions de culture :

- surface de SiO₂ sur laquelle on n'a rien incubé avant la culture des cellules
- surface de SiO₂ sur laquelle on a incubé du sérum de veau fœtal avant la culture des cellules
- couche de NTCs sur laquelle on n'a rien incubé avant la culture des cellules

²² En général, lorsqu'une culture de cellules végète pour des raisons non identifiées, on augmente le pourcentage de nutriments que l'on ajoute au milieu de culture. Les cellules sont sensibles à ce traitement et se développent mieux.

²³ Le microscope dont nous disposons en salle de culture ne permet pas de prendre des images de la culture. Nous avons donc effectué ces quantifications manuellement, en observation directe.

- couche de NTCs sur laquelle on a incubé du sérum de veau fœtal avant la culture des cellules

Les cellules sont cultivées en phase de prolifération pendant toute la durée de l'expérience, c'est-à-dire que nous ne provoquons pas leur différenciation au bout de 24 heures, comme c'est le cas pour les autres expériences.

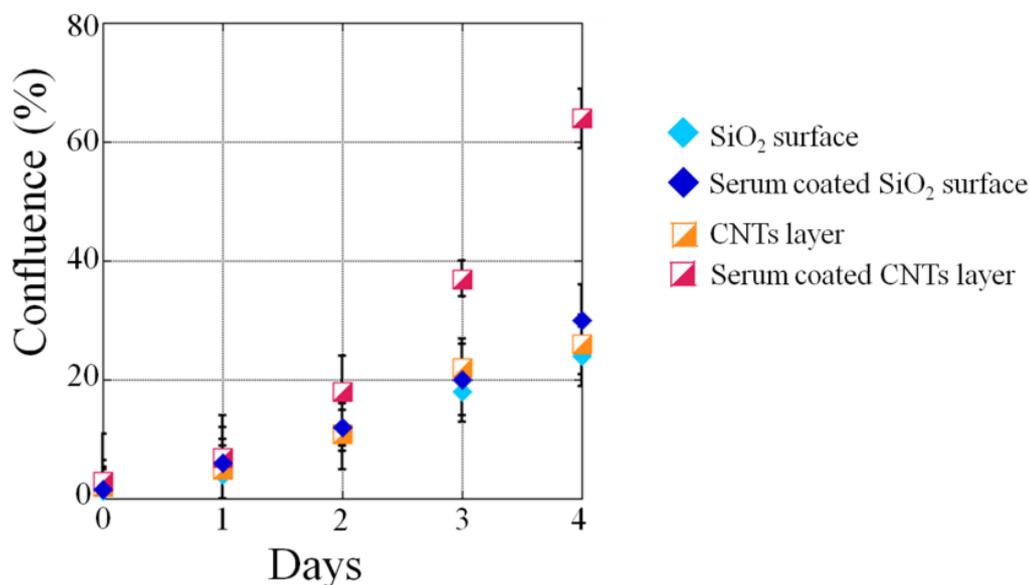


Figure 98 : évolution de la densité cellulaire (exprimée en pourcentage de confluence) au cours du temps pour des cultures de cellules neuro2a réalisées sur différentes surfaces, avec et sans incubation préalable de sérum de veau fœtal.

On observe que le pourcentage de confluence augmente avec le temps pour toutes les conditions, ce qui est cohérent car les cellules se divisent. On obtient des évolutions de ce pourcentage comparables pour les deux types de surface (SiO₂ et NTCs), lorsque celles-ci ne reçoivent pas d'incubation de sérum avant la culture. En revanche, on relève une différence d'évolution marquée entre le SiO₂ et les NTCs lorsque ces surfaces reçoivent une incubation de sérum avant la culture. Ces observations confirment donc que non seulement les NTCs jouent un rôle d'éponge pour le sérum mais aussi que ce sérum « stocké » par la couche de NTCs peut être utilisé par les cellules. Il est disponible pour les cellules. On peut alors se demander si ce sérum est directement dissous dans le milieu de culture au moment de la mise en culture, ce qui amènerait à une concentration de sérum finale dans le volume du milieu plus grande, ou bien si ce sérum serait utilisé localement par les cellules. Pour aller plus loin dans l'étude de ces phénomènes, nous avons réalisé des cultures de cellules dans des milieux très pauvres en nutriments et étudié si le fait de « stocker » au préalable des nutriments dans les couches de NTCs pourrait compenser ce manque.

L'ensemble de ces résultats a été rassemblé dans une publication soumise au journal Langmuir en mai 2012.

5. Vers de nouveaux procédés de culture cellulaire sur des couches de NTCs ?

5.1. Utiliser une couche de NTCs pour la culture de cellules en milieu pauvre en nutriments ?

Suite aux études présentées précédemment, nous avons vu que la couche de NTCs peut servir efficacement de « réservoir » pour des nutriments utilisés de manière routinière pour nourrir des cellules en culture. Nous avons souhaité étudier si cet effet « réservoir » peut être mis à profit pour compenser un manque dans un milieu de culture et ainsi créer localement un environnement permissif au développement cellulaire. Nous savons que si des cellules sont cultivées dans un milieu pauvre en nutriments, leur viabilité diminue. L'incubation préalable de nutriments sur les couches de NTCs peut-elle être une solution pour permettre la survie et la croissance des cellules dans un milieu non favorable ?

Pour répondre à cette question, nous avons cultivé des cellules neuronales humaines de la lignée « Luhmes » dans un milieu appauvri sur des couches de NTCs pré-incubées ou non avec des nutriments. Nous avons ensuite quantifié le nombre de cellules ayant adhéré et le pourcentage de différenciation pour chaque condition de culture.

Le protocole de culture des cellules neuronales Luhmes est détaillé en annexe 3. Pour cultiver ces cellules, il est nécessaire de recouvrir au préalable toutes les surfaces de culture par des protéines de la matrice extracellulaire : polylysine (PLL) et laminine. Sans cette application, aucune cellule n'adhérerait sur les surfaces de culture²⁴.

Dans cette étude, nous comparons les résultats obtenus sur des couches de NTCs à des résultats obtenus sur des surfaces de PDMS pour des mêmes conditions de culture. Nous avons choisi le PDMS comme surface de référence car nous connaissons bien le comportement des cellules « Luhmes » sur ce matériau.

Les critères que nous prenons en compte et quantifions dans nos expériences sont :

- le nombre de cellules ayant adhéré
- le pourcentage de différenciation

Pour voir si le fait d'incuber des nutriments sur une couche de NTCs peut compenser un manque de nutriments dans le milieu de culture, nous avons réalisé des cultures dans les conditions suivantes :

- échantillons a : culture en milieu normal sur couche de NTCs et sur PDMS. Le milieu dit « normal » contient des nutriments, à une concentration de 1 :50 en volume.

²⁴ Nous avons pu observer que les NTCs sans l'incubation de protéines ne permettent pas l'adhérence des cellules Luhmes.

- échantillons b : culture en milieu pauvre en nutriments sur couche de NTCs et sur PDMS. Le milieu dit « pauvre » contient des nutriments, à une concentration de 1 :250 en volume, soit 5 fois moins concentré que le milieu « normal ».

- échantillons c : culture en milieu pauvre en nutriments sur couche de NTCs et sur PDMS (concentration en nutriments : 1 :250 en volume), en ayant au préalable incubé des nutriments sur les surfaces (la concentration des nutriments pour l'étape d'incubation sur les surfaces est de 1 :10 en volume).

La Figure 99 compare le nombre de cellules ayant adhéré sur une surface de PDMS et sur une surface de NTCs. La Figure 100 présente des images des surfaces de PDMS et de NTCs après avoir réalisé la culture et les marquages immunofluorescents. Sur ces images, prises au microscope optique à fluorescence, les noyaux sont marqués en bleu (Dapi), l'actine apparaît en rouge (phalloïdine couplée au fluorophore Alexa 546nm) et les neurofilaments (Tuj-1) en vert (fluorophore Alexa488nm). D'après la Figure 99 et la Figure 100a, on observe que le nombre de cellules ayant adhéré est comparable pour les deux types de surface. Les pourcentages de différenciation obtenus sont de 100% sur les deux types de surface. Ce pourcentage de différenciation est cohérent car dans de bonnes conditions de culture, il a été décrit que les cellules de la lignée Luhmes se différencient à 100% en neurones [184]. Ces résultats montrent que le PDMS est une bonne surface de référence pour mener notre étude.

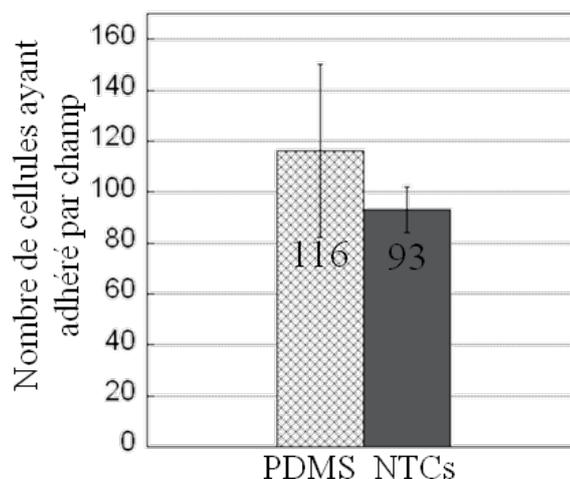


Figure 99 : **comparaison du nombre de cellules ayant adhéré par champ d'observation (0.6mm²) et du pourcentage de différenciation, en conditions de culture « normales » sur PDMS et sur couche de NTCs. Nombre de cellules moyen ayant adhéré par champ.** Pour permettre l'adhérence des cellules, les deux surfaces ont reçu avant la culture une incubation de polylysine et de laminine. Les barres d'erreur représentent l'écart type. Les résultats présentés ont été obtenus en analysant 5 champs d'observation pour trois échantillons issus d'expériences indépendantes.

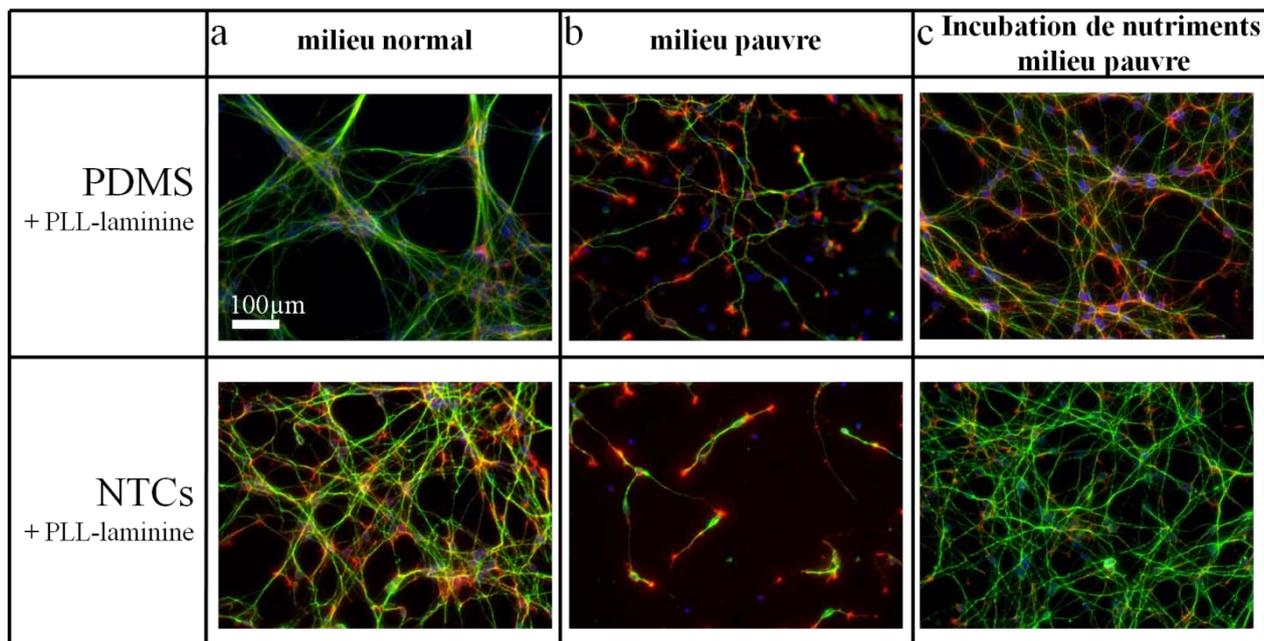


Figure 100 : Résultats représentatifs des cultures réalisées pour tester l'influence des couches de NTCs. Sur toutes les surfaces, des protéines de la matrice extra-cellulaire (Polylysine (PLL) et laminine) ont été déposées pour favoriser l'adhérence des cellules « Luhmes ».

La Figure 100b et c montre des images représentatives de chaque condition. On observe que, comparativement avec la culture en milieu normal (colonne a de la Figure 100), lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu pauvre, le nombre de cellules ayant adhéré sur les surfaces diminue. Cette diminution est aussi bien relevée pour le PDMS que pour les NTCs. Cependant, l'effet de l'appauvrissement du milieu sur le nombre de cellules ayant adhéré est plus marqué pour la surface de NTCs (diminution de 70% sur les NTCs contre 45% sur le PDMS).

La culture en milieu pauvre affecte également la différenciation des cellules. Le pourcentage de différenciation est de 100% lorsque la culture est réalisée dans un milieu comportant des nutriments à concentration normale, il descend en dessous de 75% lorsque la culture est réalisée dans un milieu pauvre en nutriments (voir Figure 101). Les neurites développés sont moins nombreux et moins longs.

Intéressons nous maintenant à ce qu'il se passe lorsqu'on incube des nutriments sur les surfaces de culture, avant le début de la culture. La Figure 101 rassemble les résultats des quantifications effectuées pour chaque condition de culture. Lorsque l'on incube les nutriments sur les surfaces de culture avant de réaliser la culture en milieu pauvre, on observe que :

- sur le PDMS, l'effet de l'incubation de nutriments n'a pas d'effet sur le nombre de cellules ayant adhéré par champ. Cette incubation améliore cependant le pourcentage de différenciation : il passe de 75% à 95%.

- sur les NTCs, l'effet de l'incubation de nutriments est en revanche très marqué. Le nombre de cellules ayant adhéré par champ passe de 28 à 156. Dans le même sens, le pourcentage de différenciation augmente de 72% à 100%.

Cela montre que les NTCs servent de réservoir pour les nutriments et que ces nutriments sont disponibles pour les cellules lors de leur développement.

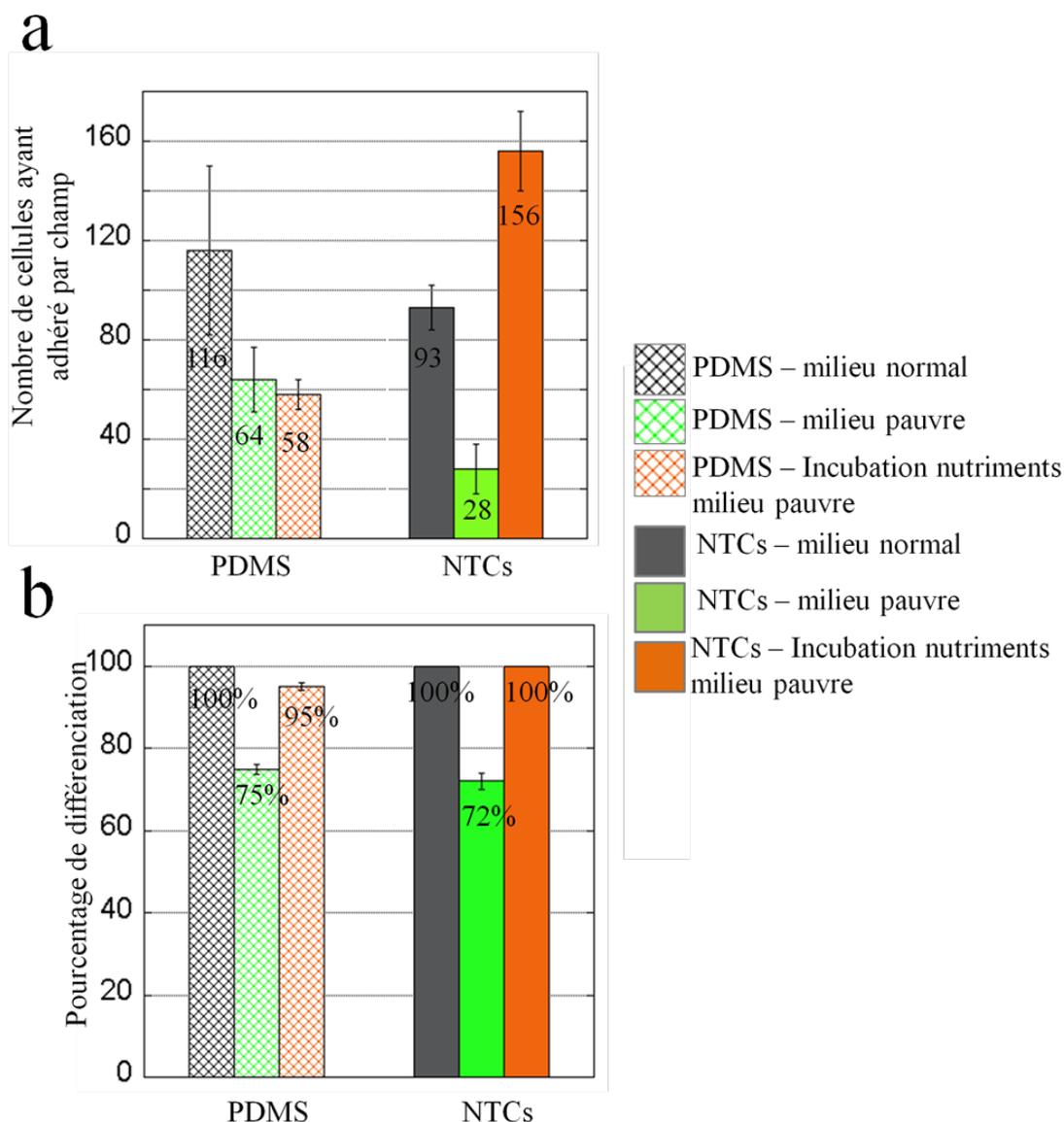


Figure 101 : Résultats des quantifications sur le nombre de cellules ayant adhéré (a) et leur différenciation (b). Les valeurs moyennes présentées pour chaque condition sont le résultat de l'observation de cinq champs pour trois échantillons issus de trois expériences indépendantes.

Toutes ces observations montrent bien que les couches de NTCs peuvent agir comme des réservoirs, assimilables à des éponges, capables de stocker puis de mettre à disposition des cellules adhérentes des nutriments indispensables à leur développement. Ces réservoirs de nutriments sont localisés sur la surface, en contact avec les cellules.

La Figure 101 met également en évidence que, sur la couche de NTCs, le nombre de cellules ayant adhéré est plus grand pour une culture réalisée en milieu pauvre sur une couche de NTCs contenant des nutriments que pour une culture réalisée avec un milieu normal. Le réservoir de NTCs ne contient pourtant pas autant de nutriments que le volume total du milieu de culture. Cependant, les nutriments qui sont dans la couche de NTCs sont directement au contact des cellules et nos résultats nous amènent à faire l'hypothèse que les cellules pourraient ainsi mieux les utiliser. Les nutriments de la

couche de NTCs seraient plus « disponibles » que ceux présents dans le volume du milieu de culture²⁵ (voir schéma c de la Figure 102).

En revanche, nous avons observé que lorsque le milieu est pauvre en nutriments, le nombre de cellules ayant adhéré est significativement plus bas. Nous pourrions alors faire l'hypothèse que les couches de NTCs n'adsorbent pas suffisamment de nutriments (car il y a peu de nutriments disponibles dans le milieu pauvre) pour devenir favorables pour la croissance des cellules.

Le fait que les NTCs soient très favorables pour le développement des neurones lorsque ceux-ci sont chargés de nutriments et peu favorables lorsque ceux-ci sont dépourvus de nutriments montrerait que c'est bien la propriété d'adsorption et le rôle de réservoir qui est mise majoritairement en jeu dans les interactions entre les cellules et les NTCs (et non leurs propriétés intrinsèques telles que la conductivité, la rugosité, la dureté).

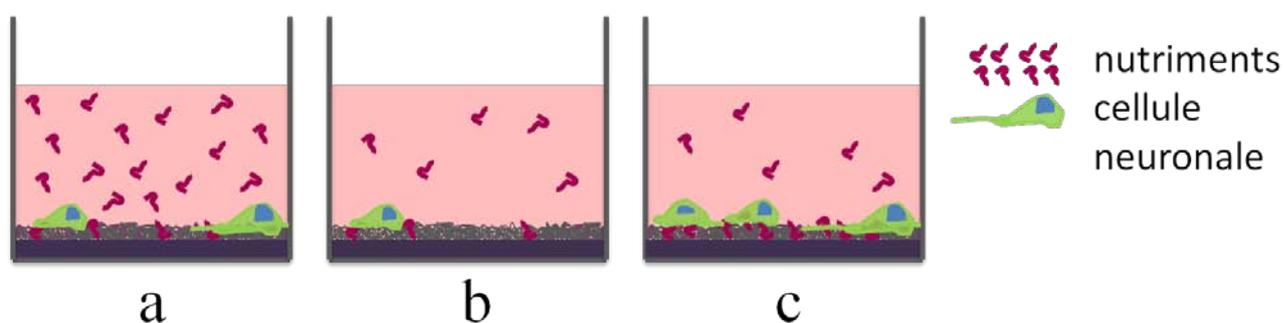


Figure 102 : Schéma résumant les résultats de culture obtenus et les hypothèses formulées sur couches de NTCs. **a : culture réalisé avec un milieu ayant une concentration « normale » en nutriments.** Une partie de ces nutriments s'adsorbe sur la couche de NTCs. Les cellules se développent normalement. **b : Culture réalisée en milieu « pauvre » en nutriments.** Il y a peu de nutriments dans le milieu et par conséquent très peu de nutriments adsorbés sur la couche de NTCs. La densité cellulaire et le pourcentage de différenciation sont faibles. **c : culture réalisée en milieu « pauvre » en nutriments mais la couche de NTCs a reçu au préalable une incubation de nutriments.** Ceux-ci se sont adsorbés sur la couche de NTCs et sont « disponibles » pour les cellules. La densité cellulaire et le pourcentage de différenciation sont très élevés.

Nous avons ainsi démontré que l'incubation de nutriments sur une couche de NTCs est une solution lorsque l'on souhaite améliorer l'adhérence et le développement de cellules neuronales.

5.2. Utiliser une couche de NTCs pour améliorer la différenciation des cellules souches adultes humaines ?

Les cellules souches adultes humaines du cerveau, présentes chez tout individu, peuvent se différencier en plusieurs types de cellules nerveuses, dont les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes. Elles apparaissent comme ayant un grand intérêt thérapeutique pour remplacer par exemple des neurones du cerveau qui auraient été détruits.

²⁵ Nous avons montré par analyse QCM que les nutriments adsorbés dans les couches de NTCs ne se dissolvent pas dans le milieu de culture, pendant les 16 premières heures de culture.

Nous avons montré précédemment (voir chapitre 2) que lorsque ces cellules sont mises en culture sur des surfaces microstructurées, elles interagissent fortement avec les surfaces. Nous avons mis en évidence que les paramètres topographiques de la surface influencent significativement le taux de différenciation des cellules souches en neurones.

Par ailleurs, nous venons de voir que les couches de NTCs sont des surfaces favorables pour le développement des neurones, issus de différentes lignées d'origine murines ou humaines. Par conséquent, il est légitime de s'interroger sur l'effet que pourraient avoir les couches de NTCs sur le comportement des cellules souches adultes humaines.

L'étude des interactions entre des NTCs et des cellules souches est récente. La croissance et la différenciation de cellules souches neurales de souris sur des surfaces comportant des NTCs a été démontrée pour la première fois en 2007 par Jan et Kotov[128]. Une autre étude a montré que des surfaces de culture comportant des polymères greffés à des NTCs ont pour effet d'augmenter la différenciation de cellules souches humaines embryonnaires en neurones, par rapport à une surface de poly-L-ornithine, utilisée habituellement pour la culture de ces cellules [185]. Des travaux postérieurs ont montré que les NTCs déposés sur la surface de culture influencent aussi le comportement de cellules souches mésenchymateuses [186]. Leur prolifération est augmentée. Les auteurs suggèrent que la nanotopographie des NTCs pourrait jouer un rôle dans la régulation de la différenciation de ces cellules. L'ensemble de ces résultats démontrent que les NTCs peuvent servir de surface permissive pour la différenciation de cellules souches.

Cependant, à notre connaissance, il n'existe aucune étude qui reporte l'effet des NTCs sur la croissance et la différenciation de cellules souches adultes humaines.

Nous présentons dans ce paragraphe les études que nous avons menées et les résultats obtenus pour des cellules souches adultes humaines cultivées sur nos couches de NTCs.

Pour cette étude, nous avons cultivé des cellules souches adultes humaines sur des surfaces planes de PDMS et sur des surfaces planes de PDMS recouvertes d'une couche continue et dense de NTCs. Les couches de NTCs ont toutes une épaisseur de 100 ± 10 nm. La surface de PDMS a été choisie comme surface de référence car nous avons déjà montré que les cellules souches se développent bien sur le PDMS (voir paragraphe paragraphe 2.3, page 86).

Les couches de NTCs ont été réalisées en employant la méthode de pulvérisation que nous avons développée, en suivant le protocole décrit dans l'annexe 5.

Pour mémoire, pour assurer l'adhérence des cellules souches sur les surfaces de culture, il est nécessaire de les recouvrir avec de la polylysine et de la laminine, avant de débiter la culture.

Les cultures sont maintenues pendant 7 jours après avoir induit leur différenciation. Nous réalisons ensuite des marquages immunofluorescents des populations de cellules neurales obtenues après la différenciation des cellules souches :

- les neurones sont repérés s'ils expriment la bêta-III tubuline, qui est une protéine structurale des microtubules neuronaux. Le fluorophore utilisé est Alexa-546nm (apparaît en rouge sur les images).

- les astrocytes sont repérés s'ils expriment la protéine GFAP (glial fibrillary acidic protein), un des composants de leurs filaments intermédiaires. Le fluorophore utilisé dans ce cas est Alexa-488nm (apparaît en vert sur les images)

- tous les noyaux cellulaires sont repérés en utilisant le marqueur nucléaire DAPI (apparaît en bleu sur les images).

La Figure 103 montre des images prises au microscope optique à fluorescence des cultures sur PDMS (a) et sur PDMS recouvert d'une couche de NTCs (b), après 7 jours de différenciation. Les cellules qui apparaissent en rouge et en vert sont les cellules qui se sont différenciées, respectivement en neurones et en astrocytes.

Pour mettre en évidence les effets des NTCs sur la culture des cellules souches, nous avons observé et quantifié les paramètres suivants :

- **la densité de cellules** ayant adhéré sur la surface, ou « densité cellulaire », que l'on exprime en nombre de cellules/mm².

- **le pourcentage de différenciation des cellules souches en neurones**. Il est calculé en divisant le nombre de neurones (cellules exprimant Tuj-1, repéré par marquage immunofluorescent et ayant des neurites plus longs que 20µm) par le nombre total de cellules (repérées par marquage des noyaux).

- **le pourcentage de différenciation des cellules souches en astrocytes**. Il est calculé en divisant le nombre d'astrocytes (cellules exprimant la GFAP repéré par marquage immunofluorescent et ayant des prolongements) par le nombre total de cellules (repérées par marquage des noyaux).

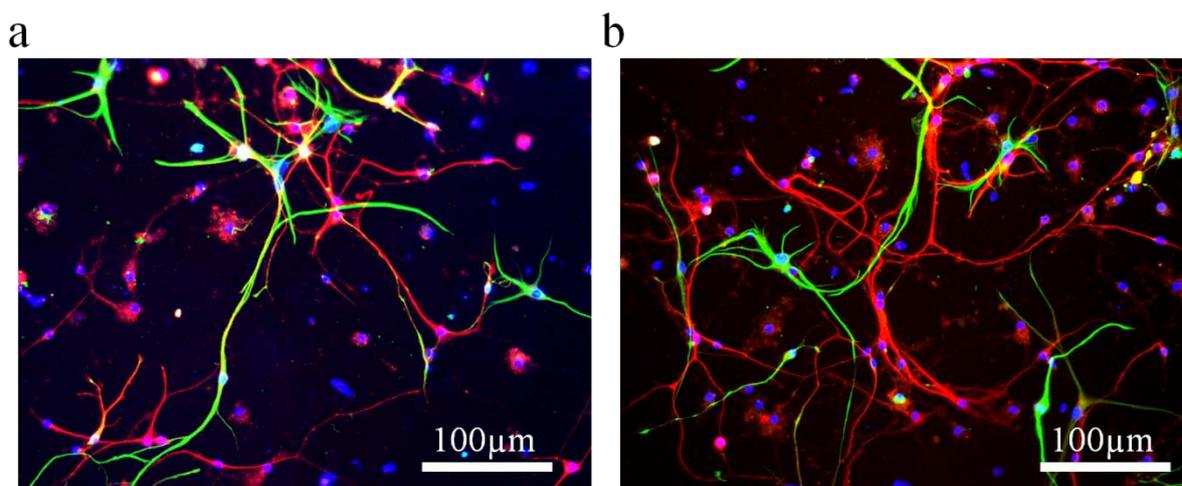


Figure 103 : Images prises au microscope optique à fluorescence des cultures de cellules souches réalisées sur PDMS (a) et sur PDMS recouvert d'une couche de NTCs de 100nm d'épaisseur. Les cellules ont été conservées en culture pendant 7 jours après avoir induit leur différenciation. La bêta-III tubuline des neurones est marquée par le fluorophore Alexa 546nm (rouge). La GFAP (glial fibrillary acidic protein) des astrocytes est marquée par le fluorophore Alexa 488nm (vert). Les noyaux cellulaires sont marqués en utilisant le DAPI (bleu).

Pour obtenir une mesure rigoureuse des effets des NTCs sur la culture des cellules souches, nous avons observé 5 champs pour chaque échantillon, et répété les expériences 3 fois en utilisant des cellules souches provenant de 3 biopsies différentes. Les résultats de nos quantifications sont présentés sur la Figure 104. On observe que les NTCs n'ont pas d'influence significative sur la densité des

cellules ayant adhéré sur la surface. En ce qui concerne la différenciation des cellules souches neurales, on relève une légère augmentation du pourcentage de différenciation en neurones lorsque la culture est réalisée sur la couche de NTCs. On remarque aussi que sur la couche de NTCs, le pourcentage de différenciation en astrocytes diminue. Il s'élève à $7.9 \pm 0.7\%$ sur la surface de PDMS alors qu'il n'est que de $4.5 \pm 0.8\%$ sur la couche de NTCs. Il semble donc qu'il y ait un effet en faveur de la différenciation neuronale par rapport à la différenciation en astrocytes. Cet effet devra être confirmé en augmentant le nombre d'échantillons.

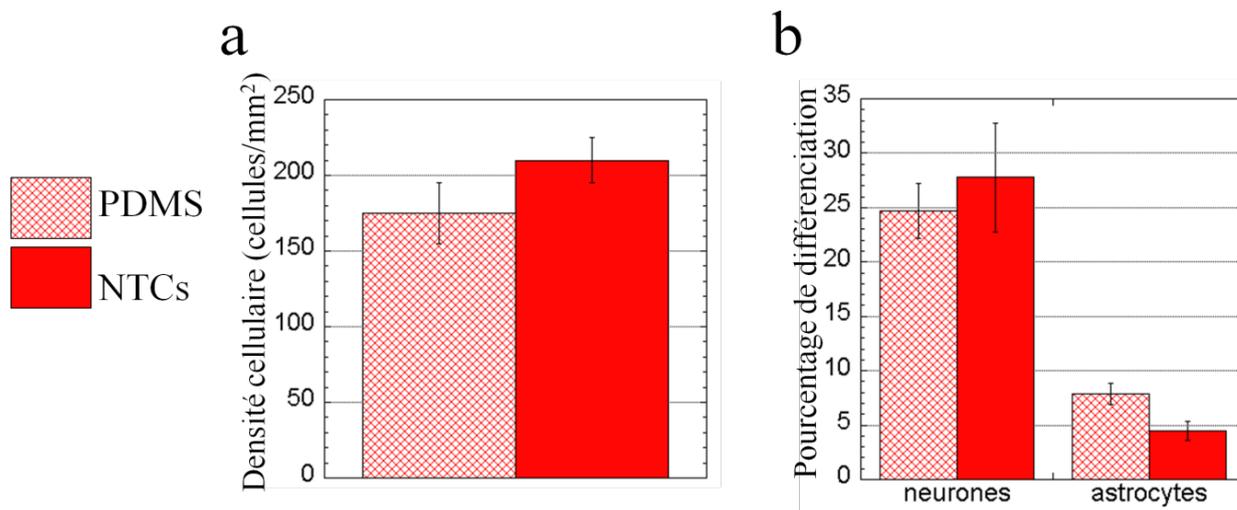


Figure 104 : Graphes représentant la densité cellulaire et le pourcentage de différenciation des cellules souches en neurones et en astrocytes, obtenus sur surface de PDMS et sur couche de NTCs. Résultats issus de l'observation de 5 zones différentes pour chaque échantillon, issus de 3 expériences indépendantes. Les valeurs reportées sont les moyennes obtenues, ainsi que les écarts types standards.

Des effets similaires ont déjà été observés lors de la culture de lignées d'astrocytes [187]. D'autres études qui utilisent des cellules primaires de l'hippocampe de rats [129] ou bien des cellules embryonnaires de rats ont montré que le pourcentage d'astrocytes dans les cultures n'augmentait pas lors de la culture sur NTCs. L'utilisation des NTCs pourrait donc réduire la formation de tissus cicatriciels astrocytaires. Cela est particulièrement intéressant pour des applications *in vivo*, pour intégrer des NTCs à la surface d'électrodes ou d'implants [135], [169], [188]. Dans notre étude, nous utilisons des cellules qui sont présentes dans le cerveau humain. Cette étude *in vitro* permet donc de se rapprocher de la situation réelle dans le cerveau.

- Arborisation des neurones obtenus par différenciation de cellules souches adultes humaines sur couche de NTCs.

Précédemment, nous avons montré que les NTCs ont un effet sur le nombre de neurites développé par des neurones issus de la lignée de souris « neuro2a » (voir paragraphe 3.1 « Effet des couches de NTCs sur le développement de cellules neuronales issues de la lignée « neuro2a », page 121). Nous nous demandons si cet effet est générique et s'il pourrait être également observé avec les neurones issus de la différenciation de cellules souches humaines. Pour répondre à cette interrogation, nous avons quantifié la proportion de neurones qui ont développé 1 ou 2 neurites, la proportion de neurones

qui ont développé 3 ou 4 neurites et la proportion de neurones qui ont développé au moins 5 neurites. La Figure 105 présente les résultats obtenus sur PDMS (surface référence) et sur couche de NTCs de 100nm d'épaisseur.

On relève que sur la surface de PDMS, une grande majorité des neurones possède 1 ou 2 neurites (62%), alors que cette morphologie ne concerne que pour 23% des neurones lorsque ceux-ci sont cultivés sur la couche de NTCs. Sur la couche de NTCs, la grande majorité des neurones possède 3 ou 4 neurites (68% sur NTCs contre 38% sur PDMS). De plus, 9% des neurones ont au moins 5 neurites sur NTCs alors qu'aucun neurone possédant une telle morphologie n'a pu être observé sur la surface de PDMS.

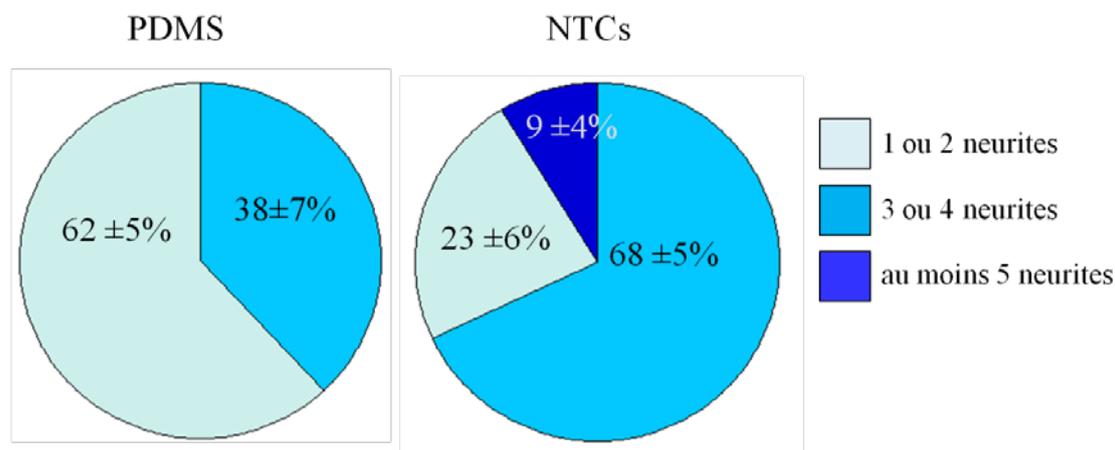


Figure 105 : Diagrammes représentant la proportion de neurones ayant développé 1 ou 2 neurites, 3 ou 4 neurites ou bien au moins 5 neurites, sur une surface de PDMS et sur couche de NTCs (épaisseur=100±10nm) après 7 jours de culture en phase de différenciation.

Les NTCs favorisent donc significativement le développement des neurites des neurones. Pour aller plus loin dans ces observations, nous avons étudié l'arborisation développée par les neurones. Nous calculons le pourcentage de neurites ayant des « ramifications » secondaires (cf. schéma ci-dessous). Il est calculé en dénombrant le nombre de neurites présentant au moins une ramification secondaire et en le rapportant au nombre total de neurites.

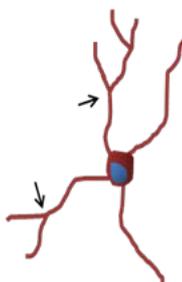


Figure 106: schéma pour la quantification des ramifications secondaires. Les flèches indiquent les ramifications secondaires, éléments quantifiés.

Le graphe de la Figure 107 compare le pourcentage de ramifications secondaires observé pour une surface de PDMS et pour une couche de NTCs.

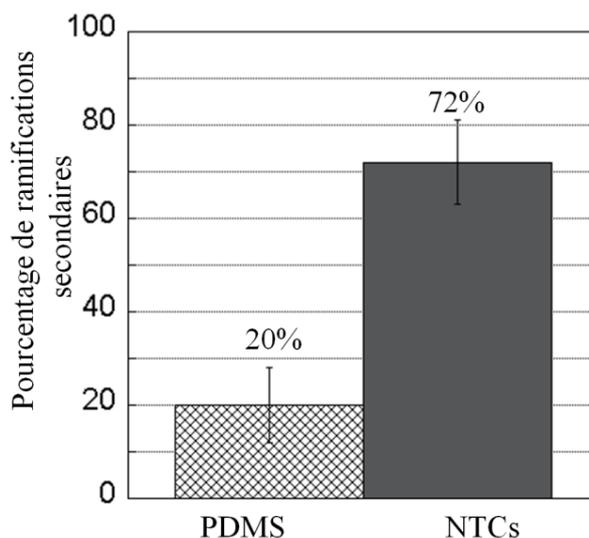


Figure 107 : Graphe représentant le pourcentage de ramifications secondaire des neurones obtenu pour une culture réalisée sur une surface de PDMS et pour une culture réalisée sur couche de NTCs (épaisseur= $100\pm 10\text{nm}$). Analyse de trois expériences indépendantes.

On observe une différence très significative entre les deux types de surface. Sur les NTCs, 72% des neurites ont au moins une ramification secondaire. Sur une surface de PDMS, seulement 20% des neurites ont au moins une ramification secondaire.

L'ensemble de ces résultats montre clairement que les neurones ont une arborisation plus développée sur la couche de NTCs que sur la surface de PDMS référence. Nous nous sommes interrogés sur les raisons d'une telle différence. Pour essayer de comprendre l'origine de ces effets, il faut remonter encore une fois aux mécanismes qui guident la croissance des neurites.

Lors du développement neuritique, le cône de croissance donne l'impression de chercher activement les indices susceptibles de guider les étapes suivantes de sa croissance. Ces indices sont chimiques, ils comprennent un grand nombre de molécules, dont les molécules d'adhérence cellulaire ou les molécules d'adhérence de la matrice extracellulaire, dont par exemple la laminine. Pour rappel, c'est avec cette molécule que nous recouvrons toutes les surfaces de nos échantillons pour favoriser l'adhérence des cellules souches que nous cultivons. Ces indices envoient un signal de feedback positif au cône de croissance, qui interagit avec des molécules de signalisation cellulaire. Ces molécules déclenchent une cascade de réactions qui commandent la croissance et le guidage du neurite, dans la direction de présence de ces indices.

Nous avons constaté que sur les NTCs, les neurones développent de plus nombreux neurites, qui ont en plus une arborisation plus complexe que sur le PDMS. La rugosité des NTCs participe certainement

à envoyer des signaux de feedback positifs aux cônes de croissance. Le cône de croissance envoie des filopodes dans toutes les directions. Ces derniers seraient sensibles à la topographie des faisceaux de NTCs et auraient tendance à les suivre. Les faisceaux de NTCs étant partout présents sur la surface, ils créent de nombreuses occasions (opportunités) pour les filopodes d'enclencher la formation et la croissance de neurites. Le même mécanisme peut être mis en jeu pour la formation des ramifications secondaires.

Mais on peut aussi se demander si les NTCs ne seraient pas indirectement mis en cause dans ces interactions. Nous avons déjà observé précédemment que les NTCs interagissent avec les entités du milieu. Nous avons montré que ces entités chimiques s'adsorbent davantage sur les NTCs que sur le dioxyde de silicium (voir paragraphe 4, page 126). Pour tenter d'observer l'adsorption de protéines sur les couches de NTCs, nous avons incubé pendant 20 minutes une solution de PBS contenant des protéines à une concentration de 10 μ g/mL (des anticorps monoclonaux de chèvre, pour des raisons de disponibilité pratique) sur une couche de NTCs. La Figure 108 montre des images AFM de couches de NTCs sans incubation de protéines (colonne de gauche) et de couches de NTCs après avoir incubé et laissé séché une gouttelette de 50 μ L d'une solution contenant des anticorps monoclonaux de chèvre, à une concentration de 10 μ g/mL (colonne de droite). On observe que les NTCs forment des faisceaux, non organisés dans le tapis de NTCs (voir en particulier les images a2). Après l'incubation de protéines, on observe clairement que ces faisceaux semblent « décorés » par des petits agrégats d'environ 50nm de taille et de 20nm de haut. Ces agrégats sont attribués à l'adsorption de protéines sur la surface. Ces résultats d'AFM semblent donc montrer que l'adsorption des protéines sur nos tapis de NTCs n'est pas homogène, et que les protéines « décorent » les faisceaux de NTCs, laissant apparaître de nombreux embranchements à l'échelle nanométrique (entre 50 et 100nm). Ainsi, il est possible d'envisager que les filopodes du cône de croissance reçoivent de multiples signaux d'embranchement directement liés à la morphologie des faisceaux de NTCs constituant le tapis, ces signaux pouvant être médiés par l'adsorption préférentielle de la poly-lysine et de la laminine sur les NTCs.

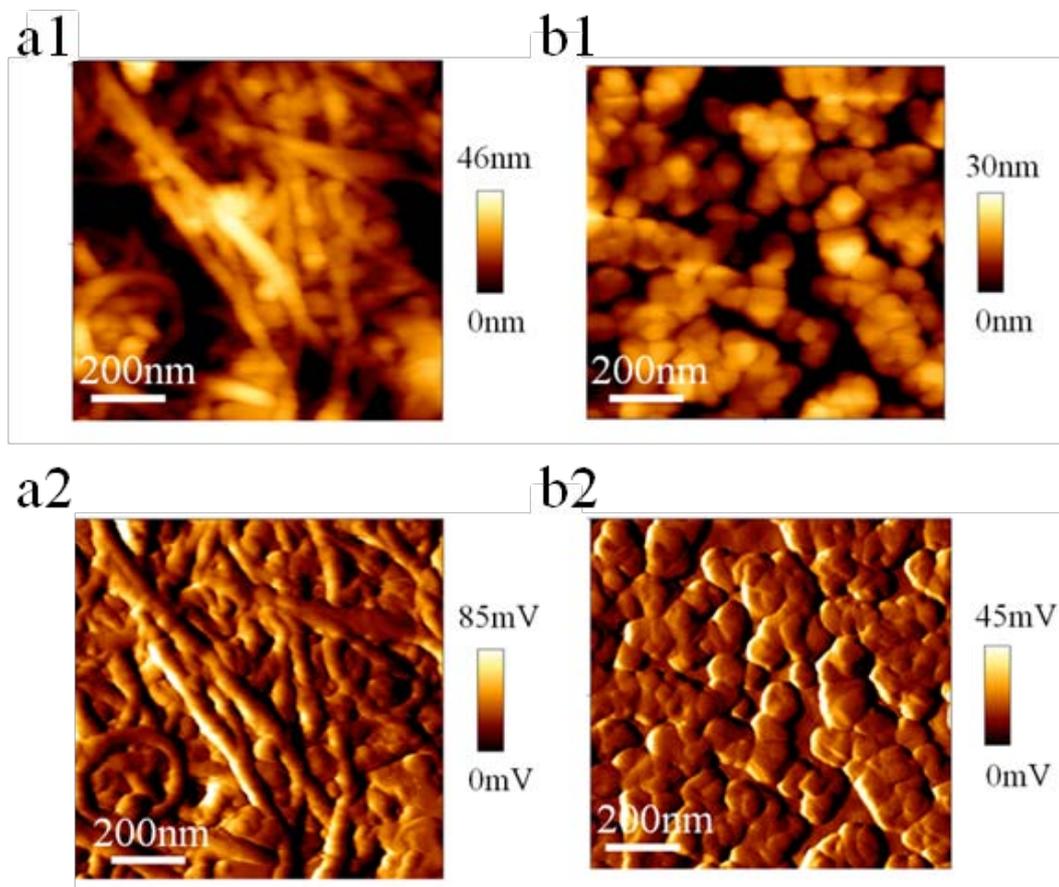


Figure 108 : Images prises au microscope à force atomique de tapis de NTCs sans incubation de protéines (colonne de gauche) et avec une incubation de protéines (colonne de droite). Anticorps monoclonaux de chèvre dilués à une concentration de 10 μ g/mL dans du PBS) pendant 20 minutes. a1 et b1 : images de topographie, a2 et b2 : images du signal d'erreur.

Ainsi, la nanotopographie due aux faisceaux de NTCs et aux NTCs coïnciderait donc avec une plus grande présence de protéines. Dans le cas de la culture des cellules, ces protéines peuvent être des molécules d'adhérence déposées pour améliorer l'adhérence des cellules (laminine) ou bien des facteurs de croissance contenu dans le milieu de culture. L'adsorption de ces molécules le long des faisceaux de NTCs induirait des feedbacks positifs pour le cône de croissance en exploration. Cela amènerait à la génération des neurites et des ramifications secondaires. Les NTCs pourraient ainsi avoir un rôle indirect sur l'arborisation neuritique, via leur nanotopographie et l'adsorption de protéines.

Quelle influence peut avoir le nombre de neurites d'un neurone d'un point de vue biologique et fonctionnel ? In vivo, la gamme des configurations neuritiques que l'on peut trouver est très vaste. Elle va d'une petite minorité de cellules complètement dépourvues de neurites jusqu'à des neurones dont l'arborisation est comparable à celle de la ramure d'un arbre. Le nombre d'afférences que reçoit un neurone dépend de la complexité de son arborisation. Plus les neurones ont une arborisation complexe,

plus les fibres afférentes²⁶ qui les innervent sont nombreuses. Les cellules nerveuses qui n'ont pas de neurites ne sont innervées que par un petit nombre d'autres neurones, voire par un seul. En revanche, celles dont l'arborisation est plus élaborée, reçoivent une innervation d'un nombre de neurones nettement plus important.

En favorisant une arborisation neuritique plus complexe, les NTCs permettraient peut être ainsi de favoriser la communication au sein d'un réseau de neurones. Cette question pourrait être étudiée en réalisant et comparant des mesures de l'activité neuronale de réseaux neuronaux mis en culture sur une surface contrôlée et sur une couche de PDMS.

5.3. Utiliser une couche de NTCs pour améliorer la fonctionnalité de réseaux neuronaux et sa mesure ?

D'après la littérature, les NTCs apparaissent comme un moyen prometteur pour améliorer les performances d'électrodes neurales [189]. En effet, des études ont montré que l'activité neuronale peut être stimulée et enregistrée via des substrats de NTCs. Les interactions entre les neurones et les NTCs ont montré une amélioration de la transmission des signaux neuronaux [190], une stimulation plus efficace [133], [191], [129] et ont également permis l'amélioration du rapport signal sur bruit lors des enregistrements [121]. Cependant, les propriétés des NTCs utilisés pour ces études sont différentes d'une étude à une autre. Par exemple, les NTCs peuvent être utilisés tels quels ou bien avoir reçu une fonctionnalisation chimique [131], [128], ils peuvent être simple paroi ou bien multi-parois ([192], pour revue).

Constatant cette diversité et la variabilité des réponses cellulaires associée, nous avons souhaité étudier l'effet de nos couches de NTCs sur la fonctionnalité de réseaux neuronaux. Pour cela, nous avons développé une collaboration avec l'unité de recherche exploratoire de l'entreprise pharmaceutique Sanofi, en particulier avec le docteur Christophe Lanneau de l'équipe « pharmacologie in vitro », qui utilise et développe différentes techniques d'électrophysiologie. Ensemble, nous avons choisi de mettre en œuvre la technique d'enregistrement électro physiologique dite par matrice de micro-électrodes (en anglais, « multi electrode array » (MEA)) pour étudier la fonctionnalité électrique de réseaux de neurones. Cette technique a fait son apparition dans les années 1970 et constitue aujourd'hui une méthode performante pour la compréhension et l'analyse du système nerveux central. Elle présente les avantages d'être simple à mettre en œuvre et de pouvoir stimuler et enregistrer l'activité d'un réseau de neurones sur de longues durées. On obtient ainsi une information globale pour un grand nombre de cellules et non pas une information très localisée, pour une cellule unique, comme c'est le cas dans la technique de patch clamp²⁷.

²⁶ Les fibres afférentes reçoivent les stimuli par leurs récepteurs sensoriels et transmettent les informations perçues au système nerveux central pour que ces informations y soient traitées (l'information vient des organes et remonte au cerveau).

²⁷ La technique de « patch clamp » permet de mesurer les courants ioniques circulant au travers de la membrane cellulaire. Son principe consiste à isoler électriquement un morceau de membrane ("patch") et à lui imposer un potentiel ("clamp") afin de mesurer le courant généré par les flux d'ions. Son principe est simple, sa mise en œuvre est beaucoup plus complexe et requiert un équipement lourd ainsi qu'un expérimentateur qualifié.

Pour étudier l'effet de nos couches de NTCs sur la fonctionnalité de réseaux neuronaux, nous avons déposé des couches de NTCs sur des puces de « MEA » et réalisé des cultures de neurones sur ces puces. Dans la suite de ce paragraphe, nous expliquons ce qu'est le potentiel d'action d'un neurone et comment il est mesuré dans la technique de MEA. Nous présentons ensuite les expériences que nous avons réalisées pour étudier l'effet de nos couches de NTCs sur l'émission de potentiels d'action par des cellules neuronales primaires de rats.

a. La génération d'un potentiel d'action et mesure par MEA

Les cellules nerveuses sont à l'origine de signaux électriques que l'on nomme potentiel d'action. Pour communiquer, les cellules nerveuses utilisent un système de transmission électrique basé sur des flux d'ions (pour un canal ionique type, le flux d'ions est de l'ordre de 10^6 ions/seconde). Toutes les cellules ont une membrane qui les entoure. Cette membrane délimite les milieux intra et extracellulaires et elle est constituée d'une double couche lipidique. La membrane des neurones est traversée par des canaux ioniques « voltages dépendants »²⁸ qui s'ouvrent et se ferment. Au repos, c'est-à-dire quand il n'y a pas d'activité, les concentrations ioniques des milieux intra et extracellulaires sont différentes. Cette situation se traduit par une différence de potentiel entre les deux milieux. On nomme ce potentiel « potentiel de repos » ou « potentiel de membrane » (par convention, il est défini comme la différence de potentiel entre le milieu extracellulaire (référence) et le milieu intracellulaire). Il est de -70mV. Les potentiels électriques qui s'instaurent entre les deux côtés de la membrane des neurones sont donc dus (i) à des différences de concentration d'ions spécifiques de part et d'autre de la membrane cellulaire et (ii) à la perméabilité sélective des membranes à certains de ces ions.

L'excitation du neurone entraîne l'ouverture de canaux ioniques spécifiques. En fonction des canaux ioniques (sodiques, potassiques et canaux de fuite) qui sont ouverts, le potentiel de membrane évolue. Lorsque le potentiel de membrane est dépolarisé jusqu'à atteindre le seuil de déclenchement, qui est de 10mV à 20mV au-dessus du potentiel de repos, il y a création du potentiel d'action. Le potentiel d'action représente un changement transitoire du potentiel de repos de la membrane du neurone. L'ouverture des canaux ioniques a ainsi pour effet de créer un courant électrique dans le milieu intracellulaire (flux d'ions). La Figure 109 présente de manière schématique l'activité d'un neurone. Les courants intracellulaires (représentés en lignes pleines sur la figure) provoquent le déplacement d'ions à l'extérieur de la cellule (lignes en pointillés). Il se crée alors des lignes de courants ioniques tout autour des cellules.

²⁸ Les canaux « voltages-dépendants » s'ouvrent et se ferment en réponse à une modification du potentiel de membrane, c'est-à-dire en réponse à un changement de charges au niveau de la membrane cellulaire.

L'enregistrement de l'activité neuronale par la méthode de MEA se fait de manière extracellulaire. Lorsqu'un potentiel d'action est émis par un neurone, le champ de potentiel autour de la cellule est modifié. La variation des courants ioniques a pour effet de créer une variation de potentiel autour des cellules, qui est enregistrée par le MEA (voir Figure 109). Cette variation de potentiel est de l'ordre de la dizaine de microvolts.

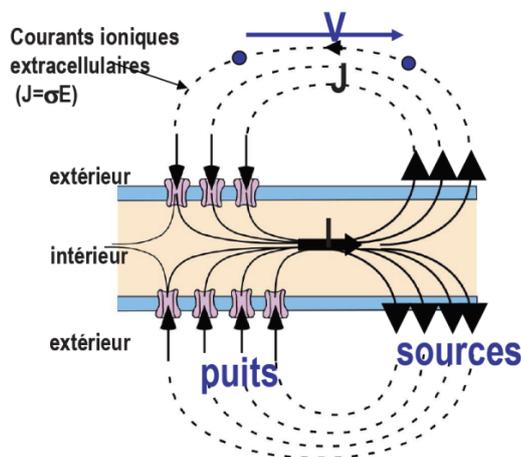


Figure 109 : **Représentation de l'activité d'un neurone.** Les courants ioniques extracellulaires, représentés par les lignes en pointillés, créent une différence de potentiel autour de la zone d'échange d'ions (flèche bleue).

La technique de mesure par MEA permet de stimuler les réseaux neuronaux en injectant du courant au moyen d'électrodes. Ces électrodes dites « de stimulation » sont situées sur la puce MEA. Cette stimulation engendre une modification des lignes de courant autour des cellules, et force ainsi l'ouverture ou la fermeture de canaux ioniques. Suite à ces échanges, le mécanisme ionique menant au déclenchement d'un potentiel d'action est mis en route. Cette technique permet également d'enregistrer les activités électriques qui sont spontanément émises par les réseaux neuronaux, sans stimulation extérieure volontaire.

Pour détecter et enregistrer les potentiels d'action, la technique de MEA utilise la réaction du métal qui constitue les électrodes avec le liquide physiologique (le milieu de culture des neurones). Lorsqu'un métal est plongé dans un liquide, des électrons de la bande de conduction du métal s'échangent avec le liquide et se recombinent avec les ions du liquide. Cela crée très localement une zone de charge espace, dépourvue de porteurs libres (électrons et ions). A chaque activité des neurones, les lignes de courant ionique sont modifiées (et donc aussi le potentiel local). Localement, la composition en ions du liquide est donc modifiée, ce qui entraîne une modification de la zone de charge espace. On peut finalement mesurer une variation de potentiel entre les bornes des électrodes d'enregistrements métalliques de la puce de MEA.

La puce de MEA comporte plusieurs électrodes d'enregistrements, réparties sur toute la surface du puits de culture. Le signal collecté par chaque électrode est une valeur moyenne de toutes les activités présentes autour de l'électrode. La proximité spatiale des neurones ainsi que leur contact avec les électrodes influence la qualité du signal enregistré. Le rapport signal sur bruit doit être le plus élevé possible pour détecter un maximum de signaux. Pour mieux visualiser l'importance de ces paramètres,

on peut faire l'analogie avec un microphone dans un stade: si un journaliste interviewe un joueur après un match et que le micro est proche de sa bouche, on peut entendre fortement et clairement ses commentaires. En revanche, si le micro est éloigné d'une dizaine de mètres, on entend le brouhaha de la foule, et même s'il crie, on pourra dire s'il parle ou pas mais on ne pourra pas entendre les mots qu'il prononce.

La Figure 110 présente les différents éléments du système de mesure par MEA. Il se compose des éléments suivants :

- puce MEA. Elle est généralement en verre ou en polyimide. Elle comporte la matrice d'électrodes de stimulation et d'enregistrement, réalisées le plus souvent en titane ou en nitrure de titane. Un puits de culture en plastique est collé sur la puce. On y réalise la culture de neurones en utilisant le même protocole que dans un puits « classique ». Pour isoler les pistes électriques du milieu de culture, une couche de passivation est déposée sur la puce et n'est ouverte que sur la zone terminale des électrodes (en forme de disque).

- électronique pour le traitement des signaux

- ordinateur. Un logiciel spécifique (« MC_Rack, développé par l'entreprise MultiChannelSystem) récupère les signaux et les met en forme. Le logiciel permet aussi de traiter et d'analyser les données obtenues (exemple : mesure des durées des potentiels d'action, comparaisons *etc...*).

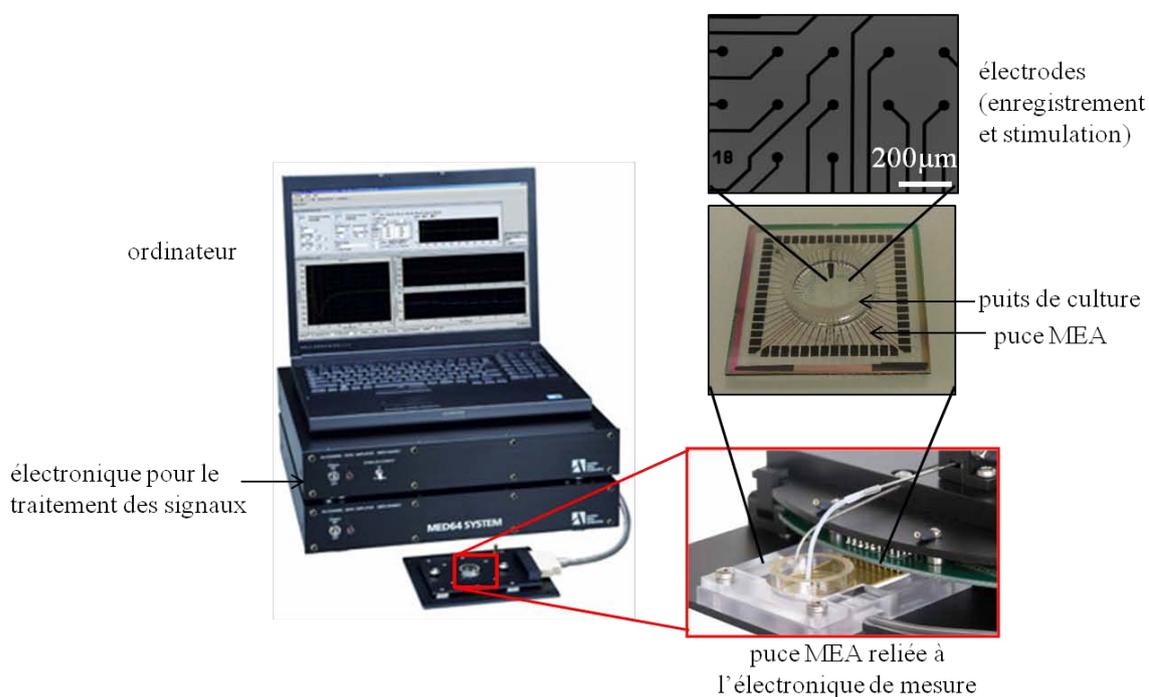


Figure 110 : **Photographies des éléments constituant un système de mesure de type MEA.** Il comprend une puce « MEA » sur laquelle se trouvent les électrodes de stimulation et d'enregistrements des signaux neuronaux. Un puits de culture en plastique est collé sur cette puce et permet de réaliser la culture des cellules directement sur les électrodes. La puce est connectée à un système électronique qui récupère et traite les signaux. Enfin, un logiciel spécialisé permet l'analyse des données. Le système utilisé dans ce travail est un système « USB-MEA32 STIM4 » développé par l'entreprise « MultiChannelSystem ».

b. Dépôt de NTCs sur des puces de MEA

Pour étudier l'effet de nos NTCs sur la fonctionnalité de réseaux neuronaux, nous avons déposé des couches de NTCs sur les puces de MEA en verre, que nous rendons hydrophiles grâce à un traitement oxydant au plasma. Pour cela, nous avons utilisé la technique de dépôt par pulvérisation que nous avons mise au point. Le protocole utilisé pour réaliser les couches de NTCs est décrit sur le tableau de la page 250 (annexe 5). La Figure 111 présente les résultats des dépôts que nous avons réalisés sur une puce de MEA. On observe que le dépôt obtenu est dense et ne présente pas de discontinuité.

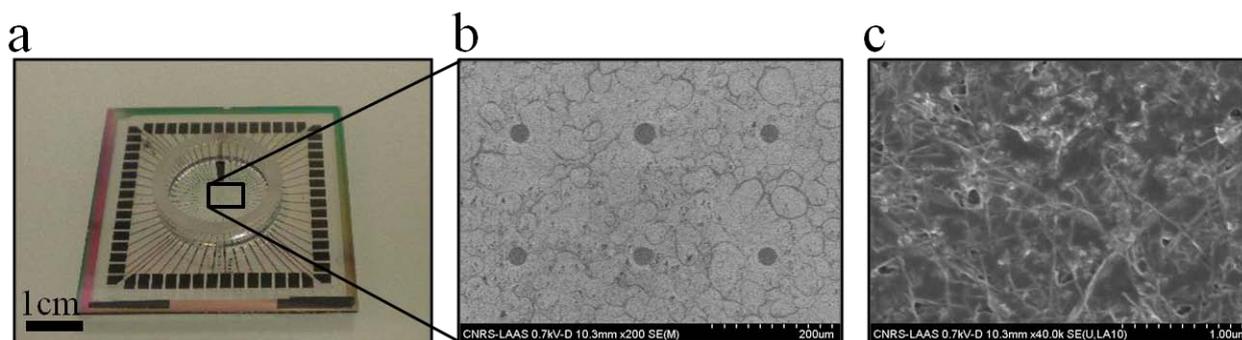


Figure 111 : **dépôt de couches de NTCs sur la puce de MEA.** a : photographie de la puce de MEA, sur laquelle est collé le puits de culture b : image MEB des électrodes sur lesquelles on a déposé une couche de NTCs. c : zoom sur une zone de la couche de NTCs.

Pour des raisons pratiques, la culture de neurones doit être réalisée à proximité du lieu de l'enregistrement. Il n'est en effet pas aisé de transporter des cellules en culture sur une puce de MEA sans risquer d'endommager la culture (risque de contamination, nécessité du maintien à température et flux de CO₂ constants). Ainsi, l'étape de culture a été réalisée par l'équipe de Christophe Lanneau, dans les laboratoires de Sanofi. Les cellules cultivées sont des neurones primaires de rats car l'équipe les utilise déjà pour réaliser des études électro physiologiques. Pour assurer l'adhérence de ces cellules sur une surface, il est nécessaire de déposer sur celle-ci de la polylysine et de la laminine avant de débiter la culture.

La Figure 112 montre des images prises au microscope optique à contraste de phase de réseaux de neurones, après 35 jours de culture. La culture a été réalisée soit sur une puce de MEA en verre ne comportant pas de NTCs (a) soit sur une puce comportant une couche de NTCs de 100nm d'épaisseur (b). Les électrodes de la puce apparaissent en noir. Les NTCs ne sont pas visibles. On observe en gris foncé les réseaux de neurones qui se sont formés. Dans le cas d'une puce de verre sans NTCs, on a relevé lors de l'observation « en direct » au microscope à contratse de phase que les neurones adhèrent mal aux électrodes de titane et ont tendance à se développer autour d'elles, à les contourner. En revanche, lorsqu'il y a une couche de NTCs sur la surface de la puce, les cellules adhèrent partout et donc aussi au niveau des électrodes. Il est toutefois difficile de distinguer ces différences sur les images de la Figure 112. Un marquage immunofluorescent de l'actine et des neurofilaments des

neurones devra être réalisé pour les prochaines expériences afin de permettre une meilleure visualisation des cellules.

L'observation du développement neuritique des réseaux neuronaux ne montre aucun effet toxique des NTCs. Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus avec les cellules de souris « neuro2a » et avec les cellules souches neurales adultes humaines.

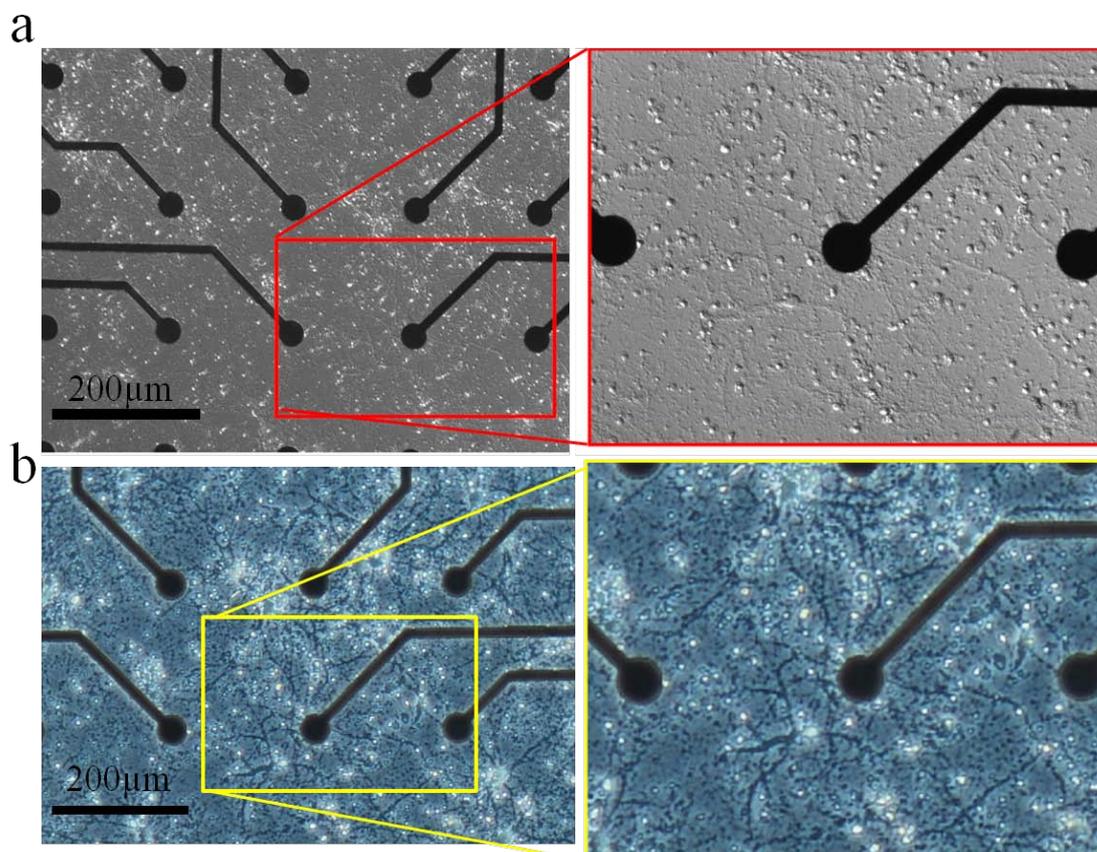


Figure 112 : Images prises au microscope optique à contraste de phase des cultures de neurones primaires de rats, réalisées sur puces de MEA, après 35 jours de culture. Les électrodes apparaissent en noir. **a** : puce de MEA de verre sans NTCs. Les neurones et les neurites apparaissent en gris clair. **b** : puce de MEA de verre recouverte d'une couche de NTCs de 100nm d'épaisseur. Les NTCs ne sont pas visibles. Les neurones et les neurites apparaissent en gris foncé.

Nous avons ensuite enregistré l'activité spontanée des réseaux neuronaux. Pour cela, aucune stimulation extérieure à la culture n'est réalisée. Le potentiel de membrane est enregistré au cours du temps. La Figure 113 présente un graphe d'enregistrement de l'évolution du potentiel de membrane au cours du temps (donc de l'activité neuronale) spontanée que nous avons obtenus pour la culture réalisée sur puce avec une couche de NTCs. On observe que le réseau neuronal présente une activité spontanée de potentiel d'action (voir flèches rouges sur la Figure 113a).

a

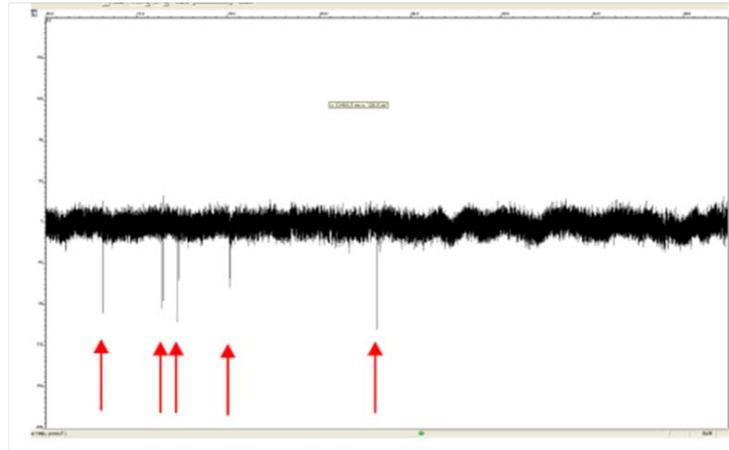


Figure 113 : évolution du potentiel de membrane au cours du temps, montrant l'activité spontanée d'un réseau de neurones, pour une puce MEA comportant une couche de NTCs d'une épaisseur de 100nm. Enregistrement montré pour une électrode. Les flèches rouges indiquent des événements correspondant à des potentiels d'action spontanés. La bande noire correspond au bruit de fond de la mesure.

Pour confirmer que cette activité est bien d'origine biologique et non un artefact de mesure, les canaux potassiques ont été volontairement bloqués, en ajoutant de la 4-Aminopyridine (4-AP) dans le milieu de culture (100 μ M pendant 10 minutes). Ce composé organique joue le rôle de bloqueur non sélectif des canaux potassiques. Son utilisation revient à induire la dépolarisation des neurones. La Figure 114 présente le graphe d'enregistrement obtenu après avoir ajouté de la 4-AP au milieu de culture dans le cas d'une puce ne comportant pas de couche de NTCs (a1) et dans le cas d'une puce comportant une couche de NTCs de 100nm d'épaisseur (b1). Après quelques minutes, on observe que l'activité spontanée du réseau neuronal est modifiée et une activité de type « burst » apparaît (encadré bleu de la Figure 114a1 et b1). On observe que lorsque la puce comporte des NTCs, les signaux sont plus « étroits », plus brefs, ce qui signifierait que la finesse de détection est améliorée en présence des NTCs.

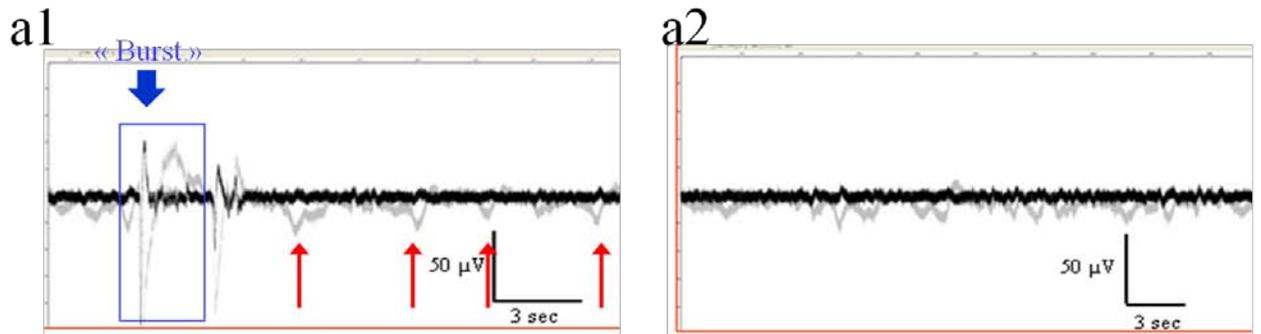
De plus, les amplitudes des événements liés à une activité spontanée du réseau sont plus grandes en présence des NTCs.

Pour démontrer l'implication des canaux sodiques dans l'activité observée, de la tetrodotoxine est ajoutée au milieu de culture, à une concentration de 0.5 μ M. La tetrodotoxine est une neurotoxine qui bloque de manière sélective le pore des canaux sodium voltage-dépendants, qui sont impliqués dans le passage des signaux neuronaux. Le résultat de ce blocage est présenté sur la Figure 114. On observe un enregistrement « plat », le signal de type « burst » a disparu. Cela prouve que l'activité observée est bien neuronale, et non pas le résultat d'un artefact de mesure.

*Induction de la dépolarisation
(ajout de 4-AP)*

*Vérification de l'implication des canaux
sodiques (ajout de tetrodoxine)*

Sans NTCs



Avec NTCs

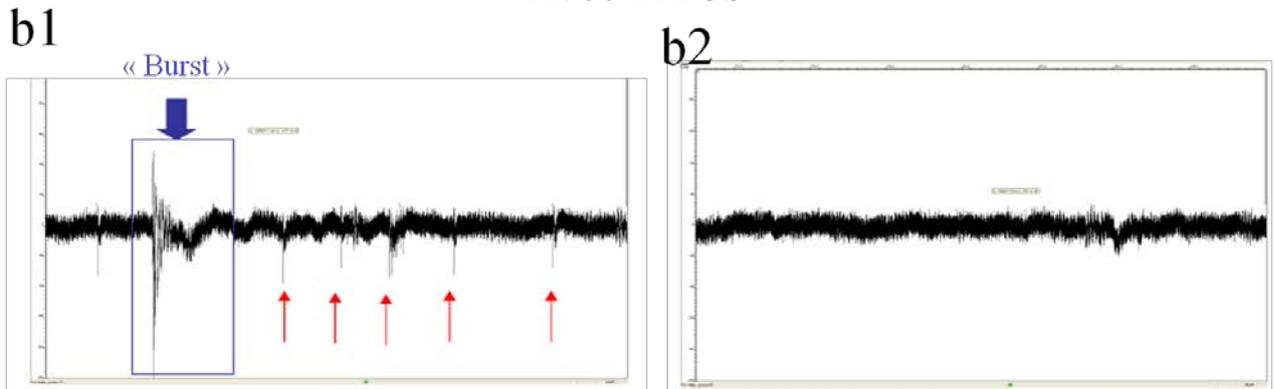


Figure 114 : évolution du potentiel de membrane au cours du temps, montrant l'activité spontanée d'un réseau de neurones, pour une puce MEA sans et avec une couche de NTCs. Enregistrement montré pour une électrode. **a1 et a2** : la puce de MEA ne comporte pas de NTCs. **a1** : l'induction de la dépolarisation des neurones est induite en ajoutant de la 4-AP au milieu de culture. Ainsi, après avoir bloqué les canaux potassiques, un signal de type « burst » apparaît (encadré bleu). Les flèches rouges indiquent des événements liés à des potentiels d'action spontanés. **a2** : après avoir bloqué les canaux sodiques, le signal de type « burst » a disparu, ce qui signifie que les canaux sodiques étaient impliqués et que cette détection n'est pas issue d'un artefact de mesure. **b1 et b2** : (mêmes échelles qu' en a1 et a2) la puce de MEA comporte une couche de NTCs d'une épaisseur de 100nm. **b1** : l'induction de la dépolarisation des neurones est induite en ajoutant de la 4-AP au milieu de culture. Ainsi, après avoir bloqué les canaux potassiques, un signal de type « burst » apparaît (encadré bleu). Le signal de burst est plus étroit, ce qui montre que la résolution de détection est meilleure. Les flèches rouges indiquent des événements liés à des potentiels d'action spontanés. Leur amplitude est supérieure à celle relevée sur la puce sans NTCs. **b2** : après avoir bloqué les canaux sodiques, le signal de type « burst » a disparu, ce qui signifie que les canaux sodiques étaient impliqués et que cette détection n'est pas issue d'un artefact de mesure.

Finalement, ces premières expériences montrent que :

- le dépôt d'une couche de NTCs sur une puce MEA permet d'améliorer l'adhérence des neurones au niveau des électrodes de titane de la puce.
- la couche de NTCs n'affecte pas le développement cellulaire à long terme (35 jours).
- la couche de NTCs facilite la détection de potentiels d'action spontanés de neurones primaires de rats.

Ces résultats sont en cohérence avec plusieurs travaux de la bibliographie [193], [194], [190]. Pour expliquer le rôle des NTCs dans ces observations, plusieurs hypothèses sont avancées. L'une d'elles est que les NTCs feraient diminuer l'impédance qui existe entre les cellules et les électrodes. La nanotopographie des NTCs favoriserait les contacts étroits et directs avec les neurones, menant à une diminution de la résistance de contact entre les électrodes et les neurones. Si l'on reprend la comparaison du journaliste qui interviewe un joueur (*un neurone*) avec son micro (*une électrode d'enregistrement du MEA*) dans le stade (*l'ensemble de la culture de neurones*), cela veut dire que le joueur de foot est plus proche du micro. Les paroles du joueur de foot, qui s'exprime qu'il soit loin ou proche du micro, sont plus facilement captées. La proximité spatiale du joueur (le neurone) ainsi que son contact avec le micro (l'électrode) influence la qualité de l'enregistrement. En favorisant le contact entre les neurones et les électrodes, les NTCs améliorent le rapport signal sur bruit de la mesure de l'activité neuronale, permettant ainsi de détecter des potentiels d'action indétectables jusqu'alors. De plus, les NTCs sont de très bons conducteurs, leur conductivité est de l'ordre de $10^8 \Omega^{-1} \text{m}^{-1}$ [195]. La conductivité dépend cependant fortement de la résistance de contact qui existe entre les tubes. Le grand nombre de porteurs libres ainsi que leur grande mobilité ($100\,000 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) ont pour effet de réduire l'impédance de contact mesurée. A chaque activité des neurones, les lignes de courant ionique sont modifiées. Localement, la composition en ions du liquide est donc modifiée, ce qui entraîne une modification locale de la zone de charge espace (ZCE), d'autant mieux détectée que les NTCs sont d'excellents conducteurs.

D'autre part, nous avons montré dans les paragraphes précédents, que nos couches de NTCs ont pour effet d'augmenter significativement le nombre de neurites développés, et ce pour différents types de neurones (neurones issus de la lignée de souris ou bien neurones issues de la différenciation de cellules souches neurales adultes humaines). La probabilité d'avoir des potentiels d'action dans le réseau de neurones est donc augmentée. Dans la technique de mesure par MEA, le signal collecté par chaque électrode est une valeur moyenne de toutes les activités présentes autour de l'électrode. S'il y a plus d'activité dans le réseau, la valeur moyenne enregistrée sera plus importante.

Ce phénomène pourrait également expliquer le fait que l'amplitude des potentiels d'action mesurée soit plus grande en présence des NTCs.

6. Conclusion

Cette étude démontre que les NTCs sont des surfaces favorables pour la culture de cellules neuronales et propose une nouvelle explication du rôle des NTCs dans la culture cellulaire. Nous avons de plus montré que les effets observés sont génériques à un large spectre de cellules neuronales : lignée neuronale de souris, lignée neuronale humaine, cellules souches neurales adultes humaines et cellules primaires de rats.

La plupart des études disponibles dans la littérature comparent la croissance de neurones sur deux types de surfaces homogènes, dont une est constituée de NTCs. Nous avons été plus loin. Nous avons

d'abord développé une méthode basée sur le micro-contact printing pour créer des motifs micrométriques de nanotubes de carbone, sur des surfaces de différentes natures. Cette méthode a l'avantage d'être fiable, rapide et de ne pas nécessiter d'équipements lourds ou onéreux. Cela nous a permis de proposer une nouvelle situation de culture, dans laquelle deux types de surface sont mis en concurrence, dont l'une est constituée de NTCs. Les cellules ont ainsi le choix de se développer sur l'une ou l'autre surface. Cette situation de culture originale accompagnée d'une analyse rigoureuse de plusieurs expériences indépendantes nous ont permis de mettre en évidence que les couches de NTCs sont des surfaces particulièrement favorables pour la croissance des neurones. Plus de 80% des neurones en culture choisissent de croître sur les NTCs. Pour expliquer cette forte sélectivité, nous avons formulé une nouvelle hypothèse, basée sur une interaction indirecte entre les NTCs et les cellules neuronales : nous avons étudié les interactions entre les protéines contenues dans le milieu de culture des cellules et les couches de NTCs. Nous avons démontré, grâce à des études en microbalance à quartz, que ces couches de NTCs jouent un rôle de « réservoir », comparable à une éponge, pour différentes protéines utiles au développement cellulaire. La quantité d'éléments que l'on peut stocker dans ces couches de NTCs dépend de leur épaisseur et nous avons démontré que ces éléments sont disponibles pour les cellules qui se développent. Nous avons ainsi pu vérifier expérimentalement notre hypothèse.

Enfin, nous montrons à travers trois études argumentées complémentaires que les couches de NTCs et leur capacité à constituer des « réservoirs » pour des protéines peuvent être utilisées avantageusement pour :

- favoriser la croissance neuronale en milieu appauvri, en incubant au préalable des nutriments sur la couche de NTCs, qui joue le rôle de « réservoir ».
- réduire la différenciation de cellules souches neurales en astrocytes et ainsi réduire la réaction inflammatoire autour de prothèses cérébrales ou d'électrodes
- favoriser le développement neuritique des neurones, ce qui peut indirectement avoir un effet sur la communication à l'intérieur d'un réseau neuronal
- améliorer les conditions de mesures de signaux électrophysiologiques spontanément émis dans un réseau de neurones.

Conclusion partie 1

Nous avons cherché à savoir comment ingénierer des surfaces pour favoriser la différenciation et la croissance de cellules neurales et orienter leur développement dans la direction de notre choix. Nos études expérimentales apportent de nouvelles solutions pour l'ingénierie cellulaire des neurones.

Pour cela, nous avons étudié le rôle de microsillons générés à la surface d'un polymère, le PDMS, sur le comportement de plusieurs types de cellules neurales, dont, pour la première fois à notre connaissance, les cellules souches neurales adultes humaines. Grâce à nos études, nous avons pu mettre à jour des règles de « micro-design » qui permettent d'obtenir des architectures de réseaux neuronaux à façon. Cette « ingénierie cellulaire » est transposable à différents types de cellules neurales et pourra être mise à profit pour des applications diverses.

Nous avons également cherché à mieux comprendre les interactions entre les cellules neurales et des facteurs d'échelle nanométrique, apportés par les nanotubes de carbone. Nous avons vérifié expérimentalement notre hypothèse que les couches de NTCs sont de véritables « réservoirs » pour différentes entités chimiques, dont profitent les neurones en culture. Cette découverte permet d'envisager d'utiliser les NTCs pour favoriser la croissance des neurones, ainsi que les mesures de leur activité électrophysiologique.

Finalement, cette première partie, consacrée aux études *in vitro*, nous permet de mieux savoir comment créer des substrats microstructurés favorables pour la croissance et le développement des cellules neurales. Ces résultats sont exploités pour la conception et la fabrication d'une bioprothèse cérébrale, présentée dans la deuxième partie de ce manuscrit.

*PARTIE 2 : Transfert des études in vitro vers une
application médicale : réalisation d'une
bioprothèse ingénierée pour la régénération de
réseaux neuronaux*

PARTIE 2 : TRANSFERT DES ETUDES IN VITRO VERS UNE APPLICATION MEDICALE : REALISATION D'UNE BIOPROTHESE INGENIEREE POUR LA REGENERATION DE RESEAUX NEURONAUX	160
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION ET POSITION DE L'ETUDE	162
1. Pourra-t-on réparer le cerveau en cas de lésion ?	162
1.1 Le cerveau adulte est plastique.....	163
1.2 Stratégies thérapeutiques en cas de traumatisme cérébral.....	163
a. Remplacer les neurones détruits lors d'un traumatisme par la greffe de nouvelles cellules ?	164
b. Créer un milieu permissif pour la croissance neuronale.....	166
2. Les bio-échafaudages pour la reconstruction dans le système nerveux central	167
2.1 Cahier des charges pour un échafaudage pour la thérapie cérébrale	168
2.2 Matériaux implantés dans le cerveau, en association avec des cellules neuronales	169
a. Définition, fonctions et natures des biomatériaux	169
b. Les matériaux polymères pour l'ingénierie tissulaire dans le cerveau.....	169
3. Conclusion.....	175
CHAPITRE 2 - FABRICATION D'UNE BIOPROTHESE CÉRÉBRALE	177
1. Fabrication d'une bioprothèse de première génération	177
1.1. Fabrication de prothèses non biodégradable en PDMS.....	177
a. Matériau.....	177
b. Fabrication des prothèses en PDMS.....	178
1.2. Conception et réalisation de prothèses biodégradables en PLGA	184
a. Matériau.....	184
b. Protocole de fabrication des prothèses en PLGA	184
c. Résultats de culture de cellules sur le PLGA.....	188
d. Eléments sur la biodégradation du PLGA	188
1.3. Bioprothèse comportant des NTCs.....	191
2. Fabrication d'une bioprothèse de deuxième génération.....	191
2.1. Ingénierie de l'ensemencement	191
2.2. Réalisation de structures plus complexes, en 3 dimensions	195
3. Conclusion.....	197
CHAPITRE 3 – PREMIERS ESSAIS IN VIVO.....	199
1. Introduction	199
2. Modèle animal.....	199
3. Modèle lésionnel.....	202
3.1. Méthode.....	202
3.2. Résultats de lésion.....	204
a. Caractérisation de l'effet de la lésion sur le déficit moteur du rat	204
b. Visualisation de la lésion par histologie	205
4. Implantation des bioprothèses et premiers résultats de récupération fonctionnelle.....	208
4.1. Méthode d'implantation	208
4.2. Analyse des résultats d'implantations	209
a. Effet de l'implantation de prothèses en PDMS.....	209
b. Effet dans le temps de l'implantation d'une bioprothèse en PDMS comportant des cellules souches neurales différenciées en neurones	215

5. Analyse des résultats	217
6. Perspectives.....	219

Chapitre 1 - Introduction et position de l'étude

La réparation du système nerveux central des mammifères adultes a été pendant longtemps, compte tenu de l'état des connaissances et des moyens techniques, rangée au rayon des utopies. Depuis quelques années, ce constat a été remis en question. En effet, des découvertes fondamentales et le progrès technologique permettent d'envisager la mise au point de réponses thérapeutiques qui amélioreraient sensiblement l'état de certains patients ayant subi une lésion cérébrale. Les scientifiques et les médecins cherchent à mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques qui permettraient la réparation ou le remplacement de tissus détruits. Ces stratégies sont basées sur l'ingénierie tissulaire, qui a pour but la régénération partielle ou complète d'un tissu ou d'un organe. C'est un domaine en pleine évolution qui attire l'intérêt de nombreux scientifiques et médecins dans le monde. L'ingénierie tissulaire a déjà amené à des réussites remarquables, comme celle des greffes de peau. Cette stratégie thérapeutique pourrait-elle un jour être transposée au système nerveux central ?

1. Pourra-t-on réparer le cerveau en cas de lésion ?

Faute d'outils expérimentaux et de techniques d'observation adaptées, le dogme de la régénération abortive, établi par Cajal au début des années 1920, selon lequel des moignons axonaux se forment après une lésion, ne fut véritablement contesté qu'au début des années 1980. Un paradoxe interrogeait les neurobiologistes : pourquoi un axone sectionné au sein d'un nerf périphérique peut-il repousser alors qu'il n'en est pas de même dans le système nerveux central ?

Depuis les années 1980 et les travaux du groupe d'Albert Aguayo, on sait que dans les nerfs périphériques, la lésion ou la dégénérescence déclenche des changements qui produisent un environnement favorable à l'allongement de l'axone. Les cellules de Schwann et d'autres cellules non neurales répondent à la lésion en élaborant des molécules d'adhérence cellulaire, des composants de la matrice extracellulaire ainsi que d'autres signaux favorisant la croissance de l'axone. De plus, les nerfs périphériques endommagés sont envahis par des macrophages qui éliminent les fragments d'axone en cours de dégénérescence car ceux-ci pourraient inhiber la croissance de nouveaux axones.

Cependant, lors d'une lésion dans le cerveau, le scénario est très différent. En effet, à mesure que les cellules neuronales se désagrègent, leurs débris, au lieu d'être éliminés rapidement, persistent pendant plusieurs semaines, gênant ainsi fortement la repousse neuronale.

Ainsi, longtemps, la réparation du système nerveux central des mammifères adultes a été considérée comme impossible. Ce vieux dogme a été remis en question ces dernières décennies par des découvertes fondamentales, porteuses de nouveaux espoirs thérapeutiques. Nous présentons certains aspects de ces thérapies dans la suite de ce chapitre.

1.1 Le cerveau adulte est plastique

Depuis les années 1980, de nombreuses études ont montré que le système nerveux central (SNC) des mammifères adultes continue d'être le siège de modifications structurales, grâce à l'existence de deux phénomènes :

- une réorganisation structurale, en particulier au niveau des synapses. Cette plasticité est un état permanent du système nerveux central. Elle apparaît aussi comme étant associée à des physiologies particulières, comme l'apprentissage ou la mémorisation. Les lésions neuronales sont également capables d'induire des changements plastiques.

- le phénomène de neurogénèse permet la naissance de nouveaux neurones à partir de cellules souches mises en évidence dans les années 1990. Cependant, il est estimé qu'au plus 1% des neurones perdus après une lésion sont remplacés grâce à la migration « naturelle » de ces nouvelles cellules souches capables de se différencier en neurones.

Ces deux différentes formes de plasticité adulte modifient et améliorent le processus de réparation du cerveau mature. Ces découvertes ont suscité de nombreuses études visant à mieux comprendre les capacités du SNC à récupérer et ainsi pouvoir améliorer les stratégies thérapeutiques suite à un traumatisme cérébral.

1.2 Stratégies thérapeutiques en cas de traumatisme cérébral

A travers les millénaires, le cerveau a toujours été perçu comme un organe central du corps humain. En tant que siège de la pensée, de la conscience et des sentiments, il soulève toujours des débats passionnés (voir annexe 6).

Déjà en 1564, Ambroise Paré [196], suite à la demande d'un homme souhaitant qu'on lui remplace son cerveau malade par un cerveau sain [197], [198], proposa une transplantation cérébrale comme thérapie. Il faudra attendre cependant la fin du 19^{ème} siècle pour que les recherches sur la régénération du système nerveux central (SNC) des mammifères commencent véritablement. La première tentative intéressante de transplantation neuronale intracérébrale fut réalisée par W. Gilmore Thomson à New York en 1890. En effet, il greffa des bouts de cortex d'un chien dans le cerveau d'un autre chien, puis observa par histologie²⁹ le comportement du greffon, Thomson a ainsi introduit des concepts modernes de neurobiologie expérimentale, à savoir le recours à la technique de transplantation pour étudier la viabilité des tissus nerveux greffés et l'influence mutuelle trophique entre le tissu hôte et le greffon. Nous retrouverons ces concepts dans la suite des travaux présentés dans le chapitre 3 de cette deuxième partie de manuscrit.

Depuis, les stratégies thérapeutiques développées pour pallier la faible capacité d'autorestitution anatomique et fonctionnelle du cerveau après un traumatisme cérébral s'articulent autour de deux axes :

²⁹ L'histologie est l'étude de la structure des tissus et des cellules qui le composent. Pour cela, en général, les tissus sont colorés et observés au microscope.

- remplacer les neurones détruits lors du traumatisme
- stimuler la repousse et la reconstitution des réseaux neuronaux en leur créant un environnement favorable.

Dans ces deux axes, la majorité des études expérimentales menées impliquent une transplantation (ou greffe) de cellules ou de tissus. Les cellules greffées peuvent être de différentes natures (neurales, neurales, c'est-à-dire un mélange de neurones et de cellules gliales, ou non neurales) et provenir de différentes sources (voir paragraphe a. ci-dessous).

Il existe d'autres formes d'intervention qui sont d'ordre pharmacologique ou qui font appel à des techniques de stimulation électrique, magnétique ou motrice, comme dans le cas de patients souffrant de la maladie de Parkinson [199], [200]. Ces techniques peuvent également être associées à des transplantations de cellules.

a. Remplacer les neurones détruits lors d'un traumatisme par la greffe de nouvelles cellules ?

Les traumatismes neurologiques ont souvent pour conséquence la destruction de cellules et/ou l'interruption de circuits neuronaux. Le système nerveux central présentant une capacité de régénération spontanée limitée, la greffe de cellules souches est depuis quelques années envisagée comme stratégie thérapeutique de réparation du SNC [201]. En effet, les cellules souches ont l'avantage de pouvoir s'auto-renouveler et de pouvoir donner, par leur différenciation, des cellules spécialisées. Les cellules souches pourraient donc être utilisées pour générer de nouveaux neurones et remplacer au moins une partie de ceux qui ont été détruits. Malheureusement, en particulier dans les pathologies affectant la locomotion (typiquement après un AVC affectant la zone motrice du cerveau), le remplacement ne serait pas suffisant pour la restauration de cette fonction. En effet, une condition nécessaire est la connexion des nouveaux neurones à la cible, constituée par les neurones restés en place et toujours fonctionnels.

Différents types de cellules souches ont été greffés dans le SNC. Les cellules greffées peuvent être embryonnaires ou non embryonnaires [202], [203].

- Les **cellules souches embryonnaires**, proviennent d'embryons aux tout premiers stades de leur développement. Elles ont in vitro un potentiel de multiplication quasi infini et peuvent donner naissance à tous types de cellules, dont celles du SNC (neurones, astrocytes, oligodendrocytes et microglies). Des études avec des cellules souches embryonnaires murines ont été menées, montrant de bons résultats de récupération fonctionnelle chez le murin [204]. Cependant, leur utilisation dans une perspective thérapeutique n'est pas transposable à l'homme. En effet, le risque de formation de tératomes est élevé et l'utilisation de cellules souches embryonnaires d'origine humaine soulève de nombreuses questions éthiques.

L'utilisation de ces cellules est très encadrée par la loi³⁰.

- Les **cellules souches neurales adultes** quant à elles présentent un risque réduit de création de tumeurs. Elles sont déjà en voie de différenciation neurales et sont présentes dans des régions précises du cerveau adultes, appelées « niches » (voir chapitre 1 de la partie 1). Ces cellules présentent une capacité d'auto-renouvellement et génèrent uniquement des cellules du SNC. Au vu de leurs caractéristiques in vitro, ces cellules semblent être de potentiels outils de thérapie cellulaire pour le SNC. Cependant, leur potentiel de multiplication et différenciation décroît avec le temps. L'interdiction législative et les nombreux débats éthiques sur les cellules souches embryonnaires humaines ont poussé les chercheurs à s'intéresser aux cellules souches adultes, bien qu'il soit difficile d'avoir accès à ce type de matériel. Nous avons utilisé ce type de cellules souches dans ce travail de thèse.

D'autres types de cellules souches présentent l'avantage de pouvoir être facilement prélevées et transplantées chez un même patient (cas appelé « autogreffe » ou greffe « autologue »). Cela élimine tout risque de rejet du greffon, même si dans le cerveau, ce phénomène est très limité. Par exemple, les **cellules de la moelle osseuse** peuvent être différenciées in vitro en cellules qui expriment des marqueurs neuronaux matures. Des cellules souches ont été identifiées dans les **tissus adipeux**. Ces cellules souches peuvent donner in vitro des cellules neuronales, cependant en faible proportion [205], [206], [207]. Les perspectives thérapeutiques les plus prometteuses pour ces cellules sont, pour le moment, dans le domaine de la reconstruction musculaire.

Les **cellules souches pluripotentes induites (iPS)** sont encore une autre source de cellules potentiellement utilisable pour la régénération de tissus cérébraux. Ces cellules sont issues de cellules adultes différenciées, qui sont redevenues pluripotentes au moyen de modifications génétiques. Leur utilisation permettrait la greffe autologue et d'éviter ainsi l'utilisation des cellules souches embryonnaires, éthiquement inappropriées. Cependant, ces cellules, dont la mise au point est récente [208], sont génétiquement modifiées et surtout doivent encore démontrer leur fonctionnalité et leur innocuité.

- greffer pour régénérer ?

La comparaison des études de greffe est difficile car les techniques mises en œuvre sont diverses. En effet, les expériences sont conduites sur des modèles animaux différents avec des types cellulaires greffés qui varient en fonction des pathologies étudiées. Le nombre de cellules greffées est également un paramètre très variable. Néanmoins, on relève dans un nombre important d'études le rôle bénéfique des greffes.

³⁰ Le gouvernement français a promulgué une loi (loi n° 2004-801 du 6 août 2004) qui n'autorise pas les recherches sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires, mais qui admet, à titre transitoire et dérogatoire leur utilisation à condition qu'elle réponde à deux critères : « être susceptible de permettre des progrès thérapeutiques majeurs » et ne pas connaître de « méthodes alternatives d'efficacité comparable ».

Les greffes peuvent servir à **remplacer les neurones détruits et/ou à apporter un support trophique**³¹, ayant pour effet de limiter voire d'interrompre le procédé de dégénération. L'origine des améliorations relevées n'est pas toujours identifiée.

De plus, les mécanismes de différenciation in vivo des cellules souches greffées restent encore mal compris (voir [209] pour revue). Des travaux réalisés dans le cerveau de murins ont montré l'importance du microenvironnement dans l'orientation du phénotype et la migration des cellules greffées. Par exemple, Suhonen et al ont montré que lorsque des cellules progénitrices³² hippocampales sont greffées dans l'hippocampe, elles se différencient en neurones hippocampaux alors que lorsque ces mêmes cellules sont greffées dans le cervelet, elles migrent jusqu'au bulbe olfactif et se différencient en cellules non hippocampales [210]. Il existerait donc une **influence du milieu sur le type cellulaire greffé**.

L'environnement joue ainsi un rôle primordial dans la survie, le développement et le devenir des cellules greffées. Aussi, le deuxième axe thérapeutique développé est de créer un environnement permissif pour favoriser la croissance des neurones.

b. Créer un milieu permissif pour la croissance neuronale

La lésion d'une partie des tissus cérébraux entraîne la formation d'une zone qui n'est pas du tout favorable pour la croissance de nouvelles cellules et la repousse axonale. L'absence de régénération axonale spontanée est en partie due à un environnement non permissif. En modifiant cet environnement, il pourrait être possible de favoriser la réparation spontanée ainsi que la survie et le développement des cellules greffées [211].

Pour créer un environnement permissif, plusieurs approches ont été développées :

- **réduction de la réaction gliale** formée suite à la lésion. En effet, la gliose astrocytaire forme une cicatrice (cicatrice gliale), empêchant la repopulation de la lésion par de nouveaux neurones (ces cellules pouvant être des cellules souches migrant dans la zone lésée, ou bien des cellules greffées). Seymour et al ont par exemple utilisé l'anticorps IN-1 pour s'opposer à l'effet inhibiteur de certains composants de la myéline (empêcher l'environnement d'émettre des facteurs inhibiteurs de la croissance neuronale) [212], [213]. D'autres stratégies consistent en la manipulation génétique pour réduire la réaction des astrocytes.

- **injection de peptides** qui miment l'effet de molécules d'adhérence favorables pour la repousse axonale [214].

- **apport de facteurs ayant un effet trophique** (comme par exemple le BDNF³³) pour augmenter le taux de survie des neurones et promouvoir la repousse axonale.

- **utilisation de polymères naturels ou synthétiques** pour créer un support physique et mécanique pour la croissance des neurones, et/ou mimer l'effet biologique d'une matrice

³¹ Le terme « trophique » qualifie la capacité de faciliter la subsistance d'un tissu ou d'une cellule.

³² Une cellule progénitrice ne peut plus se renouveler, elle ne peut plus que se différencier. Une cellule souche peut se renouveler et se différencier.

³³ BDNF signifie « brain-derived neurotrophic factor ». C'est une protéine qui est sécrétée dans le cerveau.

extracellulaire (MEC). A cette fin, le collagène, composant majeur de la MEC a été couramment utilisé [215]. Ces polymères peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec des cellules neurales.

2. Les bio-échafaudages pour la reconstruction dans le système nerveux central

Deux approches sont développées pour la création de nouveaux tissus. Elles consistent en :

- le design et la synthèse d'un tissu à l'extérieur du corps pour une implantation future (exemple de la greffe de peau)
- l'implantation d'éléments qui induiront la régénération du tissu in vivo. Ces éléments seront désignés ici par le terme « échafaudage ». Ils peuvent ou non contenir des cellules au moment de leur implantation. Ces cellules peuvent être des cellules souches ou bien des cellules de même nature que celles contenues à l'origine dans le tissu à réparer.

L'intérêt porté à l'utilisation des biomatériaux pour fournir un support physique, l'échafaudage, aux cellules à implanter est grandissant. Ces supports, qui peuvent prendre différentes formes, sont conçus à partir de matériaux répondant à des critères particuliers.

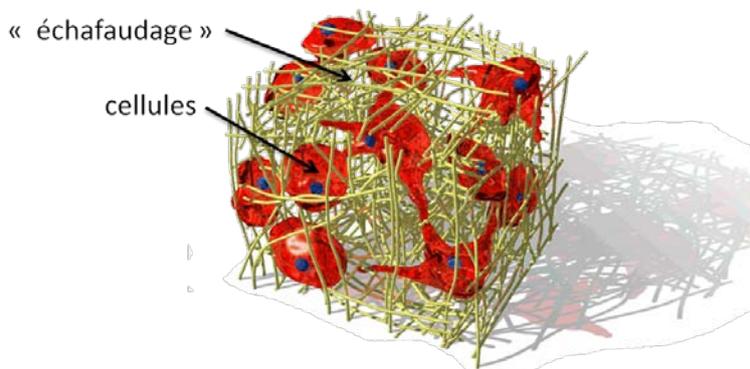


Figure 115 : **représentation schématique d'un échafaudage constitué de fibres polymères sur lequel on a cultivé in vitro des cellules.** Les cellules ont migré à l'intérieur de l'échafaudage. Vue d'artiste. D'après [216].

Leur objectif est d'améliorer le comportement cellulaire global (adhésion, migration), de par leur structure tri-dimensionnelle et de par les signaux chimiques et physiques qu'ils fournissent aux cellules in vitro comme in vivo [217]. Ils améliorent par exemple la survie des cellules implantées in vivo [218]. Cette stratégie d'ingénierie tissulaire pour le cerveau a d'abord été utilisée avec succès en associant des échafaudages à des cellules de lignées neuronales, comme les PC12. Lors de travaux postérieurs, on a associé échafaudage et cellules souches, présentant un intérêt thérapeutique réel par rapport aux cellules de lignées.

Dans ce paragraphe, nous décrivons les propriétés requises pour un échafaudage cérébral, puis nous présentons les principaux biomatériaux utilisés en thérapie cérébrale, notamment en association avec des cellules souches.

2.1 Cahier des charges pour un échafaudage pour la thérapie cérébrale

Pour être efficace, l'échafaudage tissulaire doit prendre en compte de nombreux critères. Selon Ellis-Behnke, chercheur en neurosciences au MIT, la stratégie pour la régénération du système nerveux central se résume en 4 « P » : Préserver, Permettre, Promouvoir et Plasticité.

On peut replacer ces 4 impératifs pour la conception et la réalisation d'un échafaudage tissulaire cérébral destiné à être implanté.

- préserver

Le premier critère que doit respecter un échafaudage est la préservation du milieu et des tissus dans lesquels il va être inséré. Le matériau constituant cet objet doit être biocompatible, réduire autant que possible la réaction gliale et ne pas induire de toxicité. L'implant doit être suffisamment petit afin d'être inséré facilement dans les tissus, à un endroit précis et ne pas léser ou le moins possible les tissus voisins de la région à adresser.

L'échafaudage peut également servir à préserver les tissus voisins en évitant leur dégénérescence secondaire, indirecte, liée au fait que des cellules avec lesquelles ils communiquaient sont détruites (les cellules préservées de la lésion primaire n'ayant plus de cellules avec qui communiquer chimiquement, celles-ci finissent par dépérir aussi).

- permettre

L'échafaudage doit permettre de créer un environnement favorable pour la repousse des cellules, voire des tissus. Il doit par exemple permettre aux cellules d'adhérer sur sa surface ou dans son volume, qu'elles soient cultivées in vitro ou bien qu'elles peuplent l'échafaudage à posteriori, in vivo. Pour cela, l'échafaudage doit être conçu de telle sorte qu'il évite la formation de tissus cicatriciels, qu'il contrebalance les effets inhibiteurs de facteurs sécrétés lors du traumatisme, et qu'il pallie le manque de neurones.

- promouvoir

Afin de favoriser l'adhérence et le développement des cellules, l'échafaudage peut être équipé de facteurs chimiques et physiques visant à promouvoir un comportement cellulaire particulier. Certains travaux ont fonctionnalisé les échafaudages avec des facteurs de croissance, d'autres ont développé des matériaux capables d'émettre in vivo des facteurs chimiques et/ou pharmacologiques. Les études menées in vitro sur l'analyse du comportement cellulaire vis-à-vis d'indices physiques, tels la rigidité d'un matériau, sa rugosité, la topographie ... donnent de précieuses informations pour la conception et l'ingénierie de ces échafaudages.

- *plasticité*

L'échafaudage doit permettre une capacité de réorganisation, de réarrangement des tissus neuronaux en fonction des sollicitations reçues in vivo.

2.2 Matériaux implantés dans le cerveau, en association avec des cellules neuronales

a. Définition, fonctions et natures des biomatériaux

Valves cardiaques, stents, remplacement de cristallin, ligament ou tendon artificiel, en l'espace de quelques décennies, le recours aux biomatériaux dans les stratégies thérapeutiques s'est très largement répandu. Cette variété d'applications fait qu'il est difficile de donner une définition satisfaisante des biomatériaux. Les conférences de Consensus de Chester, qui ont eu lieu au Royaume-Uni en 1986 et 1991 à l'initiative de la Société européenne des biomatériaux (ESB) ont défini un biomatériau comme « un matériau non vivant interagissant avec les systèmes biologiques. Les biomatériaux participent à la constitution d'un dispositif à visée diagnostic, à celle d'un substitut de tissu ou d'organe ou à celle d'un dispositif de suppléance fonctionnelle ».

Un biomatériau utilisé à des fins médicales est soumis à de nombreuses contraintes. La prothèse ou l'implant qu'il constitue ne doit pas susciter d'infection, de réaction inflammatoire ni de rejet. Il ne doit pas rejeter dans l'organisme des substances cancérogènes ou toxiques, il doit pouvoir être stérilisé avant implantation. Il doit aussi pouvoir supporter les contraintes mécaniques, chimiques et biochimiques propres à son usage.

Les biomatériaux sont classifiés en trois grandes classes :

- les métaux et alliages métalliques (acier inoxydable, cobalt, chrome, titane, or, ...)
- les céramiques (alumine, zircone, phosphate tricalcique, ...)
- les matériaux polymères d'origine naturelle (collagène, cellulose, ...) ou synthétique (acide polyglycolique, polycaprolactone, polyimide, ...).

Les matériaux polymères sont les matériaux les plus utilisés, en particulier pour des utilisations dans le système nerveux.

b. Les matériaux polymères pour l'ingénierie tissulaire dans le cerveau

Les matériaux polymères utilisés pour l'ingénierie tissulaire dans le cerveau sont soit naturels, soit synthétiques.

▪ Matériaux naturels

Les **matériaux naturels**, comme le collagène, le chitosan, l'alginate, ... sont particulièrement intéressants car ils comportent des sites d'adhésion, pouvant être identifiés par les complexes d'adhésion des cellules (voir chapitre 1 de la partie 1). De plus, ils possèdent des propriétés mécaniques proches de celles des tissus « mous » avec lesquels ils vont « cohabiter ». Le **collagène** est

une des protéines les plus répandues dans la matrice extracellulaire. Il est très utilisé comme support pour la croissance de tissus neuronaux. Il peut cependant impliquer une forte réponse des cellules gliales s'il est utilisé chez des espèces éloignées de l'espèce dont il a été isolé. Qu et al ont montré que l'utilisation d'un échafaudage de collagène imprégné de cellules souches de la moelle osseuse permet de réduire la taille d'une lésion traumatique cérébrale [219]. La combinaison des cellules et du biomatériau s'avère être plus efficace que la seule greffe de cellules (voir Figure 116).

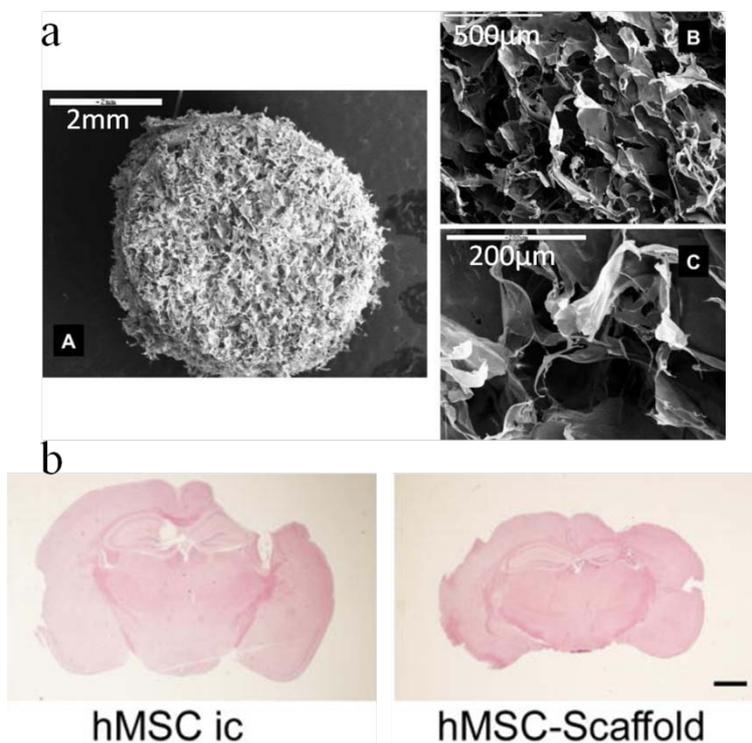


Figure 116 : Utilisation d'échafaudage de collagène associé à des cellules souches de la moelle osseuse pour reconstruire des tissus cérébraux. **a** : images MEB de la structure du collagène utilisé. **b** : images de tranches de cerveau colorées à l'éosine (couleur rose). A gauche : coupe de cerveau où seules des cellules souches ont été greffées. A droite : coupe de cerveau dans lequel l'échafaudage de collagène imprégné des cellules souches a été implanté. Avant les deux types de traitement, les deux lésions avaient la même taille. La lésion est moins grande que dans le cas de gauche. D'après [219].

L'inconvénient des matériaux naturels est qu'ils peuvent contenir des facteurs résiduels de croissance de l'hôte chez qui ils ont été prélevés ainsi que des composants biologiques non identifiés [220]. Ils doivent donc avant leur utilisation être purifiés et il est aussi difficile de contrôler leur stabilité d'un lot à un autre (variabilité biologique des animaux dont le collagène est extrait). De plus, les matériaux naturels sont délicats à modifier par rapport aux matériaux synthétiques dont on peut facilement adapter les propriétés physiques et chimiques.

- **Matériaux synthétiques**

Une classe importante parmi les classes de biomatériaux synthétiques utilisée pour créer des échafaudages cérébraux est la classe des **poly(α -hydroxy esters)**, qui comprend l'acide poly-glycolique (PGA), l'acide poly-lactique (PLA) et leur copolymère, l'acide poly-lactique-co-glycolique (PLGA). Cette classe de polymères a été approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) pour

son utilisation chez l'homme. En raison de leur biodégradabilité et de leur absence de toxicité, ce sont les bio-polymères les plus employés pour des applications de délivrance de médicament dans le cerveau. Ils possèdent aussi de bonnes propriétés mécaniques pour une utilisation en tant qu'échafaudage [221]. La dégradation de ces polymères se fait par hydrolyse. Les produits de dégradation finaux sont H₂O et CO₂ [222]. Le délai est de l'ordre de quelques mois, et varie en fonction de leur composition (pourcentage de PGA et de PLA). On dit que ces matériaux sont « biorésorbables ». Les poly(α -hydroxy esters) peuvent être structurés sous de multiples formes, principalement en :

- fibres, par électrospinning [223], [224]
- billes, par émulsion [225], [226]
- échafaudage 3D par lithographie laser directe [227]

La Figure 117 montre des exemples de structures de PGA réalisées par l'équipe de F. Claeysens [228], par lithographie laser directe. Ce type d'échafaudage a l'avantage de pouvoir « accueillir » à sa surface un grand nombre de cellules. Les auteurs n'ont pas inséré ces échafaudages in vivo.

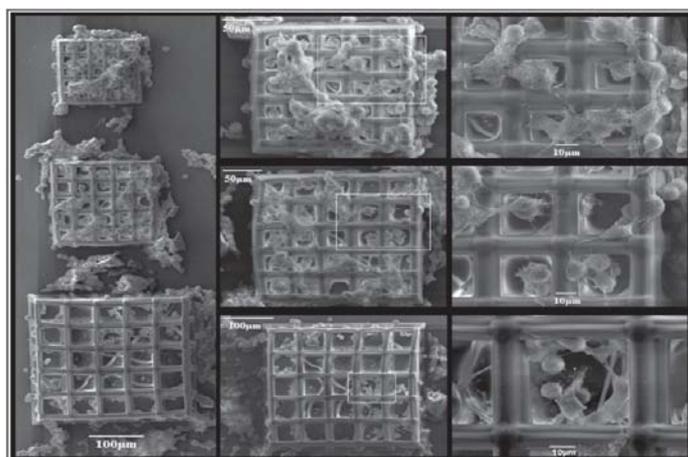


Figure 117 : images MEB d'échafaudages de PGA créés par lithographie laser directe. Les échafaudages ont été ensemencés avec des cellules issues d'une lignée neuronale de souris. D'après [228].

Mahoney et Saltzmann ont mis en forme le PLGA sous forme de microparticules en utilisant la technique d'émulsion, d'un diamètre compris entre 0.5 et 5 μm, puis ils s'en sont servi pour encapsuler du NGF [229]. Pour favoriser l'adhérence des cellules fœtales du cerveau à transplanter, ces particules ont été recouvertes de polylysine. Le NGF encapsulé s'est libéré et a diffusé in vivo pendant les jours suivants l'implantation. En réponse à cette émission, les cellules transplantées se sont différenciées en neurones de type cholinergique³⁴.

Park et al ont utilisé le PGA pour construire, par électrospinning, un substrat constitué de fibres sur lesquelles ils ont ensemencé des cellules neurales de la lignée C17.2. L'objectif était de réparer une lésion massive du cerveau, produite par ischémie [230]. Le diamètre des fibres est compris entre 10 et 15 μm et le substrat mesure plusieurs mm². Sur ce substrat, les cellules poussent de manière aléatoire et désordonnée et montrent une bonne adhésion et un fort pourcentage des cellules expriment le

³⁴ Ces neurones libèrent un type de neurotransmetteur particulier, l'acétylcholine.

marqueur neuronal des neurofilaments. Après la transplantation, des interactions entre les tissus hôtes et les cellules implantées ont été relevées, signe de la bonne intégration de l'implant.

L'équipe de M. Modo a également mis en forme le PLGA pour servir d'échafaudage à des cellules souches neurales implantées dans une lésion également induite par ischémie [22]. Ils ont créé des particules sphériques de PLGA par émulsion et évaporation, mesurant entre 50 et 200µm de diamètre. Ces particules sont recouvertes de fibronectine afin de favoriser l'adhésion des cellules souches neurales mises en culture in vitro sur celles-ci. La Figure 118 montre les particules de PLGA obtenues et l'adhésion des cellules sur la surface des particules. Ces particules ont ensuite été injectées avec précision dans la lésion induite dans un cerveau de rats. Au préalable, la lésion est repérée par IRM. Sept jours après l'injection, les auteurs ont observé, par IRM et histologie, que les cellules implantées sont restées dans la lésion, ont survécu, et se sont différenciées en neurones et astrocytes, formant une structure cellulaire inorganisée entre les particules. La présence de cellules de la microglie et d'astrocytes autour des particules a aussi été relevée. De plus, on a pu vérifier que les tissus environnant n'ont pas été endommagés par l'opération. Cependant, les auteurs n'ont pas étudié le bénéfice de leur bio-échafaudage du point de vue comportemental et fonctionnel.

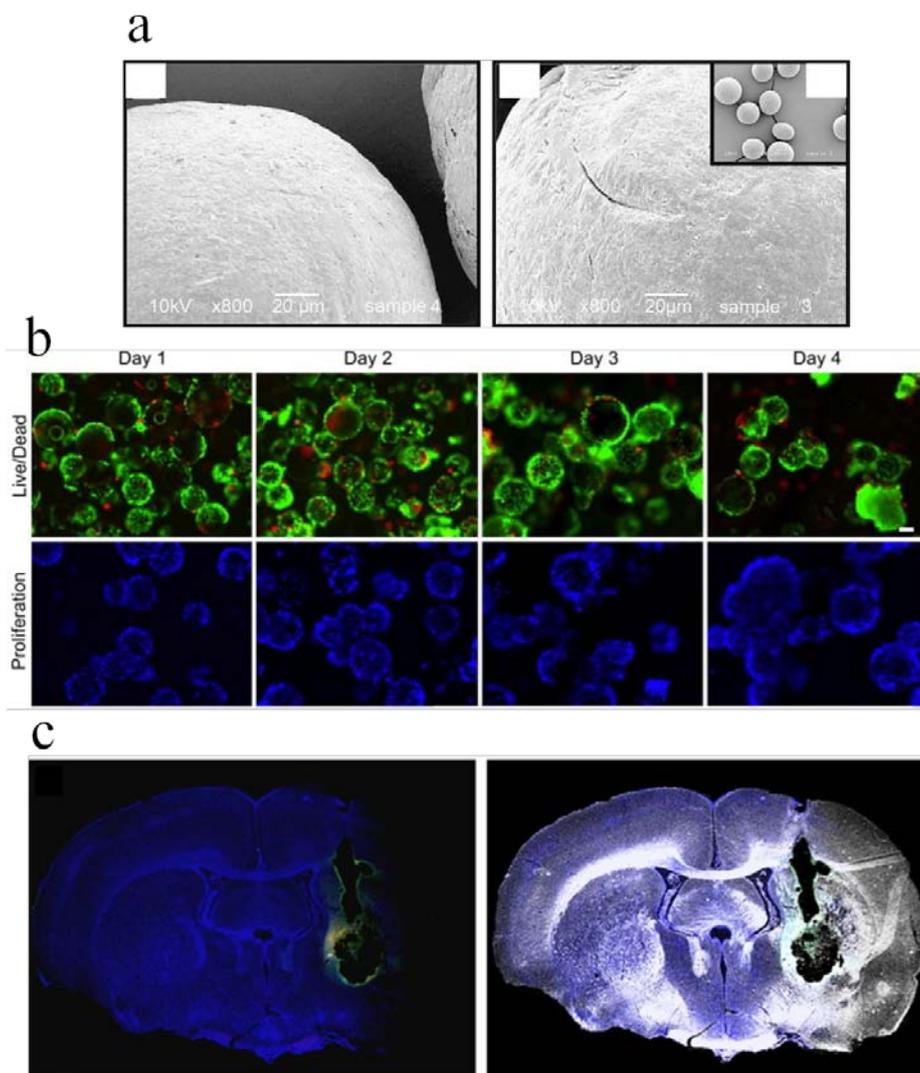


Figure 118 : **a** : images MEB de particules sphériques de PLGA formées par émulsion. **b** : images en fluorescence de cellules souches neurales mises en culture avec les particules (vert : cellule vivante, rouge : cellule morte, bleu : noyaux cellulaires).

c : images d'une coupe frontale du cerveau d'un rat. Les noyaux de toutes les cellules ont été marqués en bleu. La lésion apparaît en noir. Des particules de PLGA comportant des cellules souches ont été insérées dans la lésion. En vert, marquage de la protéine GFAP que l'on trouve dans les astrocytes. D'après [231].

Le **polycaprolactone (PCL)** est un polymère biodégradable largement utilisé pour des applications dans le système nerveux central. Il s'agit d'un polyester qui se dégrade par l'hydrolyse de ses liaisons esters, menant à la formation d'oligomères et d'hydroxyacides. Le délai de dégradation de ce matériau est de l'ordre de quelques années, ce qui peut s'avérer, selon certains auteurs, être un avantage pour la reconstruction cérébrale par rapport aux polymères se dégradant plus rapidement (PLGA, PGA, ...)[232]. Il est souvent utilisé sous formes de fibres créées par électrospinning [233] ou extrusion. On peut aussi l'utiliser sous forme de constructions 3D, créées par laminage, injection par seringue ou lithographie directe par laser.

Des travaux récents se sont intéressés à l'effet inflammatoire de fibres de PCL (sans cellules associées *in vitro*) insérées dans la région du « caudate putamen » de cerveaux de rats (voir Figure 119a). Ils ont montré que ces fibres causent une réaction inflammatoire dans les tissus durant les premiers jours suivant l'opération [234], mais que celle-ci revient à son niveau normal en 60 jours (voir Figure 119b). Ils ont de plus observé que les cellules des tissus hôtes parviennent à générer des projections vers l'échafaudage de fibres de PCL, ce qui est un signe de sa bonne intégration *in vivo*. Les auteurs ont aussi montré que même si *in vitro*, les neurones s'alignent dans la direction des fibres, *in vivo*, l'organisation des cellules hôtes n'est plus dictée par l'orientation des fibres. Ces travaux montrent que le PCL peut être utilisé en contact avec les tissus cérébraux sains.

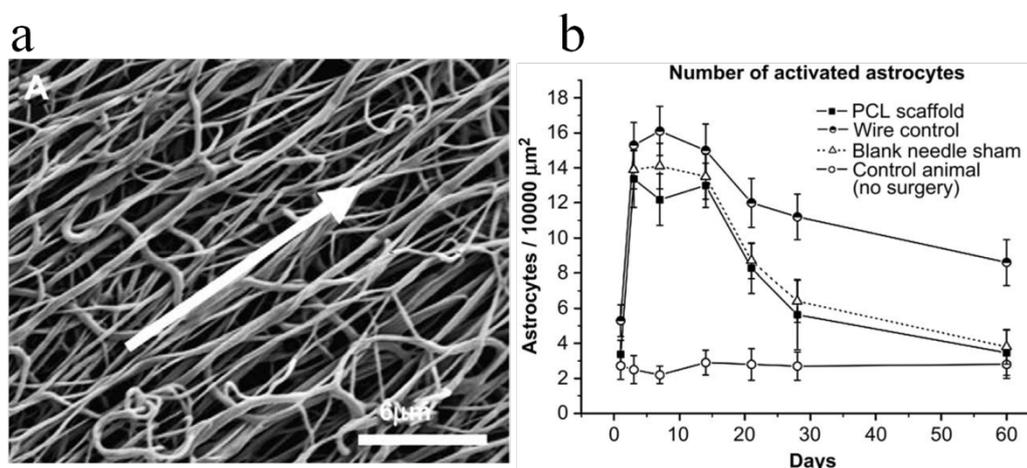


Figure 119 : a : image MEB d'un réseau de fibres de PCL, fabriquées par électrospinning. Les fibres sont orientées dans une direction préférentielle. Aucun effet d'orientation des cellules ayant migré *in vivo* sur les fibres n'a été observé. b : courbe représentant l'évolution avec le temps de la réponse astrocytaire autour des fibres de PCL implantées dans la zone « caudate putamen » du cerveau d'un rat. D'après [234].

La classe des **hydrogels** est aussi une classe de matériaux biodégradables utilisée fréquemment pour le cerveau [235], [236]. Les hydrogels sont constitués de polymères hydrophiles formant un réseau macromoléculaire non organisé saturé en eau. Ils constituent un bon modèle de la matrice

extracellulaire et ont une structure micrométrique poreuse (voir Figure 120). En plus d'avoir des propriétés mécaniques et structurelles proches de nombreux tissus biologiques, leur mise en forme peut se faire dans des conditions « douces » (en milieu aqueux, température proche de 37°C, sans utilisation de solvants), permettant l'encapsulation de cellules. Les hydrogels synthétiques sont plus facilement modifiables et adaptables que les gels naturels.

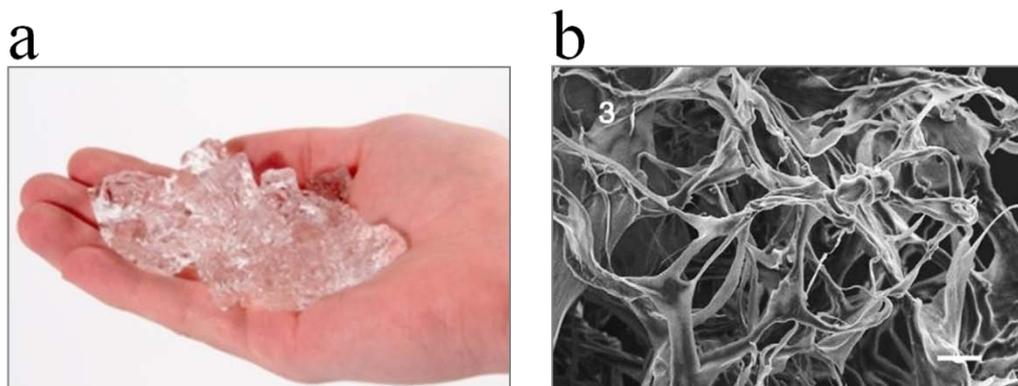


Figure 120 : **a** : photographie d'un hydrogel. **b** : image MEB de la structure poreuse d'un hydrogel utilisé pour réparer des lésions cérébrales. D'après [235].

Des **matériaux non biodégradables** sont aussi utilisés au contact de tissus cérébraux. On peut citer :

- des polymères, par exemple le polyimide, le polypyrrole, le parylène, le PDMS, [237], [238].
- des métaux ou semi-conducteurs (or, silicium, platine, iridium,...)

Certains de ces matériaux entrent dans la composition de dispositifs d'enregistrement et/ou de stimulation de l'activité cérébrale.

De nombreux travaux sont effectués pour améliorer la biocompatibilité de ces électrodes, afin notamment d'allonger leur durée de vie et d'améliorer leur efficacité.

Plus récemment, les **nanotubes de carbone** ont été utilisés *in vivo* afin d'équiper des électrodes et améliorer le rapport signal/bruit lors de mesures de l'activité électrique cérébrale ou sur des électrodes stimulantes [188], [135], [239]. Ces nano-objets ont également été utilisés *in vivo* comme moyen de vectorisation de facteurs chimiques et pharmacologiques [240]. La toxicité et le devenir des NTCs *in vivo* est une question très discutée et dépend de leur état (poudre, suspension, intégration à une matrice polymère, ...), de leur structure (multiparois, bi-parois, monoparois), de leur fonctionnalisation [241], [242] et des organes et des tissus avec lesquels ils sont en contact [243].

Plusieurs études récentes rapportent l'intérêt d'utiliser des NTCs pour soigner les dommages engendrés par un AVC [240], [244]. Moon et al ont par exemple mis en évidence que les NTCs améliorent la différenciation de cellules souches progénitrices neurales en neurones fonctionnels [244]. Une fois implantée dans une lésion cérébrale, l'association « NTCs-cellules souches neurales » a permis une meilleure récupération fonctionnelle des animaux que dans le cas où les cellules avaient été greffées seules.

3. Conclusion

Nous retenons de cette étude bibliographique rapide que le cerveau est un organe plastique, qu'il a des capacités d'autoréparation, mais qui sont bien insuffisantes pour pouvoir réparer les dégâts causés par des lésions importantes. Pour pallier cette limite, les chercheurs identifient des stratégies thérapeutiques susceptibles de rétablir les capacités perdues suite à des lésions localisées.

Parmi celles-ci, la greffe de cellules souches, qui consiste à introduire une suspension de cellules dans la lésion a été expérimentée chez l'animal. L'étude du devenir des cellules greffées, notamment en termes de prolifération (risque de tumeurs), de différenciation et d'interactions avec les tissus hôtes est un point capital. Selon plusieurs études, il semblerait que ces cellules se trouvant dans un environnement défavorable à leur développement, ont tendance à se répartir sur la périphérie de la lésion, sans établir de connexions à travers celle-ci et de plus, leur durée de vie serait courte. En sécrétant des facteurs chimiques trophiques, qui sont des signaux de survie cellulaire, elles auraient néanmoins un effet favorable pour les cellules du cerveau non endommagées.

D'après cette analyse, on peut s'interroger sur la possibilité d'augmenter le potentiel réparateur des cellules greffées en leur fournissant un support de croissance favorable pour leur développement.

Pour maintenir dans la lésion les cellules introduites, une stratégie envisagée est de fixer ces cellules sur un échafaudage, introduit dans la lésion. Différents échafaudages équipés de cellules ont déjà été mis en œuvre *in vivo*, mais les cellules s'y sont développées de manière aléatoire, ne favorisant ni leur développement en réseaux, ni leur connexion aux tissus préservés environnants. Face à ces constats et compte-tenu du fait que dans le cerveau, les réseaux neuronaux sont organisés, nous envisageons d'élaborer un échafaudage qui bien sûr supporterait les cellules mais qui aussi favoriserait leur connexion aux cellules saines de l'hôte et leur croissance de façon organisée.

Pour répondre à cette problématique, nous nous appuyons sur nos travaux réalisés *in vitro*, qui nous ont permis de dégager des « lois » pour ingénierer des substrats pour :

- Permettre l'adhésion de cellules neurales
- Promouvoir leur développement dans une direction définie
- Conserver la plasticité des réseaux neuronaux, et en leur permettant de se connecter aux cellules préservées.

Sur la base de ces travaux et de ces enseignements, nous avons développé une bioprothèse associant un matériau non cytotoxique et des cellules souches neurales adultes. Nous avons généré à la surface de ce matériau des indices topographiques anisotropiques obtenus par lithographie.

Après la réalisation de cette bioprothèse, un protocole d'essai *in vivo* sur un animal murin a été établi. Il comporte les 4 étapes suivantes :

- Induction, par injection localisée d'une toxine, d'une lésion cérébrale dans la zone motrice du cortex primaire
- Mesure du déficit occasionné chez l'animal, par tests comportementaux

- Insertion de la bioprothèse dans la zone lésée (2 semaines après la lésion)
- Mesures, à intervalle régulier, de la récupération fonctionnelle de l'animal, par des tests comportementaux.

L'analyse des tissus cérébraux est effectuée dans un dernier temps, par histologie. Cela nous a permis d'étudier la réponse des cellules hôtes vis-à-vis de notre prothèse.

Pour mener à bien un tel projet ambitieux, à la croisée de plusieurs disciplines (sciences des matériaux, microfabrication, biologie cellulaire, neurochirurgie), une équipe interdisciplinaire était incontournable. L'équipe mise en place est composée de chercheurs du site scientifique toulousain issus de:

- l'INSERM (Unité 825, spécialisée dans les nouvelles thérapies pour l'accident vasculaire cérébral) pour la partie chirurgie et tests comportementaux
- du CHU Rangueil (département de neurochirurgie) pour la partie biopsie pour obtenir les cellules souches adultes humaines
- du CIRIMAT (spécialisé dans la synthèse de nanotubes de carbone) pour la synthèse des nanotubes de carbone
- du LAAS-CNRS (équipe Nanobiosystèmes) pour la partie fabrication de la prothèse et analyses.

Chapitre 2 - Fabrication d'une bioprothèse cérébrale

Dans ce chapitre, nous présentons les bioprothèses mises au point. Pour concevoir ces bioprothèses, nous avons dû prendre en compte la morphologie du cerveau du rat, et aussi les besoins et impératifs techniques spécifiques à chaque étape du procédé, allant de la fabrication jusqu'à l'implantation in vivo en passant par la culture cellulaire.

Nous avons vu dans le chapitre 1 que la plupart des matériaux implantés dans le cerveau sont biodégradables. Une prothèse biodégradable permettrait dans l'idéal aux tissus de recoloniser tout l'espace de la lésion mais se pose la question du devenir des produits de dégradation. De plus, une fois que la prothèse s'est dégradée, il est difficile de savoir ce que deviennent les cellules implantées sur celle-ci, d'autant plus si l'on s'intéresse à leur organisation sur la prothèse. A l'inverse, une prothèse non biodégradable reste en place, ne génère aucun produit de dégradation mais limite l'espace disponible pour la reconstruction tissulaire.

Ainsi, dans un premier temps, nous avons développé une prothèse non biodégradable, en PDMS. Il sera aussi plus aisé de la localiser dans les tissus et d'observer la réaction des cellules hôtes vis-à-vis de ce matériau structuré, l'évolution des cellules greffées et leur organisation. Après cette première phase d'investigation, une fois la forme et la structuration de la prothèse validées, nous utiliserons un autre matériau, l'acide polylactique-co-glycolique qui est biodégradable.

1. Fabrication d'une bioprothèse de première génération

1.1. Fabrication de prothèses non biodégradable en PDMS

a. Matériau

Le PDMS est un polymère et plus particulièrement un élastomère. Il appartient à la famille des silicones, qui ont une structure chimique basée sur l'alternance d'atomes de silicium et d'oxygène. Le PDMS que nous utilisons est le Sylgard® 184. Nous avons vu au cours de la première partie de ce manuscrit qu'il est non-cytotoxique pour les cellules neurales.

A notre connaissance, il n'existe pas de travaux qui rapportent l'utilisation de ce matériau non biodégradable pour des applications in vivo dans le cerveau. Une étude a utilisé un objet en PDMS comme outil pour déposer des cellules neuronales sous forme de sphéroïdes à la surface du cortex. Les auteurs ont mis en contact le PDMS avec la partie la plus en surface du cortex et l'ont retiré après 24 heures de contact. Ils n'ont pas relevé d'effet toxique ou nocif de ce contact prolongé entre le PDMS et les tissus corticaux [245].

Il sera primordial d'étudier la réaction des tissus in vivo vis-à-vis du PDMS implanté. Nous montrerons les résultats obtenus dans le chapitre « Essais d'implantation in vivo ».

b. Fabrication des prothèses en PDMS

▪ Choix de la taille et de la géométrie de la prothèse

Le premier élément qui a guidé notre choix pour la taille de la prothèse est la dimension de la lésion du cerveau. Dans notre modèle, les tissus lésés sont situés dans le cortex moteur primaire et le striatum³⁵ du cerveau du rat. Les lésions sont provoquées par l'injection, dans cette zone, d'un volume constant (5µL, 3M) de malonate, qui est un inhibiteur enzymatique. Nous détaillerons le mode opératoire pour réaliser la lésion dans le dernier paragraphe de cette partie. La lésion est visualisée grâce à l'imagerie à résonance magnétique (IRM à 3 Teslas), elle apparaît en blanc sur les clichés. La mesure du volume lésé est réalisée à partir d'images IRM. La Figure 121 montre des images, réalisées par Isabelle Loubinoux. Les lésions réalisées dans les cerveaux de rats ont un volume moyen de $86 \pm 53 \text{mm}^3$, ce qui représente une boule d'environ 4mm de diamètre.

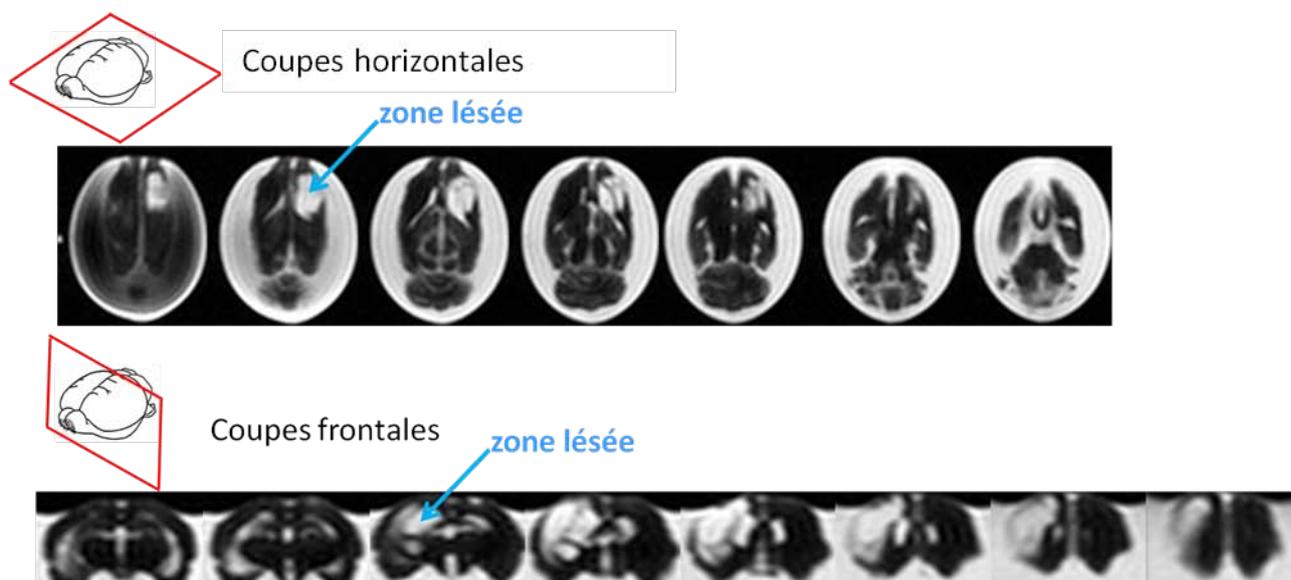


Figure 121 : Images IRM d'un cerveau de rat dans lequel une lésion a été provoquée par l'injection de malonate. Les tissus cérébraux apparaissent en noir et gris foncé. Les zones lésées apparaissent en blanc. La zone du cerveau autour de la lésion est imagée sur plusieurs plans successifs, en se déplaçant en z pour les coupes horizontales et en x pour les coupes frontales.

La prothèse ne doit pas être plus grande que la lésion car sinon, elle endommagerait les tissus sains environnants. Elle doit également être fine afin de ne pas prendre trop de place dans la lésion et aussi pour endommager le moins possible les méninges, qu'il sera nécessaire de traverser pour placer la prothèse dans la lésion. Néanmoins, elle doit être facilement manipulable avec des pinces pour l'insérer.

Ces informations nous ont amenés à fixer la taille de la prothèse à 5mm de long et 2mm de large. La manipulation de ces prothèses avec une pince nous a également posé des contraintes pour l'épaisseur de celles-ci. Pour la définir, nous avons fabriqué des prothèses de différentes épaisseurs (60µm,

³⁵ Le striatum est impliqué dans le mouvement volontaire. Son nom lui vient de son aspect strié, dû aux nombreux faisceaux de fibres que l'on trouve dans cette région.

100 μ m, 150 μ m, 200 μ m, 300 μ m, 500 μ m). Nous en avons conclu que la prothèse doit avoir une épaisseur minimale de 100 μ m pour pouvoir être manipulée aisément et une épaisseur maximale de 300 μ m afin de ne pas conduire à des ouvertures crâniennes trop délétères.

De plus, afin d'occuper au maximum l'espace lésionnel, il a été décidé d'y insérer en parallèle trois prothèses, comme illustré sur la Figure 122.

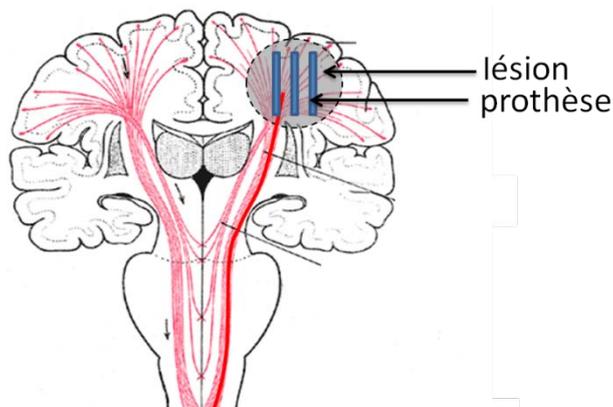


Figure 122 : Représentation schématique sur une vue frontale du cerveau et du début de la moelle épinière de la localisation des trois prothèses dans la lésion. La lésion se trouve dans la zone motrice du cortex primaire.

La forme de la prothèse dépend aussi des possibilités liées au protocole de fabrication mis en œuvre pour la réaliser. Celle-ci a ainsi été influencée par trois éléments majeurs :

- le protocole de fabrication des prothèses de PDMS microstructuré doit être rapide à mettre en œuvre. En effet, pour les campagnes d'expérimentations *in vivo*, il est nécessaire de fabriquer un grand nombre de prothèses. La fabrication en série de prothèses est un facteur à prendre en compte.

- le protocole d'ensemencement des prothèses avec les cellules neurales doit minimiser la perte de cellules. En effet, les cellules souches adultes humaines sont difficiles à obtenir. Le plus grand nombre d'entre elles doit donc pouvoir se développer sur les prothèses.

- le protocole de culture des cellules neurales sur ces prothèses doit être le plus simple et le plus proche possible de celui que nous maîtrisons et mettons en œuvre pour les cultures sur des surfaces (afin d'éviter les mises au point supplémentaires).

Pour satisfaire ces trois conditions, nous avons réalisé une prothèse en forme de plaque de PDMS microstructurée sur les deux faces principales. L'épaisseur de cette plaque est de 200 μ m environ, la longueur de 5mm et la largeur est de 2mm. On appelle « faces principales » de cet objet les deux faces qui mesurent 5mm x 2mm.

- Définition de la géométrie de la microstructuration de la surface de la prothèse

Afin de déterminer la géométrie des microsillons à créer sur les faces de la prothèse, nous avons considéré que la microstructuration doit à la fois orienter la croissance des neurones dans le sens longitudinal de la prothèse et favoriser l'adhérence, la différenciation et le développement des cellules neurales.

Les résultats de nos études *in vitro*, présentés dans la première partie de ce manuscrit, nous ont montrés que les microsillons de 60 μm de largeur, espacés de 10 μm et d'une profondeur de 10 μm étaient les plus appropriés. Ils permettent à la fois d'obtenir un grand nombre de neurones et les neurites sont alignés. Pour mémoire, la Figure 123 montre une image de neurones de la lignée humaine « Luhmes » cultivées sur une surface comportant cette géométrie de microstructures.

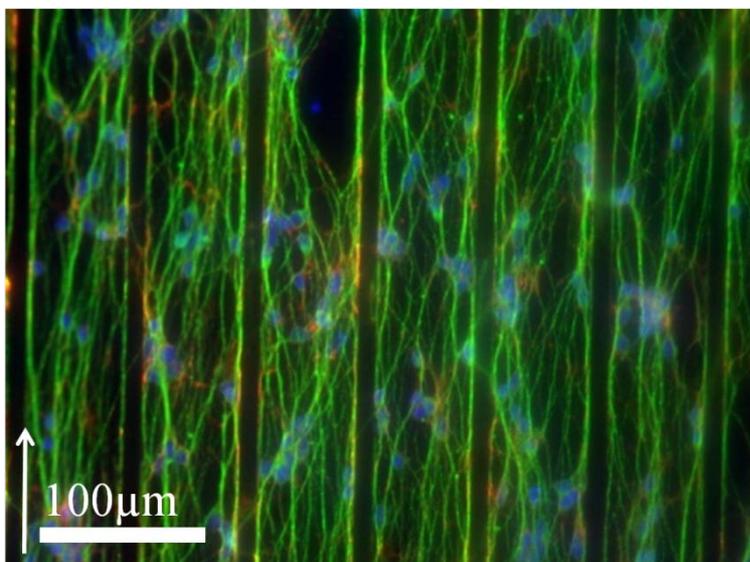


Figure 123 : **Image en fluorescence des cellules neuronales de la lignée Luhmes sur une surface de PDMS comportant des microsillons de 60 μm de large, espacés de 10 μm et de 10 μm de profondeur.** Ensemencement à une densité de 60 000 cellules/mL. Les neurofilaments ont été marqués en utilisant le marqueur Tuj-I et un anticorps secondaire fluorescent (Alexa 488nm, vert), les filaments d'actine ont été marqués en utilisant la phalloïdine, couplée à un fluorophore (Alexa 546nm, rouge). Les noyaux ont été marqués avec le DAPI (bleu).

- **Protocole de fabrication de la prothèse**

La Figure 126 présente de manière schématique le protocole de la réalisation simultanée sur un même substrat de 5 prothèses en PDMS microstructurées sur les deux faces principales. Il comporte trois grandes étapes :

1. **Moulage de deux grandes plaques de PDMS** (1,2cm x 1cm) contre un moule de silicium comportant les microstructures désirées. Afin de connaître le volume de PDMS à déposer pour obtenir l'épaisseur souhaitée, nous avons réalisé une courbe d'étalonnage, présentée sur la Figure 124. Ce graphe représente l'épaisseur de la plaque de PDMS obtenue dans les conditions de réalisation.

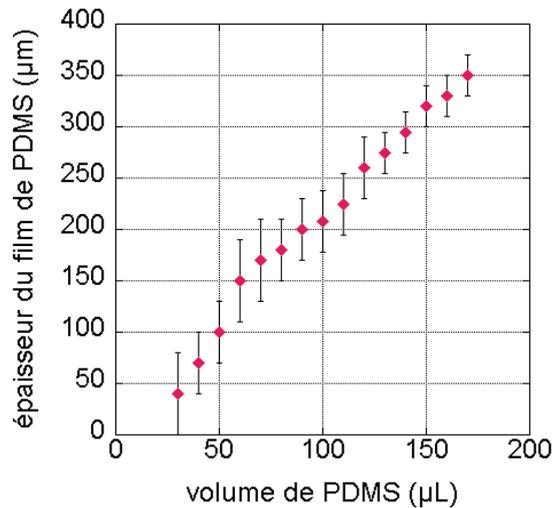


Figure 124 : **Courbe d'étalonnage permettant de connaître le volume de PDMS à déposer sur un moule pour obtenir une épaisseur donnée.** Les mesures ont été faites en mesurant au microscope optique l'épaisseur de la tranche d'une plaque de PDMS moulée sur un moule de silicium ne comportant pas de microstructures.

Nous découpons les plaques de PDMS manuellement, à l'aide d'un scalpel, en suivant des contours qui ont été tracés par lithographie sur le moule de silicium. Ainsi, les plaques découpées ont toujours la même surface. Nous retirons les plaques du moule à l'aide d'une pince.

2. Assemblage des deux plaques de PDMS microstructurées entre elles afin d'obtenir une microstructuration sur les deux faces principales de la prothèse. Pour assembler les deux plaques, nous utilisons le PDMS comme colle biocompatible. Nous étalons une fine couche de PDMS avec une lamelle de verre sur la surface non structurée de la première plaque de PDMS et nous déposons délicatement la deuxième plaque de PDMS sur celle-ci (épaisseur de la couche de la « colle » mesurée : 20µm environ). Nous alignons les bords des deux plaques. L'ensemble est ensuite placé dans une étuve à 100°C pendant 1heure afin que la couche de PDMS servant de colle réticule.

La Figure 125 montre une image de la tranche d'une plaque de PDMS microstructuré sur deux faces, obtenue par ce procédé. Les microstructures présentes sur cet exemple de surface sont des microsillons parallèles mesurant 10µm de largeur, espacés de 10µm et 10µm de profondeur.

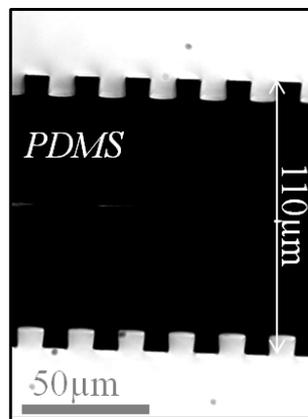


Figure 125 : **Image prise au microscope optique de la tranche d'une plaque de PDMS microstructurée sur deux faces.** Les microstructures sont des sillons parallèles de 10µm de largeur, espacés de 10µm et mesurant 10µm de profondeur.

3. **Prédécoupe de l'ensemble afin de former les prothèses.** Nous plaçons la double plaque de PDMS sur un patron sur lequel figure la forme des prothèses à obtenir, puis nous prédécoupons la plaque à l'aide d'un scalpel. La Figure 127a présente la géométrie obtenue. Les prothèses ne sont pas complètement découpées afin de pouvoir les manipuler facilement avec des pinces et pouvoir réaliser ensuite l'ensemencement en parallèle sur les cinq prothèses.

Les 5 prothèses seront complètement découpées juste avant leur l'insertion dans la lésion.

4. **Traitement oxydant au plasma.** Celui-ci permet l'adhérence de la polylysine et de la laminine sur le PDMS. Le traitement au plasma contribue aussi à la stérilisation des prothèses.

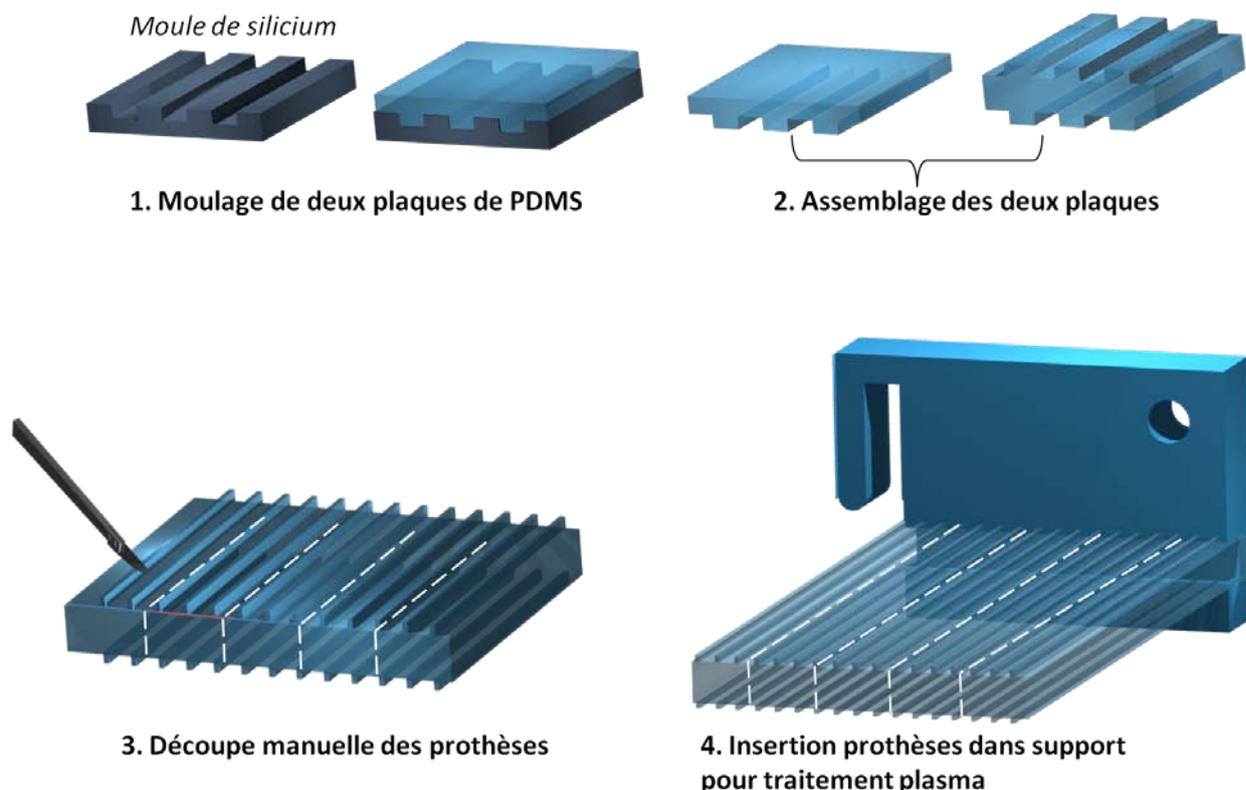


Figure 126 : schéma du protocole de la réalisation simultanée de 5 prothèses en PDMS microstructuré sur les deux faces principales. **1.** Moulage de deux plaques de PDMS contre un moule de silicium. **2.** Assemblage des deux plaques de PDMS, fixation par collage avec du PDMS non réticulé. **3.** Prédécoupe manuelle des prothèses à l'aide d'un scalpel. **4.** Insertion de la plaque de 5 prothèses dans un support, puis traitement oxydatif au plasma de l'ensemble.

L'ensemble du protocole de fabrication dure environ 2h30, les phases les plus longues correspondent à la réticulation du PDMS.

Nous obtenons finalement une plaque de 5 prothèses de PDMS microstructurées sur deux faces. Cette plaque doit être insérée dans le puits de culture. Pour cela, nous avons conçu et fabriqué un outil qui sert de support et qui maintient la plaque de PDMS en place dans le puits pendant la durée de la culture des cellules (voir Figure 126 et Figure 127). Il est en téflon et nous permet aussi de déplacer la plaque de PDMS sans la toucher. De plus, nous avons fait en sorte que la plaque de PDMS ait les mêmes dimensions que les puits de culture que nous utilisons habituellement. Notre protocole de culture des cellules est donc directement transposable. Les cellules en suspension dans le milieu de

culture vont adhérer, dans leur grande majorité, sur la grande face des prothèses (et non aller se déposer au fond du puits). Ceci est favorisé par le fait que la plaque de PDMS a les mêmes dimensions que le puits de culture. Si l'on avaitensemencé un objet de petite taille par rapport à celle du puits, une grande proportion de cellules aurait été perdue en allant adhérer au fond du puits et non sur les prothèses.

Pour maximiser in vivo l'effet des prothèses, nous avons voulu implanter grâce à elles un maximum de nouvelles cellules neurales. Pour cela, nous ensemençons les deux faces principales des prothèses. Cela est réalisé de la façon suivante :

- un premier ensemencement permet de déposer des cellules sur la première face des prothèses
- une fois que les cellules ont adhéré sur cette première face, nous sortons du puits l'ensemble « outil+plaque », retournons la plaque et la réinsérons manuellement dans l'outil à l'aide d'une pince. Le tout est ensuite placé dans un second puits de culture. Nous avons déterminé que le délai d'attente pour retourner la plaque sans que les cellules ne se décrochent de la surface déjà ensemencée est au minimum de deux heures.

- enfin, nous procédons au deuxième ensemencement, sur l'autre face de la plaque de prothèses.

Pour vérifier si les cellules que nous avons ensemencées sur la première face et qui se retrouvent donc ensuite à l'envers ne se sont pas décrochées de la plaque, nous avons quantifié la densité de cellules présentes avant et après le protocole complet de culture (dénombrement des noyaux présents par mm^2). Nous avons relevé une diminution de la densité cellulaire de 3%. Cette valeur est faible, elle se situe dans l'intervalle d'erreur commis lors de telles quantifications et n'est donc pas significative.

Pour leur utilisation in vivo, nous ensemençons les prothèses avec une suspension de cellules souches contenant 150 000 cellules/mL. L'observation des surfaces après culture nous permet d'estimer à 45 000 le nombre de cellules fixé sur une bioprothèse.

Nous obtenons finalement un objet synthétique et biologique, que nous appelons une « **bioprothèse** ».

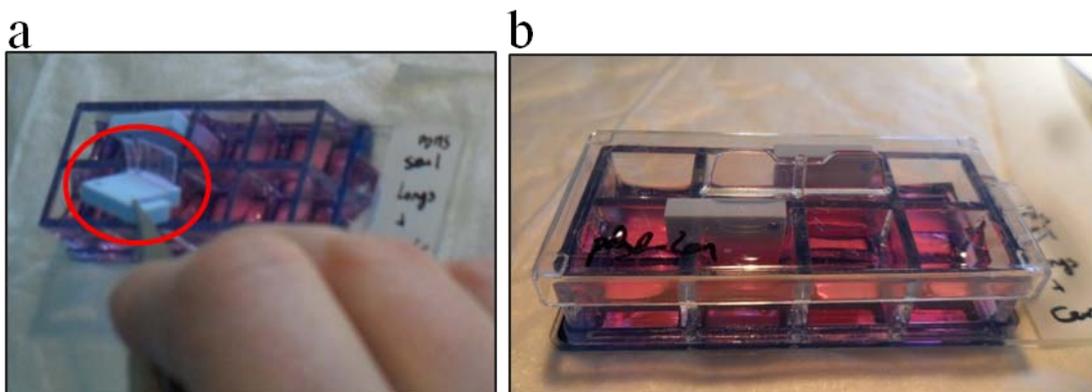


Figure 127 : photographies des plaques comportant 5 prothèses mises en place sur leur support adapté pour permettre la culture de cellules dans des puits de culture utilisés habituellement. a. Vue de la plaque de PDMS comportant 5 prothèses prédécoupées (cercle rouge). b. Vue du puits de culture.

1.2. Conception et réalisation de prothèses biodégradables en PLGA

a. Matériau

Comme matériau biodégradable, nous avons retenu l'acide polylactique-co-glycolique. Ce copolymère PLGA possède deux qualités intéressantes pour notre cas : d'une part, il est possible d'en modifier les propriétés mécaniques et la durée de vie avant la dégradation en faisant varier la proportion de PGA et de PLA (acide polylactique) et d'autre part, le PLGA a été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) pour être utilisé dans des dispositifs thérapeutiques. De plus, ce matériau a déjà été utilisé dans des tissus cérébraux (voir Chapitre 1).

Le PLGA que nous avons utilisé pour réaliser la version biodégradable de notre prothèse comporte 50% de PLA et 50% de PGA. Nous l'avons acheté chez Sigma Aldrich.

Avec ce matériau, nous avons réalisé les mêmes prothèses que celles en PDMS en termes de taille et de géométrie.

b. Protocole de fabrication des prothèses en PLGA

Pour fabriquer les prothèses en PLGA, nous avons mis au point un protocole qui comporte deux étapes. La première concerne la fabrication d'une plaque de PLGA microstructurée sur deux de ses faces. La deuxième concerne la découpe de cette plaque de manière à former les prothèses.

▪ La microimpression thermique du PLGA

Pour obtenir des microstructures sur les deux faces d'une plaque de PLGA, nous avons mis en œuvre la technique de microimpression thermique. Pour cela, nous nous sommes inspirés du protocole mis en œuvre dans l'article de Yang et al [246]. Le PLGA est chauffé au-delà de sa température de transition vitreuse et mis en forme en le pressant contre un moule de PDMS comportant les microstructures à reproduire sur le PLGA.

A température ambiante, le PLGA dont nous disposons se présente sous forme de granulés calibrés pesant 15mg. Il est dur et brillant, comme montré sur la Figure 128. La température de transition vitreuse du PLGA se situe autour de 50°C. Cependant, plus on chauffe ce matériau, plus il devient liquide et il peut donc mieux pénétrer dans les cavités micrométriques du moule de PDMS. Selon le protocole développé par Gao et al, la température la plus favorable pour la mise en forme serait autour de 90°C.



Figure 128 : **photographie des granulés du PLGA utilisé.** Chaque granulé pèse 15mg.

Le protocole est présenté de manière schématique sur la Figure 129. Il comporte trois étapes, en plus de celle de création des moules en PDMS:

1. Le nombre calculé de granulés de PLGA est déposé sur un premier moule de PDMS (lui-même déposé sur une lame de verre, face plane contre la lame). Pour éviter que le PLGA visqueux et chaud ne s'échappe, nous entourons le moule en PDMS par des bordures en PDMS collées sur la lame de verre support. Le tout est chauffé à 90°C afin de dépasser largement la température de transition vitreuse du PLGA.

2. Un second moule est délicatement déposé sur le PLGA fluide. Puis, on dépose une masse de 200g sur ce dernier afin de forcer le remplissage des cavités du moule supérieur. On laisse le tout en place pendant 3 minutes.

3. L'ensemble des deux moules et du PLGA est récupéré et placé en contact avec de la glace pilée, afin de refroidir le PLGA. Les deux moules sont ensuite retirés manuellement, avec délicatesse. On obtient finalement une plaque de PLGA comportant des microstructures sur deux faces.

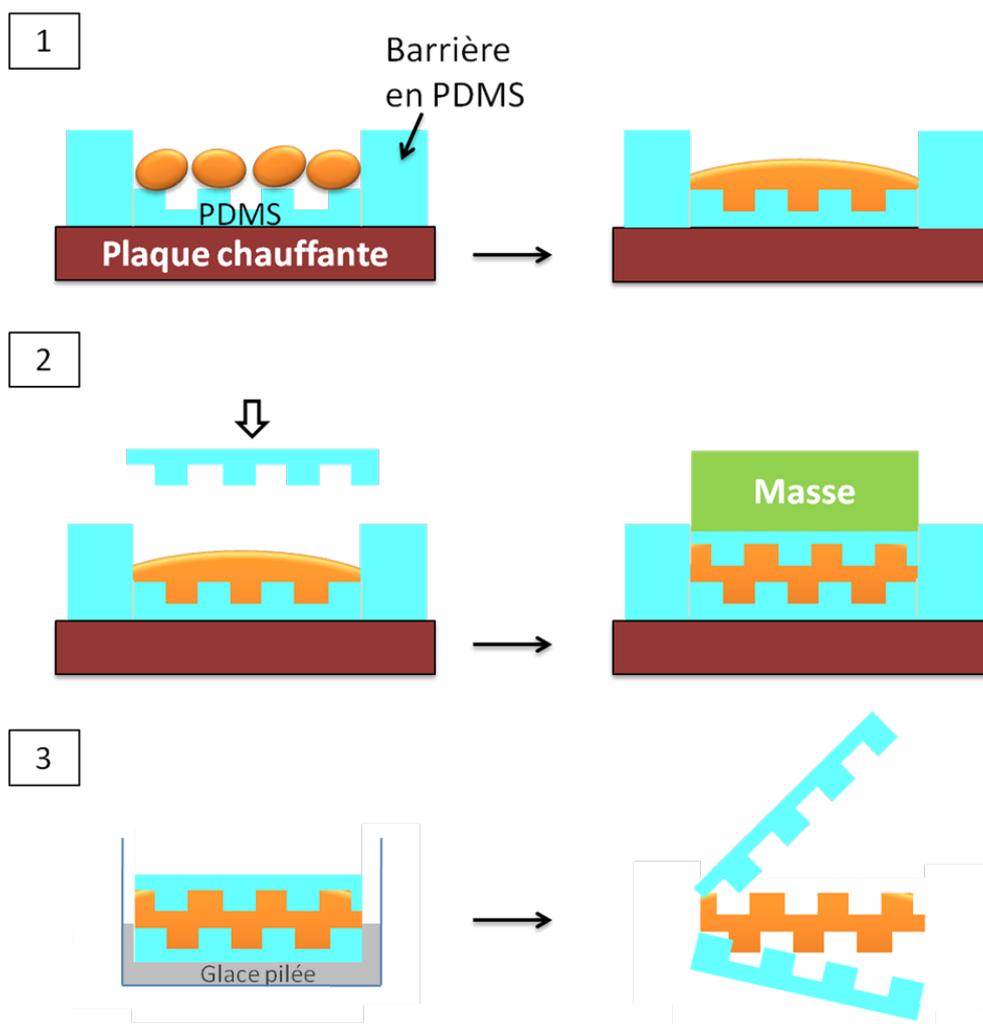


Figure 129 : Schéma représentant le protocole mis en place pour obtenir une plaque de PLGA microstructurée sur deux faces. 1. Les granulés de PLGA sont disposés sur le moule de PDMS. Le tout est placé sur une plaque chauffante, à 90°C. Le PLGA fond et pénètre dans les microsilons du moule pendant 2 minutes. 2. Un deuxième moule en PDMS est placé en contact avec le PLGA fondu. Une masse est posée sur l'ensemble. 3. Trois minutes après, l'ensemble « moules-PLGA » est mis au contact de glace pilée pour accélérer le refroidissement et les moules de PDMS sont délicatement désolidarisés du PLGA. Il en résulte une couche de PLGA comportant des microstructures sur deux faces.

Les principaux paramètres que l'on a dû optimiser pour obtenir des structures conformes à celles du moule sont :

- la température de chauffage du PLGA et le délai avant la mise en contact avec le moule supérieur. En effet, le PLGA doit être suffisamment fluide pour pénétrer les cavités du moule.
- la valeur et la durée de la pression exercée, le moule supérieur de PDMS pouvant se déformer sous l'effet d'une pression trop importante.

Pour obtenir l'épaisseur de plaque désirée (200 μ m), nous avons fait varier la quantité de granulés sans changer les autres paramètres et mesuré les épaisseurs des couches obtenues. Concrètement, pour obtenir une plaque de 6cmx2cm d'une épaisseur de 200 μ m, nous utilisons 14 granulés, soit une masse de 210mg. L'épaisseur de la plaque obtenue n'est cependant pas rigoureusement constante sur toute sa surface en raison de petites déformations des moules de PDMS et/ou à cause de l'entrée de bulles d'air lors du positionnement du moule supérieur (erreur mesurée sur une même plaque : 30à40 μ m, ce qui est acceptable pour notre utilisation). Pour améliorer la qualité des plaques, il faudrait pouvoir travailler avec une machine dédiée, permettant de faire le vide lors de l'impression.

La Figure 130 montre une photographie d'une grande plaque de PLGA que nous avons microstructurée par microimpression thermique. Dans chaque rectangle visible de cette plaque figure une géométrie de micromotifs différente.

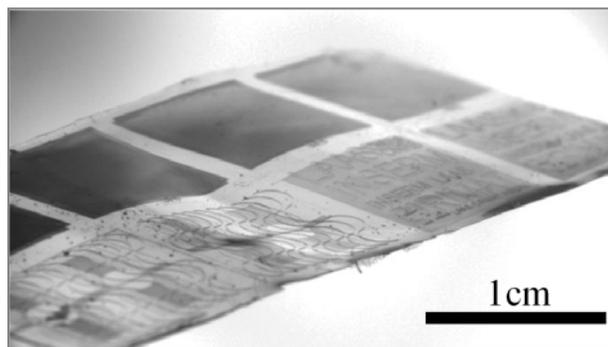


Figure 130 : **Photographie d'une plaque de PLGA** d'une épaisseur de 200 μ m, comportant différentes géométries de motifs, formés par microimpression thermique.

La Figure 131 présente une vue micrométrique d'un exemple de motifs moulés. La Figure 131a est une image des motifs prise au microscope optique. L'image b est une reconstitution 3D de la surface de l'échantillon. Celle-ci est issue de l'observation par microscopie confocale de la surface. La figure c montre le profil des structures. On observe que les structures ont une forme bien rectangulaire, ce qui montre que le PLGA est allé jusqu'au fond des microsillons lors du moulage. Nous avons donc obtenu des microstructures conformes à celles du moule et avons pu former avec succès des structures ayant des facteurs de forme allant jusqu'à 5 (microstructures en forme de ligne de 5 μ m de large et 25 μ m de hauteur).

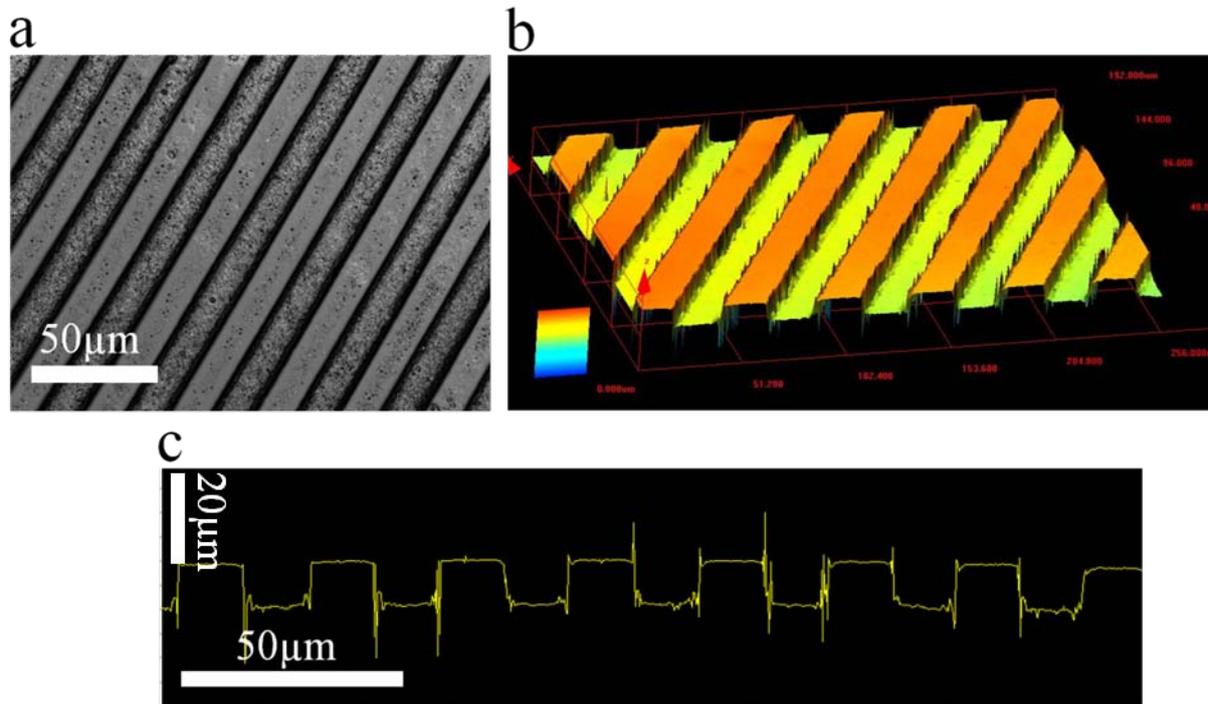


Figure 131 : Surface de PLGA après structuration par microimpression thermique en utilisant un moule de PMDS comportant des microsillons de 15µm de largeur, espacés de 15µm et de 10µm de profondeur. **a** : image prise au microscope optique de la surface de PLGA microstructurée. **b** : reconstitution en trois dimensions de la surface microstructurée. **c** : vue du profil de la surface.

Les gros avantages de cette technique d'impression sont : sa simplicité, son faible coût et surtout, elle ne nécessite pas la mise des granulés de PLGA en solution dans un solvant, qui est souvent toxique et non compatible avec la culture cellulaire.

- Découpe de la plaque de PLGA pour former les prothèses

Le PLGA étant très cassant, nous n'avons pas pu utiliser de scie circulaire automatique pour la découpe. La plaque de PLGA obtenue est donc découpée manuellement, en suivant un patron qui comporte la géométrie souhaitée. Cela est réalisé à l'aide d'un ciseau. La Figure 132 montre une photographie des prothèses obtenues. L'équipe de l'INSERM qui insère les prothèses in vivo a jugé ces nouvelles prothèses manipulables.

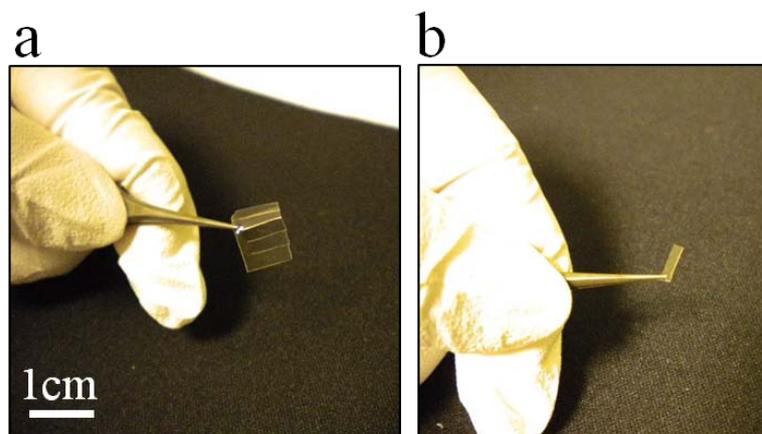


Figure 132 : Photographies des implants réalisés en PLGA, à partir d'une plaque microstructurée découpée manuellement. **a** : plaque de 5 prothèses. **b** : prothèse individuelle.

c. Résultats de culture de cellules sur le PLGA

Nous savons déjà, grâce à nos expériences présentées au chapitre 2 de la partie 1, que le PDMS est un excellent substrat pour la culture de cellules neuronales. Afin d'étudier si le PLGA est aussi un matériau adapté pour la culture de cellules, nous avons réalisé une culture de cellules de la lignée de souris « neuro2a » sur des surfaces de PLGA et comparé le nombre de cellules ayant adhéré sur de mêmes surfaces de PDMS.

La Figure 133 montre des images des cellules neuro2a cultivées sur une surface de PDMS (a) et sur une surface de PLGA (b). Les substrats comportent des microsillons parallèles de 20µm de large, espacés de 20µm et de 10µm de profondeur. La culture a été réalisée dans les mêmes conditions pour les deux types de substrats. Elle a duré deux jours et aucune molécule n'a été déposée au préalable sur les surfaces. L'actine des cellules a été marquée par immunofluorescence en utilisant de la phalloïdine couplée à un fluorophore Alexa 546nm, rouge.

On observe que la densité de cellules ayant adhéré est plus grande sur la surface de PLGA que sur la surface de PDMS. Les neurites développés sont orientés dans la direction des microsillons, sur les deux types de surfaces. La quantification du nombre de cellules sur la surface donne une moyenne de 160 ± 24 cellules/mm² pour la surface de PDMS et 310 ± 30 cellules/mm² sur le PLGA. Ainsi, les cellules neuro2a montrent une plus grande affinité pour le PLGA que pour le PDMS. Le PLGA est donc validé pour la réalisation de la version biodégradable de notre prothèse.

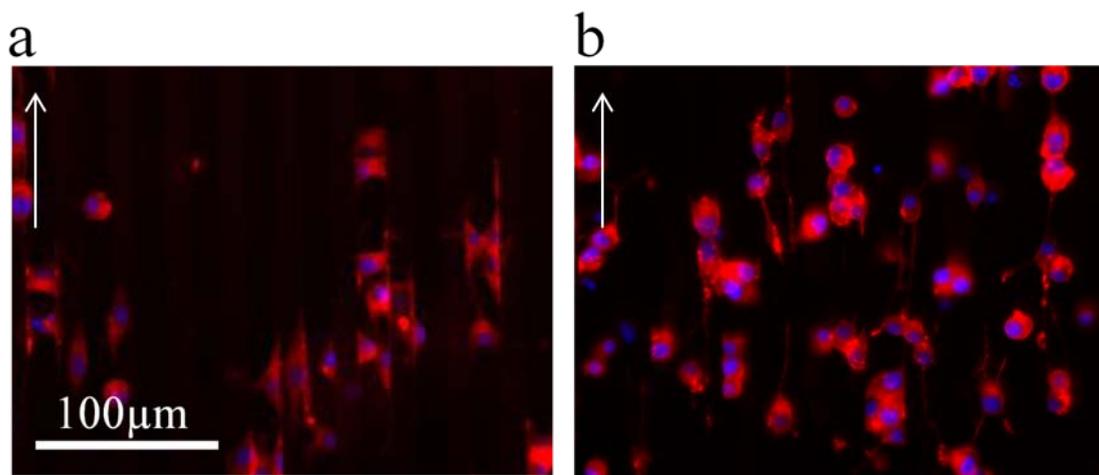


Figure 133 : Images prises au microscope en fluorescence des cellules « neuro2a » cultivées pendant 2 jours sur des substrats comportant des microsillons de 20µm de large et 10µm de profondeur. Les flèches représentent la direction des microsillons. L'actine des cellules a été marquée en utilisant la phalloïdine couplée à un fluorophore Alexa546nm, rouge. a : Substrat de PDMS. b : substrat de PLGA.

d. Eléments sur la biodégradation du PLGA

En présence d'eau, le PLGA se dégrade dans sa masse par hydrolyse de ses liaisons ester. Sa dégradation donne les monomères qui le constituaient, l'acide lactique et l'acide glycolique qui sont des produits du métabolisme cellulaire. La cinétique de dégradation du PLGA dépend de plusieurs facteurs, dont :

- la proportion des polymères PGA et de PLA que comprend ce co-polymère (plus il contient de PGA, plus il se dégrade rapidement).
- la porosité du matériau
- sa surface développée, qui est liée à sa mise en forme.

Dans la plupart des études menées sur la dégradation du PLGA, une solution de PBS est utilisée comme milieu dégradant [247], [248]. Notre objectif est d'étudier la dégradation de notre substrat de PLGA microstructuré dans des conditions les plus proches possibles de celle de la culture cellulaire. Plus particulièrement, nous nous intéressons à la durée pendant laquelle le substrat peut être conservé dans du milieu de culture avant de devenir inutilisable. Pour cela, nous l'immergeons dans du milieu de culture porté à 37°C, puis nous observons l'évolution de l'état général du substrat et de ses microsillons³⁶.

Ces premières informations nous permettront de vérifier si la prothèse en PLGA peut répondre aux impératifs de notre protocole d'ensemencement cellulaire et de notre protocole in vivo.

Le Tableau 8 résume les conditions expérimentales et les observations réalisées au cours du temps.

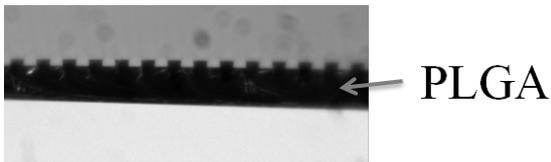
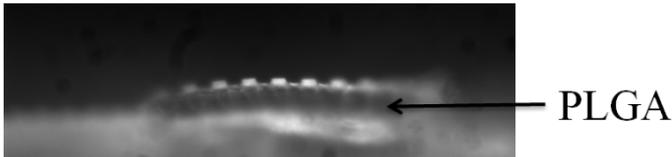
Conditions de conservation des plaques de PLGA : - milieu de culture, changé tous les quatre jours. - 37°C - incubateur, 5% de CO ₂ Dimensions des plaques de PLGA : 10mm x 10mm x 0,2mm Microsillons mesurant 15µm de large espacés de 15µm et 10µm de profondeur, présents sur une face.	
Après 1 jour	La plaque et ses microsillons sont intacts. 
Après 3 jours	Début de déformation générale de la plaque. Torsion. La plaque est manipulable et les microsillons sont toujours présents (voir aussi Figure 134 ci-après). 
Après 7 jours	Torsion de la plaque plus importante. Les microsillons sont toujours présents.
Après 14 jours	La plaque s'est recroquevillée sur elle-même. Elle s'effrite lorsqu'on la saisit avec une pince. On distingue encore les microsillons.
Après 21 jours	La plaque est recroquevillée, fortement déformée. On distingue encore les microsillons.
Après 28 jours	La plaque s'est complètement dégradée.

Tableau 8 : Résultats des observations au cours du temps d'une plaque de PLGA de 0,2mm d'épaisseur, comportant des microsillons de 15µm de largeur, espacés de 15µm et 10µm de profondeur. Cette plaque est immergée dans du milieu de culture, à 37°C sous flux de CO₂.

³⁶ Nous avons réalisé les mêmes expériences en utilisant non plus seulement du milieu de culture mais aussi du milieu de culture contenant des cellules neuronales neuro2a. Les résultats obtenus sont identiques dans les deux conditions, la présence des cellules n'a pas montré d'effet particulier sur la dégradation du PLGA.

La Figure 134 montre la surface de PLGA, observée au microscope optique confocal après avoir été conservée pendant 3 jours dans du milieu de culture à 37°C et sous flux de CO₂. On voit que la surface a un aspect rugueux, les microsillons sont toujours présents mais ils sont légèrement déformés et ne sont plus parfaitement droits, comme c'était le cas après le moulage (voir Figure 134a).

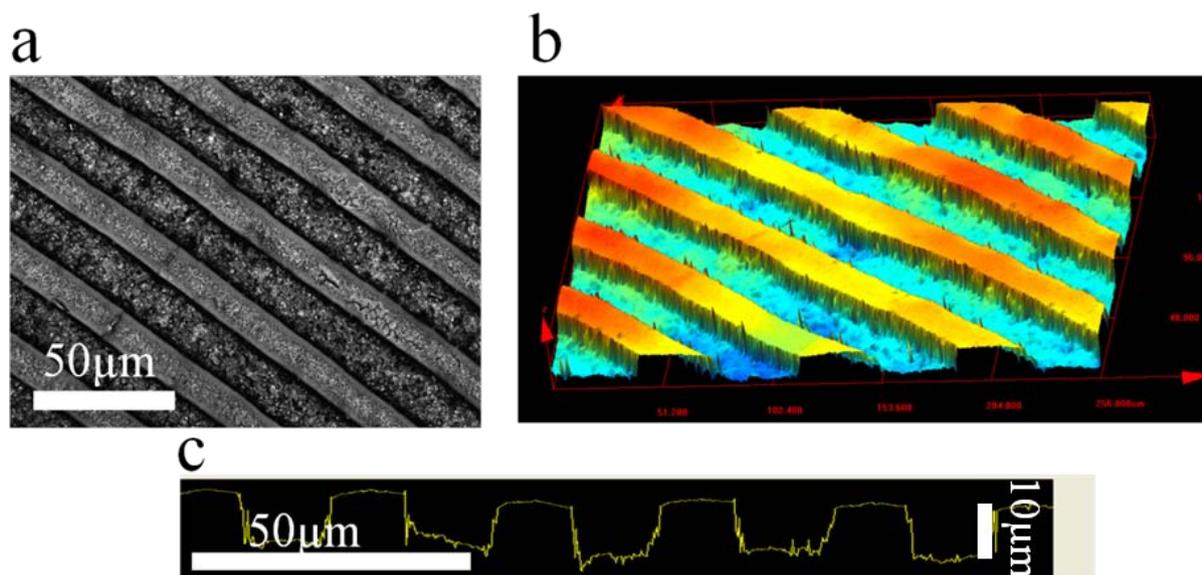


Figure 134 : Surface de PLGA comportant des microsillons après avoir été immergée pendant 3 jours dans du milieu de culture à 37°C sous flux de CO₂. Les microsillons mesurent initialement 15µm de largeur, 10µm de profondeur et sont espacés de 15µm. **a** : image prise au microscope optique de la surface de PLGA microstructurée. **b** : reconstitution en trois dimensions de la surface microstructurée. **c** : vue du profil de la surface. La hauteur des microstructures est de 10µm.

Le Tableau 8 montre que la plaque de PLGA a mis entre 21 et 28 jours pour se dégrader dans du milieu de culture placé à 37°C dans un incubateur sous flux de CO₂. Cette durée est inférieure à la durée avancée dans la littérature, qui est de 2 mois. Cependant, il est délicat de comparer nos résultats car les conditions de conservation ne sont pas rigoureusement identiques avec celles décrites dans la plupart des articles. En effet, notre objectif était d'étudier la dégradation d'une de nos plaques de PLGA dans les conditions de culture de nos cellules neuronales. Cette différence peut trouver son explication dans la faible épaisseur de notre plaque de PLGA qui serait un facteur qui accélère sa dégradation. Pour réaliser nos cultures de cellules neurales in vitro, ce délai de dégradation est satisfaisant. En effet, le protocole de culture dure 7 jours. Cependant, nous jugeons que pour notre application in vivo, où le substrat de PLGA joue le rôle de support et de guide pour la reconstruction cellulaire, ce délai avant dégradation est trop court. Il est possible d'augmenter le délai avant dégradation du PLGA en augmentant la proportion de PGA le constituant. Cette possibilité devra être exploitée pour la réalisation de prothèses biodégradables de plus longue durée.

1.3. Bioprothèse comportant des NTCs

Pour augmenter l'effet bénéfique potentiel de notre bioprothèse, nous nous sommes appuyés sur nos études *in vitro*, menées sur les interactions entre les cellules souches neurales et les NTCs. Ces travaux ont été détaillés au chapitre 3 de la première partie de ce manuscrit. Nous avons montré qu'une couche de NTCs sert de « réservoir » pour différents facteurs chimiques que l'on y dépose (par incubation), dont par exemple le NGF (nerve growth factor) et que lorsque les couches de NTCs sont imprégnées de NGF avant la mise en culture de cellules sur ces surfaces, la survie et le développement des cellules sont améliorés.

En équipant nos prothèses de PDMS et de PLGA de couches de NTCs imprégnées de facteurs de croissance, nous fournissons aux cellules un environnement encore plus favorable à leur survie et à leur développement dans la lésion cérébrale. Ces couches de NTCs pourraient aussi favoriser l'adhérence et développement des cellules déjà présentes *in vivo*.

Dans ces perspectives, nous avons déposé des couches de 100nm d'épaisseur de NTCs à la surface de nos prothèses faites en PDMS, en utilisant la technique de dépôt par pulvérisation présentée dans l'annexe 5. Nous avons déposé des couches de NTCs sur les prothèses en PDMS pour ensuite les récupérer et observer le devenir des NTCs après que la prothèse soit restée quelques mois dans le cerveau de rats. Compte-tenu de ce long délai, les essais *in vivo* sont toujours en cours.

2. Fabrication d'une bioprothèse de deuxième génération

Les prothèses en PDMS de « première génération » que nous avons fabriquées ont été utilisées pour réaliser nos premiers essais *in vivo* chez le rat. Nous verrons au cours du dernier chapitre « premiers essais *in vivo* » qu'elles ont permis de répondre à certaines questions. Il existe néanmoins de nombreuses pistes d'amélioration pour ces bioprothèses qu'il sera intéressant de développer. Dans le cadre de cette thèse, nous avons proposé deux exemples d'amélioration que l'on pourrait apporter pour obtenir une prothèse cérébrale plus perfectionnée, dite de « deuxième génération ». Ces deux exemples sont présentés dans les paragraphes suivants.

2.1. Ingénierie de l'ensemencement

Jusqu'à présent, lorsque nous ensemencions un substrat, nous déposons uniformément des cellules sur toute sa surface. Ce geste simple ne permet pas à lui seul d'organiser l'adhérence des cellules. Nous avons souhaité, dès l'ensemencement, disposer d'une méthode pour déposer des cellules sur un endroit précis de notre substrat, afin qu'elles se développent depuis une région vers une autre. Cette notion de direction pourra peut être participer à favoriser l'échange de l'influx nerveux entre groupes de cellules. Comme nous l'avons vu dans la partie 1 de ce manuscrit, il existe de nombreuses techniques pour localiser précisément des cellules sur des substrats. Cependant, la plupart d'entre elles s'appuient sur

des traitements chimiques des surfaces. Ces traitements créent une différence d'adhérence des cellules entre des zones du substrat où l'adhérence est favorisée et d'autres zones où elles ne peuvent pas adhérer. Cette zone non adhérente peut constituer une « barrière » pour le développement des cellules, ce qui ne favorise pas les échanges entre groupes de cellules.

Si l'on souhaite éviter d'avoir sur une surface des zones non favorables pour l'adhérence des cellules, les méthodes les plus employées sont la lithographie par jet d'encre et la lithographie par stencil (ou « pochoir »). Directement inspirées du monde de la microélectronique, ces méthodes ont été adaptées pour des applications en biologie [249], [250], [251], [252].

La technique que nous avons mise en œuvre est la lithographie par pochoir. Nous avons conçu le système du pochoir en téflon. Il est usiné par fraisage et perçage dans une plaque de téflon et comporte une bordure sur son périmètre qui forme un puits et les motifs se trouvent au fond de ce puits. Il a été fabriqué à l'atelier mécanique du LAAS. La Figure 135 présente une photographie de cet objet.

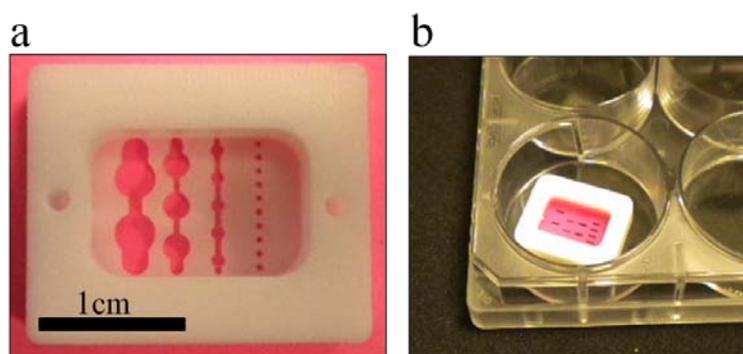


Figure 135 : **photographie du pochoir créé.** Sur l'extérieur, le pochoir comporte une bordure, plus haute, qui sert de puits pour la culture cellulaire. **a** : Au centre de la photographie : différents motifs du pochoir. La plaque du fond a une épaisseur de 100 μ m. **b** : pochoir dans le puits de culture, posé sur un substrat de PDMS (non visible sur la photo). La suspension de cellules est introduite dans le pochoir.

La Figure 136 présente de manière schématique les différentes étapes de notre technique. Le pochoir en téflon est posé sur le substrat de PDMS (1). Afin d'améliorer la mouillabilité du téflon et son contact avec la surface de culture, celui-ci est au préalable traité au plasma oxygène (300W, 3 minutes, système Pico μ W UHP, Diener Electronic). Puis, nous déposons le milieu de culture contenant les cellules en suspension dans le puits du pochoir (2). Nous laissons le pochoir en place pendant 2 heures, durée nécessaire pour l'adhérence des cellules. Après ce délai, nous retirons manuellement à l'aide d'une pince le pochoir et ajoutons du milieu de culture (3) et (4). Ensuite, nous terminons le protocole de culture habituel.

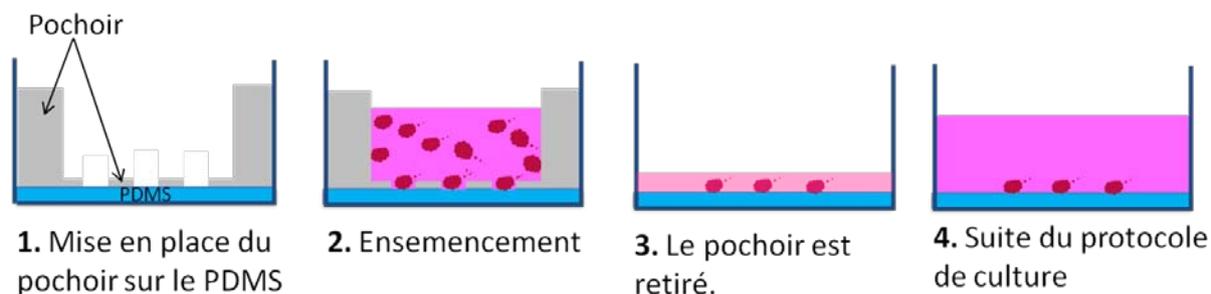


Figure 136 : **représentation schématique de l'utilisation du pochoir pour créer des motifs de cellules sur une surface de PDMS.** 1. Le pochoir est mis en place dans un puits de culture cellulaire classique. 2. Ensemencement. La suspension cellulaire est déposée à l'intérieur du pochoir, qui comporte des barrières. 3. Le milieu de culture est aspiré et le pochoir est retiré. 4. Du milieu de culture est ajouté rapidement et le protocole de culture habituel est poursuivi.

La Figure 137 montre les résultats de culture obtenus, pour une densité d'ensemencement de 100 000 cellules/mL. Nous avons réalisé des marquages immunofluorescents des filaments d'actine (phalloïdine couplée à un fluorophore alexa 546nm, rouge), des neurofilaments (béta-III tubuline, marquée avec Tuj-I et un anticorps secondaire fluorescent alexa 488nm, vert) et des noyaux (DAPI, bleu). Les cercles en pointillés indiquent la limite du motif du pochoir. On observe que l'on obtient une grande sélectivité de la localisation des cellules. En effet, aucune cellule n'a adhéré en dehors des régions où le pochoir était « ouvert », ce qui montre qu'il remplit bien sa fonction. De plus, on constate que les corps cellulaires (repérables grâce aux noyaux) se trouvent majoritairement au centre des motifs (voir en particulier l'image b). Les neurites se développent à partir du centre des motifs et s'étendent de manière isotrope dans toutes les directions. Les cônes de croissance, repérés par le marquage de l'actine, ont aussi une forme isotrope et semblent explorer toutes les directions de leur environnement.

De plus, le nombre de cellules ayant adhéré dépend du diamètre des motifs et se trouve être stable pour une même géométrie de motifs. Par exemple, l'image c de la Figure 137 montre 4 disques d'un diamètre de 300 μ m. Nous avons relevé que le nombre de cellules varie peu d'un disque à l'autre, et on compte en moyenne 50 ± 13 cellules par disque.

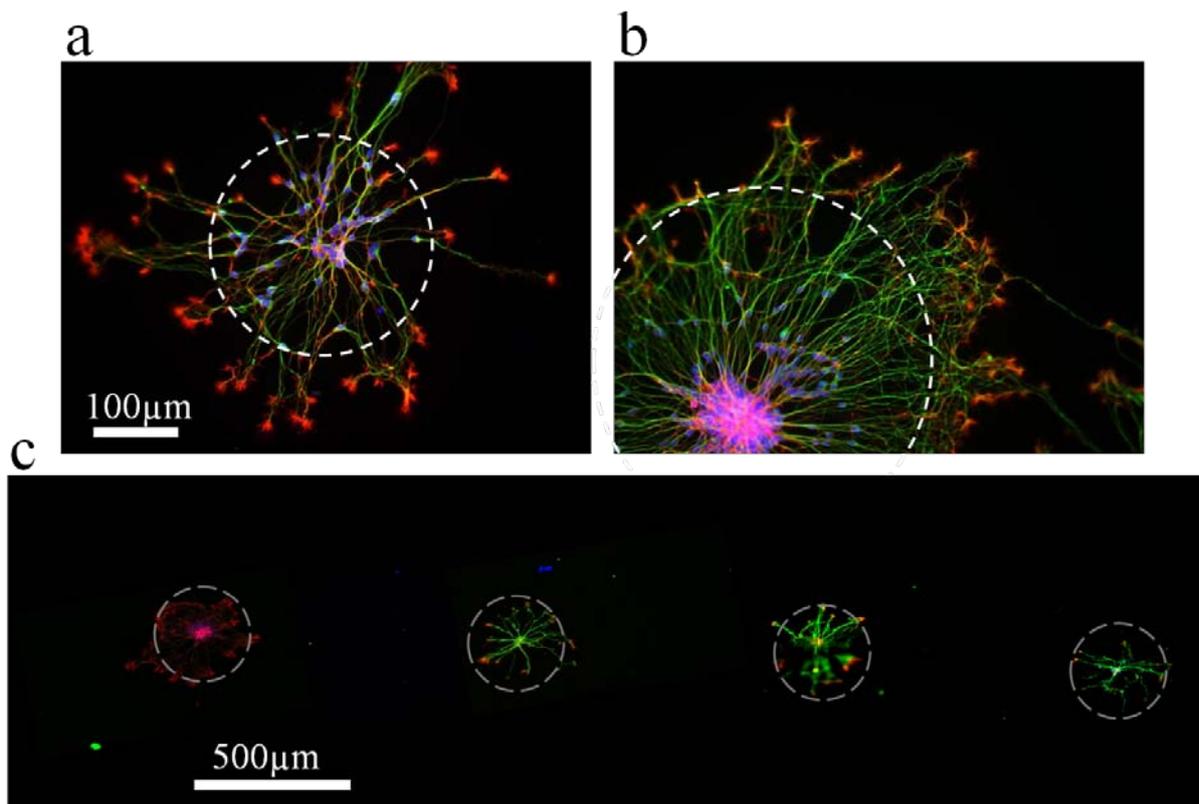


Figure 137 : Images en fluorescence des cultures de cellules neuronales de la lignée Luhmes réalisées sur une surface de PDMS plat, en utilisant le pochoir pour l'ensemencement. Les cercles en pointillés représentent les limites des motifs du pochoir. L'actine a été marquée avec la phalloïdine couplée à un fluorophore Alexa 546nm, rouge, les neurofilaments ont été marqués avec l'anticorps tuj-I couplé à un anticorps secondaire fluorescent Alexa 488nm, vert, les noyaux ont été marqués avec le DAPI. Ensemencement à une densité de 100 000 cellules/mL. **a** : zone avec un motif en disque de 300 μ m de diamètre. **b** : Zone avec un motif en disque de 500 μ m de diamètre. **c** : Zone comportant plusieurs disques de 300 μ m de diamètre.

La Figure 138 montre un autre exemple de géométrie, juxtaposant un disque et un rectangle, repérés en pointillés sur l'image a. On constate de nouveau que la majorité des noyaux se trouve dans la zone centrale du disque et que les neurites se développent de manière isotrope. Par contre, dans le rectangle, les noyaux sont répartis de manière homogène. Les neurites qui sont du côté du disque s'orientent selon la longueur du rectangle et rejoignent les neurites développés par les neurones qui sont dans le disque (voir flèches blanches sur l'image b). En revanche, les neurites qui sont à l'extrémité opposée au disque, donc les plus éloignés du groupe de cellules qui se trouve dans le disque ont une orientation isotrope (voir flèches sur l'image b). Cette orientation des neurites est un indice montrant la communication entre les cellules. Ce résultat montre également qu'il est possible d'obtenir un certain degré d'alignement des neurites sans aucune structuration de surface mais simplement grâce à une ingénierie de l'ensemencement. L'étude de cet effet intéressant n'a pas été détaillée au cours de cette thèse.

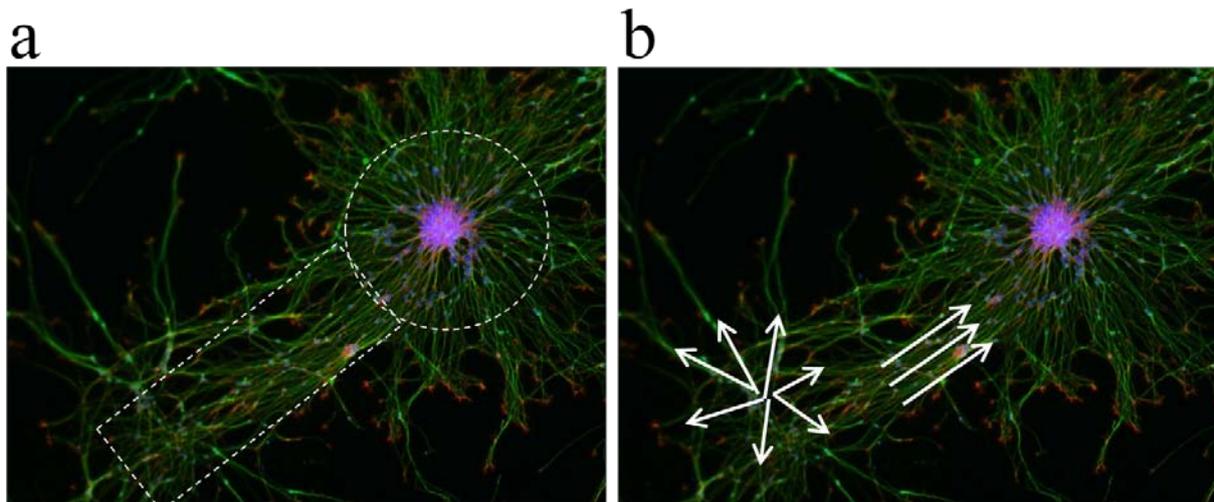


Figure 138 : **Images en fluorescence des cultures de cellules neuronales de la lignée Luhmes réalisées sur une surface de PDMS plat, en utilisant le pochoir pour l'ensemencement.** L'actine a été marquée avec la phalloïdine couplée à un fluorophore Alexa 546nm, rouge, les neurofilaments ont été marqués avec l'anticorps tuj-I couplé à un anticorps secondaire fluorescent Alexa 488nm, vert, les noyaux ont été marqués avec le DAPI. Ensemencement à une densité de 100 000 cellules/mL. **a** : Les lignes en pointillés représentent les limites des motifs du pochoir. **b** : les flèches mettent en évidence la direction de développement des neurites.

Grâce au développement de cette technique, nous disposons d'un outil pour déposer des cellules neuronales selon une géométrie que nous avons préalablement définie, et ceci sans avoir recours à un traitement chimique de la surface de culture. De plus, en utilisant une densité cellulaire et une surface des motifs du pochoir connues, nous maîtrisons et connaissons le nombre de cellules déposées.

L'utilisation de notre pochoir est rapide, simple et ne demande pas de modifier le protocole de culture habituel. Les possibilités d'utilisation sont multiples. Cet outil pourra servir pour réaliser des ensemencements encore plus perfectionnés, mettant en jeu plusieurs étapes d'ensemencement, chacune avec un type cellulaire différent. Cette situation de co-culture, où plusieurs types cellulaires co-habitent permettra d'étudier leurs interactions, ce qui est très prometteur pour faire progresser l'ingénierie tissulaire [253].

2.2. Réalisation de structures plus complexes, en 3 dimensions

Nous avons également exploré les possibilités qui permettraient de créer des prothèses ayant une géométrie plus complexe et plus « aérée » que les prothèses de première génération que nous avons fabriquées jusqu'ici. L'utilisation de la lithographie laser 3D permettrait de créer de telles prothèses. Cette technologie, notamment développée par l'équipe du professeur Wegener, à Karlsruhe permet de fabriquer des structures en 3 dimensions avec une résolution pouvant atteindre la dizaine de nanomètres. Elle repose sur le déplacement d'un point de focalisation d'un laser à travers une résine photosensible. L'entreprise « Nanoscribe » fondée par des membres du groupe du professeur Wegener fabrique des systèmes de lithographie laser 3D et nous avons réalisé plusieurs structures en collaboration avec les ingénieurs de cette société.

La Figure 139 est une représentation schématique du mode de fonctionnement de leur système. Les matériaux que l'on peut structurer sont par exemple la SU-8 ou encore des matériaux propres développés par Nanoscribe (IP-L, IP-G). La dimension maximale des objets que l'on peut fabriquer avec ce système est de $300\mu\text{m}$ de côté. Un nouveau système est depuis disponible pour pouvoir réaliser des objets plus grands.

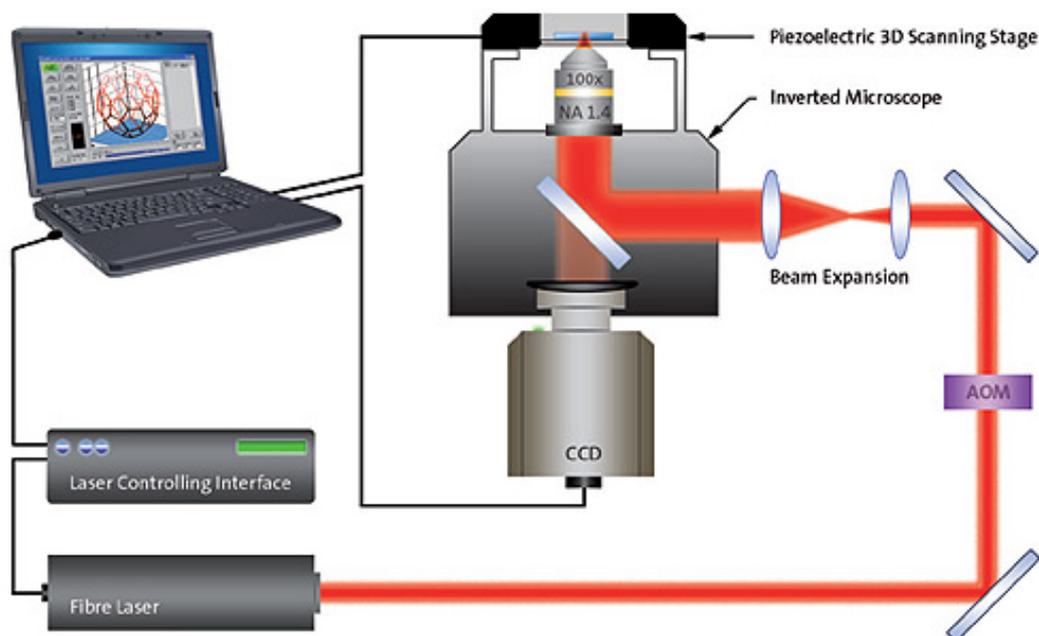


Figure 139 : schéma représentant le fonctionnement du système de lithographie laser développé par Nanoscribe. D'après [254].

Un point de focalisation du laser, appelé voxel, est déplacé dans un volume de résine photosensible. Les photons émis par le laser lorsque celui-ci n'est pas fortement focalisé ont une énergie inférieure au seuil d'absorption de la résine. En revanche, un processus d'absorption à deux photons a lieu dans le faible volume du voxel au point de focalisation, ce qui va permettre la modification de la résine uniquement au point focal.

En pratique, nous avons conçu et dessiné la structure que l'on souhaite fabriquer, en prenant en compte les contraintes imposées par l'équipement de lithographie laser. Afin de réaliser un dessin en trois dimensions de la structure, nous avons utilisé le logiciel de conception 3D « Catia ». Le logiciel de l'équipement « Nanoscribe » peut générer automatiquement un programme de pilotage des moteurs de la platine à partir d'un fichier généré par ce logiciel. Ensuite, on dépose une goutte de matériau photosensible sur une lamelle de verre. Celle-ci est placée sur une platine dont les mouvements sont contrôlés dans les trois directions de l'espace par des moteurs piézoélectriques, extrêmement précis (quelques nm). Les moteurs sont contrôlés par ordinateur. La Figure 140a présente le dessin de la structure et la Figure 140b montre des images MEB des structures obtenues. Les structures sont en « IP-L », une résine à base d'acrylate photosensible développée par Nanoscribe. Ce matériau a été utilisé pour réaliser les premiers essais mais d'autres résines biocompatibles seront étudiées à l'avenir. On observe que les structures obtenues sont globalement conformes au dessin réalisé. Les microsillons, mesurant $20\mu\text{m}$ de large, espacés de $20\mu\text{m}$ et $10\mu\text{m}$ de profondeur, sont présents mais

leur définition n'est pas précise. Certaines zones des structures ont été abîmées lors de leur manipulation.

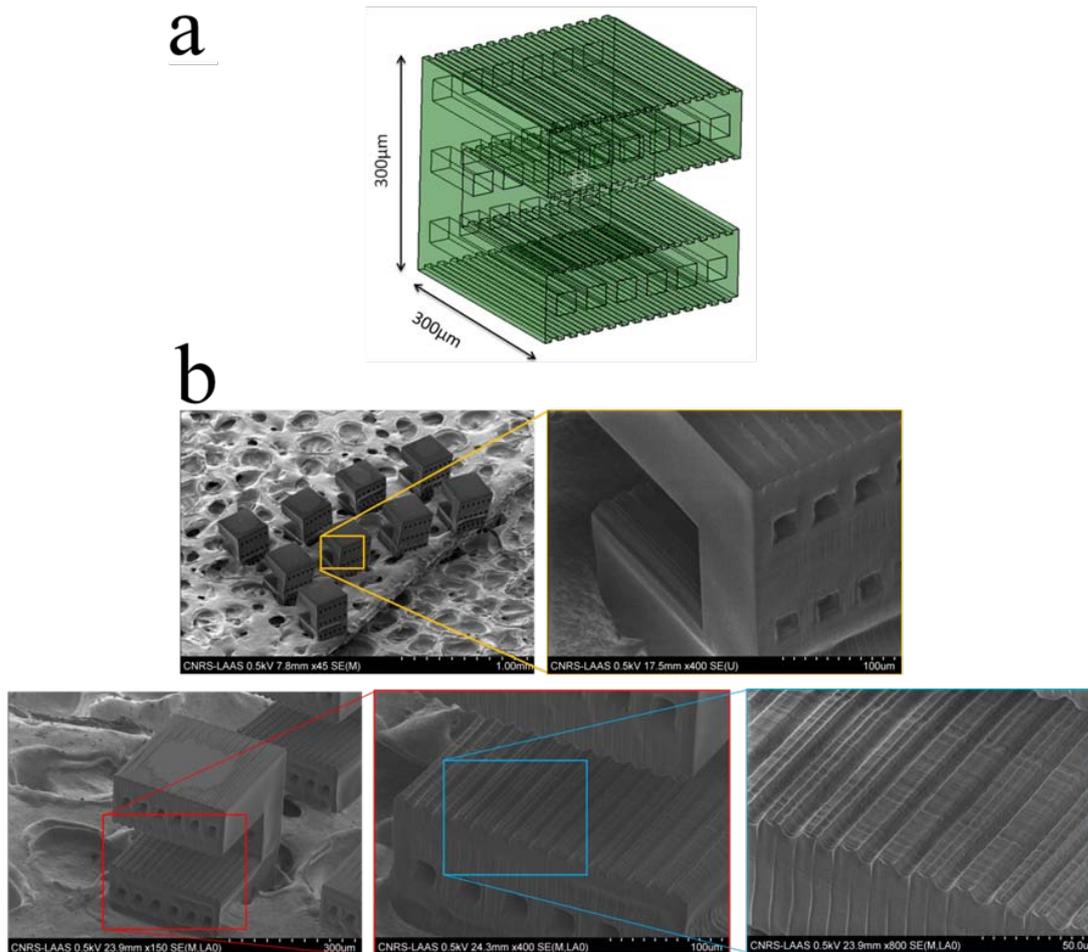


Figure 140 : **a** : dessin réalisé avec le logiciel de conception en trois dimensions « Catia » de la structure à fabriquer. **b**: images MEB des structures obtenues. Pour l'observation, les structures ont été placées sur un scotch carbone.

Cette technique de lithographie laser nous permettrait de réaliser des prothèses plus aérées, ayant une surface développée plus importante que les prothèses de première génération que nous avons fabriquées. On pourrait ainsi déposer davantage de cellules sur cet objet. De plus, cette technologie permet d'adapter la forme des prothèses à celle de la lésion, qui serait imagée par IRM au préalable. On pourrait reproduire de manière détaillée la structure des tissus qui existaient avant la lésion et obtenir des objets « biomimétiques ». Cependant, cette technologie demande un gros investissement financier de départ pour acquérir un équipement et la durée de fabrication des prothèses est 5 à 8 fois plus longue que pour nos prothèses de première génération.

3. Conclusion

Nous avons conçu et fabriqué des bioprothèses, répondant à des besoins identifiés, en nous appuyant sur nos travaux réalisés précédemment in vitro. Ces besoins étaient :

- apporter un nombre maximal de nouvelles cellules neuronales dans la zone lésée du cerveau
- favoriser le développement des neurones

- organiser la croissance des neurones dans une direction déterminée

Pour répondre à ces besoins, nous avons dû prendre en compte les impératifs des techniques de :

- mise en forme et de microfabrication des polymères
- culture cellulaire
- chirurgie

Nos études et travaux nous ont permis d'apporter une réponse à tous ces impératifs. La solution technologique qui a été développée est basée sur l'association d'un polymère non-cytotoxique microstructuré et de cellules souches neurales adultes.

Ainsi, nous avons conçu et fabriqué des prothèses en PDMS, non biodégradables, et des prothèses en PLGA biodégradables. Dans les deux cas, les prothèses sont des plaques de 5mmx2mmx0.2mm. Leurs deux plus grandes faces comportent des microsillons de 60µm espacés de 10µm et de 10µm de profondeur, afin d'organiser la croissance des réseaux neuronaux.

La mise au point d'un support spécifique pour les prothèses a permis d'ensemencer efficacement ces deux faces des prothèses avec une perte minimale de cellules. Ces types de prothèse peuvent être tapissés par une mince couche de NTCs, qui pourront être imbibés de facteurs pharmacologiques avant implantation.

Nous disposons finalement de bioprothèses qui répondent à tous les critères médicaux et techniques initialement identifiés. Elles seront utilisées in vivo, chez le rat.

La mise au point de ces prothèses et l'expérience que nous en avons tirée nous ont amenés à commencer à étudier deux pistes pour l'amélioration de celles-ci.

La première concerne la mise en place d'une technique de pochoir afin de déposer des cellules sur des zones bien précises d'une surface, sans avoir besoin de la modifier. Nous disposons maintenant d'une technique pour maîtriser la localisation et le nombre de cellules déposées.

La deuxième piste est l'utilisation de la technique de lithographie laser 3D pour créer des prothèses microstructurées en trois dimensions moins massives, plus aérées, que nos prothèses de première génération, ce qui devrait permettre d'augmenter le nombre de cellules implantées.

Chapitre 3 – Premiers essais in vivo

1. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit le protocole de fabrication de bioprothèses dont l'ambition est d'amplifier le potentiel réparateur des cellules souches en leur fournissant un support de croissance favorable pour leur développement.

L'environnement fortement interdisciplinaire de cette thèse a également permis d'étudier l'effet de l'implantation in vivo de ces bioprothèses en collaboration avec l'équipe de l'INSERM, dont les membres disposent des accréditations et formations adaptées pour l'expérimentation animale et ainsi de découvrir ce domaine.

Nous avons choisi de réaliser les premiers essais in vivo avec la bioprothèse non biodégradable afin de pouvoir visualiser la prothèse lors des caractérisations des tissus. En effet, si la prothèse utilisée se dégrade au bout de quelques semaines, l'analyse de son intégration dans les tissus est délicate, voire impossible. Ainsi, dans cette première phase exploratoire, nous avons implanté les bioprothèses en PDMS microstructuré et sans NTCs en surface.

Ce chapitre présente le modèle animal choisi par l'INSERM pour réaliser ces essais, ainsi que le protocole expérimental mis en œuvre pour étudier l'effet des bioprothèses sur la récupération fonctionnelle des animaux. Ensuite, nous analysons les premiers résultats obtenus après l'implantation des bioprothèses en PDMS. Nous en faisons le bilan, ce qui nous permet d'envisager des pistes d'améliorations.

2. Modèle animal

Selon la « American National Research Council Committee on Animal Models for Research and Aging », on définit en recherche biomédicale un modèle animal comme un modèle permettant :

- l'étude des données de référence sur la biologie ou le comportement
- l'observation d'un processus pathologique spontané ou induit, celui-ci ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain ou d'autres espèces animales.

Ces modèles sont généralement imparfaits et ne présentent souvent que partiellement le terrain biologique d'un patient humain. Néanmoins, ils s'avèrent très utiles dans un premier temps pour tenter de comprendre les mécanismes des maladies et pour la mise au point de nouveaux traitements. Les objectifs scientifiques, la disponibilité et les exigences réglementaires sont tout autant de facteurs qui sont à prendre en compte pour le choix d'un modèle animal. Les études in vivo doivent

obligatoirement être réalisées par étapes, avec des modèles animaux de plus en plus proches de l'humain, chaque étape devant être validée par une avancée significative vers l'objectif thérapeutique déclaré initialement.

Cette démarche exclut, du moins dans un premier temps, l'utilisation de primates, bien que ceux-ci tiennent un rôle primordial dans la recherche sur le cerveau. Ces animaux possèdent en effet un cerveau d'une complexité, d'une taille et d'une structure proches de celui d'un être humain, mais l'utilisation de primates pour l'expérimentation pose de nombreux problèmes, notamment des questions d'ordre éthique (proximité avec l'homme, intelligence, ...) de coût car son élevage est long et demande des moyens importants (nourriture, entretien, locaux, ...).

Tous ces arguments nous ont guidés vers l'utilisation d'un animal très utilisé en laboratoire, dont l'élevage est bien maîtrisé, à savoir le rat. Il est connu pour son intelligence et sa capacité à trouver de la nourriture en faisant preuve d'adaptation. Il est extrêmement prolifique et de croissance rapide. Il constitue, notamment par rapport à la souris, un bon sujet pour la réalisation de tests de comportement.

Les rats utilisés sont issus de la lignée « Sprague-Dawley ». Ils sont génétiquement stables et sont âgés de 3 mois (Centre d'élevage René Janvier, France). Ils sont hébergés pendant la durée de l'expérience à l'animalerie Claude Bernard située sur le site du CHU de Purpan. Leur origine et leurs conditions d'hébergement et d'utilisation sont conformes aux prescriptions des textes réglementaires, et en particulier de l'article L. 214-3 du code de la recherche, ayant pour objet de leur assurer la meilleure protection possible en accord avec les objectifs du projet scientifique. Les rats sont élevés et maintenus en cage, par groupe de 2 ou 3. Ils disposent de nourriture à volonté, hormis pendant la période où ils sont évalués par les tests mettant en jeu les capacités de l'animal à attraper sa nourriture.

La démarche pour étudier l'effet des bioprothèses est la suivante : une lésion est induite dans une zone du cerveau déterminée, le cortex moteur et le striatum, qui contrôlent la motricité d'une patte du rat. Puis, dans un deuxième temps, nous implantons les prothèses et bioprothèses dans cette lésion et étudions leurs effets sur :

- leur interaction et la réaction des tissus *in vivo*, par histologie
- la récupération de la motricité de rats, par la réalisation de tests comportementaux à intervalles réguliers après l'intervention chirurgicale.

Pour pouvoir réellement attribuer l'effet observé à l'implantation des bioprothèses et s'assurer que les différentes opérations ne nuisent pas à l'animal, nous avons défini différents groupes de rats :

1. le groupe « sham³⁷ lésion » (n=15): les rats de ce groupe subissent la même opération chirurgicale que s'ils allaient être lésés mais ne le sont pas. Ce groupe sert à mesurer l'impact de la seule opération chirurgicale sur le comportement des animaux. Il est un contrôle plus rigoureux que le cas où les rats ne subissent aucune opération.

³⁷ «Sham » signifie imposteur en anglais. Les groupes que l'on nomme « sham ... » miment une opération.

2. le groupe « lésé » (n=10) : les cerveaux de rats sont lésés en utilisant le protocole qui sera détaillé dans le paragraphe suivant. Ce groupe sert à mesurer l'impact de la lésion.

3. le groupe « sham prothèse » (n= 10): comme pour le cas du groupe « sham lésion », ce groupe de rats subit les mêmes opérations chirurgicales que le groupe de rats « prothèse » : il est lésé puis à nouveau opéré pour implanter la prothèse. Celle-ci est introduite, pour mimer le plus fidèlement possible l'opération mais elle retirée quelques secondes après.

4. le groupe « prothèse » (n=10) : les cerveaux de rats sont lésés puis, on leur implante une prothèse ne comportant pas de cellules neurales. Ce groupe sert à évaluer l'effet de la prothèse, que ce soit au niveau comportemental de l'animal mais aussi au niveau de la réaction des tissus in vivo vis-à-vis du PDMS.

5. le groupe « bioprothèse » (n=9) : les rats sont lésés puis on leur implante une bioprothèse, comportant des cellules souches neurales adultes humaines prédifférenciées en neurones in vitro. Ce groupe sert à mesurer l'effet de la bioprothèse sur la récupération fonctionnelle mais aussi à étudier les interactions et réactions entre les cellules implantées et les tissus de l'hôte.

Les cellules qui sont sur les bioprothèses sont d'origine humaine (voir chapitre 2 partie 2). Le choix d'implanter ces cellules chez le rat se justifie par le fait que nous testons une intervention qui sera transposée chez l'homme en cas de succès chez l'animal.

Le schéma présenté sur la Figure 141 résume les interventions chirurgicales ainsi que les caractérisations réalisées pour chacun de ces groupes.

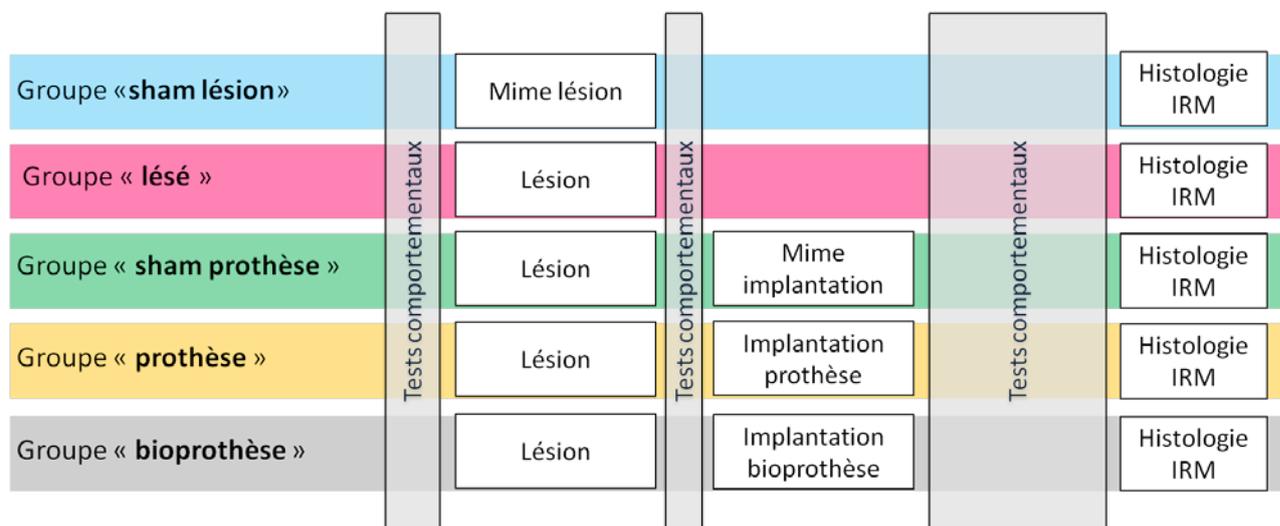


Figure 141 : schéma des opérations réalisées pour chacun des groupes de rats formés.

3. Modèle lésionnel

3.1. Méthode

Nos bioprothèses seront implantées dans une lésion induite dans le cortex moteur primaire de l'un des hémisphères cérébraux gouvernant l'une des pattes avant. Dans le cerveau, certaines zones sont spécialisées dans certaines fonctions. Les fonctions des différentes aires du cerveau ont été identifiées puis répertoriées, ainsi on sait situer une aire sensitive, une aire auditive, une aire motrice, ... on parle d'anatomie fonctionnelle. Pour chaque espèce, ces données sont répertoriées dans des atlas anatomiques.

Pour modéliser une lésion cérébrale dont la cause peut être par exemple un AVC, l'équipe de nos collaborateurs de l'INSERM procède à une lésion d'une partie du cerveau du rat. Le choix de la partie à léser, motrice en l'occurrence, a été déterminé par la fréquence de ce type d'atteinte chez l'homme. Ainsi, pour notre étude, la lésion affecte tout le cortex primaire et également une partie du striatum, ce qui correspond à la fonction motrice de la patte avant du rat. Les tests comportementaux sont ensuite choisis pour mesurer la perte de fonction engendrée par la lésion, notamment la force dans notre cas.

L'animal est dès le début complètement anesthésié profondément par inhalation d'isoflurane gazeux (agent anesthésique de la famille des éthers halogénés). La lésion est induite en injectant avec une seringue Hamilton une toxine qui est un inhibiteur d'enzyme mitochondrial, le malonate (5 μ L, 3M, pH 7,4). D'autres méthodes plus courantes existent, comme l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne, mais l'équipe de l'INSERM l'a jugée incompatible avec notre objectif car le volume lésionnel créé est peu reproductible et ne comprend pas le cortex moteur primaire. D'autre part, notre méthode est relativement simple à mettre en œuvre.

Pour repérer l'endroit précis où s'effectuera l'injection dans le cerveau de l'animal, on utilise un cadre stéréotaxique dans lequel la tête du rat est fixée, comme illustré sur la Figure 142a et b. Chez le rat, le crâne comporte un point caractéristique, appelé « bregma » au croisement de deux sutures (voir Figure 142c). En repérant ce point, et en s'aidant des atlas anatomiques, on déplace le cadre dans lequel est fixé le crâne du rat à l'aide de vis micrométriques de façon à aligner l'outil placé verticalement (seringue Hamilton) et la zone à toucher, en l'occurrence M1 (zone motrice). La Figure 143 illustre le point d'injection, sur l'atlas anatomique « paxinos ». Il se trouve à 2.5mm en latéral par rapport au bregma, 0 mm en antéropostérieur et 2mm en profondeur.

L'animal reçoit une dose de buprénorphine pour éviter la douleur lors de l'opération. Une fois positionné et fixé et après avoir rasé les poils du haut de sa tête, la peau est soigneusement désinfectée à la chlorexédrine puis incisée afin de l'écarter et dégager le crâne. L'os du crâne est perforé avec une perceuse pour permettre le passage de l'aiguille de la seringue contenant la toxine. La seringue est solidaire de la potence mobile verticalement.

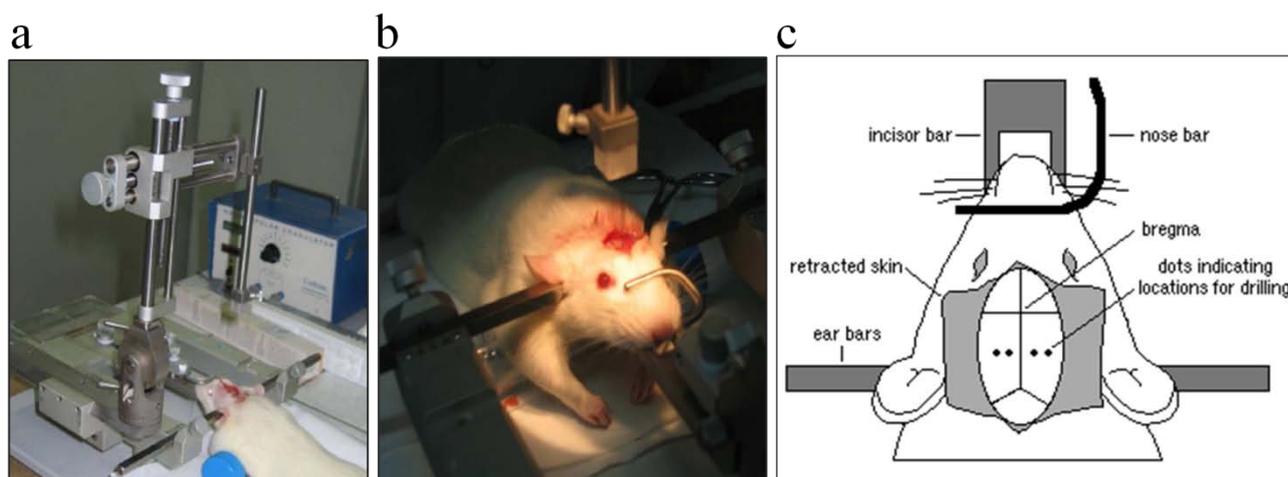


Figure 142 : **a** : photographie du cadre stéréotaxique destiné au petit animal utilisé. Trois vis micrométriques permettent de régler la position du crâne du rat par rapport à l'outil (fraise, seringue, ...) fixé verticalement. **b** : photographie d'un rat anesthésié maintenu en place par le cadre stéréotaxique pendant l'opération. **c** : schéma de la tête d'un rat fixée dans le cadre stéréotaxique. Schématisation du point « bregma », point sortant de l'os, repérable chez tous les rats (schéma d'après [255]).

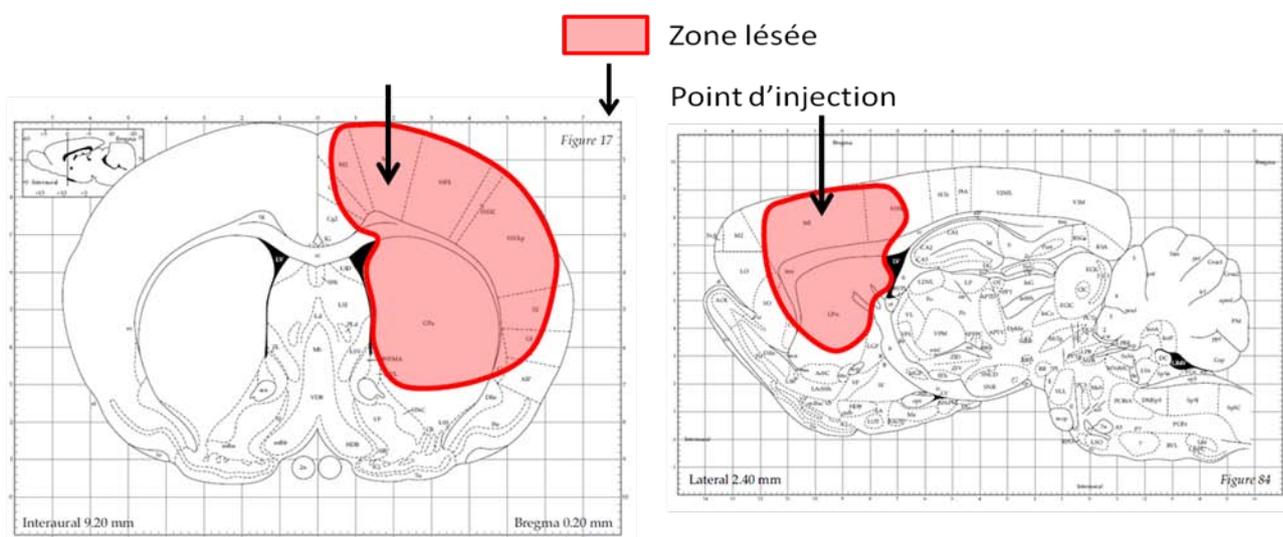


Figure 143 : planches extraites de l'atlas stéréotaxique du rat (« paxinos »). Le point d'injection de la toxine est indiqué par la flèche. La zone en rouge délimite les contours théoriques de la lésion induite.

Afin d'obtenir la lésion souhaitée, plusieurs essais ont été réalisés pour ajuster le protocole de lésion permettant d'obtenir un déficit moteur de la patte avant de l'animal. Les mises au point du volume à injecter et du débit ont été réalisées par l'équipe de l'INSERM et ne seront pas détaillées ici. Un volume de 5 μ L de malonate (3M) injecté à un débit de 1 μ L/min permet d'obtenir le volume de lésion souhaité, après diffusion du malonate dans les tissus. L'orifice est enfin comblé en utilisant de la cire à os et la peau est recousue avec du fil chirurgical. En cas d'attitude prostrée lors du réveil de l'animal, celui-ci est traité avec des corticoïdes (Méthylprednisolone, 30 à 130 mg/kg). Afin de surveiller l'état général du rat et prévenir toute complication, la température corporelle de l'animal est contrôlée durant toute la chirurgie.

3.2. Résultats de lésion

a. Caractérisation de l'effet de la lésion sur le déficit moteur du rat

Pour évaluer les effets de la lésion induite dans le cerveau sur la motricité de l'animal, ainsi que ceux des différents traitements, nous mesurons les performances des rats lors de la réalisation de différentes tâches, pour lesquelles ils ont au préalable été entraînés. Trois tests comportementaux ont été utilisés par l'équipe de l'INSERM. Nous montrerons les résultats obtenus pour l'un d'entre eux, le « grip strength test » (ou test d'accrochage). Ce test, qui a donné les résultats les plus significatifs, permet d'évaluer la force musculaire des membres antérieurs. Pour cela, l'expérimentateur suspend le rat dans le vide afin de simuler sa chute. Il lui présente une tige, qu'il peut saisir pour ne pas tomber (voir Figure 144). Cette tige est reliée mécaniquement à un capteur de force. Lorsque le rat attrape la tige, la force qu'il développe est mesurée. On peut ainsi mesurer la force exercée par la patte dont la zone motrice a été lésée ou par la patte non affectée par la lésion.

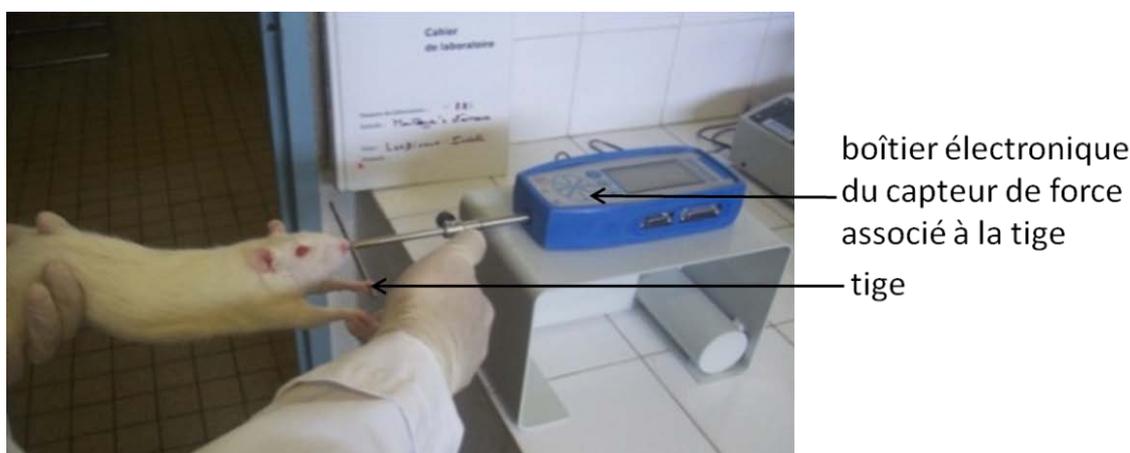


Figure 144 : **photographie d'un opérateur faisant réaliser le test « grip strength » à un rat.** Ce rat a accroché sa patte gauche à la tige présentée par l'opérateur. Lorsque l'expérimentateur voit que le rat a attrapé la tige, il l'entraîne vers l'arrière jusqu'à ce que le rat lâche la tige. Il mesure la force maximale du rat.

Les performances des rats aux différents tests sont mesurées 3 fois par jour pendant trois jours consécutifs :

- avant la lésion pour connaître leur performance en état « normal »
- 2 jours après la lésion, pendant 3 jours pour mesurer le déficit engendré par la lésion
- 1 jour après l'implantation pendant 3 jours puis tous les mois pour mesurer l'évolution des performances des rats lésés et ayant été implantés.

La Figure 145 présente l'évolution dans le temps des pourcentages de performances par rapport à leur performance initiale obtenue pour les rats du groupe « sham lésion » (15 rats) et les rats du groupe « lésé » (10 rats). Les performances de chaque rat sont normalisées par rapport à la performance initiale du rat, avant toute opération. Après la lésion pour le groupe « lésé » et le mime de la lésion pour le groupe « sham lésion », on observe une baisse des performances. Cette diminution est très

marquée pour le groupe de rats lésé : 2 jours après la lésion, leur capacité n'est plus que de 30%. La lésion génère un déficit moteur important de la patte avant droite de l'animal. Pour les deux groupes d'animaux, on note une récupération des performances avec le temps. Les rats qui n'ont pas été lésés retrouvent rapidement leur pleine capacité, une fois le « traumatisme » de la chirurgie passé (après une trentaine de jours). Les rats lésés quant à eux présentent une courbe de récupération « naturelle » plus lente, avec un déficit pérenne au bout de 90 jours qui atténue de 40% leur performance initiale. Cela montre que le cerveau du rat met en place un mécanisme de récupération fonctionnelle, probablement lié à une réorganisation cérébrale. Cette courbe est très importante pour notre étude car elle montre la récupération typique d'un rat en l'absence de toute prothèse. On peut ainsi mesurer la cinétique « naturelle » de récupération ainsi qu'une valeur maximale de la récupération (incomplète) après un temps long.

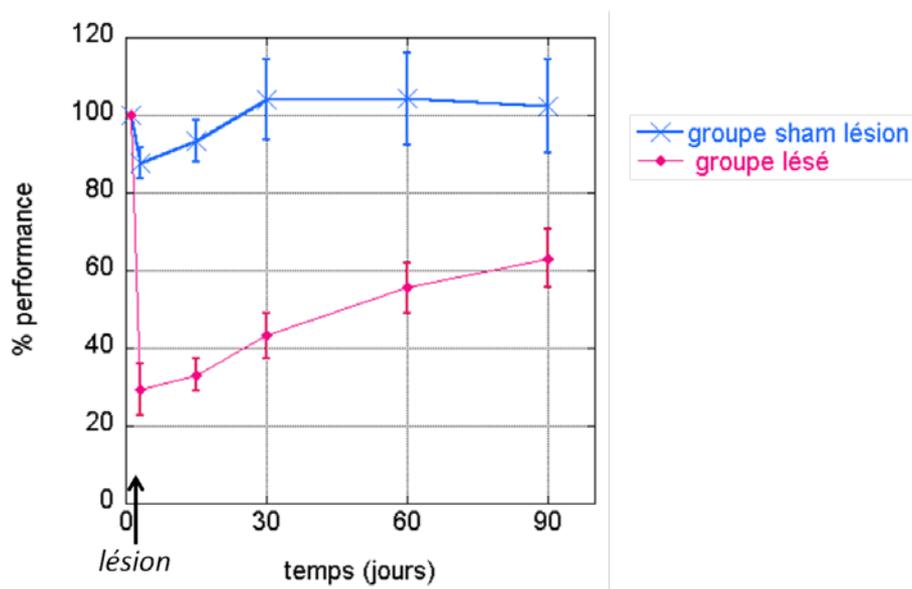


Figure 145 : **Effet de la lésion provoquée par l'injection de malonate** - Evolution du pourcentage de performance des rats du groupe « sham lésion », qui n'ont pas été lésés (n=15) et des rats du groupe « lésé » (n=10).

b. Visualisation de la lésion par histologie

Pour visualiser la lésion réalisée, nous avons utilisé la technique d'histologie. Après que les tests comportementaux d'une durée de trois mois aient été effectués, les animaux sont sacrifiés et les cerveaux sont prélevés. Des fines coupes sont alors réalisées pour pouvoir procéder à différents immunomarquages de cellules de ces coupes. Pour cela, les rats sont endormis par injection létale de pentobarbital de sodium, appartenant à la famille des barbituriques, puis, une perfusion intracardiaque est réalisée. Après rinçage du système circulatoire sanguin par perfusion d'une solution de PBS hépariné, les tissus sont fixés en perfusant pendant 45 minutes une solution de paraformaldéhyde (4% dans du PBS).

Les cerveaux sont extraits puis immergés pendant 24 heures dans des bains de sucrose. Ils sont ensuite coupés à l'aide d'un microtome selon le plan horizontal. Les tranches, d'une épaisseur de 50 µm sont

colorées soit avec du crésyl violet, colorant le cytoplasme en bleu et la chromatine des noyaux en rouge-violet, soit par immunofluorescence.

La technique d'histologie va nous permettre d'analyser les tissus potentiellement formés autour et dans la lésion et surtout autour des prothèses et bioprothèses implantées. Combinée à la réalisation de marquages immunofluorescents spécifiques, nous pourrons aussi analyser la nature des cellules présentes autour des prothèses (cicatrice gliale, migration de nouveaux neurones, survie des neurones implantés) afin d'étudier leur « intégration » dans les tissus et la lésion.

La Figure 146 présente une photographie d'un cerveau lésé retiré du crâne. La lésion est entourée par le cercle en pointillés verts.

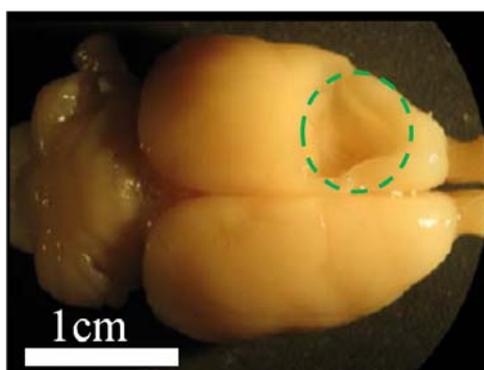


Figure 146 : **photographie d'un cerveau de rat ayant été lésé** par l'injection de malonate dans la zone motrice. La zone lésée est visible à l'intérieur du cercle en pointillés verts.

La Figure 147 présente des images de coupes horizontales réalisées dans la zone du cerveau lésé, colorées au crésyl violet. La zone lésée apparaît en blanc. D'après ces deux figures, on observe que la lésion s'étend sur une grande proportion de l'hémisphère gauche et dépasse largement la zone primaire motrice de cet hémisphère. En effet, pour pouvoir obtenir un déficit fonctionnel mesurable de la patte avant du rat, des tests préliminaires ont montré que la zone lésée doit être plus étendue par rapport à ce qui était envisagé initialement. Cela tient probablement au fait que les rats utilisés sont jeunes et disposent donc d'un cerveau très plastique, capable de se réorganiser rapidement après un traumatisme de faible ampleur, ce qui n'est pas le cas du cerveau adulte humain âgé. Ce point met en évidence une des limites du modèle animal du rat.

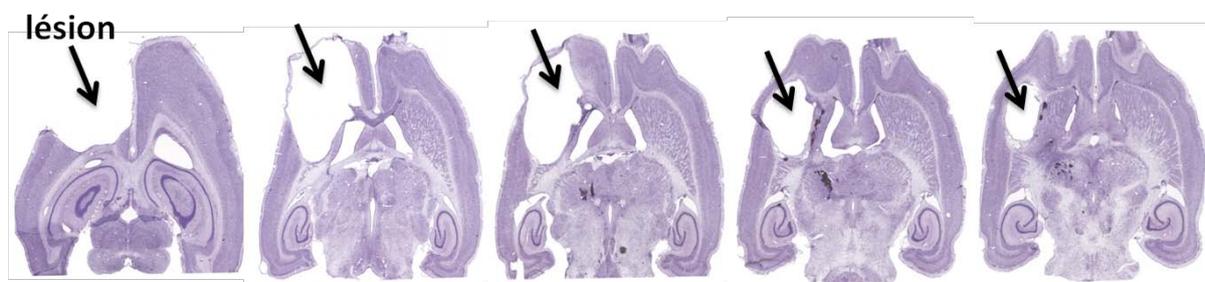


Figure 147 : Volume lésionnel après lésion au malonate. **Images de coupes horizontales successives d'un cerveau de rat dans lequel une lésion a été induite.** Coloration au crésyl violet (noyaux cellulaires et cytoplasme). Les flèches indiquent la localisation de la lésion. Rat sacrifié 3 mois après avoir subi la lésion.

Les lésions ont aussi été caractérisées en IRM. Ces deux techniques ont permis de mesurer le volume lésionnel obtenu, qui est de $86 \pm 53 \text{ mm}^3$. Ce volume n'est pas identique pour tous les rats, du fait de la variabilité de leur sensibilité au malonate ou de sa diffusion dans les tissus. Ainsi, dans le souci de réaliser ensuite des comparaisons rigoureuses du comportement des rats, les rats ont été triés en fonction du déficit mesuré 2 jours après la lésion. Nous ne conservons que les rats qui ont un déficit compris entre 20% et 40%.

Pour observer plus précisément l'effet de la lésion sur les tissus, nous avons réalisé un marquage immunofluorescent de la GFAP (couplé à un fluorophore Alexa 488nm, vert) des astrocytes ainsi qu'un marquage spécifique de la microglie du rat (monocytes et macrophages) avec l'anticorps anti-ED1, (couplé à un fluorophore Alexa 488nm, vert). La Figure 148 présente les images obtenues. Les noyaux de toutes les cellules ont été marqués par le DAPI (bleu). Il n'y a pas de cellules dans la lésion (aucun noyau visible). On observe de plus un grand nombre d'astrocytes en périphérie de la lésion. Très peu d'astrocytes se trouvent dans les tissus éloignés de la lésion. Les astrocytes ont migré vers la lésion, de même que les macrophages (Figure 148), et forment une cicatrice gliale à la périphérie du tissu lésé. Il s'agit d'une réaction logique face à un milieu hostile in vivo car une de leurs fonctions est de participer à la réparation et cicatrisation des tissus cérébraux.

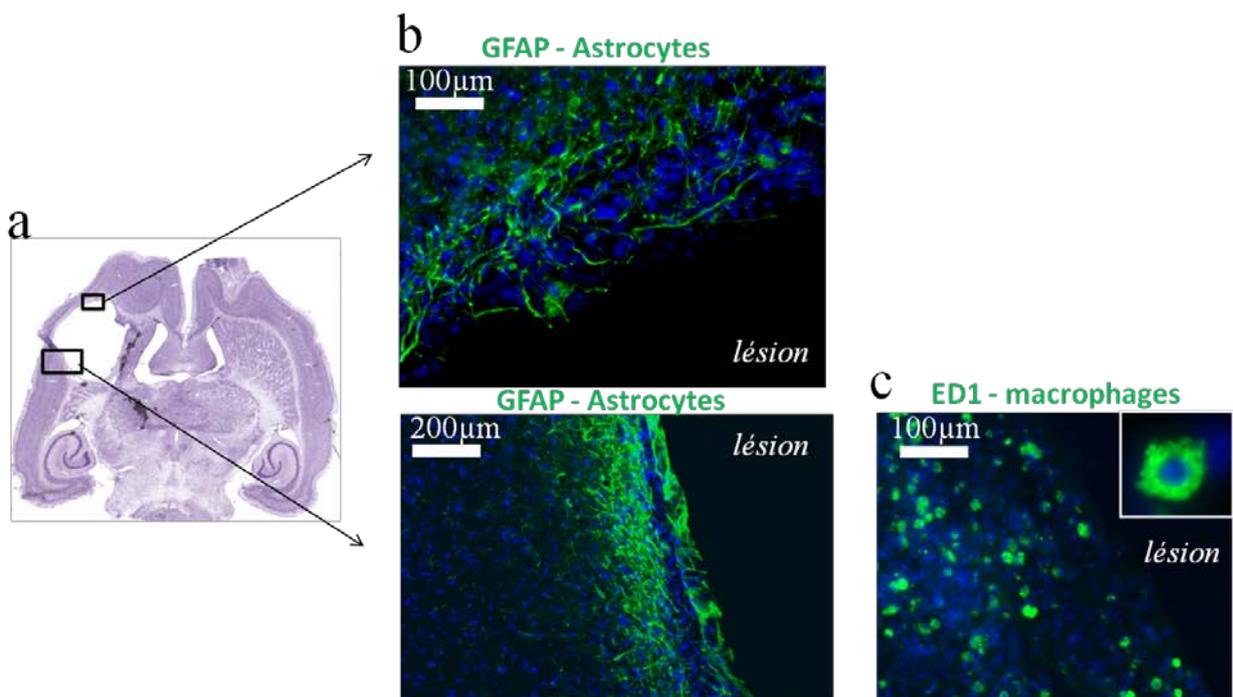


Figure 148 : **Migration des astrocytes de l'hôte vers la périphérie de la lésion.** a : image d'une coupe horizontale de cerveau colorée au crésyl violet. b : images en fluorescence d'une zone située en bord de la lésion. Marquage GFAP (astrocytes, vert) et noyaux (DAPI, bleu). c : images en fluorescence d'une zone située en bord de la lésion. Marquage ED1 (macrophages, vert) et noyaux (DAPI, bleu).

4. Implantation des bioprothèses et premiers résultats de récupération fonctionnelle

4.1. Méthode d'implantation

Pour comprendre et prendre en compte dès la conception des bioprothèses les impératifs et exigences de la chirurgie pratiquée par l'équipe de l'INSERM, nous avons assisté et participé aux opérations chirurgicales de mise au point. Nous avons ainsi intégré pour la conception des bioprothèses les impératifs de forme, de dimensions ainsi que les impératifs relatifs à leur stérilisation, conservation, transport et manipulation.

L'implantation des bioprothèses est réalisée 15 jours après avoir induit la lésion, afin d'éviter la phase aigue post-lésionnelle particulièrement inflammatoire.

Pour implanter les prothèses de PDMS dans la lésion, le rat est au préalable positionné dans le cadre stéréotaxique, et endormi en suivant la même méthode décrite pour la réalisation de la lésion. Avant l'insertion des prothèses, les rats sont traités à l'antibiotique terramycine. Ensuite, la boîte crânienne doit être découpée localement après avoir dégagé la peau qui la recouvre. Pour cela, les chirurgiens réalisent un « volet crânien », c'est-à-dire qu'ils découpent avec une fraise l'os sur un périmètre entourant la zone où se trouve la lésion (disque de 5mm de diamètre) Après découpe, l'os est soulevé pour accéder aux tissus. Le chirurgien dispose ainsi d'une bonne visibilité sur le cerveau. La zone lésée est repérée car elle présente un léger gonflement. Par contre, il dispose de peu d'informations sur l'étendue de la lésion et peu de moyens de contrôle sur la position verticale de l'implant dans la lésion. La bioprothèse est saisie avec une pince et insérée directement dans la lésion³⁸. Ces manipulations sont réalisées le plus rapidement possible afin de ne pas endommager les cellules neurales se trouvant sur la bioprothèse. La Figure 149 illustre cette opération. Nous implantons 3 prothèses en parallèle dans chaque lésion afin d'occuper un maximum l'espace lésionnel avec les prothèses.

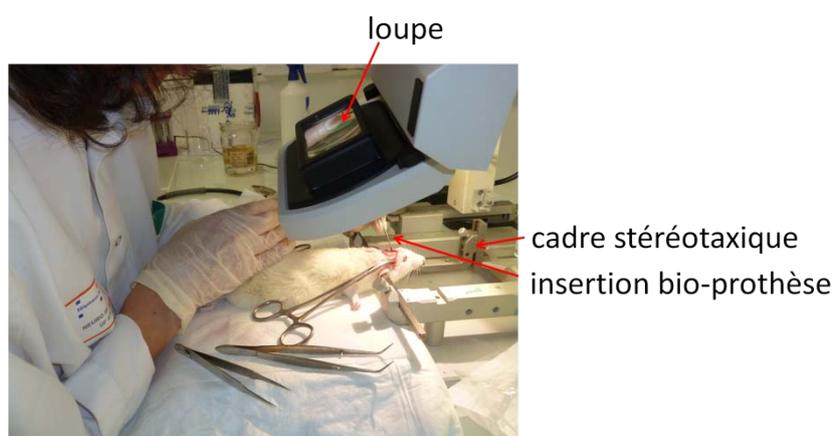


Figure 149 : photographie de l'étape d'implantation de la bioprothèse.

³⁸Avant leur implantation, les bioprothèses sont conservées dans du milieu de culture cellulaire à 37°C. Pour rappel, les bioprothèses sont regroupées par groupe de 5 et l'opérateur doit au préalable les désolidariser à l'aide d'un ciseau.

- Effet de l'opération chirurgicale sur le comportement des rats

Nous avons cherché à savoir quelles étaient les conséquences de l'acte chirurgical réalisé pour l'insertion de trois prothèses dans la lésion d'un rat. Pour cela, nous avons soumis les rats au test comportemental « grip strength » et nous avons comparé l'évolution des performances des rats du groupe « lésé », qui ont subi la seule lésion et des rats du groupe « sham prothèse » qui ont aussi été lésés et qui ensuite ont subi une deuxième opération mimant l'implantation des prothèses (les prothèses ne sont pas laissées in situ, elles sont retirées quelques secondes après leur insertion). La Figure 150 présente les résultats obtenus. On observe que les évolutions des capacités des deux groupes de rats sont comparables. Les cinétiques de récupération fonctionnelle des deux graphes sont quasi identiques. **La deuxième opération chirurgicale réalisée pour implanter les prothèses ne présente aucun effet délétère sur la récupération des rats.** Ces résultats conformes à nos attentes nous amènent à poursuivre nos opérations avec ce protocole.

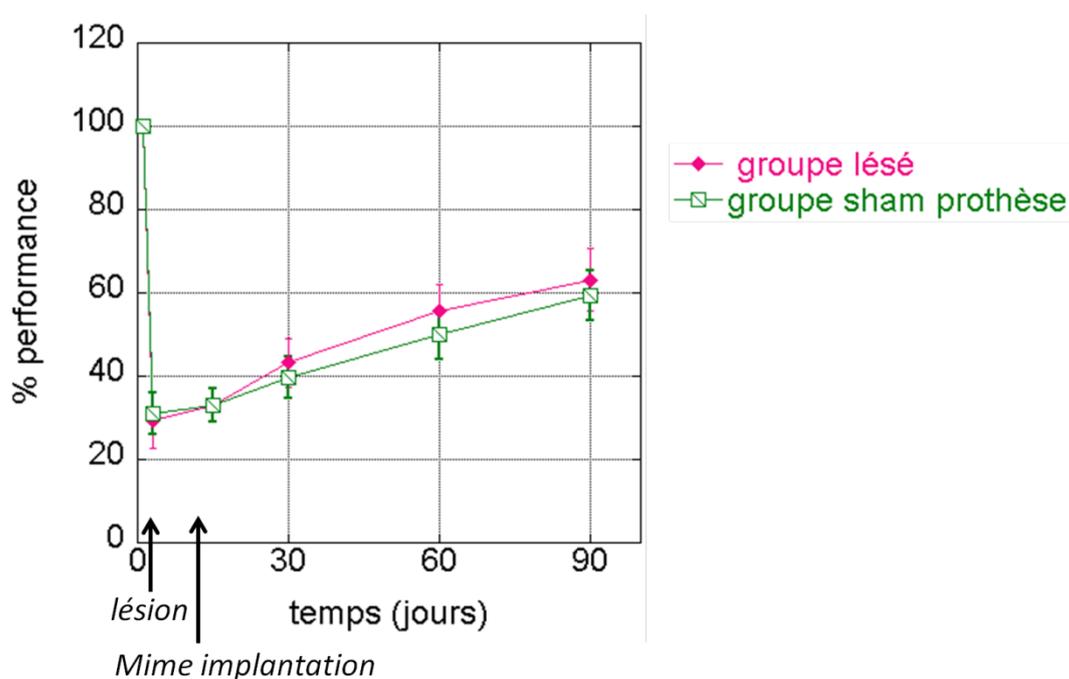


Figure 150 : Effet de l'opération d'implantation sur l'évolution du pourcentage de performance. Groupe « lésé » (rats lésés) (n=10) et groupe « sham prothèse » (n=10).

4.2. Analyse des résultats d'implantations

a. Effet de l'implantation de prothèses en PDMS

Pour étudier in vivo l'effet des prothèses en PDMS microstructuré, nous avons implanté aux rats du groupe « prothèse » des prothèses ne comportant pas de cellules sur leurs surfaces. Ce groupe nous permet d'observer la réaction des tissus cérébraux à ce polymère, encore rarement implanté surtout pendant des périodes aussi longues. La Figure 151 montre l'évolution des performances des trois

groupes de rats, le groupe de rats ayant reçu la prothèse, le groupe de rats lésés et le groupe de rats non lésés (sham lésion). On observe que les performances de tous les groupes de rats augmentent avec le temps, signe d'une récupération et d'une plasticité naturelle. On remarque surtout que l'évolution des capacités du groupe de rats « prothèse » est comparable à celle obtenue pour les rats lésés, ce qui montre que la présence des prothèses en PDMS dans le cerveau ne ralentit ni n'accélère la récupération « naturelle » des rats. Ainsi, la présence des 3 prothèses de PDMS in vivo ne semble pas provoquer de réaction négative après 90 jours, ce qui pourrait témoigner d'une bonne biocompatibilité. Leur présence n'induit aucun effet thérapeutique, ce qui est un résultat attendu car les prothèses n'apportent aucune nouvelle cellule neurale au sein de la lésion.

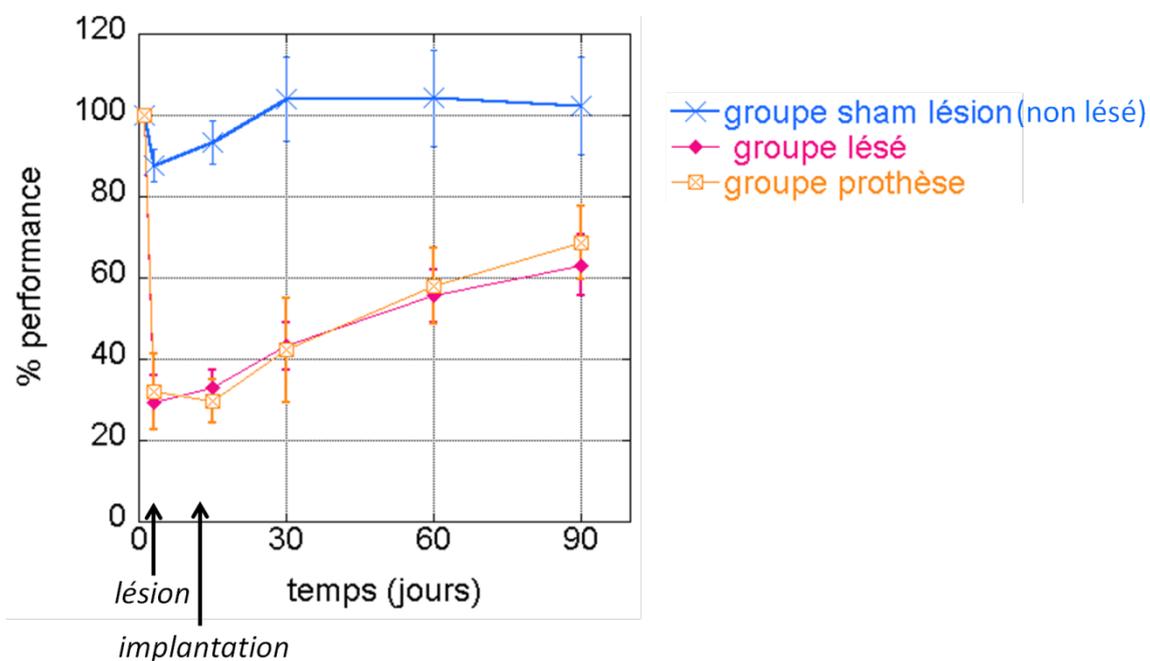


Figure 151 : Effet de l'implantation des prothèses de PDMS ne comportant pas de cellules sur l'évolution du pourcentage de performance. Groupe « lésé » (rats lésés) (n=10) et groupe « prothèse » (n=10).

Pour comprendre plus en détails ces résultats, nous avons procédé à la découpe des cerveaux, 3 mois après l'implantation, et à l'analyse des tissus par histologie.

La Figure 152 montre deux coupes successives colorées au crésyl violet des cerveaux dans lesquels 3 prothèses ont été implantées. La découpe au microtome des cerveaux comportant les prothèses de PDMS est très délicate car le PDMS étant plus dur que les tissus cérébraux, les prothèses se désolidarisent des tissus. On distingue les emplacements et les formes des prothèses (rectangles blancs, sans cellules puisqu'il y avait la prothèse). Un tissu s'est développé autour des prothèses de PDMS. La nature de ce tissu n'est pas encore clairement identifiée.

De plus, nous avons observé que les prothèses sont parfois implantées en bord de lésion et même en partie dans les tissus sains (cas de la Figure 152). Cette imprécision est due à la difficulté technique de localiser la lésion et de connaître sa taille. De plus, l'implantation étant manuelle, nous ne disposons que de peu de contrôle sur la hauteur de l'insertion des prothèses. Ces points pourront être

améliorés en réalisant une caractérisation à l'IRM de tous les cerveaux lésés avant l'implantation des prothèses et en fixant les prothèses à un outil déplaçable verticalement de manière précise à l'aide du cadre stéréotaxique. Cette implantation partielle dans les tissus nous a permis d'étudier la réaction des tissus sains au contact prolongé avec le PDMS.

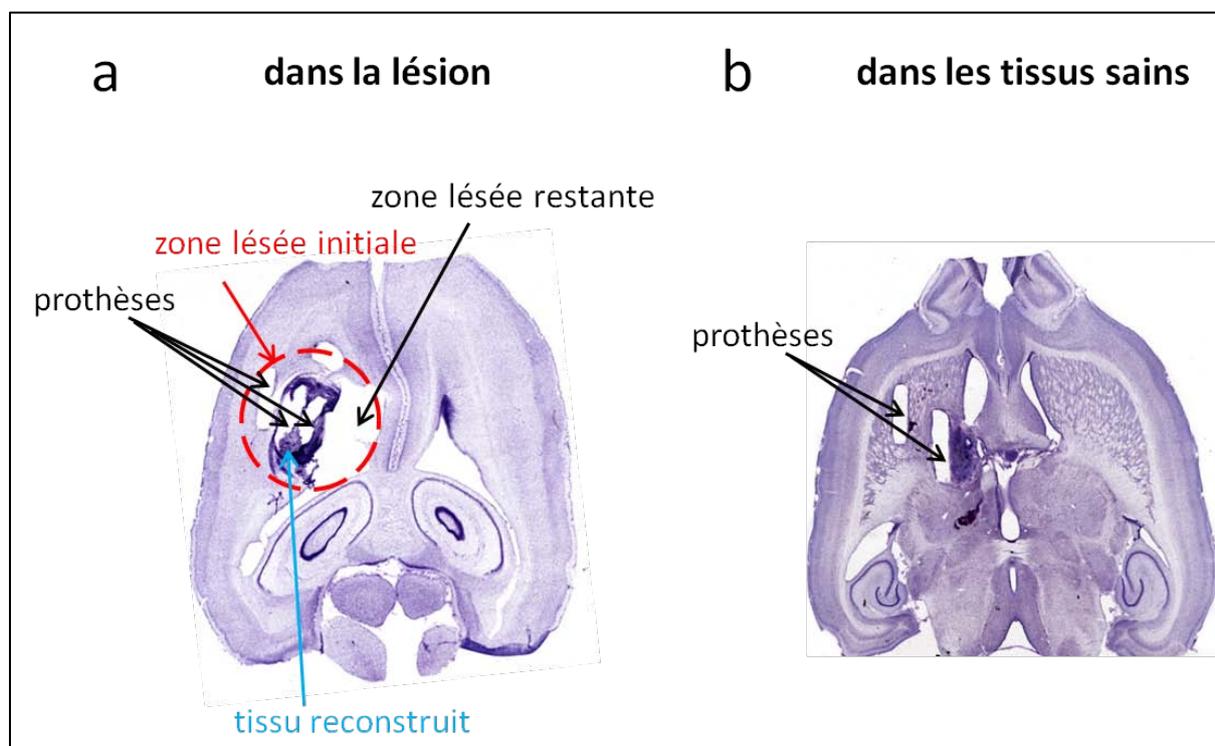


Figure 152 : coupes horizontales d'un cerveau, 3 mois après l'implantation des prothèses de PDMS. **a** : image d'une coupe où les 3 prothèses implantées se trouvent dans la lésion. Du tissu s'est reconstruit autour des prothèses. **b** : image d'une coupe où 2 prothèses sont dans les tissus sains.

Pour définir le tissu formé **autour des prothèses**, nous avons réalisé des marquages immunofluorescents. Nous avons commencé par réaliser des immunomarquages de cellules actrices de la réaction inflammatoire, les macrophages et les astrocytes afin d'étudier la réaction qui a lieu in vivo face au PDMS. La Figure 153 présente les images obtenues, après avoir marqué les macrophages (a, marquage ED1 + Alexa 488nm, vert) et les astrocytes (b, marquage GFAP + Alexa 488nm, vert), autour de la prothèse se trouvant dans la lésion. On observe la présence d'astrocytes et de rares macrophages autour de la prothèse. Ces cellules semblent avoir migré vers la surface du PDMS. Cette réaction est comparable à celle observée précédemment au bord de la lésion. Ces deux types de cellules contribuent à la formation de la cicatrice gliale, processus de défense et de cicatrisation. Cette « enveloppe » peut constituer une barrière pour la migration des neurones vers la prothèse ou l'intégration des neurones implantés dans les tissus de l'hôte. La réaction observée est comparable à celle obtenue lors de l'implantation d'autres matériaux [256], comme le PLGA et ne semble pas excessive.

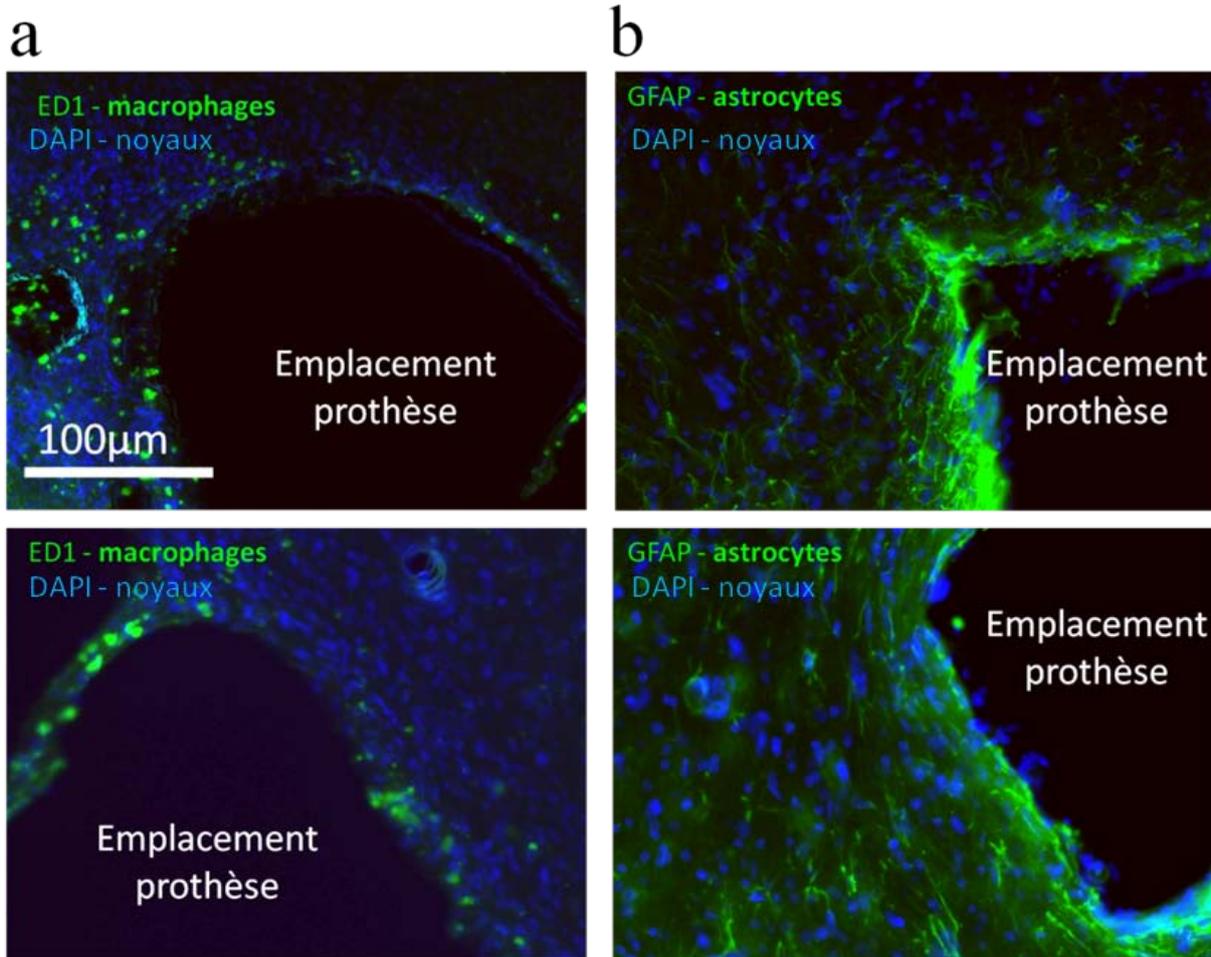


Figure 153 : Macrophages et astrocytes présents autour des prothèses de PDMS dans la lésion, après 3 mois d'implantation. Images prises avec un microscope optique en fluorescence. **a** : marquage des macrophages avec le marqueur ED1, couplé à un anticorps secondaire fluorescent Alexa 488nm (vert). Marquage de tous les noyaux avec le DAPI(bleu). **b** : marquage des astrocytes (GFAP couplé à un anticorps secondaire fluorescent Alexa 488nm, vert). Echelle identique pour toutes les images.

De plus, des marquages immunofluorescents des neurones matures (marqueur SMI312³⁹) nous ont permis d'observer la présence de quelques neurones (voir Figure 154). Ils se distinguent du « bruit de fond » vert par leur forte intensité de fluorescence. Très peu de neurones de l'hôte se sont développés sur la prothèse. Ce résultat n'est pas surprenant car la lésion ne constitue pas un milieu favorable pour la migration et la croissance des neurones. Ce point important montre clairement la nécessité d'équiper ces prothèses de PDMS avec des cellules exogènes, car la lésion empêche la colonisation naturelle des prothèses par des cellules endogènes.

³⁹ SMI312 est un marqueur axonal

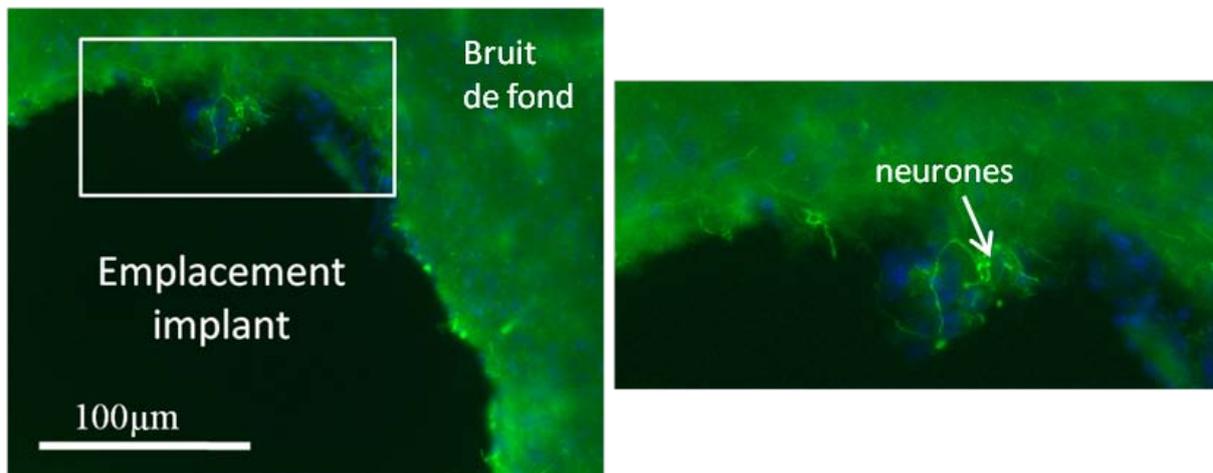


Figure 154 : coupes des tissus reconstruits autour des prothèses, 3 mois après leur implantation dans la lésion. Marquage immunofluorescent des neurones avec le marqueur des neurones immatures SMI 312, couplé à un anticorps secondaire fluorescent Alexa488nm, vert. Marquage de tous les noyaux cellulaires avec le DAPI (bleu).

La Figure 155 montre une image de l'emplacement d'une partie de prothèse **implantée dans les tissus sains**. La densité d'astrocytes présents autour de la prothèse est modérée. Ils ne paraissent pas être plus nombreux autour de la prothèse que dans les tissus sains environnants. Ces analyses nous ont permis de **valider le PDMS comme étant un matériau non biodégradable adapté à l'utilisation in vivo**. Si l'on observe en détails la frontière entre le PDMS et les tissus, on relève la présence de nombreux noyaux cellulaires tout autour de la prothèse, en particulier dans les microsillons de sa surface. De manière beaucoup plus surprenante, nous constatons que les surfaces de la prothèse sont colonisées par des cellules de manière **non homogène**. Sur le zoom de la Figure 155, on observe que l'invasion de la surface de la prothèse s'opère de **manière organisée**, avec des fronts d'invasion régulièrement espacés. On relève sur cette image la géométrie des microsillons. Ainsi, il semble clair qu'*in vivo*, les sillons du PDMS influencent l'organisation cellulaire du tissu hôte de manière similaire aux observations *in vitro*. Les sillons sont « remplis » de noyaux (voir zoom Figure 155). Ces cellules ne sont pas des astrocytes. D'autres marquages immunofluorescents spécifiques nous ont permis d'éliminer les hypothèses que ces cellules soient des macrophages ou encore des neurones. D'autres analyses en utilisant des anticorps spécifiques pour d'autres types cellulaires devraient nous permettre d'identifier ces cellules.

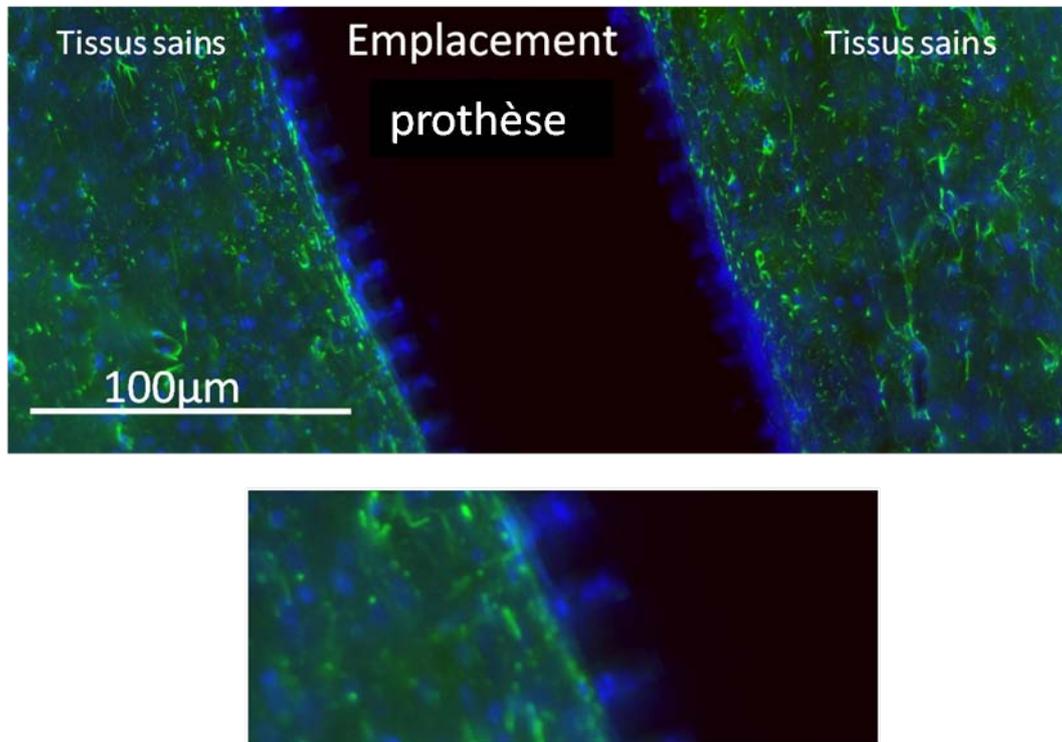


Figure 155 : Marquage des astrocytes et des noyaux cellulaires présents autour de l'emplacement de la prothèse dans les tissus sains se trouvant sous la lésion. La prothèse n'est plus présente au sein des tissus. Marquage de GFAP couplé à un anticorps secondaire fluorescent Alexa 488nm, vert. Marquage de tous les noyaux avec le DAPI (bleu). Encart : zoom sur les bords de la zone qui fût en contact avec la prothèse.

Les cellules sont ici aussi sensibles à la topographie du matériau sur lequel elles sont mises en culture. Peu d'études se sont intéressées à étudier si ce phénomène a lieu in vivo. Nisbet et al, par exemple, ont montré que les cellules neurales qui migrent in vivo sur un échafaudage constitué de fibres orientées de PCL ne s'orientent pas dans le sens des fibres, contrairement aux cellules neuronales cultivées in vitro sur ces mêmes fibres [234]. Dans notre cas, il semblerait que des cellules avec lesquelles le PDMS microstructuré est en contact in vivo soient sensibles à cette topographie. La même observation a été faite lorsque la prothèse est située au sein de la lésion. En effet, pour observer l'organisation des cellules qui ont adhéré sur les faces principales de notre prothèse de PDMS comportant les microsillons, nous avons découpé soigneusement le cerveau autour de la prothèse, jusqu'à pouvoir l'en extraire dans sa totalité, sans déchirer les tissus. La prothèse étant implantée dans la lésion, cela est relativement aisé. La Figure 156 montre deux images en fluorescence d'une face principale de la prothèse de PDMS. Seuls les noyaux ont été marqués. On observe que **les noyaux se trouvent quasiment exclusivement dans les microsillons**. Ces résultats montrent que la prothèse est utilisée comme support d'adhésion par les cellules de l'hôte. De plus, **ces cellules sont sensibles à la topographie de sa surface et s'y organisent de manière similaire à celle observée in vitro**.

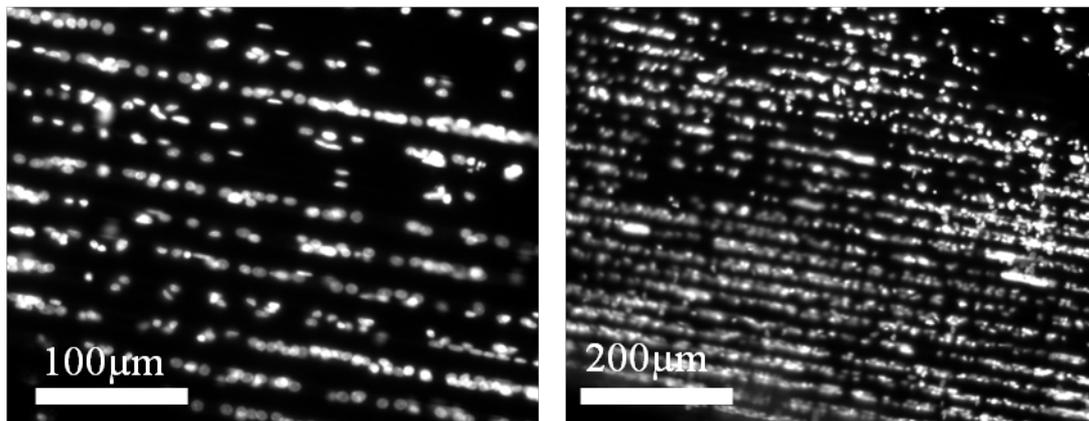


Figure 156 : **Surface d'une prothèse microstructurée, après 3 mois de séjour dans une lésion.** Images en noir et blanc des noyaux cellulaires, marqués en utilisant le DAPI.

b. Effet dans le temps de l'implantation d'une bioprothèse en PDMS comportant des cellules souches neurales différenciées en neurones mesuré lors de tests comportementaux

Ce paragraphe présente les résultats aux tests comportementaux obtenus après l'implantation des bioprothèses⁴⁰. Les bioprothèses sont en tous points semblables aux prothèses de PDMS mais elles sont en plus équipées de cellules souches neurales adultes humaines que l'on a cultivées in vitro et prédifférenciées en neurones pendant 3 jours. Les taux de différenciation de ces cellules en neurones et en astrocytes ont été quantifiés⁴¹ et s'élèvent à $20\pm 4\%$ pour les neurones et $15\pm 4\%$ pour les astrocytes. Ces cellules étant d'origine humaine, nous n'en disposons que d'un nombre limité. Ainsi, pour ces essais, chaque bioprothèse est équipée de 15 000 cellules souches neurales. Après cette phase de culture in vitro, les bioprothèses sont transportées à l'animalerie afin d'être implantées in vivo. Comme pour le cas de l'implantation des prothèses seules, nous implantons trois bioprothèses dans la lésion de chaque cerveau de rat. Chaque rat reçoit donc au total 45 000 cellules souches prédifférenciées en neurones (soit environ 9000 neurones).

La Figure 157 montre l'évolution des capacités du groupe de rats « bioprothèse » sur une durée de 3 mois après avoir subi l'implantation. On observe clairement que dès le premier mois post-implantation, la cinétique de récupération fonctionnelle du groupe de rats implantés avec les bioprothèses rats est plus rapide que celles de tous les autres groupes. Les performances des groupes de rats équipés des bioprothèses deviennent significativement meilleures que celles des rats lésés n'ayant reçu aucun traitement thérapeutique (analyse par Anova à 2 facteurs : traitement et temps, après vérification de l'homogénéité des variances) au bout de deux mois. On s'aperçoit qu'après 3 mois, les rats équipés des bioprothèses ont retrouvé 80% de leurs capacités initiales, alors que les rats qui n'ont reçu aucun traitement récupèrent seulement à peine plus de 60% de leurs capacités initiales. L'implantation des bioprothèses a donc permis une amélioration des capacités d'environ 20%. La différence entre ces deux groupes s'accroît avec le temps en faveur du groupe « bioprothèse ». Selon

⁴⁰ Le protocole de fabrication des prothèses ainsi que de leur ensemencement avec les cellules neurales a été décrit dans le chapitre 2 de la partie 2.

⁴¹ Les méthodes de quantification ont été détaillées dans le chapitre 2 de la première partie de ce manuscrit.

l'allure des courbes présentées sur la Figure 157, il semble que cet écart pourrait continuer à augmenter si l'on prolongeait la durée des tests comportementaux.

De plus, en comparant la courbe de récupération des rats implantés avec les prothèses et celles des rats équipés de bioprothèses, on s'aperçoit que les prothèses n'ont pas d'effet délétère sur le comportement mais surtout que la présence des cellules implantées sur la bioprothèse joue un rôle majeur dans le processus de récupération des animaux, dont l'origine pourrait être une reconstruction tissulaire. Cet effet thérapeutique pourrait probablement être amplifié en équipant les bioprothèses d'un nombre de cellules neuronales plus important⁴².

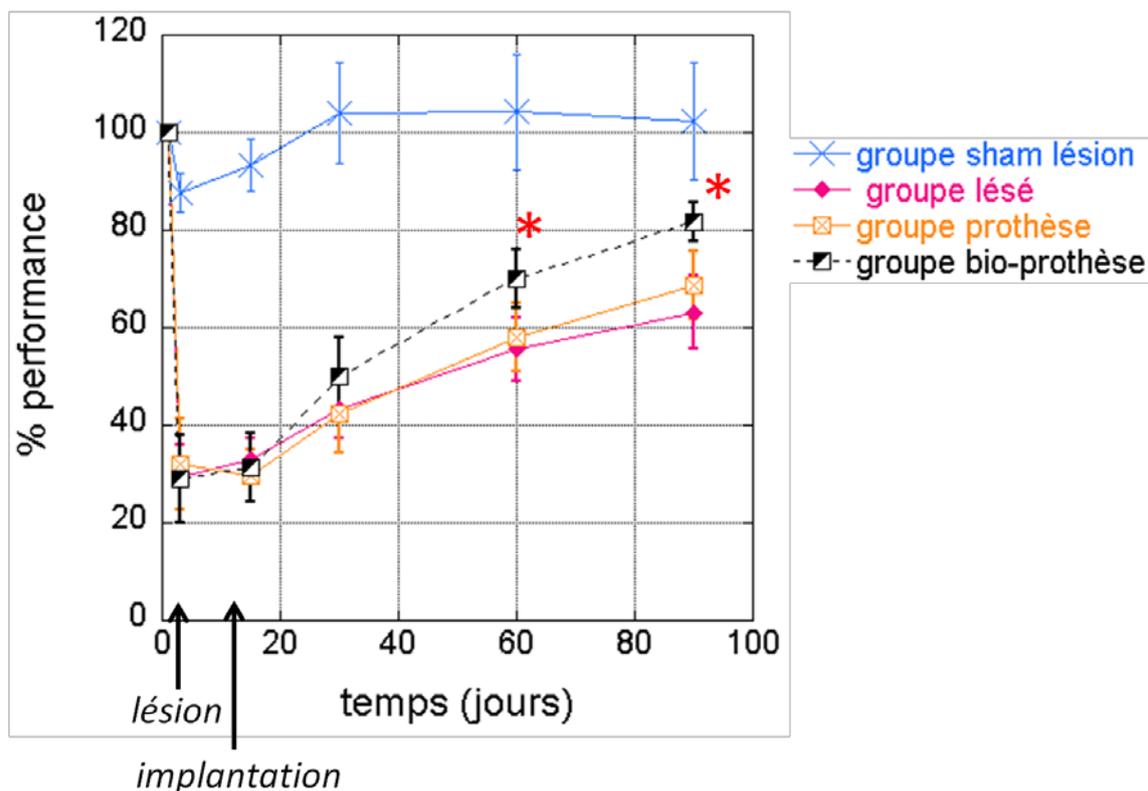


Figure 157 : Effet de l'implantation des bioprothèses de PDMS sur l'évolution du pourcentage de performance. Groupe « lésé » (rats lésés) (n=10), groupe « prothèse » (n=10, pas de cellules implantées), groupe « bioprothèse » (n=9, 45 000 cellules souches neurales différenciées en neurones implantées). Analyse statistique par anova à deux facteurs : traitement (aucun, prothèse ou bioprothèse) et temps. Les étoiles indiquent la significativité des points, après analyse par tests post-hoc. $P < 0,001$.

Pour obtenir des informations complémentaires à celles apportées par les tests comportementaux, nous avons analysé les cerveaux de ce groupe de rats 4 mois après l'implantation, en réalisant des marquages immunofluorescents de coupes de cerveau autour des bioprothèses implantées. Le premier point d'investigation a porté sur le devenir des cellules humaines implantées sur la bioprothèse.

Les neurones implantés étant d'origine humaine, nous avons réalisé un marquage immunofluorescent spécifique des noyaux cellulaires humains. Cela permet ainsi de distinguer les cellules implantées des cellules du rat. La Figure 158 montre une image en fluorescence de ce

⁴² Lors de greffes de cellules seules dans une lésion cérébrale, la quantité de cellules greffées est beaucoup plus importante, de l'ordre de 1 million de cellules neuronales chez un rat.

marquage. Une partie de l'image est noire, elle correspond à l'emplacement de la bioprothèse de PDMS. La prothèse s'est désolidarisée des tissus lors de la découpe des tissus. On ne peut donc observer que les cellules qui sont restées dans les tissus, après la découpe. Aucun noyau n'est présent dans la zone « noire » de l'image car les cellules implantées se trouvent à la surface de la prothèse. En revanche, on observe qu'à l'emplacement correspondant à la surface de la prothèse de PDMS, il y a des noyaux (formes arrondies) qui apparaissent en vert intense, signe de leur origine humaine. Les cellules humaines implantées sont donc toujours présentes autour de la bioprothèse, 4 mois après l'implantation. **Les cellules implantées restent donc en place dans la lésion** et il semble qu'au moins une partie d'entre elles survivent, même après quelques mois. Les analyses histologiques doivent donc être poursuivies afin de savoir quels types cellulaires ont survécu et de quelles façons ils s'intègrent dans les tissus de l'hôte.

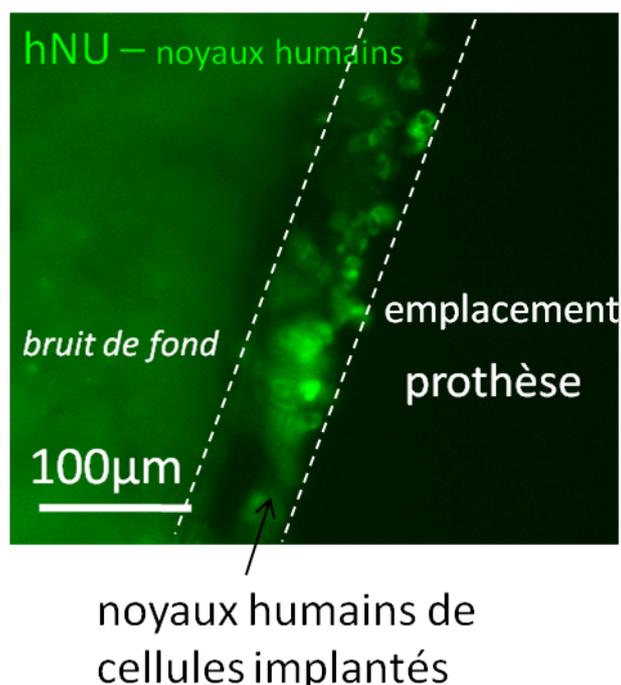


Figure 158 : Noyaux humains marqués en fluorescence par le marqueur nucléaire hNU se trouvant à la surface de la bioprothèse, 4 mois après l'implantation. Marquage immunofluorescent- anticorps secondaire fluorescent Alexa 488nm, vert.

5. Analyse des résultats

- Implantation des prothèses

Le PDMS a été implanté et maintenu in vivo, dans le cerveau de rats, pendant une période de trois mois. Nous avons mis en évidence que le **protocole chirurgical mis en place pour implanter les prothèses ainsi que l'implantation du PDMS in vivo ne sont pas délétères** sur le comportement de groupes de rats. **Aucune réaction inflammatoire** n'a été observée, même lors de l'implantation dans les tissus cérébraux sains. Nous avons observé la migration d'astrocytes vers la surface de la prothèse de PDMS, ce phénomène apparaît également et dans la même mesure avec d'autres matériaux biodégradables. La « non biodégradabilité » du PDMS nous a permis de localiser la prothèse de

manière précise in vivo, notamment lors des analyses histologiques des tissus. Ainsi, nous avons pu observer que les prothèses implantées ne sont pas altérées et qu'un nouveau tissu s'est formé autour d'elles. La nature de ce tissu n'est pas encore bien identifiée.

De plus, nous avons montré que **les cellules qui adhèrent aux prothèses de PDMS in vivo sont sensibles à leur topographie**. Les microstructures présentes à la surface des prothèses sont intactes, après 3 mois de séjour in vivo. Ce phénomène montre qu'il est possible de dicter l'organisation des cellules endogènes in vivo, en leur présentant des signaux topographiques.

- Implantation des bioprothèses

L'implantation des prothèses en PDMS n'ayant eu aucun effet délétère ni sur le comportement des rats, ni sur les tissus cérébraux, nous avons implanté les bioprothèses. Chacune des 3 bioprothèses implantées par rat comportent 15 000 cellules souches neurales adultes humaines pré-différenciées in vitro en neurones et en astrocytes.

Une récupération fonctionnelle significative des animaux a été constatée deux mois après l'implantation. Cette **récupération augmente de plus en plus avec le temps, ce qui pourrait être le signe d'une reconstruction tissulaire**. Notre stratégie associant l'implantation de nouvelles cellules neurales sur un support de PDMS microstructuré apporte donc un bénéfice, dont l'origine et la cause ne sont, à ce jour, pas totalement identifiées. Les cellules implantées sécrétant des facteurs chimiques, envoient probablement des **signaux de survie cellulaire aux cellules de l'hôte encore saines et empêcheraient ainsi une dégénérescence secondaire** des régions se trouvant autour de la lésion. La reconnexion de ces cellules aux tissus sains n'a pas pu être étudiée par manque de moyens de caractérisation. Les deux phénomènes peuvent potentiellement avoir lieu : effet trophique et reconstitution tissulaire.

Une stratégie thérapeutique répandue, qui a montré une récupération fonctionnelle dans certains cas [257], [258] est la **greffe de cellules dans la lésion**. Dans le cas d'une greffe de cellules, nous relevons, d'après la littérature que :

- la récupération apparaît plus rapidement qu'après l'implantation de notre bioprothèse.
- l'évolution des performances se stabilise quelques semaines après la greffe alors que la récupération semble encore s'améliorer dans le cas de l'implantation de notre bioprothèse. La récupération obtenue dans le cas de la greffe serait, selon les auteurs, le signe d'un effet trophique des cellules implantées, qui en sécrétant des facteurs chimiques, envoient des signaux de survie cellulaire aux cellules des tissus sains environnants la lésion.
- le nombre de cellules greffées pour obtenir une récupération fonctionnelle est toujours beaucoup plus élevé que dans notre cas, de l'ordre de plusieurs millions de cellules. De nombreuses cellules greffées meurent dans la lésion, elles ne survivent pas dans cet environnement non favorable pour la reconstruction tissulaire et leur potentiel régénératif est sous-exploité pour la récupération.

Notre stratégie, associant un matériau « support » et des cellules souches neurales pré-différenciées in vitro permet d'obtenir une récupération fonctionnelle en utilisant 10 à 100 fois moins de matériel biologique que dans le cas d'une greffe. Cela est un avantage considérable, surtout dans le cas où les cellules que l'on implante sont difficiles à obtenir. De plus, les cellules implantées sur la prothèse de PDMS sont déjà différenciées, notamment en neurones, elles disposent d'un support de croissance favorable à leur survie et restent dans la lésion. **Leur potentiel régénératif serait donc davantage exploité que lors de la greffe.** Afin de vérifier ce constat, une campagne d'essais in vivo visant à comparer l'effet de la greffe de 500 000 cellules souches et l'implantation sur une prothèse de PDMS de 45 000 cellules souches pré-différenciées en neurones est en cours de réalisation au sein de l'équipe de l'INSERM.

6. Perspectives

Nos premiers résultats sont très encourageants. En effet, notre bioprothèse a permis d'obtenir une récupération fonctionnelle partielle des rats implantés. Les examens des cerveaux, l'analyse histologique des tissus et les analyses comportementales nous ont donné de nombreuses informations, qui nous permettront d'améliorer encore ces résultats. Ces améliorations concernent à la fois le modèle animal, la bioprothèse, les techniques d'opération chirurgicale, les techniques de caractérisation.

- modèle animal

Le modèle animal du rat a été choisi pour sa disponibilité et sa flexibilité mais il s'avère limité. Une de ses premières limites, lorsque l'on s'intéresse à la motricité d'une de ses pattes, est qu'il s'agit d'un animal purement quadrupède. Il peut donc facilement compenser la perte de la fonction d'une de ses pattes par les trois autres. Le rat, qui plus est le rat jeune, utilisé dans ces travaux, dispose également d'une grande plasticité cérébrale. Suite à une lésion cérébrale, il met rapidement en place des mécanismes de récupération fonctionnelle. La réorganisation cérébrale chez le rat met en jeu l'hémisphère du cerveau qui n'a pas été lésé, qui peut compenser la perte subie dans l'autre hémisphère, ce qui est un phénomène moins efficace chez l'homme. Le modèle du rat nous a permis de réaliser nos premières démonstrations, mais il est souhaitable de le remplacer par un modèle plus proche de l'Homme, comme le primate.

- bioprothèse

La bioprothèse peut aussi être améliorée. Nous avons présenté au cours du chapitre 2 quelques pistes d'amélioration de ses propriétés intrinsèques, dont la nature du matériau (utilisation d'un matériau biodégradable, de nanotubes de carbone). Nous avons déjà effectué des implantations de prothèses en PLGA ainsi que l'implantation de prothèses en PDMS comportant en surface une couche de nanotubes de carbone. Nous n'avons pas, compte-tenu de la durée de ces essais, pu faire d'analyses.

L'augmentation du nombre de neurones implantés dans la lésion est un point majeur qui permettra certainement d'augmenter l'effet bénéfique des bioprothèses.

Pour cela, on pourra :

- augmenter la densité en cellules lors de l'ensemencement

- implanter des bioprothèses plus grandes
- utiliser un matériau poreux ou réaliser des structures « aérées » en trois dimensions pouvant accueillir des cellules non plus seulement sur sa surface mais dans son volume entier.

Nous avons observé la survie des cellules neuronales implantées sur les bioprothèses 4 mois après leur implantation in vivo dans la lésion. Pour améliorer encore leur survie, la bioprothèse pourrait être équipée de facteurs chimiques favorisant le développement des neurones (NGF, BDNF, nanotubes de carbone chargés de facteurs chimiques et/ou pharmacologiques...). Pour cela, l'utilisation de matériaux poreux comme les hydrogels ou encore de couches de nanotubes de carbone pourrait s'avérer bénéfique.

- chirurgie

Une autre amélioration primordiale concerne **l'adaptation de la taille de la prothèse implantée à la taille de la lésion mesurée.**

Nous nous sommes aperçus que les lésions étaient souvent beaucoup plus grandes que les prothèses implantées et que les bioprothèses n'étaient pas toujours implantées avec précision. Pour arriver à une meilleure adaptation prothèse-lésion, il faudrait disposer d'un équipement IRM ou scanner destiné au petit animal et réaliser, avant l'implantation, une cartographie de la lésion pour chaque animal. Cette localisation permettrait aussi d'améliorer la chirurgie. La fabrication et l'implantation d'une prothèse « personnalisée » pour chaque individu est une piste majeure à poursuivre.

- techniques de caractérisation

Pour progresser dans la compréhension des phénomènes de récupération, et pour mieux cerner et évaluer le rôle de l'organisation in vitro préalable des réseaux neuronaux implantés, nous devons poursuivre les analyses des tissus par histologie, ainsi qu'**élargir les techniques de caractérisations** utilisées.

L'étude anatomo-fonctionnelle par IRM ou encore la technique de tractographie, technique d'IRM qui met en évidence les faisceaux de neurones servant à la connexion de zones du cerveau éloignées, nous permettront d'étudier l'organisation fonctionnelle des fibres nerveuses reconstituées après l'implantation.

Les **études comportementales devront être menées sur de plus longues périodes** afin de connaître jusqu'à quel niveau les rats récupèrent leurs capacités.

Conclusion Partie 2

Les premiers essais in vivo d'implantation des bioprothèses dites de « première génération » chez le rat nous ont amenés à découvrir le domaine de l'expérimentation animale. La mise en place du modèle de lésion induite chez le rat pour provoquer un déficit moteur de l'animal ont été réalisées par l'INSERM. Cependant, en participant aux opérations chirurgicales, nous avons pris conscience des fortes contraintes imposées par les techniques de chirurgie et le matériel expérimental disponibles au laboratoire de l'INSERM. Cela nous a permis de fabriquer une bioprothèse adaptée à la fois au protocole de culture des cellules souches neurales et au protocole de chirurgie. Nous avons ainsi pu apporter des améliorations pratiques pour faciliter l'étape de manipulation des bioprothèses avant leur implantation.

Les essais in vivo et notamment l'étude du comportement des animaux durent plusieurs mois, ce qui explique que seules les premières versions de bioprothèses ont pu être testées pendant cette thèse. Certains rats sont encore en phase d'études et ne livreront leurs résultats que dans quelques mois. Néanmoins, grâce à ces premières campagnes d'essais, nous avons pu répondre à certaines questions, franchir plusieurs étapes importantes, porteuses d'espoir et de progrès pour la suite du projet.

Nous avons notamment démontré que :

- le protocole opératoire d'implantation des prothèses de première génération n'est pas délétère pour l'animal
- le PDMS est un matériau non biodégradable adapté à l'implantation in vivo à long terme (4 mois).
- l'implantation de cellules souches prédifférenciées sur un support de PDMS constituant un environnement favorable pour leur survie et leur croissance a un effet bénéfique significatif sur la récupération fonctionnelle des rats
- les cellules humaines implantées sont toujours présentes sur la prothèse, dans la lésion, plusieurs mois après leur implantation.

Ces premiers essais in vivo nous ont également permis d'identifier les pistes d'amélioration qui devront être apportées pour la suite du projet.

Conclusion générale

L'approche innovante développée dans ce travail de thèse visait à créer une bioprothèse qui combine le potentiel régénératif des cellules souches adultes humaines avec un pilotage du comportement de ces cellules par la microtopographie et les nanotubes de carbone.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons mis en évidence dans quelle mesure l'environnement physique influence le développement des neurones, qu'ils soient issus de lignées ou de la différenciation de cellules souches neurales adultes humaines. Nos expériences ont permis de dégager des lignes fortes caractérisant la culture des cellules sur des surfaces ingénierées comportant des microsillons de différentes dimensions et nous fournissons ainsi à la communauté scientifique des éléments transposables pour créer à façon des architectures neuronales avec différents types de cellules.

Par ailleurs, nous nous sommes attachés à mieux comprendre le rôle des nanotubes de carbone sur le développement neuronal. La mise au point d'une méthode pour créer des motifs de nanotubes de carbone, basée sur la lithographie douce, nous a amenés à montrer que les neurones se développent préférentiellement sur les nanotubes de carbone, certainement parce-que les couches de nanotubes jouent le rôle de « réservoirs » pour les protéines dont ont besoin les cellules pour se développer.

Dans la deuxième partie de ce manuscrit, les résultats *in vitro* ont été utilisés pour créer une bioprothèse cérébrale pour le murin, visant à aider à la reconstruction tissulaire. Le contexte fortement interdisciplinaire de cette thèse nous a permis de mener à bien les premiers essais *in vivo* et de montrer que les bioprothèses développées amènent une amélioration de la récupération des rats qui en ont été équipés. L'objectif d'une bioprothèse pleinement efficace nécessite encore plusieurs étapes de mise au point itératives au sein d'équipes interdisciplinaires. Nos résultats obtenus chez le rat offrent tout de même des perspectives prometteuses et nous donnent des motifs raisonnables d'espérer un jour apporter une solution thérapeutique pour des patients gravement cérébro-lésés.

Ces stratégies de réparation s'inscrivent pleinement dans un contexte éthique et sociétal. Il est nécessaire de veiller à ce que les motivations humanistes de ces stratégies de réparation, conformes au principe posé par l'organisation mondiale de la santé en 1946 : « La possession du meilleur état de santé qu'il est capable d'atteindre constitue l'un des droits fondamentaux de tout être humain » ne soient pas utilisées pour créer un homme non plus réparé mais augmenté.

Bibliographie

- [1] Y. Ikegaya, Y. Itsukaichi-Nishida, M. Ishihara, D. Tanaka, et N. Matsuki, « Distance of target search of isolated rat hippocampal neuron is about 150 microm », *Neuroscience*, vol. 97, n° 2, p. 215-217, 2000.
- [2] J. W. Fawcett et R. Asher, « The glial scar and central nervous system repair », *Brain Research Bulletin*, vol. 49, n° 6, p. 377-391, 1999.
- [3] M. Nedergaard, B. Ransom, et S. A. Goldman, « New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain », *Trends in Neurosciences*, vol. 26, n° 10, p. 523-530, 2003.
- [4] S. A. Goldman et F. Nottebohm, « Neuronal Production, Migration, and Differentiation in a Vocal Control Nucleus of the Adult Female Canary Brain », *PNAS*, vol. 80, n° 8, p. 2390-2394, 1983.
- [5] J. A. Paton et F. N. Nottebohm, « Neurons Generated in the Adult Brain Are Recruited into Functional Circuits », *Science*, vol. 225, n° 4666, p. 1046-1048, 1984.
- [6] B. A. Reynolds et S. Weiss, « Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system », *Science*, vol. 255, n° 5052, p. 1707-1710, 1992.
- [7] « Institut des Neurosciences de Montpellier: Physiologie et approches thérapeutiques des pathologies médullaires ». [Online]. Available: http://www.inmfrance.com/1_equipe4_gpehugnot.php. [Accessed: 15-juin-2012].
- [8] D. Purves, G. Augustine, D. Fitzpatrick, L. Katz, A.-S. Lamantia, J. McNamara, et H. Williams, « Plasticité des synapses et des circuits adultes », in *Neurosciences*, De boeck., Sinauer, 2003, p. 559-560.
- [9] M. C. Nunes, N. S. Roy, H. M. Keyoung, R. R. Goodman, G. McKhann 2nd, L. Jiang, J. Kang, M. Nedergaard, et S. A. Goldman, « Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain », *Nat. Med.*, vol. 9, n° 4, p. 439-447, 2003.
- [10] R. D. Goldman, S. Khuon, Y. H. Chou, P. Opal, et P. M. Steinert, « The Function of Intermediate Filaments in Cell Shape and Cytoskeletal Integrity. », *J Cell Biol*, vol. 134, n° 4, p. 971-983, 1996.
- [11] « <http://www.olympusfluoview.com/gallery/cells/bpae/bpaelarge1.html> ». .
- [12] I. Kaverina et A. Straube, « Regulation of cell migration by dynamic microtubules », *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 22, n° 9, p. 968-974, 2011.
- [13] « <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/microtubules/microtubules.html> ». .
- [14] D. A. Fletcher et R. D. Mullins, « Cell mechanics and the cytoskeleton », *Nature*, vol. 463, n° 7280, p. 485-492, 2010.
- [15] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, et P. Walter, « La communication cellulaire », in *L'essentiel de la biologie cellulaire*, 2ème éd., Flammarion Médecine-Sciences, 2005, p. 532-544.
- [16] M. J. Dalby, « Topographically induced direct cell mechanotransduction », *Med Eng Phys*, vol. 27, n° 9, p. 730-742, 2005.
- [17] D. E. Ingber, « Cellular Mechanotransduction: Putting All the Pieces Together Again », *FASEB J*, vol. 20, n° 7, p. 811-827, 2006.
- [18] U. S. Schwarz et I. B. Bischofs, « Physical determinants of cell organization in soft media », *Med Eng Phys*, vol. 27, n° 9, p. 763-772, 2005.
- [19] R. M. Lafrenie et K. M. Yamada, « Integrin-dependent signal transduction », *J. Cell. Biochem.*, vol. 61, n° 4, p. 543-553, 1996.
- [20] A. van der Flier et A. Sonnenberg, « Function and interactions of integrins », *Cell Tissue Res.*, vol. 305, n° 3, p. 285-298, 2001.
- [21] S. H. Ngali, A. Magenau, G. Le Saux, J. J. Gooding, et K. Gaus, « How Do Cells Make Decisions: Engineering Micro- and Nanoenvironments for Cell Migration », *Journal of Oncology*, vol. 2010, p. 1-7, 2010.
- [22] M.-H. Kim, M. Kino-oka, et M. Taya, « Designing culture surfaces based on cell anchoring mechanisms to regulate cell morphologies and functions », *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, n° 1, p. 7-16, 2010.
- [23] B. Geiger, J. P. Spatz, et A. D. Bershadsky, « Environmental sensing through focal adhesions », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 10, n° 1, p. 21-33, 2009.
- [24] L. T. Allen, M. Tosetto, I. S. Miller, D. P. O'Connor, S. C. Penney, I. Lynch, A. K. Keenan, S. R. Pennington, K. A. Dawson, et W. M. Gallagher, « Surface-induced changes in protein adsorption and implications for cellular phenotypic responses to surface interaction », *Biomaterials*, vol. 27, n° 16, p. 3096-3108, 2006.
- [25] D. A. Lauffenburger et A. F. Horwitz, « Cell migration: a physically integrated molecular process », *Cell*, vol. 84, n° 3, p. 359-369, 1996.

- [26] C. Le Clairche et M.-F. Carlier, « Regulation of Actin Assembly Associated With Protrusion and Adhesion in Cell Migration », *Physiol Rev*, vol. 88, n° 2, p. 489-513, 2008.
- [27] W. H. Guilford, D. E. Dupuis, G. Kennedy, J. Wu, J. B. Patlak, et D. M. Warshaw, « Smooth muscle and skeletal muscle myosins produce similar unitary forces and displacements in the laser trap. », *Biophys J*, vol. 72, n° 3, p. 1006-1021, 1997.
- [28] H. Kress, E. H. K. Stelzer, D. Holzer, F. Buss, G. Griffiths, et A. Rohrbach, « Filopodia act as phagocytic tentacles and pull with discrete steps and a load-dependent velocity », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, n° 28, p. 11633-11638, 2007.
- [29] P. K. Mattila et P. Lappalainen, « Filopodia: molecular architecture and cellular functions », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 9, n° 6, p. 446-454, 2008.
- [30] D. E. Ingber, « Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton », *J. Cell. Sci.*, vol. 104 (Pt 3), p. 613-627, 1993.
- [31] N. Wang, J. P. Butler, et D. E. Ingber, « Mechanotransduction Across the Cell Surface and Through the Cytoskeleton », *Science*, vol. 260, n° 5111, p. 1124-1127, 1993.
- [32] N. Arimura et K. Kaibuchi, « Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms », *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 8, n° 3, p. 194-205, 2007.
- [33] J. Z. Parrish, K. Emoto, M. D. Kim, et Y. N. Jan, « Mechanisms that regulate establishment, maintenance, and remodeling of dendritic fields », *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 30, p. 399-423, 2007.
- [34] H. Witte et F. Bradke, « The role of the cytoskeleton during neuronal polarization », *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 18, n° 5, p. 479-487, 2008.
- [35] D. Cojoc, F. Difato, E. Ferrari, R. B. Shahapure, J. Laishram, M. Righi, E. M. Di Fabrizio, et V. Torre, « Properties of the Force Exerted by Filopodia and Lamellipodia and the Involvement of Cytoskeletal Components », *PLoS ONE*, vol. 2, n° 10, p. e1072, 2007.
- [36] C. E. Chan et D. J. Odde, « Traction dynamics of filopodia on compliant substrates », *Science*, vol. 322, n° 5908, p. 1687-1691, 2008.
- [37] C. Bouzigues, D. Holcman, et M. Dahan, « A mechanism for the polarity formation of chemoreceptors at the growth cone membrane for gradient amplification during directional sensing », *PLoS ONE*, vol. 5, n° 2, p. e9243, 2010.
- [38] K. Franze, J. Gerdemann, M. Weick, T. Betz, S. Pawlizak, M. Lakadamyali, J. Bayer, K. Rillich, M. Gögler, Y.-B. Lu, A. Reichenbach, P. Janmey, et J. Käs, « Neurite branch retraction is caused by a threshold-dependent mechanical impact », *Biophys. J.*, vol. 97, n° 7, p. 1883-1890, 2009.
- [39] A. von Philipsborn et M. Bastmeyer, « Mechanisms of Gradient Detection: A Comparison of Axon Pathfinding with Eukaryotic Cell Migration », in *International Review of Cytology*, vol. 263, Elsevier, 2007, p. 1-62.
- [40] S. K. W. Dertinger, X. Jiang, Z. Li, V. N. Murthy, et G. M. Whitesides, « Gradients of substrate-bound laminin orient axonal specification of neurons », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 99, n° 20, p. 12542-12547, 2002.
- [41] L. Erskine et E. Herrera, « The retinal ganglion cell axon's journey: Insights into molecular mechanisms of axon guidance », *Developmental Biology*, vol. 308, n° 1, p. 1-14, 2007.
- [42] A. Khademhosseini, R. Langer, J. Borenstein, et J. P. Vacanti, « Microscale technologies for tissue engineering and biology », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 103, n° 8, p. 2480-2487, 2006.
- [43] D. B. Weibel, W. R. DiLuzio, et G. M. Whitesides, « Microfabrication meets microbiology », *Nature Reviews Microbiology*, vol. 5, n° 3, p. 209-218, 2007.
- [44] A. M. Ross, Z. Jiang, M. Bastmeyer, et J. Lahann, « Physical Aspects of Cell Culture Substrates: Topography, Roughness, and Elasticity », *Small*, vol. 8, n° 3, p. 336-355, 2012.
- [45] A. P. Quist, E. Pavlovic, et S. Oscarsson, « Recent advances in microcontact printing », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 381, n° 3, p. 591-600, 2005.
- [46] Y. Xia et G. M. Whitesides, « Soft Lithography », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 37, n° 5, p. 550-575, 1998.
- [47] G. M. Whitesides, E. Ostuni, S. Takayama, X. Jiang, et D. E. Ingber, « Soft Lithography in Biology and Biochemistry », *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 3, n° 1, p. 335-373, 2001.
- [48] C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, et D. E. Ingber, « Geometric Control of Cell Life and Death », *Science*, vol. 276, n° 5317, p. 1425-1428, 1997.
- [49] A. Azioune, M. Storch, M. Bornens, M. Théry, et M. Piel, « Simple and rapid process for single cell micro-patterning », *Lab on a Chip*, vol. 9, n° 11, p. 1640, 2009.
- [50] X. Jiang, D. A. Bruzewicz, A. P. Wong, M. Piel, et G. M. Whitesides, « Directing Cell Migration with Asymmetric Micropatterns », *PNAS*, vol. 102, n° 4, p. 975-978, 2005.
- [51] N. Minc et M. Piel, « Predicting division plane position and orientation », *Trends in Cell Biology*, vol. 22, n° 4, p. 193-200, 2012.

- [52] « Cytoo, adhesive micropatterns ».
- [53] G. Zeck et P. Fromherz, « Noninvasive Neuroelectronic Interfacing with Synaptically Connected Snail Neurons Immobilized on a Semiconductor Chip », *PNAS*, vol. 98, n^o. 18, p. 10457-10462, 2001.
- [54] J. L. Charest et W. P. King, « Engineering Biomaterial Interfaces Through Micro and Nano-Patterning », in *BioNanoFluidic MEMS*, P. J. Hesketh, Éd. Springer US, 2008, p. 251-277.
- [55] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml, et V. Svorcik, « Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants », *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, n^o. 6, p. 739-767, 2011.
- [56] A. Tsuruma, M. Tanaka, S. Yamamoto, et M. Shimomura, « Control of neural stem cell differentiation on honeycomb films », *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 313-314, n^o. 0, p. 536-540, 2008.
- [57] H. Craighead, C. James, et A. M. Turner, « Chemical and topographical patterning for directed cell attachment », *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, vol. 5, n^o. 2-3, p. 177-184, 2001.
- [58] C. D. James, R. Davis, M. Meyer, A. Turner, S. Turner, G. Withers, L. Kam, G. Banker, H. Craighead, M. Isaacson, J. Turner, et W. Shain, « Aligned microcontact printing of micrometer-scale poly-L-lysine structures for controlled growth of cultured neurons on planar microelectrode arrays », *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 47, n^o. 1, p. 17-21, 2000.
- [59] C. Miller, S. Jeftinija, et S. Mallapragada, « Synergistic effects of physical and chemical guidance cues on neurite alignment and outgrowth on biodegradable polymer substrates », *Tissue Eng.*, vol. 8, n^o. 3, p. 367-378, 2002.
- [60] R. G. Harrison, « The cultivation of tissues in extraneous media as a method of morpho-genetic study », *The Anatomical Record*, vol. 6, n^o. 4, p. 181-193, 1912.
- [61] P. Weiss, « The Problem of Specificity in Growth and Development », *Yale J Biol Med*, vol. 19, n^o. 3, p. 235-278, 1947.
- [62] A. S. CURTIS et M. VARDE, « CONTROL OF CELL BEHAVIOR: TOPOLOGICAL FACTORS », *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 33, p. 15-26, 1964.
- [63] P. Clark, P. Connolly, A. S. Curtis, J. A. Dow, et C. D. Wilkinson, « Topographical control of cell behaviour. I. Simple step cues », *Development*, vol. 99, n^o. 3, p. 439-448, 1987.
- [64] P. Clark, P. Connolly, A. S. Curtis, J. A. Dow, et C. D. Wilkinson, « Topographical control of cell behaviour: II. Multiple grooved substrata », *Development*, vol. 108, n^o. 4, p. 635-644, 1990.
- [65] A. Curtis et C. Wilkinson, « Topographical control of cells », *Biomaterials*, vol. 18, n^o. 24, p. 1573-1583, 1997.
- [66] J. D. Foley, E. W. Grunwald, P. F. Nealey, et C. J. Murphy, « Cooperative modulation of neuritogenesis by PC12 cells by topography and nerve growth factor », *Biomaterials*, vol. 26, n^o. 17, p. 3639-3644, 2005.
- [67] N. Gomez, Y. Lu, S. Chen, et C. E. Schmidt, « Immobilized nerve growth factor and microtopography have distinct effects on polarization versus axon elongation in hippocampal cells in culture », *Biomaterials*, vol. 28, n^o. 2, p. 271-284, 2007.
- [68] M. J. Mahoney, R. R. Chen, J. Tan, et W. Mark Saltzman, « The influence of microchannels on neurite growth and architecture », *Biomaterials*, vol. 26, n^o. 7, p. 771-778, 2005.
- [69] F. Haq, V. Anandan, C. Keith, et G. Zhang, « Neurite development in PC12 cells cultured on nanopillars and nanopores with sizes comparable with filopodia », *Int J Nanomedicine*, vol. 2, n^o. 1, p. 107-115, 2007.
- [70] H. S. Koh, T. Yong, C. K. Chan, et S. Ramakrishna, « Enhancement of neurite outgrowth using nano-structured scaffolds coupled with laminin », *Biomaterials*, vol. 29, n^o. 26, p. 3574-3582, 2008.
- [71] A. Sørensen, T. Alekseeva, K. Katechia, M. Robertson, M. O. Riehle, et S. C. Barnett, « Long-term neurite orientation on astrocyte monolayers aligned by microtopography », *Biomaterials*, vol. 28, n^o. 36, p. 5498-5508, 2007.
- [72] D. Hoffman-Kim, J. A. Mitchel, et R. V. Bellamkonda, « Topography, Cell Response, and Nerve Regeneration », *Annu Rev Biomed Eng*, vol. 12, p. 203-231, 2010.
- [73] F. Johansson, P. Carlberg, N. Danielsen, L. Montelius, et M. Kanje, « Axonal outgrowth on nano-imprinted patterns », *Biomaterials*, vol. 27, n^o. 8, p. 1251-1258, 2006.
- [74] J. F. Walsh, M. E. Manwaring, et P. A. Tresco, « Directional neurite outgrowth is enhanced by engineered meningeal cell-coated substrates », *Tissue Eng.*, vol. 11, n^o. 7-8, p. 1085-1094, 2005.
- [75] N. Li et A. Folch, « Integration of topographical and biochemical cues by axons during growth on microfabricated 3-D substrates », *Experimental Cell Research*, vol. 311, n^o. 2, p. 307-316, 2005.
- [76] D. Riveline, E. Zamir, N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger, et A. D. Bershadsky, « Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism », *J. Cell Biol.*, vol. 153, n^o. 6, p. 1175-1186, 2001.
- [77] D. E. Discher, P. Janmey, et Y.-L. Wang, « Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate », *Science*, vol. 310, n^o. 5751, p. 1139-1143, 2005.

- [78] D. E. Ingber, « Tensegrity: The Architectural Basis of Cellular Mechanotransduction », *Annual Review of Physiology*, vol. 59, n° 1, p. 575-599, 1997.
- [79] C. H. Seo, K. Furukawa, K. Montagne, H. Jeong, et T. Ushida, « The effect of substrate microtopography on focal adhesion maturation and actin organization via the RhoA/ROCK pathway », *Biomaterials*, vol. 32, n° 36, p. 9568-9575, 2011.
- [80] I. Nagata, A. Kawana, et N. Nakatsuji, « Perpendicular contact guidance of CNS neuroblasts on artificial microstructures », *Development*, vol. 117, n° 1, p. 401-408, 1993.
- [81] A. Rajniecek, S. Britland, et C. McCaig, « Contact guidance of CNS neurites on grooved quartz: influence of groove dimensions, neuronal age and cell type », *J. Cell. Sci.*, vol. 110 (Pt 23), p. 2905-2913, 1997.
- [82] L. E. Dickinson, S. Kusuma, et S. Gerecht, « Reconstructing the differentiation niche of embryonic stem cells using biomaterials », *Macromol Biosci*, vol. 11, n° 1, p. 36-49, 2011.
- [83] « Method for preserving proliferation and differentiation potential of undifferentiated cells », US Patent 2009/0305415 A1.
- [84] « Materials composition and methods to control neural progenitor and stem cell attachment, proliferation and guide cell differentiation », European Patent Application EP2450432, 2012.
- [85] J. Y. Lim et H. J. Donahue, « Cell sensing and response to micro- and nanostructured surfaces produced by chemical and topographic patterning », *Tissue Eng.*, vol. 13, n° 8, p. 1879-1891, 2007.
- [86] G. Wang, Q. Ao, K. Gong, A. Wang, L. Zheng, Y. Gong, et X. Zhang, « The effect of topology of chitosan biomaterials on the differentiation and proliferation of neural stem cells », *Acta Biomaterialia*, vol. 6, n° 9, p. 3630-3639, 2010.
- [87] K. K. Parker, A. L. Brock, C. Brangwynne, R. J. Mannix, N. Wang, E. Ostuni, N. A. Geisse, J. C. Adams, G. M. Whitesides, et D. E. Ingber, « Directional Control of Lamellipodia Extension by Constraining Cell Shape and Orienting Cell Tractional Forces », *FASEB J*, vol. 16, n° 10, p. 1195-1204, 2002.
- [88] M. D. Bashyam, « Understanding cancer metastasis: an urgent need for using differential gene expression analysis », *Cancer*, vol. 94, n° 6, p. 1821-1829, 2002.
- [89] G. Kumar, B. Chen, C. C. Co, et C.-C. Ho, « Differential migration and proliferation of geometrical ensembles of cell clusters », *Exp. Cell Res.*, vol. 317, n° 10, p. 1340-1352, 2011.
- [90] T. Tzvetkova-Chevolleau, A. Stéphanou, D. Fuard, J. Ohayon, P. Schiavone, et P. Tracqui, « The motility of normal and cancer cells in response to the combined influence of the substrate rigidity and anisotropic microstructure », *Biomaterials*, vol. 29, n° 10, p. 1541-1551, 2008.
- [91] C. J. Bettinger, R. Langer, et J. T. Borenstein, « "Engineering Substrate Micro- and Nanotopography to Control Cell Function" », *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 48, n° 30, p. 5406-5415, 2009.
- [92] S. Li, S. Bhatia, Y. L. Hu, Y. T. Shiu, Y. S. Li, S. Usami, et S. Chien, « Effects of morphological patterning on endothelial cell migration », *Biorheology*, vol. 38, n° 2-3, p. 101-108, 2001.
- [93] B. A. Dalton, X. F. Walboomers, M. Dziegielewski, M. D. Evans, S. Taylor, J. A. Jansen, et J. G. Steele, « Modulation of epithelial tissue and cell migration by microgrooves », *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 56, n° 2, p. 195-207, 2001.
- [94] L. E. McNamara, R. Burchmore, M. O. Riehle, P. Herzyk, M. J. P. Biggs, C. D. W. Wilkinson, A. S. G. Curtis, et M. J. Dalby, « The role of microtopography in cellular mechanotransduction », *Biomaterials*, vol. 33, n° 10, p. 2835-2847, 2012.
- [95] M. J. Dalby, M. O. Riehle, S. J. Yarwood, C. D. W. Wilkinson, et A. S. G. Curtis, « Nucleus alignment and cell signaling in fibroblasts: response to a micro-grooved topography », *Exp. Cell Res.*, vol. 284, n° 2, p. 274-282, 2003.
- [96] M. J. Dalby, M. J. P. Biggs, N. Gadegaard, G. Kalna, C. D. W. Wilkinson, et A. S. G. Curtis, « Nanotopographical stimulation of mechanotransduction and changes in interphase centromere positioning », *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 100, n° 2, p. 326-338, 2006.
- [97] S. Britland, C. Perridge, M. Denyer, H. Morgan, A. Curtis, et C. Wilkinson, « Morphogenetic guidance cues can interact synergistically and hierarchically in steering nerve cell growth », *Experimental Biology Online*, vol. 1, n° 2, p. 1-15, 1997.
- [98] N. Gomez, S. Chen, et C. E. Schmidt, « Polarization of Hippocampal Neurons with Competitive Surface Stimuli: Contact Guidance Cues Are Preferred Over Chemical Ligands », *J. R. Soc. Interface*, vol. 4, n° 13, p. 223-233, 2007.
- [99] J. B. J. B. Recknor, J. C. J. C. Recknor, D. S. D. S. Sakaguchi, et S. K. S. K. Mallapragada, « Oriented astroglial cell growth on micropatterned polystyrene substrates », *Biomaterials*, vol. 25, n° 14, p. 2753-2767, 2004.
- [100] H. Kaji, G. Camci-Unal, R. Langer, et A. Khademhosseini, « Engineering systems for the generation of patterned co-cultures for controlling cell-cell interactions », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1810, n° 3, p. 239-250, 2011.

- [101] J. J. Norman et T. A. Desai, « Methods for fabrication of nanoscale topography for tissue engineering scaffolds », *Ann Biomed Eng*, vol. 34, n^o. 1, p. 89-101, 2006.
- [102] E. Lamers, F. Walboomers, et J. Jansen, « Nanotopography on Implant Biomaterials », in *Nanobiomaterials Handbook*, B. Sitharaman, Éd. CRC Press, 2011, p. 1-21.
- [103] J. P. Spatz, T. Herzog, S. Mößmer, P. Ziemann, et M. Möller, « Micellar Inorganic–Polymer Hybrid Systems—A Tool for Nanolithography », *Advanced Materials*, vol. 11, n^o. 2, p. 149–153, 1999.
- [104] M. Arnold, E. A. Cavalcanti-Adam, R. Glass, J. Blümmel, W. Eck, M. Kantschler, H. Kessler, et J. P. Spatz, « Activation of Integrin Function by Nanopatterned Adhesive Interfaces », *ChemPhysChem*, vol. 5, n^o. 3, p. 383–388, 2004.
- [105] M. J. P. Biggs, R. G. Richards, et M. J. Dalby, « Nanotopographical modification: a regulator of cellular function through focal adhesions », *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 6, n^o. 5, p. 619-633, 2010.
- [106] V. Brunetti, G. Maiorano, L. Rizzello, B. Sorce, S. Sabella, R. Cingolani, et P. P. Pompa, « Neurons Sense Nanoscale Roughness with Nanometer Sensitivity », *PNAS*, vol. 107, n^o. 14, p. 6264-6269, 2010.
- [107] F. Yang, R. Murugan, S. Wang, et S. Ramakrishna, « Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering », *Biomaterials*, vol. 26, n^o. 15, p. 2603-2610, 2005.
- [108] F. Gentile, L. Tirinato, E. Battista, F. Causa, C. Liberale, E. M. di Fabrizio, et P. Decuzzi, « Cells preferentially grow on rough substrates », *Biomaterials*, vol. 31, n^o. 28, p. 7205-7212, 2010.
- [109] R. Ravichandran, S. Liao, C. C. Ng, C. K. Chan, M. Raghunath, et S. Ramakrishna, « Effects of nanotopography on stem cell phenotypes », *World J Stem Cells*, vol. 1, n^o. 1, p. 55-66, 2009.
- [110] S. Balloni, EM. Calvi, F. Damiani, G. Bistoni, M. Calvitti, P. Locci, E. Becchetti, L. Marinucci "Effects of titanium surface roughness on mesenchymal stem cell commitment and differentiation signaling", *Int.J Oral Maxillofac Implants*, vol. 24, n^o4, p.627-635, 2009.
- [111] M. J. Dalby, N. Gadegaard, R. Tare, A. Andar, M. O. Riehle, P. Herzyk, C. D. W. Wilkinson, et R. O. C. Oreffo, « The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder », *Nat Mater*, vol. 6, n^o. 12, p. 997-1003, 2007.
- [112] J.-W. Shen, T. Wu, Q. Wang, et Y. Kang, « Induced stepwise conformational change of human serum albumin on carbon nanotube surfaces », *Biomaterials*, vol. 29, n^o. 28, p. 3847-3855, 2008.
- [113] C. González-García, S. R. Sousa, D. Moratal, P. Rico, et M. Salmerón-Sánchez, « Effect of nanoscale topography on fibronectin adsorption, focal adhesion size and matrix organisation », *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 77, n^o. 2, p. 181-190, 2010.
- [114] S. Minnikanti et N. Peixoto, « Implantable Electrodes with Carbon Nanotube Coatings », in *Carbon Nanotubes Applications on Electron Devices*, J. M. Marulanda, Éd. InTech, 2011.
- [115] H. Hu, Y. Ni, V. Montana, R. C. Haddon, et V. Pargura, « Chemically Functionalized Carbon Nanotubes as Substrates for Neuronal Growth », *Nano Lett.*, vol. 4, n^o. 3, p. 507-511, 2004.
- [116] K. Matsumoto, C. Sato, Y. Naka, R. Whitby, et N. Shimizu, « Stimulation of neuronal neurite outgrowth using functionalized carbon nanotubes », *Nanotechnology*, vol. 21, n^o. 11, p. 115101, 2010.
- [117] J. Liu, F. Appaix, O. Bibari, G. Marchand, A.-L. Benabid, F. Sauter-Starace, et M. D. Waard, « Control of neuronal network organization by chemical surface functionalization of multi-walled carbon nanotube arrays », *Nanotechnology*, vol. 22, n^o. 19, p. 195101, 2011.
- [118] M. P. Mattson, R. C. Haddon, et A. M. Rao, « Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth », *J. Mol. Neurosci.*, vol. 14, n^o. 3, p. 175-182, 2000.
- [119] P. Galvan-Garcia, E. W. Keefer, F. Yang, M. Zhang, S. Fang, A. A. Zakhidov, R. H. Baughman, et M. I. Romero, « Robust cell migration and neuronal growth on pristine carbon nanotube sheets and yarns », *J Biomater Sci Polym Ed*, vol. 18, n^o. 10, p. 1245-1261, 2007.
- [120] E. Ben-Jacob et Y. Hanein, « Carbon nanotube micro-electrodes for neuronal interfacing », *Journal of Materials Chemistry*, vol. 18, n^o. 43, p. 5181, 2008.
- [121] E. W. Keefer, B. R. Botterman, M. I. Romero, A. F. Rossi, et G. W. Gross, « Carbon nanotube coating improves neuronal recordings », *Nature Nanotechnology*, vol. 3, n^o. 7, p. 434-439, 2008.
- [122] A. O. Lobo, E. F. Antunes, A. H. A. Machado, C. Pacheco-Soares, V. J. Trava-Airoldi, et E. J. Corat, « Cell viability and adhesion on as grown multi-wall carbon nanotube films », *Materials Science and Engineering: C*, vol. 28, n^o. 2, p. 264-269, 2008.
- [123] M. J. Jang, S. Namgung, S. Hong, et Y. Nam, « Directional neurite growth using carbon nanotube patterned substrates as a biomimetic cue. », *Nanotechnology*, vol. 21, n^o. 23, p. 235102, 2010.
- [124] R. Sorkin, A. Greenbaum, M. David-Pur, S. Anava, A. Ayali, E. Ben-Jacob, et Y. Hanein, « Process entanglement as a neuronal anchorage mechanism to rough surfaces », *Nanotechnology*, vol. 20, n^o. 1, p. 015101, 2009.

- [125] K. Matsumoto, C. Sato, Y. Naka, A. Kitazawa, R. L. D. Whitby, et N. Shimizu, « Neurite outgrowths of neurons with neurotrophin-coated carbon nanotubes », *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 103, n^o. 3, p. 216-220, 2007.
- [126] M. A. Correa-Duarte, N. Wagner, J. Rojas-Chapana, C. Morsczeck, M. Thie, et M. Giersig, « Fabrication and Biocompatibility of Carbon Nanotube-Based 3D Networks as Scaffolds for Cell Seeding and Growth », *Nano Lett.*, vol. 4, n^o. 11, p. 2233-2236, 2004.
- [127] T. Gabay, E. Jakobs, E. Ben-Jacob, et Y. Hanein, « Engineered self-organization of neural networks using carbon nanotube clusters », *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, vol. 350, n^o. 2-4, p. 611-621, 2005.
- [128] E. Jan et N. A. Kotov, « Successful Differentiation of Mouse Neural Stem Cells on Layer-by-Layer Assembled Single-Walled Carbon Nanotube Composite », *Nano Lett.*, vol. 7, n^o. 5, p. 1123-1128, 2007.
- [129] V. Lovat, D. Pantarotto, L. Lagostena, B. Cacciari, M. Grandolfo, M. Righi, G. Spalluto, M. Prato, et L. Ballerini, « Carbon Nanotube Substrates Boost Neuronal Electrical Signaling », *Nano Letters*, vol. 5, n^o. 6, p. 1107-1110, 2005.
- [130] G. Cellot, E. Cilia, S. Cipollone, V. Rancic, A. Sucapane, S. Giordani, L. Gambazzi, H. Markram, M. Grandolfo, D. Scaini, F. Gelain, L. Casalis, M. Prato, M. Giugliano, et L. Ballerini, « Carbon nanotubes might improve neuronal performance by favouring electrical shortcuts », *Nature Nanotechnology*, vol. 4, n^o. 2, p. 126-133, 2008.
- [131] E. B. Malarkey, K. A. Fisher, E. Bekyarova, W. Liu, R. C. Haddon, et V. Parpura, « Conductive Single-Walled Carbon Nanotube Substrates Modulate Neuronal Growth », *Nano Lett.*, vol. 9, n^o. 1, p. 264-268, 2008.
- [132] A. Mazzatenta, M. Giugliano, S. Campidelli, L. Gambazzi, L. Businaro, H. Markram, M. Prato, et L. Ballerini, « Interfacing Neurons with Carbon Nanotubes: Electrical Signal Transfer and Synaptic Stimulation in Cultured Brain Circuits », *J. Neurosci.*, vol. 27, n^o. 26, p. 6931-6936, 2007.
- [133] M. K. Gheith, T. C. Pappas, A. V. Liopo, V. A. Sinani, B. S. Shim, M. Motamedi, J. P. Wicksted, et N. A. Kotov, « Stimulation of Neural Cells by Lateral Currents in Conductive Layer-by-Layer Films of Single-Walled Carbon Nanotubes », *Advanced Materials*, vol. 18, n^o. 22, p. 2975-2979, 2006.
- [134] G. Gabriel, R. Gómez, M. Bongard, N. Benito, E. Fernández, et R. Villa, « Easily made single-walled carbon nanotube surface microelectrodes for neuronal applications », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, n^o. 7, p. 1942-1948, 2009.
- [135] F. Sauter-Starace, O. Bibari, F. Berger, P. Caillat, et A. L. Benabid, « ECoG recordings of a non-human primate using carbon nanotubes electrodes on a flexible polyimide implant », in *Neural Engineering, 2009. NER '09. 4th International IEEE/EMBS Conference on*, 2009, p. 112 -115.
- [136] J. Sagiv, « Organized monolayers by adsorption. 1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 102, n^o. 1, p. 92-98, 1980.
- [137] S. R. Wasserman, G. M. Whitesides, I. M. Tidswell, B. M. Ocko, P. S. Pershan, et J. D. Axe, « The structure of self-assembled monolayers of alkylsiloxanes on silicon: a comparison of results from ellipsometry and low-angle x-ray reflectivity », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 111, n^o. 15, p. 5852-5861, 1989.
- [138] N. Patrino, C. McCague, P. R. Norton, et N. O. Petersen, « Spatially controlled cell adhesion via micropatterned surface modification of poly(dimethylsiloxane) », *Langmuir*, vol. 23, n^o. 2, p. 715-719, 2007.
- [139] J. S. Kaiser, M. Kamperman, E. J. de Souza, B. Schick, et E. Arzt, « Adhesion of biocompatible and biodegradable micropatterned surfaces », *Int J Artif Organs*, vol. 34, n^o. 2, p. 180-184, 2011.
- [140] P. M. van Midwoud, A. Janse, M. T. Merema, G. M. M. Groothuis, et E. M. J. Verpoorte, « A comparison of the biocompatibility and adsorption properties of different plastics for advanced microfluidic cell and tissue culture models », *Anal. Chem.*, 2012.
- [141] S. K. Sia et G. M. Whitesides, « Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies », *Electrophoresis*, vol. 24, n^o. 21, p. 3563-3576, 2003.
- [142] E. Leclerc, Y. Sakai, T. Fujii, "Cell culture in 3-Dimensional microfluidic structure of PDMS (polydimethylsiloxane)", *Biomed. Microdevices*, vol.5, n^o.2, p.109-114, 2003.
- [143] B. Kim, E. T. K. Peterson, et I. Papautsky, « Long-term stability of plasma oxidized PDMS surfaces », in *Engineering in Medicine and Biology Society, 2004. IEMBS '04. 26th Annual International Conference of the IEEE*, 2004, vol. 2, p. 5013 -5016.
- [144] D. Bodas et C. Khan-Malek, « Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment—An SEM investigation », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 123, n^o. 1, p. 368-373, 2007.
- [145] C. Thibault, C. Séverac, A.-F. Mingotaud, C. Vieu, et M. Mauzac, « Poly(dimethylsiloxane) contamination in microcontact printing and its influence on patterning oligonucleotides », *Langmuir*, vol. 23, n^o. 21, p. 10706-10714, 2007.
- [146] A. Bédier, L. Vaysse, E. Flahaut, F. Seichepine, I. Loubinoux, et C. Vieu, « Multi-scale engineering for neuronal cell growth and differentiation », *Microelectronic Engineering*, vol. 88, n^o. 8, p. 1668-1671, 2011.

- [147] D. Scholz, D. Pörtl, A. Genewsky, M. Weng, T. Waldmann, S. Schildknecht, et M. Leist, « Rapid, complete and large-scale generation of post-mitotic neurons from the human LUHMES cell line », *Journal of Neurochemistry*, vol. 119, n^o. 5, p. 957-971, 2011.
- [148] R. Rezakhaniha, A. Agianniotis, J. T. C. Schrauwen, A. Griffa, D. Sage, C. V. C. Bouten, F. N. Vosse, M. Unser, et N. Stergiopoulos, « Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy », *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, vol. 11, n^o. 3-4, p. 461-473, 2011.
- [149] E. Meijering, M. Jacob, J.-C. F. Sarría, P. Steiner, H. Hirling, et M. Unser, « Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images », *Cytometry A*, vol. 58, n^o. 2, p. 167-176, 2004.
- [150] H. Chen, W. Song, F. Zhou, Z. Wu, H. Huang, J. Zhang, Q. Lin, et B. Yang, « The effect of surface microtopography of poly(dimethylsiloxane) on protein adsorption, platelet and cell adhesion », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 71, n^o. 2, p. 275-281, 2009.
- [151] L. E. McNamara, R. Burchmore, M. O. Riehle, P. Herzyk, M. J. P. Biggs, C. D. W. Wilkinson, A. S. G. Curtis, et M. J. Dalby, « The role of microtopography in cellular mechanotransduction », *Biomaterials*, vol. 33, n^o. 10, p. 2835-2847, 2012.
- [152] Z. Pan, C. Yan, R. Peng, Y. Zhao, Y. He, et J. Ding, « Control of cell nucleus shapes via micropillar patterns », *Biomaterials*, vol. 33, n^o. 6, p. 1730-1735, 2012.
- [153] S. W. Moore, N. Biais, et M. P. Sheetz, « Traction on Immobilized Netrin-1 Is Sufficient to Reorient Axons », *Science*, vol. 325, n^o. 5937, p. 166-166, 2009.
- [154] J. Mai, L. Fok, H. Gao, X. Zhang, et M.-M. Poo, « Axon Initiation and Growth Cone Turning on Bound Protein Gradients », *J. Neurosci.*, vol. 29, n^o. 23, p. 7450-7458, 2009.
- [155] G. Ming, S. T. Wong, J. Henley, X. Yuan, H. Song, N. C. Spitzer, et M. Poo, « Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones », *Nature*, vol. 417, n^o. 6887, p. 411-418, 2002.
- [156] C. S. Goodman, « Mechanisms and Molecules that Control Growth Cone Guidance », *Annual Review of Neuroscience*, vol. 19, n^o. 1, p. 341-377, 1996.
- [157] G. A. Dunn et J. P. Heath, « A new hypothesis of contact guidance in tissue cells », *Exp. Cell Res.*, vol. 101, n^o. 1, p. 1-14, 1976.
- [158] C. H. Seo, K. Furukawa, K. Montagne, H. Jeong, et T. Ushida, « The effect of substrate microtopography on focal adhesion maturation and actin organization via the RhoA/ROCK pathway », *Biomaterials*, vol. 32, n^o. 36, p. 9568-9575, 2011.
- [159] Purves, Augustine, Fitzpatrick, Katz, Lamantia, McNamara, et Williams, *Neuroscience*, De Boeck. Sunderland, Mass.: Sinauer, 2008.
- [160] O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, et F. J. Sigworth, « Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches », *Pflugers Arch.*, vol. 391, n^o. 2, p. 85-100, 1981.
- [161] L. K. Liem, J. M. Simard, Y. Song, et K. Tewari, « The patch clamp technique », *Neurosurgery*, vol. 36, n^o. 2, p. 382-392, 1995.
- [162] B. G. Kornreich, « The patch clamp technique: principles and technical considerations », *J Vet Cardiol*, vol. 9, n^o. 1, p. 25-37, 2007.
- [163] R. Cossart, Y. Ikegaya, et R. Yuste, « Calcium imaging of cortical networks dynamics », *Cell Calcium*, vol. 37, n^o. 5, p. 451-457, 2005.
- [164] M. A. Wood, « Colloidal Lithography and Current Fabrication Techniques Producing in-Plane Nanotopography for Biological Applications », *J. R. Soc. Interface*, vol. 4, n^o. 12, p. 1-17, 2007.
- [165] V. Torres-Costa, G. Martínez-Muñoz, V. Sánchez-Vaquero, Á. Muñoz-Noval, L. González-Méndez, E. Punzón-Quijorna, D. Gallach-Pérez, M. Manso-Silván, A. Climent-Font, J. P. García-Ruiz, et R. J. Martín-Palma, « Engineering of silicon surfaces at the micro- and nanoscales for cell adhesion and migration control », *Int J Nanomedicine*, vol. 7, p. 623-630, 2012.
- [166] H. Hu, Y. Ni, S. K. Mandal, V. Montana, B. Zhao, R. C. Haddon, et V. Parpura, « Polyethyleneimine Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes as a Substrate for Neuronal Growth », *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 109, n^o. 10, p. 4285-4289, 2005.
- [167] C. P. Firme III et P. R. Bandaru, « Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems », *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 6, n^o. 2, p. 245-256, 2010.
- [168] X. Zhao et R. Liu, « Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels », *Environment International*, vol. 40, n^o. 0, p. 244-255, 2012.
- [169] S. M. and N. Peixoto, « Implantable Electrodes with Carbon Nanotube Coatings », 2011.
- [170] T. J. Webster, M. C. Waid, J. L. McKenzie, R. L. Price, et J. U. Ejiófor, « Nano-biotechnology: carbon nanofibres as improved neural and orthopaedic implants », *Nanotechnology*, vol. 15, n^o. 1, p. 48-54, 2004.

- [171] T. Gabay, M. Ben-David, I. Kalifa, R. Sorkin, Z. R. Abrams, E. Ben-Jacob, et Y. Hanein, « Electrochemical and biological properties of carbon nanotube based multi-electrode arrays », *Nanotechnology*, vol. 18, n° 3, p. 035201, 2007.
- [172] M. Shein, A. Greenbaum, T. Gabay, R. Sorkin, M. David-Pur, E. Ben-Jacob, et Y. Hanein, « Engineered neuronal circuits shaped and interfaced with carbon nanotube microelectrode arrays », *Biomed Microdevices*, vol. 11, n° 2, p. 495-501, 2009.
- [173] M. Heim, B. Yvert, et A. Kuhn, « Nanostructuring strategies to enhance microelectrode array (MEA) performance for neuronal recording and stimulation », *Journal of Physiology-Paris*, n° 0.
- [174] M. Majumder, C. Rendall, M. Li, N. Behabtu, J. A. Eukel, R. H. Hauge, H. K. Schmidt, et M. Pasquali, « Insights into the physics of spray coating of SWNT films », *Chemical Engineering Science*, vol. 65, n° 6, p. 2000-2008, 2010.
- [175] J. Ma, B. F. Liu, Q. Y. Xu, et F. Z. Cui, « AFM study of hippocampal cells cultured on silicon wafers with nano-scale surface topography », *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 44, n° 2-3, p. 152-157, 2005.
- [176] Y. Fan, F. Cui, L. Chen, Y. Zhai, Q. Xu, et I.-S. Lee, « Adhesion of neural cells on silicon wafer with nano-topographic surface », *Applied Surface Science*, vol. 187, n° 3-4, p. 313-318, 2002.
- [177] S. P. Khan, G. G. Auner, et G. M. Newaz, « Influence of nanoscale surface roughness on neural cell attachment on silicon », *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 1, n° 2, p. 125-129, 2005.
- [178] B. P. Graham et A. van Ooyen, « Mathematical modelling and numerical simulation of the morphological development of neurons », *BMC Neurosci*, vol. 7 Suppl 1, p. S9, 2006.
- [179] S. M. Maskery, H. M. Buettner, et T. Shinbrot, « Growth cone pathfinding: a competition between deterministic and stochastic events », *BMC Neurosci*, vol. 5, p. 22, 2004.
- [180] K. K. Kanazawa et J. G. Gordon, « Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid », *Anal. Chem.*, vol. 57, n° 8, p. 1770-1771, 1985.
- [181] C. González-García, S. R. Sousa, D. Moratal, P. Rico, et M. Salmerón-Sánchez, « Effect of nanoscale topography on fibronectin adsorption, focal adhesion size and matrix organisation », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 77, n° 2, p. 181-190, 2010.
- [182] V. Kunduru, M. Bothara, J. Grosch, S. Sengupta, P. K. Patra, et S. Prasad, « Nanostructured surfaces for enhanced protein detection toward clinical diagnostics », *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 6, n° 5, p. 642-650, 2010.
- [183] M. S. Lord, M. Foss, et F. Besenbacher, « Influence of nanoscale surface topography on protein adsorption and cellular response », *Nano Today*, vol. 5, n° 1, p. 66-78, 2010.
- [184] D. Scholz, D. Pörtl, A. Genewsky, M. Weng, T. Waldmann, S. Schildknecht, et M. Leist, « Rapid, complete and large-scale generation of post-mitotic neurons from the human LUHMES cell line », *Journal of Neurochemistry*, vol. 119, n° 5, p. 957-971, 2011.
- [185] T.-I. Chao, S. Xiang, C.-S. Chen, W.-C. Chin, A. J. Nelson, C. Wang, et J. Lu, « Carbon nanotubes promote neuron differentiation from human embryonic stem cells », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 384, n° 4, p. 426-430, 2009.
- [186] C. Y. Tay, H. Gu, W. S. Leong, H. Yu, H. Q. Li, B. C. Heng, H. Tintang, S. C. J. Loo, L. J. Li, et L. P. Tan, « Cellular behavior of human mesenchymal stem cells cultured on single-walled carbon nanotube film », *Carbon*, vol. 48, n° 4, p. 1095-1104, 2010.
- [187] J. L. McKenzie, M. C. Waid, R. Shi, et T. J. Webster, « Decreased functions of astrocytes on carbon nanofiber materials », *Biomaterials*, vol. 25, n° 7-8, p. 1309-1317, 2004.
- [188] F. Sauter-Starace, N. Torres-Martinez, V. Agache, C. Pudda, J. Dijon, B. Pierrat, J. L. Divoux, N. Bourquin, J. F. Charmeux, F. Berger, A. L. Benabid, A. Sherdil, et S. Chabardes, « Epileptic seizure recordings of a non-human primate using carbon nanotube microelectrodes on implantable silicon shanks », in *Neural Engineering (NER), 2011 5th International IEEE/EMBS Conference on*, 2011, p. 589-592.
- [189] S. M. and N. Peixoto, « Implantable Electrodes with Carbon Nanotube Coatings », 2011.
- [190] A. Mazzatenta, M. Giugliano, S. Campidelli, L. Gambazzi, L. Businaro, H. Markram, M. Prato, et L. Ballerini, « Interfacing Neurons with Carbon Nanotubes: Electrical Signal Transfer and Synaptic Stimulation in Cultured Brain Circuits », *J. Neurosci.*, vol. 27, n° 26, p. 6931-6936, 2007.
- [191] A. V. Liopo, M. P. Stewart, J. Hudson, J. M. Tour, et T. C. Pappas, « Biocompatibility of Native and Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes for Neuronal Interface », *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 6, n° 5, p. 1365-1374, 2006.
- [192] C. M. Voge et J. P. Stegemann, « Carbon nanotubes in neural interfacing applications », *Journal of Neural Engineering*, vol. 8, n° 1, p. 011001, 2011.
- [193] A. Fabbro, G. Cellot, M. Prato, et L. Ballerini, « Interfacing neurons with carbon nanotubes: (re)engineering neuronal signaling », *Prog. Brain Res.*, vol. 194, p. 241-252, 2011.
- [194] W. Lee et V. Parpura, « Chapter 6 - Carbon nanotubes as substrates/scaffolds for neural cell growth », *Prog. Brain Res.*, vol. 180, p. 110-125, 2009.

- [195] M. Baxendale, « Biomolecular applications of carbon nanotubes », *Nanobiotechnology, IEE Proceedings* -, vol. 150, n° 1, p. 3 - 8, 2003.
- [196] J.-P. Poirier, *Ambroise Paré: un urgentiste au XVIe siècle*. Pygmalion, 2005.
- [197] A. Paré, R. W. Linker, et N. Womack, *Ten Books of Surgery With the Magazine of the Instruments Necessary for It*. University of Georgia Press, 2010.
- [198] C. B. Drucker, « Ambroise Paré and the Birth of the Gentle Art of Surgery », *Yale J Biol Med*, vol. 81, n° 4, p. 199-202, 2008.
- [199] A. L. Benabid, « Functional Neurosurgery for Parkinson's Disease », in *Practical Handbook of Neurosurgery*, M. Sindou, Éd. Springer Vienna, 2009, p. 1350-1368.
- [200] A. L. Benabid, S. Chabardes, J. Mitrofanis, et P. Pollak, « Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease », *The Lancet Neurology*, vol. 8, n° 1, p. 67-81, 2009.
- [201] K. Reekmans, J. Praet, J. Daans, V. Reumers, P. Pauwels, A. Van der Linden, Z. Berneman, et P. Ponsaerts, « Current Challenges for the Advancement of Neural Stem Cell Biology and Transplantation Research », *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 8, n° 1, p. 262-278, 2012.
- [202] H. Okano, « Stem cell biology of the central nervous system », *J. Neurosci. Res.*, vol. 69, n° 6, p. 698-707, 2002.
- [203] H. Okano, « Neural stem cells and strategies for the regeneration of the central nervous system », *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.*, vol. 86, n° 4, p. 438-450, 2010.
- [204] O. Einstein et T. Ben-Hur, « The changing face of neural stem cell therapy in neurologic diseases », *Arch. Neurol.*, vol. 65, n° 4, p. 452-456, 2008.
- [205] L. Casteilla, « Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update », *World Journal of Stem Cells*, vol. 3, n° 4, p. 25, 2011.
- [206] S. Jang, H.-H. Cho, Y.-B. Cho, J.-S. Park, et H.-S. Jeong, « Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin », *BMC Cell Biol.*, vol. 11, p. 25, 2010.
- [207] E. Anghileri, S. Marconi, A. Pignatelli, P. Cifelli, M. Galié, A. Sbarbati, M. Krampera, O. Belluzzi, et B. Bonetti, « Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells », *Stem Cells Dev.*, vol. 17, n° 5, p. 909-916, 2008.
- [208] K. Takahashi et S. Yamanaka, « Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors », *Cell*, vol. 126, n° 4, p. 663-676, 2006.
- [209] T. C. Burns, C. M. Verfaillie, et W. C. Low, « Stem cells for ischemic brain injury: a critical review », *J. Comp. Neurol.*, vol. 515, n° 1, p. 125-144, 2009.
- [210] J. O. Suhonen, D. A. Peterson, J. Ray, et F. H. Gage, « Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo », *Nature*, vol. 383, n° 6601, p. 624-627, 1996.
- [211] T. M. Bliss, R. H. Andres, et G. K. Steinberg, « Optimizing the success of cell transplantation therapy for stroke », *Neurobiology of Disease*, vol. 37, n° 2, p. 275-283, 2010.
- [212] A. B. Seymour, E. M. Andrews, S.-Y. Tsai, T. M. Markus, M. R. Bollnow, M. M. Brenneman, T. E. O'Brien, A. J. Castro, M. E. Schwab, et G. L. Kartje, « Delayed treatment with monoclonal antibody IN-1 1 week after stroke results in recovery of function and corticorubral plasticity in adult rats », *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 25, n° 10, p. 1366-1375, 2005.
- [213] P. Freund, E. Schmidlin, T. Wannier, J. Bloch, A. Mir, M. E. Schwab, et E. M. Rouiller, « Anti-Nogo-A antibody treatment promotes recovery of manual dexterity after unilateral cervical lesion in adult primates--re-examination and extension of behavioral data », *Eur. J. Neurosci.*, vol. 29, n° 5, p. 983-996, 2009.
- [214] P. Marino, J.-C. Norreel, M. Schachner, G. Rougon, et M.-C. Amoureux, « A polysialic acid mimetic peptide promotes functional recovery in a mouse model of spinal cord injury », *Exp. Neurol.*, vol. 219, n° 1, p. 163-174, 2009.
- [215] D. Lu, A. Mahmood, C. Qu, X. Hong, D. Kaplan, et M. Chopp, « Collagen scaffolds populated with human marrow stromal cells reduce lesion volume and improve functional outcome after traumatic brain injury », *Neurosurgery*, vol. 61, n° 3, p. 596-602; discussion 602-603, 2007.
- [216] OZ Biosciences, « 3D Transfection: a new outlook for your cells ».
- [217] E. Garbayo, G. J.-R., P. C., et C. N., « Advances in the Combined Use of Adult Cell Therapy and Scaffolds for Brain Tissue Engineering », in *Tissue Engineering for Tissue and Organ Regeneration*, D. Eberli, Éd. InTech, 2011.
- [218] C. C. Tate, D. A. Shear, M. C. Tate, D. R. Archer, D. G. Stein, et M. C. LaPlaca, « Laminin and fibronectin scaffolds enhance neural stem cell transplantation into the injured brain », *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 3, n° 3, p. 208-217, 2009.
- [219] C. Qu, Y. Xiong, A. Mahmood, D. L. Kaplan, A. Goussev, R. Ning, et M. Chopp, « Treatment of traumatic brain injury in mice with bone marrow stromal cell-impregnated collagen scaffolds », *J. Neurosurg.*, vol. 111, n° 4, p. 658-665, 2009.

- [220] H. K. Kleinman, M. L. McGarvey, J. R. Hassell, V. L. Star, F. B. Cannon, G. W. Laurie, et G. R. Martin, « Basement membrane complexes with biological activity », *Biochemistry*, vol. 25, n^o. 2, p. 312-318, 1986.
- [221] R. Thomson, M. Wake, M. Yaszemski, et A. Mikos, « Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs », in *Biopolymers II*, vol. 122, N. Peppas et R. Langer, Éd. Springer Berlin / Heidelberg, 1995, p. 245-274.
- [222] R. A. Kenley, M. O. Lee, T. R. Mahoney, et L. M. Sanders, « Poly(lactide-co-glycolide) decomposition kinetics in vivo and in vitro », *Macromolecules*, vol. 20, n^o. 10, p. 2398-2403, 1987.
- [223] Z.M. Huang, Y.-Z. Zhang, M. Kotaki, et S. Ramakrishna, « A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites », *Composites Science and Technology*, vol. 63, n^o. 15, p. 2223-2253, 2003.
- [224] Q. P. Pham, U. Sharma, et A. G. Mikos, « Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review », *Tissue Eng.*, vol. 12, n^o. 5, p. 1197-1211, 2006.
- [225] M. Muthu, « Nanoparticles based on PLGA and its co-polymer: An overview », *Asian Journal of Pharmaceutics*, vol. 3, n^o. 4, p. 266, 2009.
- [226] R. A. Jain, « The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices », *Biomaterials*, vol. 21, n^o. 23, p. 2475-2490, 2000.
- [227] A. Koroleva, A. A. Gill, I. Ortega, J. W. Haycock, S. Schlie, S. D. Gittard, B. N. Chichkov, et F. Claeysens, « Two-photon polymerization-generated and micromolding-replicated 3D scaffolds for peripheral neural tissue engineering applications », *Biofabrication*, vol. 4, n^o. 2, p. 025005, 2012.
- [228] V. Melissinaki, A. A. Gill, I. Ortega, M. Vamvakaki, A. Ranella, J. W. Haycock, C. Fotakis, M. Farsari, et F. Claeysens, « Direct laser writing of 3D scaffolds for neural tissue engineering applications », *Biofabrication*, vol. 3, n^o. 4, p. 045005, 2011.
- [229] M. J. Mahoney et W. M. Saltzman, « Transplantation of brain cells assembled around a programmable synthetic microenvironment », *Nature biotechnology*, vol. 19, n^o. 10, p. 934-939.
- [230] K. I. Park, Y. D. Teng, et E. Y. Snyder, « The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue », *Nat. Biotechnol.*, vol. 20, n^o. 11, p. 1111-1117, 2002.
- [231] E. Bible, D. Y. S. Chau, M. R. Alexander, J. Price, K. M. Shakesheff, et M. Modo, « The support of neural stem cells transplanted into stroke-induced brain cavities by PLGA particles », *Biomaterials*, vol. 30, n^o. 16, p. 2985-2994, 2009.
- [232] D. Y. Wong, S. J. Hollister, P. H. Krebsbach, et C. Nosrat, « Poly(epsilon-caprolactone) and poly (L-lactic-co-glycolic acid) degradable polymer sponges attenuate astrocyte response and lesion growth in acute traumatic brain injury », *Tissue Eng.*, vol. 13, n^o. 10, p. 2515-2523, 2007.
- [233] G. H. Kim, « Electrospun PCL nanofibers with anisotropic mechanical properties as a biomedical scaffold », *Biomedical Materials*, vol. 3, n^o. 2, p. 025010, 2008.
- [234] D. R. Nisbet, A. E. Rodda, M. K. Horne, J. S. Forsythe, et D. I. Finkelstein, « Neurite infiltration and cellular response to electrospun polycaprolactone scaffolds implanted into the brain », *Biomaterials*, vol. 30, n^o. 27, p. 4573-4580, 2009.
- [235] S. Hou, Q. Xu, W. Tian, F. Cui, Q. Cai, J. Ma, et I.-S. Lee, « The repair of brain lesion by implantation of hyaluronic acid hydrogels modified with laminin », *J. Neurosci. Methods*, vol. 148, n^o. 1, p. 60-70, 2005.
- [236] J. Zhong, A. Chan, L. Morad, H. I. Kornblum, G. Fan, et S. T. Carmichael, « Hydrogel matrix to support stem cell survival after brain transplantation in stroke », *Neurorehabil Neural Repair*, vol. 24, n^o. 7, p. 636-644, 2010.
- [237] H.-Y. Lai, S.-H. Lin, C.-W. Cho, W.-H. Chao, C.-H. Liao, S. Tsang, Y.-F. Chen, et S.-Y. Lin, « Design and fabrication of a polyimide-based microelectrode array: application in neural recording and repeatable electrolytic lesion in rat brain. », *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 182, n^o. 1, p. 6-16, 2009.
- [238] J. J. FitzGerald, N. Lago, S. Benmerah, J. Serra, C. P. Watling, R. E. Cameron, E. Tarte, S. P. Lacour, S. B. McMahon, et J. W. Fawcett, « A regenerative microchannel neural interface for recording from and stimulating peripheral axons in vivo », *Journal of Neural Engineering*, vol. 9, n^o. 1, p. 016010, 2012.
- [239] A. L. Benabid, F. Sauter-Starace, et P. Caillat, « Multiple electrode lead and a system for deep electrical neurostimulation ... », U.S. Patent 79914812011.
- [240] K. T. Al-Jamal, L. Gherardini, G. Bardi, A. Nunes, C. Guo, C. Bussy, M. A. Herrero, A. Bianco, M. Prato, K. Kostarelos, et T. Pizzorusso, « Functional Motor Recovery from Brain Ischemic Insult by Carbon Nanotube-Mediated siRNA Silencing », *PNAS*, vol. 108, n^o. 27, p. 10952-10957, 2011.
- [241] L. Lacerda, A. Bianco, M. Prato, et K. Kostarelos, « Carbon nanotubes as nanomedicines: From toxicology to pharmacology », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 58, n^o. 14, p. 1460-1470, 2006.
- [242] H. J. Johnston, G. R. Hutchison, F. M. Christensen, S. Peters, S. Hankin, K. Aschberger, et V. Stone, « A critical review of the biological mechanisms underlying the in vivo and in vitro toxicity of carbon nanotubes: The contribution of physico-chemical characteristics », *Nanotoxicology*, vol. 4, n^o. 2, p. 207-246, 2010.

- [243] X. Zhao et R. Liu, « Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels », *Environment International*, vol. 40, n^o. 0, p. 244-255, 2012.
- [244] S. U. Moon, J. Kim, K. K. Bokara, J. Y. Kim, D. Khang, T. J. Webster, et J. E. Lee, « Carbon nanotubes impregnated with subventricular zone neural progenitor cells promotes recovery from stroke », *Int J Nanomedicine*, vol. 7, p. 2751-2765, 2012.
- [245] M. Kato-Negishi, Y. Tsuda, H. Onoe, et S. Takeuchi, « A neurospheroid network-stamping method for neural transplantation to the brain. », *Biomaterials*, vol. 31, n^o. 34, p. 8939-8945, 2010.
- [246] Y. Yang, S. Basu, D. L. Tomasko, L. J. Lee, et S.-T. Yang, « Fabrication of well-defined PLGA scaffolds using novel microembossing and carbon dioxide bonding », *Biomaterials*, vol. 26, n^o. 15, p. 2585-2594, 2005.
- [247] S. Oh, S. Kang, et J. Lee, « Degradation behavior of hydrophilized PLGA scaffolds prepared by melt-molding particulate-leaching method: Comparison with control hydrophobic one », *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 17, n^o. 2, p. 131-137, 2006.
- [248] L. Lu, S. J. Peter, M. D. Lyman, H. L. Lai, S. M. Leite, J. A. Tamada, S. Uyama, J. P. Vacanti, R. Langer, et A. G. Mikos, « In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams », *Biomaterials*, vol. 21, n^o. 18, p. 1837-1845, 2000.
- [249] T. Xu, C. A. Gregory, P. Molnar, X. Cui, S. Jalota, S. B. Bhaduri, et T. Boland, « Viability and electrophysiology of neural cell structures generated by the inkjet printing method », *Biomaterials*, vol. 27, n^o. 19, p. 3580-3588, 2006.
- [250] T. Xu, J. Jin, C. Gregory, J. J. Hickman, et T. Boland, « Inkjet printing of viable mammalian cells », *Biomaterials*, vol. 26, n^o. 1, p. 93-99, 2005.
- [251] D. Wright, B. Rajalingam, J. M. Karp, S. Selvarasah, Y. Ling, J. Yeh, R. Langer, M. R. Dokmeci, et A. Khademhosseini, « Reusable, reversibly sealable parylene membranes for cell and protein patterning », *J Biomed Mater Res A*, vol. 85, n^o. 2, p. 530-538, 2008.
- [252] D. Wright, B. Rajalingam, S. Selvarasah, M. R. Dokmeci, et A. Khademhosseini, « Generation of static and dynamic patterned co-cultures using microfabricated parylene-C stencils », *Lab Chip*, vol. 7, n^o. 10, p. 1272-1279, 2007.
- [253] H. Kaji, G. Camci-Unal, R. Langer, et A. Khademhosseini, « Engineering systems for the generation of patterned co-cultures for controlling cell-cell interactions », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1810, n^o. 3, p. 239-250, 2011.
- [254] « Technology, Technologie, Direktes Laserschreiben, Direct Laser Writing, DiLL, Dip-in Laserlithografie, Dip-in Laser Lithography », 2012. [Online]. Available: <http://www.nanoscribe.de/de/technologie/3d-laserlithografie>. [Accessed: 14-juin-2012].
- [255] L. A. Phebus et K. W. Johnson, « Dural Inflammation Model of Migraine Pain », in *Current Protocols in Neuroscience*, J. N. Crawley, C. R. Gerfen, M. A. Rogawski, D. R. Sibley, P. Skolnick, et S. Wray, Éd. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- [256] V. S. Polikov, P. A. Tresco, et W. M. Reichert, « Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes », *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 148, n^o. 1, p. 1-18, 2005.
- [257] M. Modo, R. P. Stroemer, E. Tang, S. Patel, et H. Hodges, « Effects of Implantation Site of Stem Cell Grafts on Behavioral Recovery From Stroke Damage », *Stroke*, vol. 33, n^o. 9, p. 2270-2278, 2002.
- [258] S.-W. Jeong, K. Chu, K.-H. Jung, S. U. Kim, M. Kim, et J.-K. Roh, « Human Neural Stem Cell Transplantation Promotes Functional Recovery in Rats With Experimental Intracerebral Hemorrhage », *Stroke*, vol. 34, n^o. 9, p. 2258-2263, 2003.

Contributions scientifiques

Brevet

– A. Bédurier, E. Flahaut, C. Vieu, F. Seichepine, Procédé de formation de motifs d'objets sur la surface d'un substrat, déposé, PCT/IB2012/051567 (**2011**).

Publications

– A. Bédurier, F. Seichepine, E. Flahaut, L. Vaysse, I. Loubinoux, C. Vieu, Elucidation of the role of carbon nanotube patterns on the development of cultured neuronal cells, *soumis à Langmuir* (**mai 2012**).

– L. Vaysse, C. Labie, B. Canolle, S. Jozan, A. Bédurier, C. Vieu, F. Arnauduc, JC. Sol, I. Loubinoux, Adult human progenitor cells from the temporal lobe: another source of neuronal cells, *Experimental neurology*, in press (**2012**).

– A. Bédurier, F. Seichepine, E. Flahaut, C. Vieu, A simple and versatile micro-contact printing method for generating carbon nanotubes patterns on various substrates, *Microelectronic Engineering*, in press, disponible en ligne (**2012**).

– A. Labrousse, E. Meunier, J. Record, A. Labernadie, A. Bédurier, C. Vieu, T. Ben Safta, I. Maridonneau-Parini, Frustrated phagocytosis on micro-patterned immune complexes to characterize lysosome movements in live macrophages, *Frontiers in inflammation*, Volume 2, article 51 (**2011**).

– A. Bédurier, C. Vieu, F. Arnauduc, JC Sol, I. Loubinoux, L. Vaysse, Engineering of human neural stem cells differentiation through surface micropatterning, *Biomaterials*, Volume 33; Issue 2, pp504-514, (**2012**).

– A. Bédurier, L. Vaysse, E. Flahaut, F. Seichepine, I. Loubinoux, C. Vieu, Multi-scale engineering for neuronal cell growth and differentiation, *Microelectronic Engineering*, Volume 88; Issue 8, pp 1668-167, (**2011**).

Communications orales

– A. Bédurier, *INTERBIO, Regenerative Medicine and stems cell*, Regeneration of a damaged cerebral region by using tissue engineering, Valence, Espagne, **Janvier 2010**.

– A. Bédurier, *36th International Conference on Micro and Nano Engineering*, Multi-scale engineering for neuronal cell growth and differentiation, Genes, Italie, **Septembre 2010**.

– A. Bédurier, *37th International Conference on Micro and Nano Engineering*, Elucidation of the role of carbon nanotubes on the neuronal growth, Berlin, Germany, **Septembre 2011**.

– A. Bédurier, *2011 Materials Research Society Fall Meeting*, Multi-scale engineering for adult human stem cells growth and differentiation, Boston, Massachusetts, USA, **Décembre 2011**.

Communications par posters

– *Nanomedicine: Visions for the Future*, Micro and nano patterning for neural tract engineering, Amsterdam, Netherlands, **Février 2010**.

ANNEXES

<i>Annexe 1 : Procédés de photolithographie pour la fabrication de moules de silicium</i>	236
<i>Annexe 2 : Résultats de mesures d'angles de goutte sur le PDMS</i>	238
<i>Annexe 3 : Protocoles de culture des cellules.....</i>	240
<i>Annexe 4 : Comparaison de plusieurs méthodes de traitement des images en fluorescence</i>	245
<i>Annexe 5 : Matériel et méthodes pour la réalisation de couches et de motifs de nanotubes de carbone</i>	247
1. Réalisation d'une suspension stable de nanotubes de carbone	247
2. Réalisation de couches minces de nanotubes de carbone par dépôt par pulvérisation	249
3. Mise au point d'une méthode permettant de réaliser des micro-motifs de NTCs	254
<i>Annexe 5 : Réflexions personnelles.....</i>	260
Quelques pistes de réflexions sur les enjeux réglementaires et éthiques liés à mes recherches	260

Annexe 1 : Procédés de photolithographie pour la fabrication de moules de silicium

Procédé pour la photolithographie avec la résine PFI38A (Sumitomo) 2,5µm

Etape	Paramètres
Préparation du substrat de silicium	- nettoyage RT2 pendant 2 minutes puis rinçage eau DI - déshydratation, dans étuve à 200°C pendant 20minutes - dépôt d'un promoteur d'adhérence pour la résine : HMDS
Enduction résine	- volume de résine déposé : 3mL - réglages tournette : vitesse rotation = 850tr/min, accélération rotation = 5000 tr/min/s, durée = 30 s
Pré-recuit résine	(sur une plaque chauffante), 90°C pendant 60 s
Détourage	(sert à enlever la sur épaisseur de résine se trouvant sur le bord de la plaque de silicium) - utilisation d'un jet d'acétone, dispensé localement sur la plaque, lorsque celui-ci est en rotation (réglages tournette : vitesse rotation = 5000tr/min, accélération rotation = 5000 tr/min/s, durée = 30 s)
Insolation	- équipement : MA 150 - dose du rayonnement : 350mJ/cm ² , pour une longueur d'onde de 405nm - puissance : 20mW/cm ² , durée exposition : 15s
Recuit post-insolation	(sur une plaque chauffante), 110°C pendant 60s
Développement	- révélateur : MF 26 CD - durée : 40s
Contrôle	- microscopie optique (contrôle de la bonne révélation des motifs) - profilomètre (mesure de l'épaisseur de la résine et contrôle révélation des motifs)

Procédé pour la photolithographie avec la résine PFI38A (Sumitomo) 1,05µm

Etape	Paramètres
Préparation du substrat de silicium	- nettoyage piranha (acide sulfurique et peroxyde d'hydrogène 1 : 1 en volume) - déshydratation, dans étuve à 200°C pendant 20minutes - dépôt d'un promoteur d'adhérence pour la résine : HMDS
Enduction résine	- volume de résine déposé : 3mL - réglages tournette : vitesse rotation = 3500tr/min, accélération rotation = 5000 tr/min/s, durée = 30 s
Pré-recuit résine	(sur une plaque chauffante), 90°C pendant 60 s
Détourage	(sert à enlever la sur épaisseur de résine se trouvant sur le bord de la plaque de silicium) - utilisation d'un jet d'acétone, dispensé localement sur la plaque, lorsque celui-ci est en rotation (réglages tournette : vitesse rotation = 5000tr/min, accélération rotation = 5000 tr/min/s, durée = 30 s)

Insolation	<ul style="list-style-type: none"> - équipement : MA 150 - dose du rayonnement : 350mJ/cm², pour une longueur d'onde de 405nm - puissance : 20mW/cm², durée exposition : 5s
Recuit post-insolation	(sur une plaque chauffante), 110°C pendant 60s
Développement	<ul style="list-style-type: none"> - révélateur : MF 26 CD - durée : 40s
Contrôle	<ul style="list-style-type: none"> - microscopie optique (contrôle de la bonne révélation des motifs) - profilomètre (mesure de l'épaisseur de la résine et contrôle révélation des motifs)

Annexe 2 : Résultats de mesures d'angles de goutte sur le PDMS

Il est connu que le traitement oxydatif du PDMS le rendant hydrophile a une durée de vie limitée dans le temps. Dans notre cas, il s'est avéré nécessaire de déposer sur la surface du PDMS les protéines d'adhérence ou les cellules tant que le PDMS est encore hydrophile. Pour déterminer la plage de temps durant laquelle nous pouvons réaliser le dépôt de protéines ou de cellules, nous avons effectué des mesures d'angle de goutte afin de suivre dans le temps l'évolution de l'hydrophilie de la surface du PDMS. Pour cela, nous avons utilisé l'équipement « Digidrop ».

Paramètre étudié: Méthode de conservation du PDMS une fois traité

Méthodes:

- fabrication des substrats de PDMS

Le PDMS Sylgard 184 (proportion d'agent réticulant 1 :10) est coulé sur un substrat plat de silicium traité afin d'être non adhérent. Il est réticulé à 80°C pendant 3 heures. Il est ensuite découpé en morceaux de 1cm x 1cm.

- mesures des angles de contact

Une fois que les substrats de PDMS ont refroidi et sont à température ambiante, nous mesurons les angles de contact entre une goutte d'eau déionisée et le substrat de PDMS avec l'équipement Digidrop avant et après le traitement oxydatif au plasma. Nous réalisons 6 mesures sur 6 zones différentes du substrat, pour chaque substrat. Les graphes ci-après rapportent les valeurs moyennes et les écarts types obtenus.

- paramètres du traitement oxydatif au plasma

L'équipement utilisé est le modèle « pico μ W UHP », du constructeur Diener Electronics.

Puissance du plasma	300W
Pression d'entrée de l'oxygène	1,5mbars
Durée du traitement	2 minutes ou 4 minutes

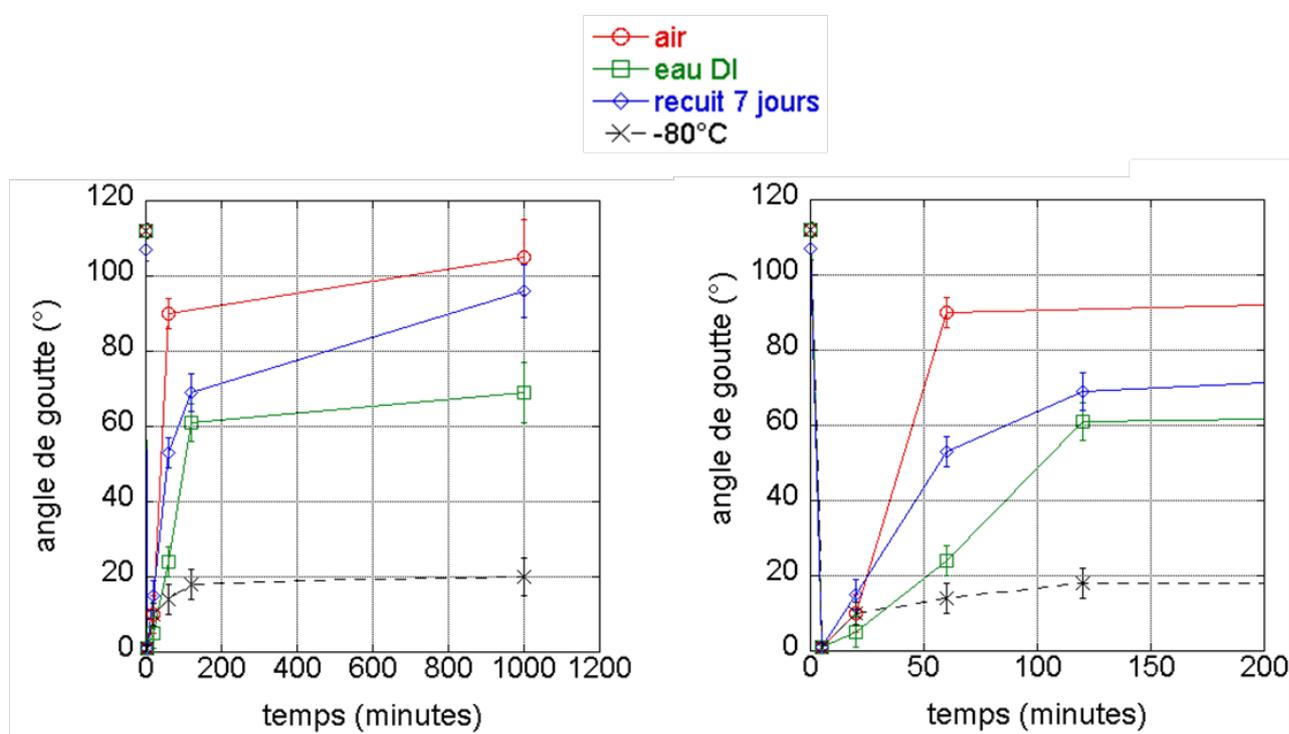
- méthodes de conservation des substrats de PDMS

- Substrats de PDMS conservés à l'air : une fois réticulé et découpé, les substrats de PDMS sont conservés dans une boîte de pétri, à l'air ambiant.
- Substrats de PDMS conservés dans l'eau déionisée (DI) : quelques secondes après la fin du traitement oxydant au plasma, les substrats de PDMS sont immergés dans de l'eau DI. Ils sont séchés au préalable des mesures d'angle de contact, sous un flux d'azote.

- Substrats de PDMS recuits 7 jours : une fois réticulés et découpés, les substrats de PDMS sont maintenus pendant 7 jours dans une étuve, à 80°C. Avant chaque mesure d'angle de goutte, on attend que les substrats refroidissent et soient à température ambiante.
- Substrats de PDMS conservés au congélateur à -80°C : une fois réticulés et découpés, les substrats de PDMS sont maintenus pendant 7 jours dans un congélateur à -80°C. Avant chaque mesure d'angle de goutte, on attend que la température des substrats de PDMS regagne la température ambiante.

Résultats

Le graphe suivant montre l'évolution des angles de gouttes mesurés pour les substrats de PDMS conservés dans différents environnements. On observe que la conservation dans de l'eau DI ou encore au congélateur à -80°C augmente le délai de retour à l'hydrophobicité des substrats de PDMS. Ils permettent donc de disposer d'un délai plus long pour procéder au dépôt de protéines ou de cellules.



Annexe 3 : Protocoles de culture des cellules

Protocole de culture des cellules de la lignée neuronale “Neuro2a”

Extrait de “Multi-scale engineering for neuronal cell growth and differentiation”, A. Bédurier et al, Microelectronic Engineering, Volume 88, Issue 8, 2011, pages 1668–1671.

Cell culture

Neuroblastoma N2a mouse cells were grown in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories) and 1% penicillin–streptomycin (GIBCO) in petri dishes (FALCON). Cells were subcultured twice a week, and maintained at 37 °C and 5% CO₂. All reported experiments were performed using cells with less than 20 passages. Neuro2a cells were seeded on PDMS substrates at a density of 1.2×10^4 cells/cm². Cells were incubated 24 h then differentiated by switching the medium DMEM to a prewarmed DMEM containing 0.1% BSA (bovine serum albumine, Euromedex). Cells were then maintained at 37 °C during 48 h before being fixed with 3.5% paraformaldehyde (Sigma) for characterization.

Fluorescence immunostaining

To observe the cells and quantify their behavior, we stained the actin cytoskeleton and the cells nucleus. Cells were fixed with 3.5% paraformaldehyde in PBS and sucrose (1:1) for 30 min at room temperature, rinsed three times with PBS and permeabilized (2 min in a 50 mM solution of NH₄Cl in PBS and 10 min in a PBS–Triton solution (0.3% in volume)). Actin cytoskeleton was stained with tetramethylrhodamine(TRITC)-conjugated phalloidin (molecular probes) at a dilution of 1:200. Cell nucleus are stained with the 4'-6-diamidine-2-phenyl indole (DAPI) used at 1:100, targeting DNA.

Protocole de culture des cellules de la lignée neuronale humaine "Luhmes"

Dépôt de protéines d'adhérence sur les surfaces de culture

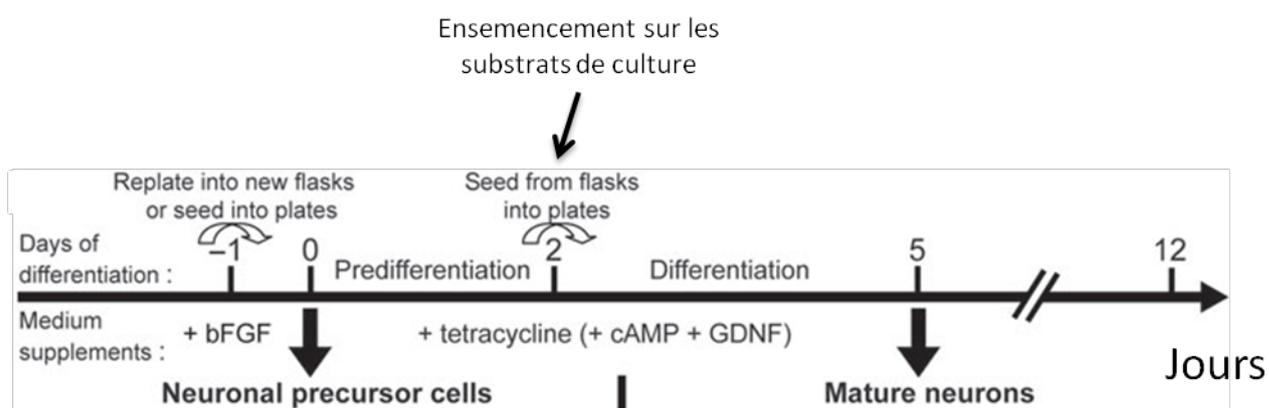
Dépôt de polylysine et de laminine

- Poly-D-Lysine (Sigma) : 100µg/mL dans de l'eau mQ stérile, incubation pendant 4 heures à température ambiante

- Enlever la poly-D-lysine puis laisser sécher les substrats sous la hotte pendant une nuit

- Laminine (Sigma): 40µg/mL dans de l'eau mQ stérile, incubation pendant 1 nuit à température ambiante

Schéma global du protocole de culture des cellules "Luhmes" :



1. Culture des cellules en milieu de prolifération

Utilisation de boîtes de pétri recouvertes au préalable de polylysine et laminine, comme détaillé ci-avant.

- Dénombrement des cellules présentes dans la boîte de culture, à l'aide de la lame de Malassez

- Passage de $4.5 \cdot 10^4$ cellules/cm² dans du milieu de prolifération.

Le milieu de prolifération contient :

- DMEM/F12, 1 :1, Gibco
- B-27 1 :50, Gibco
- β FGF 40ng/mL, Invitrogen

Le milieu de culture « classique » contient :

- DMEM/F12, 1 :1, Gibco
- Penicilin-Streptomycin (5% volume du milieu total)
- FBS (10% volume du milieu total)

Enlever le milieu de culture « classique », le remplacer par 1mL de solution de trypsine EDTA

Incuber la trypsine pendant 3 minutes à 37°C

Ajouter du milieu de culture « classique »

Centrifuger (800rpm, 8 minutes) et retirer le surnageant

Re-suspendre le culot de cellules obtenu dans du milieu de prolifération
Dénombrer les cellules avec la lame de Malassez
Ajouter le milieu nécessaire pour obtenir la densité cellulaire souhaitée
Conservation dans l'incubateur, 37°C, 5% CO₂

▪ 2. Induction de la prédifférenciation dans les boîtes de Pétri

Utilisation de boîtes de pétri recouvertes au préalable de polylysine et laminine, comme détaillé ci-avant.

- Le milieu de différenciation est utilisé pour cette phase. Il contient :
 - DMEM/F12, 1 :1, Gibco
 - B-27 1 :50, Gibco
 - tétracycline hydrochloride, 1µg/mL
- Passage des cellules en suivant le même protocole que précédemment et en remplaçant le milieu de culture « classique » par du milieu de différenciation.
- Maintien des cellules pendant 2 jours.

▪ 3. Ensemencement sur les substrats de culture et induction de la différenciation

Utilisation des substrats (PDMS, NTCs, ...) traités au plasma oxydant et recouverts de polylysine et laminine, comme détaillé ci-avant.

- Passage des cellules en suivant le même protocole que précédemment, en utilisant du milieu de différenciation.
- Ensemencement après avoir dénombré les cellules dans la suspension et ajusté le volume en fonction de la densité cellulaire souhaitée.
- Maintien des cellules en culture pendant 5 jours, dans du milieu de différenciation changé tous les deux jours.

Fixation et marquages immunofluorescents

- Fixation des cellules : le milieu de culture est remplacé par une solution de fixation (paraformaldehyde, 4% dans du PBS). Incubation pendant 1 nuit.
- Perméabilisation, remplacement de la solution de fixation par une solution de triton X-100 (5% dans du PBS)
- Blocage des sites non spécifiques (sérum de chèvre 3% dans du PB), 30 minutes à température ambiante
- incubation anticorps primaire (Tuj-1 1 :1000 dans PB, pour le marquage de la β-III tubuline des neurones humains), 2 heures.
- 3 lavages au PB, 5 minutes chacun
- incubation anticorps secondaire (Alexa 488nm, 1 :1000 dans PB), 2 heures
- lavage au PB, 5 minutes chacun
- incubation phalloïdine (marquage de l'actine des cellules, 1 :200 dans PB), 45 minutes
- incubation DAPI (marquage des noyaux, 1 :1000), 5 minutes
- 3 lavages au PB, 5 minutes chacun

Montage des substrats de culture entre lame et lamelle, milieu de montage DAKO.

Extrait de “Adult human progenitor cells from the temporal lobe: another source of neuronal cells” L. Vaysse et al, in press in Brain injury

Isolation of neural progenitors

Biopsies from the temporal lobe (cortex with some adjacent white matter) and the subventricular zone (SVZ) were obtained from individuals (n=9, table I) undergoing neurosurgery for the treatment of pharmacoresistant epilepsy. All procedures were performed with informed patient consent according to our local human ethics committee (CPP Sud- Ouest Outre Mer Toulouse I) and in accordance with institutional human tissue handling and use guidelines. Immediately after removal, primary tissues were placed in cold DMEM/F12 (Gibco life technology) with 5% glucose and gentamycine (100µg/ml).

Tissue samples were then dissected under sterile conditions to remove damaged tissue and blood vessels, cut into 1 mm³ pieces and placed in dissociation medium consisting of trypsin (65 µg/ml, Sigma-Aldrich), hyaluronidase (1.4 mg/ml, Sigma-Aldrich) and kyrunic acid (0.2 mg/ml, Sigma-Aldrich) in DMEM/F12/5%glucose. Tissues were then digested for 20 min at 37°C and were triturated using restricted bore pipetting every 5 min. Following trypsin neutralisation by ovomucoid (0.7 mg/ml, Sigma-Aldrich), cell solutions were passed through a 70µm strainer (Falcon) and centrifuged (800 rpm, 10 min). After two washes in HBSS without Ca₂₊ and Mg₂₊ (Gibco, Life technology), cells were resuspended in proliferative media containing DMEM/F12 with B27 supplements (Gibco, Life technology), EGF (20ng/ml, Invitrogen), bFGF (20ng/ml, Invitrogen) and gentamycin. Cells were grown in suspension culture flasks (Greiner Bio-one) to avoid adhesion and half of the proliferative medium was changed twice a week.

Neurosphere passaging and differentiation

After 12 days of primo-culture, neurospheres were passaged before the center became necrotic or before neurosphere fusion. Neurospheres were collected by centrifugation (800 rpm, 8 min), washed with HBSS without Ca₂₊ and Mg₂₊ and enzymatically digested by incubation in 0.5% trypsin-EDTA (Gibco, Life technology) for 3 min at 37°C to obtain neurosphere dissociation. Cells were seeded in T25 flasks at a density of 5 10⁵ per flask and grown for twelve further days in the proliferative medium to allow them to reform secondary spheres. For some samples, BrdU (10µm, sigma) was added to the culture medium for 48h during this amplification step. To induce differentiation, secondary neurospheres were dissociated in single cell suspension as described above and seeded at 3 10⁴ cells/ well in 16-well chamber slides (Labteck) precoated with polylysine (100 µg/ml, Sigma-Aldrich) and laminin (40 µg/ml, Sigma-Aldrich) in DMEM/F12

with B27 supplements. The following day, NGF (20 ng/ml, Peprotech), NT3 (20 ng/ml, AbCys) or retinoic acid (RA, 1 μ M, Sigma) were added as specified.

For cell seeding, neurospheres were collected by centrifugation, washed with HBSS without Ca^{2+} and Mg^{2+} and enzymatically digested by incubation in 0.5% trypsin-EDTA (Gibco, Life technology), 3 min at 37°C, to obtain single cell suspension. Cells were seeded at a density of 75 000 cells/cm² on PDMS patterned surfaces in DMEM/F12 supplemented with B27 nutrients and NGF (20 ng/ml, Peprotech).

Immunocytochemistry

Cells were fixed with 4% buffered formaldehyde (Sigma-Aldrich) over night. After permeabilization, with 0.5 % Triton X-100 (Sigma) 10 min at room temperature followed by 10 min incubation with blocking solution (3% goat serum), slides were allowed to react with primary antibodies for 2 hours at room temperature using the appropriate dilution: mouse anti-Tuj1 1:2000 (Covance) as neuronal marker, rabbit anti-GFAP 1:1000 (DAKO) as astrocyte marker. After PBS washes, the secondary antibody including Alexa Fluor 546 goat anti-mouse, Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (Molecular Probes) was incubated 1 h at room temperature. Nuclei were stained by DAPI application (1 μ g/ml, Sigma-Aldrich) and slides were then coverslipped using fluorescent mounting medium (Dako Cytomation).

Annexe 4 : Comparaison de plusieurs méthodes de traitement des images en fluorescence

Pour un traitement rapide et fiable des données obtenues à partir d'images prises au microscope à fluorescence, nous avons étudié les possibilités d'automatiser ces différentes quantifications. Pour cela, nous avons comparé les résultats obtenus en utilisant plusieurs logiciels d'analyse d'images, dont Imaris®, Amira® et image J et ses différents « plugin ». Certaines fonctions de ces logiciels permettent de détecter les formes, les contours des cellules et même parfois les neurites des neurones. Les fonctions de ces logiciels peuvent être selon le cas, automatiques, semi-automatiques ou manuelles.

Le tableau suivant présente les résultats obtenus avec les différents logiciels et protocoles. Il indique dans chaque cas aussi les durées de traitement nécessaires.

Équipement utilisé pour l'acquisition de l'image	Durée de l'acquisition de l'image	Protocole de traitement réalisé	Durée du procédé de traitement	Durée totale	Résultats quantification * pourcentage d'erreur par rapport à la réalité
Microscope optique à fluorescence	1 min	Automatique <i>Logiciel Image J</i> -Binarisation de l'image représentant les neurofilaments -Dénombrement des objets	30s	1min30s	100 neurites * +450%
Microscope optique à fluorescence	1 min	Semi-automatique <i>Logiciel Image J</i> -Reprise manuelle de l'image (amélioration du contraste, suppression artefacts) -Binarisation de l'image représentant les neurofilaments -Dénombrement des objets	7 min	6 minutes	40 neurites * +120%
Microscope bi-photon ou confocal	10-20 min	Automatique <i>Logiciel Imaris ou logiciel amira</i> -Reconstruction 3D -Fonction neurite tracer	2 min	15-20 min	60 neurites * +233%
Microscope bi-photon ou confocal	10-20 min	Semi-automatique <i>Logiciel Imaris ou logiciel amira</i> - Reconstruction 3D -Amélioration manuelle de l'image (suppression artefacts, lissage, seuillage) -Fonction neurite tracer	10 min	20-30 min	20 neurites * +10%
Microscope optique à fluorescence	1 min	Semi-automatique <i>Logiciel Image J</i> Plugin NeuronJ :	3-5 min	4-6 min	19 neurites * +5%

		-tracé manuel des neurites			
		-Dénombrement des neurites automatique			

Comparaison des protocoles testés pour réaliser le dénombrement des neurites de neurones issues de la différenciation de cellules souches adultes humaines. Le nombre exact de neurites est 18 (dénombrement manuel).

On relève de grandes différences entre les différents protocoles et donc de grandes erreurs. Celles-ci ont essentiellement deux causes :

- les cellules que l'on utilise sont des cellules souches. Toutes les cellules ne sont pas différenciées et la présence des cellules non différenciées génère un « bruit de fond ». Des formes fluorescentes sont présentes et ne doivent pourtant pas être comptées en tant que neurites. Ces différences sont moins importantes dans le cas des cellules issues de lignées.
- dans le cas des images prises au microscope optique à fluorescence, celles-ci sont à 2 dimensions alors que les cultures sont en réalité à trois dimensions. On moyenne ainsi la fluorescence présente sur plusieurs μm . Ainsi, les logiciels ne peuvent pas discerner si un neurite est continu ou bien s'il s'agit de deux neurites qui sont en fait dans deux plans focaux différents. Une solution serait de faire des images au microscope confocal ou au microscope bi-photon, ce qui nécessite un temps d'acquisition des images trop important, étant donné l'énorme quantité d'échantillons à observer.

Enfin, le traitement manuel des images afin d'éliminer les artefacts des images avant de lancer les traitements automatiques sont plus longs que le traitement semi-automatique. De plus, les erreurs réalisées par les traitements automatiques ne sont pas stables, ce qui ne nous permet pas de comparer les résultats des quantifications entre eux.

Annexe 5 : Matériel et méthodes pour la réalisation de couches et de motifs de nanotubes de carbone

Cette annexe présente les méthodes développées pour créer des couches de NTCs et des surfaces comportant des motifs de NTCs. Ces surfaces ont été utilisées pour la culture de neurones et les résultats obtenus ont été présentés dans **le chapitre 3 de la première partie** de ce manuscrit.

1. Réalisation d'une suspension stable de nanotubes de carbone

1.1. Nanotubes de carbone utilisés

Il existe plusieurs types de nanotubes de carbone, possédants différentes structures (simple-paroi, bi-parois ou multiparois) et différentes propriétés électriques (ils peuvent être semi-conducteurs ou métalliques). Nous avons utilisé des nanotubes de carbone qui nous ont été fournis par Emmanuel Flahaut⁴³, avec qui notre groupe de recherche est en collaboration. Ce sont des nanotubes de carbone bi-paroi, qui ont un comportement très majoritairement métallique. Ils ont été synthétisés par dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD: Catalytic Chemical Vapor Deposition), selon un protocole précédemment développé [260].

Cette technique permet d'obtenir des échantillons de NTCs comportant une proportion de nanotubes bi-parois de l'ordre de 80% en nombre. Le catalyseur mis en œuvre est basé sur l'oxyde de magnésium (MgO) et contient du cobalt et un très faible ajout de molybdène. Le traitement par CCVD de 10g de ce catalyseur (composition élémentaire $Mg_{0.99}Co_{0.0075}Mo_{0.0025}O$) conduit à l'obtention de plus de 1g de nanotubes de carbones bi-parois. Ils ne nécessitent aucune opération de purification particulière (peu ou pas de dépôts de carbone amorphe, absence de particules graphitiques, contamination par du métal résiduel limitée). Le seul traitement appliqué est la dissolution de l'oxyde et du métal non protégé par acide chlorhydrique (HCl), non oxydant, ce qui n'endommage pas les NTCs (pas de fonctionnalisation accidentelle).

1.2. Choix d'un agent dispersant et d'un solvant non-toxiques

Pour pouvoir par la suite générer des couches de nanotubes de carbone continues et homogènes, nous avons d'abord dû réaliser une suspension de NTCs qui soit stable dans le temps. Pour cela, nous avons choisi un agent dispersant⁴⁴ et un solvant.

L'agent dispersant permet de séparer les NTCs puis d'éviter leur agglomération. Sans l'ajout de cet agent dispersant, les fortes forces d'adhérence entre tubes entravent leur dispersion, ces derniers

⁴³ Emmanuel Flahaut est chercheur au Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux (CIRIMAT), à Toulouse.

⁴⁴ Un agent dispersant permet de créer une suspension en séparant les particules et en limitant leur agglomération ultérieure.

demeurant sous forme d'agglomérats de tubes, sous forme de faisceaux ou de pelotes⁴⁵, préjudiciables pour la suite du procédé.

Pour disperser des suspensions de NTCs, l'équipe d'Emmanuel Flahaut utilise couramment le sodium dodecyl sulfate (SDS), qui est un détergeant et un tensioactif ionique [265]. Ce composé est très toxique pour les cellules car il dénature les protéines en supprimant leurs liaisons non-covalentes [266], [267]. Nous avons donc dû trouver une autre stratégie pour stabiliser notre suspension de NTCs. Elle a été d'utiliser la carboxyméthylcellulose sodique (CMC) comme agent dispersant. Il s'agit d'un polymère qui enveloppe individuellement les NTCs et qui permet l'obtention de suspensions stables dans de l'eau [268].

Pour le solvant, nous nous sommes orientés vers l'utilisation de l'eau désionisée filtrée. Cette eau ne comprend pas d'ions ni d'impuretés qui pourraient perturber la stabilité de la suspension.

Dans un premier temps, il est important de s'assurer que la CMC n'a aucune influence sur le développement et la viabilité des cellules neuronales en culture. Pour cela, nous avons réalisé d'une part une culture de cellules neuronales « neuro2a » sur des lamelles de verre ayant reçu un traitement de surface avec de la CMC et d'autre part une culture de cellules neuronales réalisée sur lamelle de verre, mais sans CMC. Nous avons ensuite comparé visuellement leur croissance. L'observation des cellules cultivées sur les deux types de support n'a montré aucune différence. L'utilisation de la CMC est donc validée pour assurer la stabilité et l'homogénéité des suspensions de NTCs utilisées pour la suite des travaux.

1.3. Préparation de la suspension de nanotubes de carbone

Nous avons préparé plusieurs suspensions de NTCs à différentes concentrations. Nos premiers tests de dépôt de couches de NTCs nous ont amené à sélectionner la suspension la plus concentrée en NTCs. Par contre, la quantité de CMC doit être minimisée car, bien que n'ayant pas d'influence sur le développement des cellules, il est préférable de l'éliminer le plus possible pour étudier seulement les interactions entre les cellules et les NTCs.

La suspension de NTCs est finalement composée de :

- NTCs synthétisés par CCVD et extraits par acide, 0.1% en masse
- carboxyméthylcellulose, 1% en masse
- eau désionisée filtrée

Pour obtenir une bonne dispersion des tubes dans la suspension, celle-ci est agitée pendant 30 minutes à l'aide d'une sonde à ultrasons (Sonics Vibra Cell, puissance : 150W). Une étape de centrifugation (16 000tr/min, 10 minutes) et de récupération du surnageant permet d'enlever les plus gros agglomérats de tubes, formés malgré l'utilisation de la CMC. A la fin de cette étape de

⁴⁵ D'autres stratégies de mise en suspension, telles que la fonctionnalisation de surface des tubes, ou l'utilisation de tensioactifs existent mais ne seront pas détaillées dans ce travail de thèse. Se reporter aux références [261], [262], [263], [264].

centrifugation, la concentration finale estimée en NTCs est d'environ 1µg/mL en nanotubes. Cette concentration est constante pour l'ensemble de nos expériences.

2. Réalisation de couches minces de nanotubes de carbone par dépôt par pulvérisation

2.1. Définitions des exigences pour les couches de nanotubes de carbone

Les couches de NTCs générées doivent avoir des caractéristiques maîtrisées et reproductibles d'un échantillon à un autre afin de pouvoir comparer entre eux les résultats obtenus après la culture des neurones. Les couches doivent être continues (pas de zones sans NTCs), denses et d'une épaisseur contrôlée. La première méthode testée pour générer des couches de NTCs sur une surface a été l'incubation d'une goutte de suspension sur la surface. La Figure 1 est une image prise au microscope électronique à balayage d'une surface de dioxyde de silicium (SiO₂) sur laquelle nous avons déposé puis laissé sécher une goutte de suspension de NTCs. On observe que les NTCs se sont agglomérés entre eux sous l'effet de forces capillaires, ayant pour résultats des dépôts non homogènes et discontinus. Cette méthode ne peut donc être utilisée dans nos expériences.

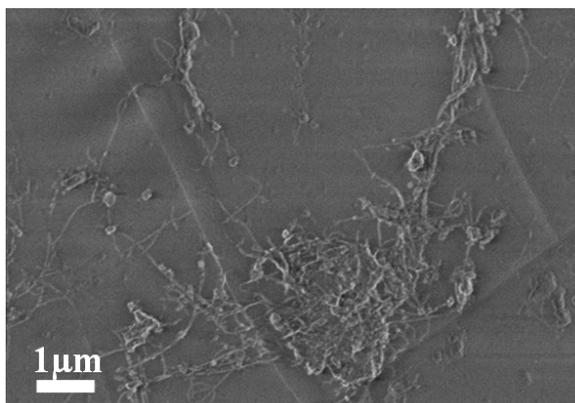


Figure 1: **Résultat de dépôt de NTCs par incubation d'une goutte de suspension de NTCs sur une surface de SiO₂. Image prise au microscope électronique à balayage.**

Les exigences pour la couche de NTCs nous ont amenés à utiliser une méthode plus élaborée que la simple incubation d'une goutte de suspension de NTCs sur une surface. Nous avons choisi d'utiliser une technique de dépôt par pulvérisation.

2.2. Mise en œuvre du dépôt par pulvérisation

a. Principe du dépôt par pulvérisation

Nous utilisons un pistolet pulvérisateur (ou « aérographe ») de peinture, que nous avons acheté dans le commerce. La peinture est dans notre cas remplacée par la suspension de NTCs. La Figure 2 montre une photographie du pistolet pulvérisateur utilisé. La Figure 3 est un schéma qui présente les

différents éléments de ce dispositif. Lorsque le manipulateur appuie sur la gâchette, de l'air comprimé est injecté dans un canal, dont l'extrémité est ouverte (l'extrémité sera appelée buse). Ce canal est alimenté en continu par la suspension de NTCs, stockée dans un réservoir. Des gouttelettes de suspension de NTCs sont alors projetées depuis la buse sur la surface à recouvrir. En parcourant manuellement ainsi la surface à recouvrir, les dépôts successifs de gouttelettes vont donner lieu à une couche continue. Plusieurs paramètres sont réglables dans ce système. Ils ont été optimisés afin d'obtenir des couches de NTCs continues et denses.



Figure 2 : **photographie du système utilisé pour la pulvérisation de NTCs, de marque « Mecafer », modèle « AG4 ».**

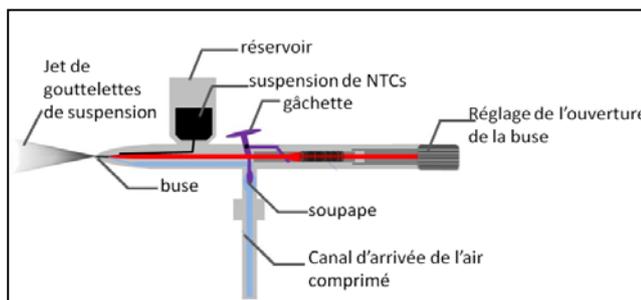


Figure 3 : **schéma représentant le dispositif de pulvérisation utilisé.**

Les paramètres optimisés et employés pour la suite des expériences sont détaillés dans le tableau suivant, pour une durée de dépôt que l'on a choisi de fixer à 5 minutes.

Paramètre	Condition retenue
<i>Suspension de NTCs</i> Concentration en NTCs Nature et concentration en stabilisant Solvant	NTCs 0,1% en masse CMC 1% en masse eau désionisée
Mouillabilité de la surface	L'angle de contact doit être inférieur à 20°
Pression d'entrée de l'air comprimé	1,5bar
Diamètre d'ouverture de la buse	100µm
Distance buse-surface à traiter	20cm
Température de la surface à traiter	20°C

Tableau 1: **résumé des paramètres expérimentaux optimisés utilisés pour générer des couches de NTCs.**

- *Considérations supplémentaires sur la mouillabilité de la surface à recouvrir de la couche de NTCs*

Dans cette technique de dépôt, un paramètre important est la mouillabilité de la surface à traiter. Intuitivement, il est aisé de comprendre que pour obtenir un dépôt homogène sur la surface, il faut favoriser l'étalement des gouttelettes de suspension avant l'évaporation du solvant. Afin d'illustrer ce phénomène, nous avons réalisé des expériences sur un substrat de PDMS. En effet, cet élastomère naturellement hydrophobe peut être rendu hydrophile par un simple traitement au plasma oxydant. Ainsi, en comparant des dépôts de NTCs réalisés par pulvérisation sur des substrats de PDMS vierges de tout traitement ou ayant subi une oxydation (voir Figure 4), il est possible de mettre en évidence l'influence de la mouillabilité de la surface, tous les autres paramètres expérimentaux étant identiques. La Figure 4 met en évidence l'intérêt de rendre une surface de PDMS hydrophile pour générer à sa surface une couche homogène de NTCs. Sur cette figure, la surface de PDMS comporte des microstructures sous forme de lignes.

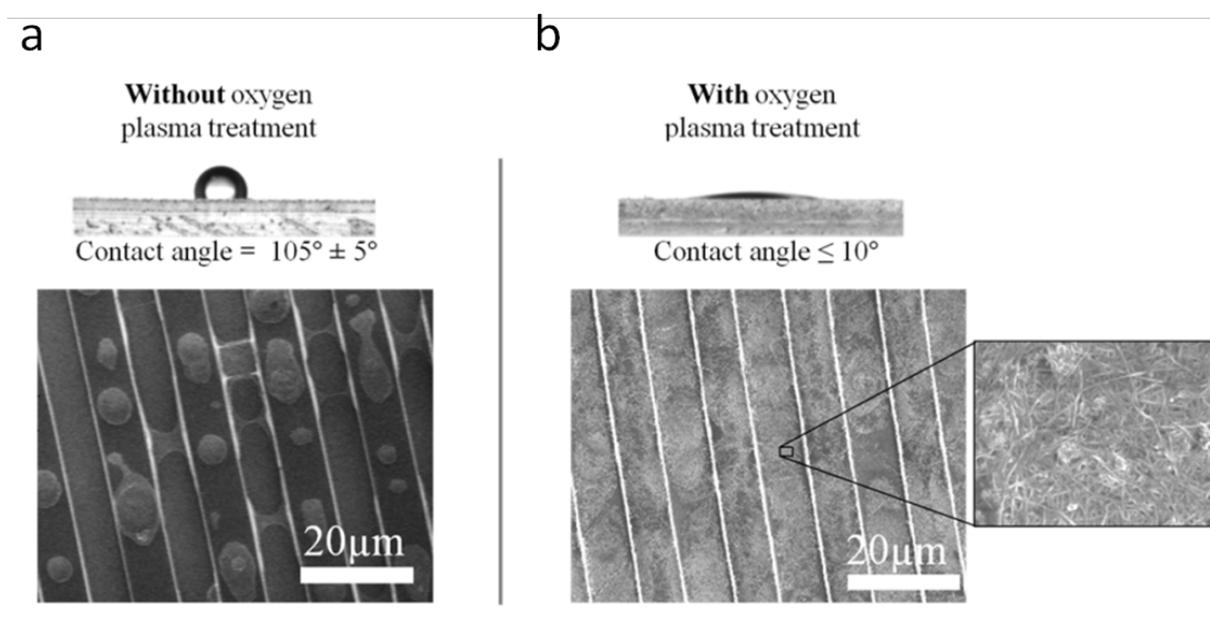


Figure 4: **Illustration de l'intérêt de rendre une surface de PDMS hydrophile pour générer un dépôt homogène de NTCs.** Haut : photographies des gouttes d'eau déposées sur les surfaces de PDMS (mesures des angles de contact). Bas : images prises au MEB des surfaces de PDMS après dépôt de NTCs par pulvérisation. **a** : surface de PDMS microstructurée, sans traitement au plasma oxygène. L'angle de contact est élevé et les gouttelettes de suspension ne sont pas étalées. Le dépôt n'est pas correct. **b** : surface de PDMS microstructurée ayant reçu un traitement au plasma oxygène. L'angle de contact est très faible (mesure réalisée 20 minutes après le traitement) et les gouttelettes de suspension se sont bien étalées, menant à un dépôt dense, homogène et continu, qui épouse le relief topographique de la surface à traiter.

b. Contrôle des caractéristiques des couches de NTCs

▪ Suivi de la résistance de la couche en temps réel

Dans toute technique de dépôt, il est souhaitable de pouvoir contrôler l'épaisseur de la couche déposée à la surface de l'échantillon. Lorsque ce contrôle est effectué en temps réel pendant le dépôt, il est alors possible d'assurer au procédé une très grande reproductibilité. Ceci est très important dans le cas de dépôts obtenus par pulvérisation avec notre outil de travail simple (pistolet à peinture commercial), qui peut être sujet à des fluctuations de débit liées en particulier à l'état de propreté de la buse. Dans ce but, nous avons mis en place un suivi in situ en temps réel de la résistance électrique des couches. Pour cela, nous intégrons deux électrodes réalisées avec de la laque d'argent sur le support de verre sur lequel est placée la surface à traiter (voir Figure 5a). Ce support reçoit le même dépôt de NTCs en même temps que notre surface. L'évolution de la résistance électrique est suivie en temps réel grâce à un multimètre.

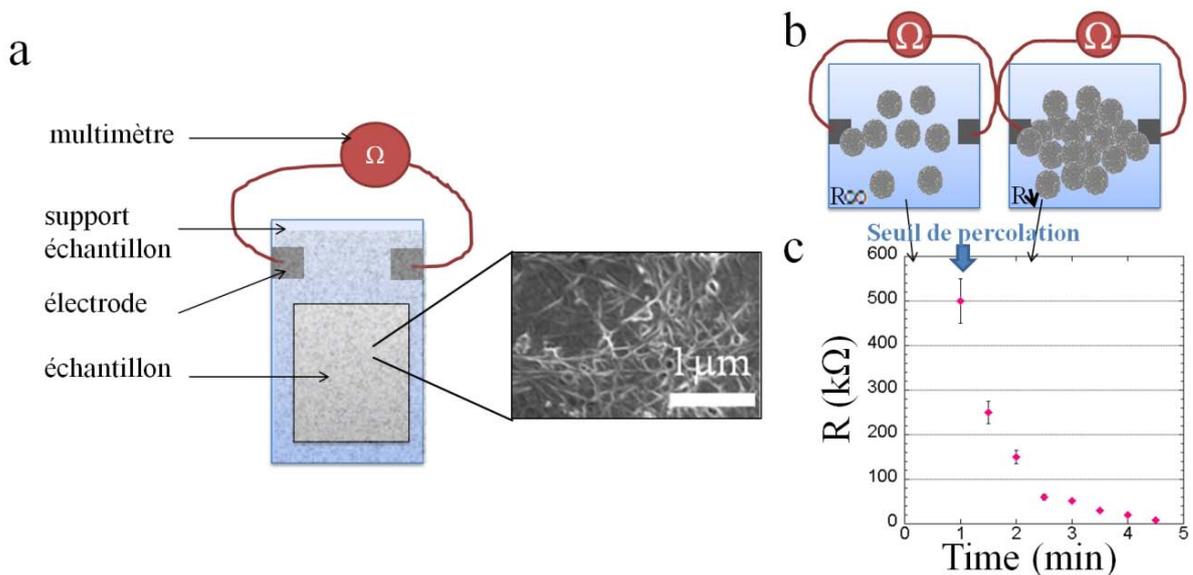


Figure 5 : Suivi in situ de l'évolution de la résistance pendant la génération des couches de NTCs. a : représentation schématique du dispositif expérimental. b : représentation schématique de la génération d'une couche de NTCs par pulvérisations successives de gouttelettes autour des électrodes. c : Tracé de l'évolution de la résistance électrique d'une couche de NTCs en fonction de la durée de pulvérisation.

La Figure 5c représente l'évolution de la résistance de la couche au cours du dépôt. On voit que la résistance n'est pas linéaire avec le temps. En effet, durant la première minute de dépôt, les gouttelettes séchées ne sont pas encore confluentes, les deux électrodes ne sont pas connectées (résistance infinie) et le seuil de percolation n'est pas encore atteint. Une fois ce seuil de percolation atteint, la résistance diminue jusqu'à atteindre un palier. L'ajout de NTCs ne permet plus de faire diminuer la résistance de manière significative.

- Relation entre l'épaisseur et la résistance des couches fabriquées

Pour connaître l'évolution de la résistance de la couche en fonction de son épaisseur, nous avons mesuré par AFM les épaisseurs et les résistances de différentes couches. Les résultats de ces mesures sont présentés sur la Figure 6. On observe que l'évolution de l'épaisseur de couche en fonction de la résistance n'est pas linéaire. On peut distinguer deux régimes :

- pour une variation de résistance entre $100\text{k}\Omega$ et $20\text{k}\Omega$, l'épaisseur de couche varie faiblement.

- en dessous de $20\text{k}\Omega$, pour de petites variations de résistances, on relève une grande augmentation de l'épaisseur de la couche.

Cette méthode de mesure en temps réel de la résistance permet donc un contrôle de l'épaisseur de la couche tant que les épaisseurs sont inférieures à 100nm . Au-delà de cette épaisseur, la méthode n'est plus sensible à l'ajout de NTCs supplémentaires.

Le contrôle en temps réel de l'épaisseur de la couche générée permet de réaliser des couches à façon, ce qui nous a permis de réaliser des dépôts d'une grande reproductibilité, en utilisant un appareillage simple.

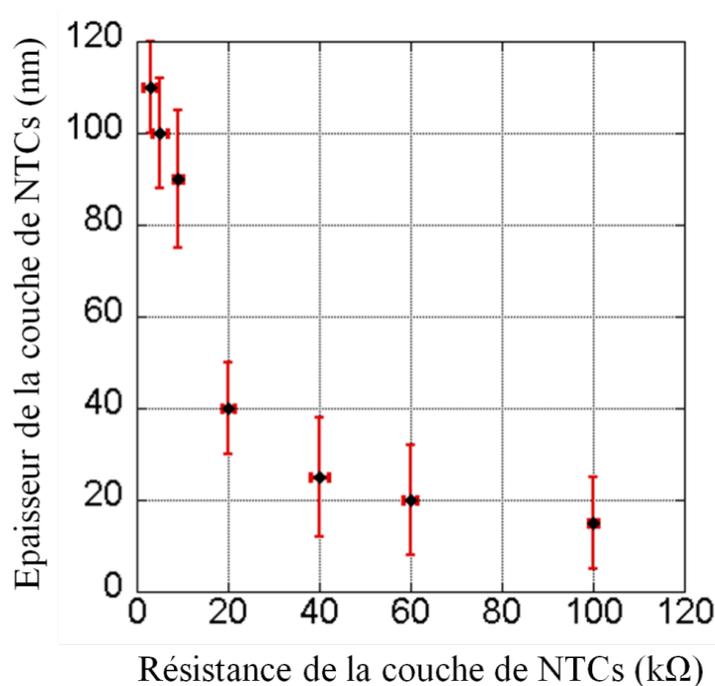


Figure 6: évolution de l'épaisseur des couches de NTCs déposées par pulvérisation sur des substrats de verre, en fonction de leur résistance. Les épaisseurs des couches ont été mesurées en utilisant le microscope à force atomique. Pour chaque point de la courbe, trois mesures indépendantes ont été réalisées. Les barres d'erreur représentent les écarts types obtenus. La résistance des couches a été mesurée avec un multimètre.

3. Mise au point d'une méthode permettant de réaliser des motifs de NTCs

Cette méthode a été mise au point pour chercher à comprendre les interactions entre les nanotubes de carbone et les cellules neuronales et plus particulièrement pour comprendre le développement de cellules neuronales quand elles ont le choix de se développer sur deux surfaces juxtaposées sur un même substrat, l'une étant des nanotubes de carbone.

La réalisation de micro-motifs de nanotubes de carbone suscite l'intérêt des chercheurs et ingénieurs dans le domaine de la microélectronique. En effet, ces nano-objets sont d'excellents conducteurs électriques et pourraient remplacer le cuivre des circuits électroniques et élargir le champ des possibilités pour faire des connexions souples. Des procédés ont déjà été mis au point pour fabriquer des micro-motifs de nanotubes de carbone. Les principales techniques déjà mises en œuvre peuvent être réparties en deux catégories :

- techniques d'intégration en cours de synthèse des nanotubes, basées sur leur croissance localisée [6], [7]. Le catalyseur de synthèse des NTCs est déposé sélectivement sur une surface puis les NTCs sont synthétisés in situ sur le substrat, par croissance CCVD.

- techniques d'intégration post-synthèse, comme par exemple l'auto-assemblage sur des surfaces présentant un contraste chimique [271], l'impression par jet d'encre [9], [273] ou la diélectrophorèse [11].

Cependant, ces techniques de création de motifs modifient voire endommagent souvent la surface d'accueil, soit parce-qu'elles nécessitent des modifications chimiques de la surface, soit à cause d'ablations pratiquées au laser, qui attaquent le relief de la surface [275]. Elles peuvent aussi s'avérer très lourdes (temps et équipement), comme dans le cas de la croissance localisée. Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons besoin d'une méthode simple, peu onéreuse, capable de traiter des surfaces de plusieurs cm² et bien sûr compatible avec la culture cellulaire. La méthode que nous avons développée est basée sur le micro-contact printing. Elle associe :

- **une étape d'encrage d'un timbre de PDMS.** Ici, l'encrage ne se fait pas par incubation, comme dans le cas du micro-contact printing « classique » de molécules, mais par pulvérisation. En effet, le paragraphe précédent a montré que le dépôt par pulvérisation permet de générer des couches denses, homogènes et continues de NTCs à la surface d'un échantillon, contrairement à l'incubation. Le dépôt est réalisé sur une surface de PDMS rendu hydrophile par un bref traitement au plasma oxygène. Cette surface de PDMS comporte en relief le dessin des motifs souhaités.

- **une étape d'impression.** Le timbre de PDMS encré par l'application d'une couche de NTCs est placé en contact avec la surface sur laquelle on souhaite obtenir les motifs de NTCs.

3.1. Le principe du micro-contact printing de molécules

Le micro-contact printing est une technique de lithographie douce introduite par Whitesides au début des années 1990. Elle permet de générer des motifs par impression.

La Figure 7 illustre schématiquement les 4 étapes du micro-contact printing. Ces 4 étapes sont :

1. la réalisation d'un moule, le plus souvent en silicium. Il comporte, en relief, les micromotifs de notre choix. Il est réutilisable. Les techniques employées pour fabriquer ce moule en salle blanche ont été détaillées dans le chapitre 2 de cette première partie de manuscrit.

2. le moulage d'un élastomère dans ce moule le plus souvent du PDMS pour obtention d'un « réplikat », aussi appelé « timbre de PDMS ».

3. l'encrage de ce timbre de PDMS avec une solution contenant les molécules/protéines de notre choix. Habituellement, cet encrage est réalisé en déposant une goutte de la solution à la surface du timbre puis après quelques minutes de séchage en l'exposant à un flux d'azote.

4. l'impression, c'est-à-dire la mise en contact entre les sommets du timbre et la surface d'accueil ayant pour objectif le transfert des molécules/protéines du timbre sur cette surface. Après retrait du timbre, on obtient des motifs moléculaires imprimés sur la surface.

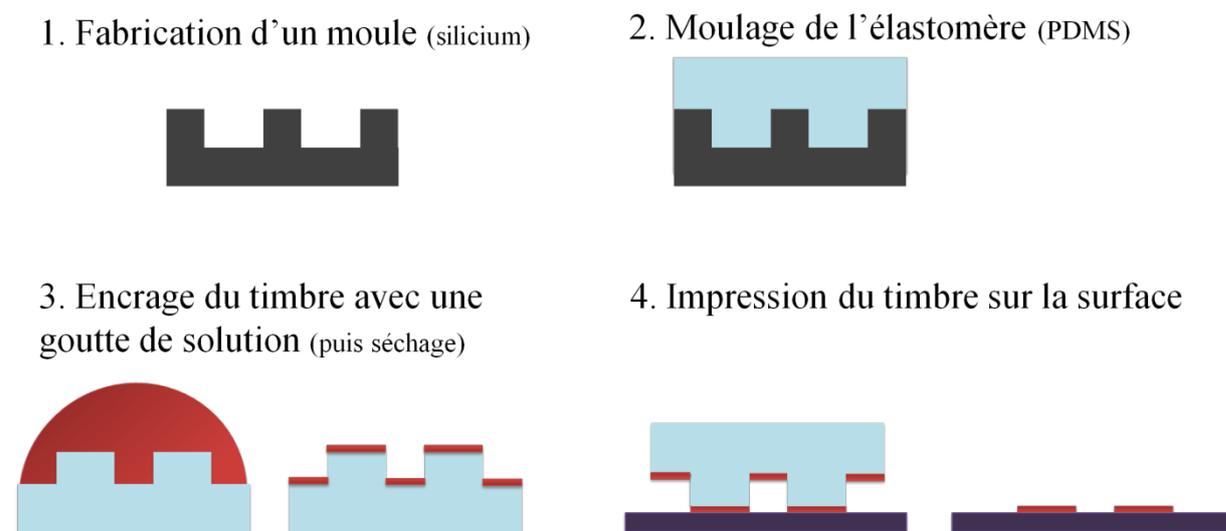


Figure 7: **Représentation schématique des 4 étapes mises en jeu dans le micro-contact printing.** 1. Un moule comportant les microstructures de notre choix est fabriqué (il est le plus souvent en silicium). 2. Un élastomère est moulé dans ce moule (il s'agit le plus souvent du PDMS). On obtient alors un réplikat, appelé timbre de PDMS. 3. Le timbre de PDMS est encré par incubation d'une solution contenant les molécules à déposer. Le timbre est ensuite séché. 4. Le timbre est appliqué sur la surface puis retiré pour former les motifs moléculaires de surface.

L'ensemble des procédés de micro-fabrication pour le dépôt sélectif de molécules, le cas échéant de protéines, a fait l'objet de plusieurs revues très complètes [13], [14], [15], [16]. Des surfaces comportant des motifs de protéines ont notamment été utilisées pour la culture cellulaire, ce qui a par

exemple permis de mettre en évidence des mécanismes d'organisation des compartiments intracellulaires de cellules adhérentes[17], [18], [19].

3.2. Adaptation du principe du micro-contact printing pour la réalisation de motifs de NTCs

Pour pouvoir réaliser des motifs de NTCs par micro-contact printing, nous avons dû adapter cette technique. En effet, nous avons vu précédemment que si l'on incube une goutte de suspension de NTCs directement sur une surface, cela amène à un dépôt de NTCs qui n'est pas continu et dense. Pour réaliser des impressions de NTCs, nous avons donc adapté la méthode d'encre. Pour encrer les timbres de PDMS et obtenir une couche continue et dense, nous utilisons la méthode de pulvérisation décrite précédemment, comme schématisé sur la Figure 9a. Pour pouvoir obtenir des dépôts homogènes à la surface du PDMS, il est primordial de rendre sa surface hydrophile. Pour cela, le timbre de PDMS reçoit un traitement au plasma oxydant. Cela permet aux gouttelettes de suspension de NTCs de s'étaler sur la surface du PDMS et on obtient finalement un dépôt homogène. Ce point constitue la première adaptation du micro-contact printing.

Un deuxième point critique a été le transfert de la couche des NTCs depuis la surface du timbre de PDMS vers le substrat d'accueil. La Figure 8 montre des images de résultats de micro-contact printing obtenus en utilisant un timbre de PDMS correctement encré par pulvérisation. Les motifs présents en relief sur les timbres employés sont une spirale (image de gauche) et un réseau de lignes de 10 μ m de largeur, espacées de 30 μ m (image de droite). On observe sur ces images MEB que les motifs de NTCs obtenus par micro-contact printing ne sont pas complets (image de gauche), voire même quasiment absents (image de droite). Ainsi, on conclut que le transfert ne se produit pas de façon correcte lorsqu'on met simplement en contact le timbre et le substrat d'accueil.

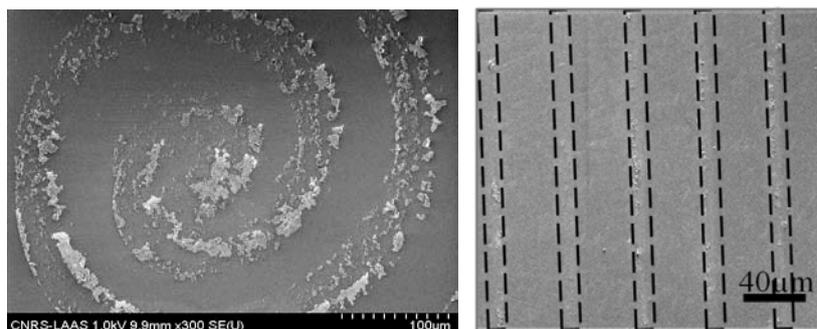


Figure 8: **images MEB de résultats de dépôt de NTCs par micro-contact printing, non optimisé.** Sur l'image de gauche, le motif présumé est une spirale que l'on peut deviner. Les traits en pointillés sur l'image de droite représentent l'emplacement des motifs de lignes parallèles censés avoir été transférés.

Pour pallier ce problème, nous avons mis en place un nouveau protocole : nous avons déposé quelques gouttes de solvant (eau désionisée ou éthanol) sur le substrat d'accueil. Cette étape est schématisée sur la Figure 9b. Par capillarité, le solvant facilite le contact entre le timbre et la surface et pénètre probablement dans le réseau de NTCs. L'ensemble « timbre-substrat d'accueil » resté en

contact est ensuite placé dans une étuve à 100°C pendant 15 minutes. Le timbre est finalement retiré manuellement. Grâce à ces opérations complémentaires, le transfert des NTCs du timbre vers la surface a été très nettement amélioré. Le processus d'évaporation qui a lieu alors que le timbre est en contact avec la surface conduit certainement à la création de forces capillaires qui « plaquent » les NTCs sur la surface d'accueil. Ainsi, le processus de chauffage qui permet une évaporation rapide et complète du solvant facilite peut être la désolidarisation des NTCs du timbre et des phénomènes capillaires les plaquent contre le substrat d'accueil. Cette technique est très efficace et nous a permis d'obtenir des motifs de NTCs parfaits, solidement ancrés sur le substrat, et de manière reproductible avec un taux de transfert proche de 100%.

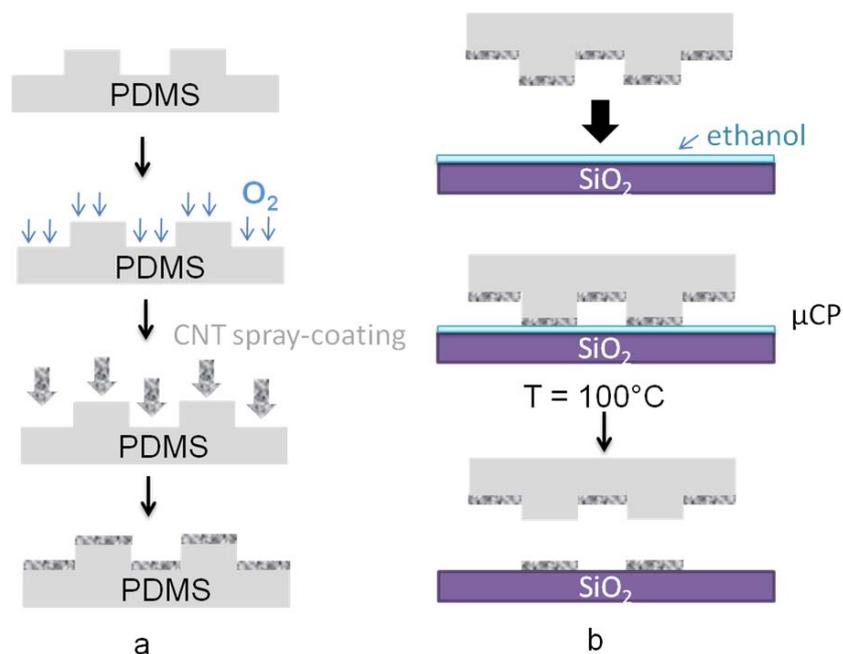


Figure 9: **représentation schématique du procédé de réalisation de motifs de NTCs.** **a.** Encrage d'un timbre de PDMS par pulvérisation de gouttelettes de suspension de NTCs. Le timbre reçoit dans un premier temps un traitement au plasma, ce qui le rend hydrophile. Les paramètres expérimentaux sont décrits dans le Tableau 1, page 250. **b.** Transfert assisté par solvant des NTCs depuis le timbre de PDMS vers le substrat d'accueil.

L'image b de la Figure 10 montre une photographie de la surface qui a reçu les motifs de NTCs, les NTCs sont les zones gris foncé. L'image c est une photographie du timbre qui a servi au transfert de ces motifs. On voit qu'il y a des NTCs partout (zones gris foncé), sauf sur les motifs en relief du timbre (zones gris clair, dépourvues de NTCs après le transfert). Ces observations ont été complétées par des observations au MEB, qui ont confirmé que le transfert des NTCs depuis les motifs en relief du PDMS vers la surface d'accueil est total. Connaissant la hauteur de la couche de NTCs déposée par pulvérisation sur le timbre de PDMS, on peut donc connaître l'épaisseur des motifs de NTCs réalisés.

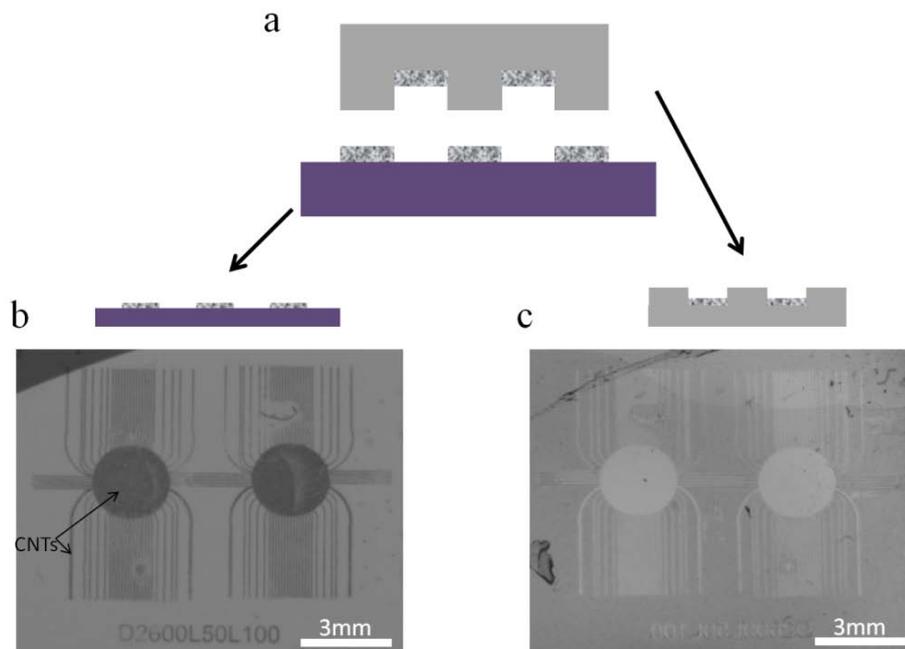


Figure 10: **Observation du timbre et de la surface d'accueil après l'étape de transfert.** **a** : Schématisation du transfert depuis le timbre vers la surface d'accueil. **b** : image optique d'une surface de SiO₂ avec des motifs de NTCs (en gris foncé sur l'image). Les zones en gris clair sont la surface de SiO₂ **c** : image optique du timbre de PDMS après le transfert. Le timbre a des NTCs partout sauf sur les zones qui ont été en contact avec le SiO₂ (zones gris clair).

Finalment, nous avons adapté le procédé de micro-contact printing à deux étapes : lors de l'encreage du timbre de PDMS et lors de l'impression. Ces adaptations nous permettent de disposer d'un procédé simple, rapide et flexible pour réaliser des motifs de NTCs sur des substrats de différentes natures⁴⁶. Ce procédé a fait l'objet de la rédaction d'un brevet d'invention (« Procédé de formation de motifs d'objets sur la surface d'un substrat », A. Bédurier, F. Seichepine, C. Vieu, E. Flahaut, PCT/IB2012/051567) et d'une publication (A. Bédurier et al, A simple and versatile micro-contact printing method for generating carbon nanotubes patterns on various substrates, *Microelectronic Engineering*, in press, disponible en ligne, 2012).

Bibliographie

- [1] E. Flahaut, R. Bacsa, A. Peigney, et C. Laurent, « Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes », *Chemical Communications*, n° 12, p. 1442, 2003.
- [2] L. Jiang, L. Gao, et J. Sun, « Production of aqueous colloidal dispersions of carbon nanotubes », *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 260, n° 1, p. 89-94, 2003.
- [3] C. Giancola, C. De Sena, D. Fessas, G. Graziano, et G. Barone, « DSC studies on bovine serum albumin denaturation Effects of ionic strength and SDS concentration », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 20, n° 3, p. 193-204, 1997.
- [4] A. K. Bhuyan, « On the mechanism of SDS-induced protein denaturation », *Biopolymers*, vol. 93, n° 2, p. 186-199, 2010.

⁴⁶ Le procédé mis au point est très flexible. Il permet de créer des motifs faits de différents nano-objets, sur des surfaces qui peuvent être souples.

- [5] I. Riou, P. Bertoncini, H. Bizot, J. Y. Mevellec, A. Buléon, et O. Chauvet, « Carboxymethylcellulose/single walled carbon nanotube complexes », *J Nanosci Nanotechnol*, vol. 9, n° 10, p. 6176-6180, 2009.
- [6] J. Kong, H. T. Soh, A. M. Cassell, C. F. Quate, et H. Dai, « Synthesis of individual single-walled carbon nanotubes on patterned silicon wafers », *Nature*, vol. 395, n° 6705, p. 878-881, 1998.
- [7] W. Z. Li, S. S. Xie, L. X. Qian, B. H. Chang, B. S. Zou, W. Y. Zhou, R. A. Zhao, et G. Wang, « Large-Scale Synthesis of Aligned Carbon Nanotubes », *Science*, vol. 274, n° 5293, p. 1701-1703, 1996.
- [8] K. H. Choi, J. P. Bourgoin, S. Auvray, D. Esteve, G. S. Duesberg, S. Roth, et M. Burghard, « Controlled deposition of carbon nanotubes on a patterned substrate », *Surface Science*, vol. 462, n° 1-3, p. 195-202, 2000.
- [9] K. Kordás, T. Mustonen, G. Tóth, H. Jantunen, M. Lajunen, C. Soldano, S. Talapatra, S. Kar, R. Vajtai, et P. M. Ajayan, « Inkjet Printing of Electrically Conductive Patterns of Carbon Nanotubes », *Small*, vol. 2, n° 8-9, p. 1021-1025, 2006.
- [10] W. R. Small et M. in het Panhuis, « Inkjet Printing of Transparent, Electrically Conducting Single-Walled Carbon-Nanotube Composites », *Small*, vol. 3, n° 9, p. 1500-1503, 2007.
- [11] S. Shekhar, P. Stokes, et S. I. Khondaker, « Ultrahigh Density Alignment of Carbon Nanotube Arrays by Dielectrophoresis », *ACS Nano*, vol. 5, n° 3, p. 1739-1746, 2011.
- [12] V. K. Sangwan, V. W. Ballarotto, D. R. Hines, M. S. Fuhrer, et E. D. Williams, « Controlled growth, patterning and placement of carbon nanotube thin films », *Solid-State Electronics*, vol. 54, n° 10, p. 1204-1210, 2010.
- [13] G. M. Whitesides et A. D. Stroock, « Flexible methods for microfluidics », *Physics Today*, vol. 54, p. 42-48, 2001.
- [14] A. P. Quist, E. Pavlovic, et S. Oscarsson, « Recent advances in microcontact printing », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 381, n° 3, p. 591-600, 2005.
- [15] R. Singhvi, A. Kumar, G. P. Lopez, G. N. Stephanopoulos, D. I. Wang, G. M. Whitesides, et D. E. Ingber, « Engineering Cell Shape and Function », *Science*, vol. 264, n° 5159, p. 696-698, 1994.
- [16] Y. Xia et G. M. Whitesides, « SOFT LITHOGRAPHY », *Annual Review of Materials Science*, vol. 28, n° 1, p. 153-184, 1998.
- [17] M. They et M. Piel, « Adhesive Micropatterns for Cells: A Microcontact Printing Protocol », *Cold Spring Harbor Protocols*, vol. 2009, n° 7, p. pdb.prot5255-pdb.prot5255, 2009.
- [18] M. They, V. Racine, M. Piel, A. Pepin, A. Dimitrov, Y. Chen, J.-B. Sibarita, et M. Bornens, « From the Cover: Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, n° 52, p. 19771-19776, 2006.
- [19] M. Théry, V. Racine, A. Pépin, M. Piel, Y. Chen, J.-B. Sibarita, et M. Bornens, « The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis », *Nature Cell Biology*, vol. 7, n° 10, p. 947-953, 2005

Annexe 6 : Réflexions personnelles

Quelques pistes de réflexions sur les enjeux réglementaires et éthiques liés à mes recherches

Ma thèse se situe à la croisée entre plusieurs thématiques : les cellules souches, la micro et nanotechnologie, les neurosciences et aussi l'expérimentation animale. Ces thèmes font parfois la une de l'actualité, qui en vante les avancées et les espoirs ou qui en dénigre certains abus ou dérives. J'ai voulu m'informer sur tous ces aspects et essayer de m'en faire une idée plus précise et si possible objective. Pour cela j'ai pensé que de rassembler dans un petit exposé, annexé à ma thèse, la synthèse de mes informations et de les relier à mon travail serait un bon moyen de m'obliger à être rigoureuse dans mes approches et argumentations.

Ingénierie tissulaire et cellules souches

Mon travail de thèse se situe dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, et nous avons utilisé des cellules souches pour réaliser notre bioprothèse. L'ingénierie tissulaire suscite de grands espoirs thérapeutiques, et pourrait apporter une réponse aux problèmes rencontrés par les techniques de greffes (manque de donneurs, rejet des greffons par l'hôte). L'ingénierie tissulaire a déjà à son actif des succès comme la régénération in vitro de la peau utilisée pour soigner les grands brûlés. Les recherches les plus avancées, concernent les vaisseaux sanguins, les valves cardiaques, les os, le foie. Elles en sont au stade in vivo chez l'animal.

Les cellules souches sont très utilisées en ingénierie tissulaire. Il en existe de plusieurs sortes. Parmi elles, les cellules souches totipotentes issues de l'embryon. Elles présentent un fort intérêt car elles peuvent se diviser indéfiniment et se différencier en tout type de cellules. Elles constituent donc un réservoir de cellules pour la réparation et permettraient même d'envisager de remplacer la greffe d'organe. Porteuses d'espoirs, ces cellules totipotentes, posent de nombreuses questions éthiques. En effet, les recherches à partir des cellules embryonnaires mettent en jeu le statut de l'embryon. Les avis divergent sur le bien fondé d'utiliser ces cellules. Plusieurs courants de pensée s'opposent.

L'un d'eux est pour l'interdiction de toutes les recherches sur ce type de cellules. Ce courant de pensée est inspiré, entre autre, par la doctrine de l'Eglise catholique. Il considère que l'embryon est une personne dès la fécondation, et qu'il y a une continuité de la vie, de la fécondation à la naissance. Un autre argument mis en avant est le principe de dignité de l'embryon, et qu'il ne doit pas être considéré comme un matériel de recherche, ou un produit à finalité thérapeutique. Puisqu'il y a continuité de la vie, il n'appartient pas à une autre personne de porter atteinte à son intégrité.

Un autre, est en faveur d'une autorisation encadrée des recherches. Le point de départ de l'argumentation dans ce cas repose sur la méthode de conception de l'embryon. Les embryons conçus in vitro, ne sont considérés que comme de simples amas de cellules sans statut particulier et sont semblables à d'autres ensembles de cellules étudiées en laboratoire. Pour qu'un embryon acquière un statut différent, il doit être implanté avec succès dans l'utérus de la mère. La dignité de l'embryon est alors fonction du projet parental.

Ces points de vue ont suscité et suscitent toujours de nombreux débats. L'Etat français n'est pas insensible à ces questions. Il a créé en 1983 le Comité consultatif national d'éthique (CCNE). Sa mission est de « donner des avis sur les problèmes éthiques et les questions de société soulevées par les progrès de la connaissance dans les domaines de la biologie, de la médecine et de la santé ». Le parlement de son côté a légiféré, et aujourd'hui les recherches sur l'embryon sont encadrées par la loi de 2004, réexaminée en 2011 qui pose les principes suivants :

- le clonage thérapeutique est interdit
- la recherche sur l'embryon et les cellules embryonnaires est en principe interdite
- par dérogation, les recherches peuvent être autorisées sur l'embryon et les cellules embryonnaires pour une période limitée à 5 ans si elles sont « susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs » et ne sont autorisées qu'en cas d'absence de « méthode alternative d'efficacité comparable ».

Ces positions sont spécifiques à la France. La recherche est internationale et les enjeux économiques entre pays sont forts. Par ailleurs les frontières sont largement ouvertes. Tous les pays n'ont pas une même approche juridique. Ainsi, les recherches sur les cellules souches embryonnaires sont autorisées dans d'autres Etats. Aux Etats-Unis, la société Geron Corporation a obtenu le droit de tester des cellules souches embryonnaires sur un patient humain atteint d'une lésion à la moelle épinière.

Pour avoir une approche homogène sur le plan international, au sein de l'UNESCO un Comité international de bioéthique (CIB), fut créé en 1993. Sa mission est d'encadrer les progrès des recherches dans les sciences de la vie et leurs applications en veillant au respect des principes de dignité et de liberté de la personne humaine.

Les instances internationales ne jouent seulement qu'un rôle de conseil et leur influence est limitée. Indépendamment d'une prise de position, pour ou contre l'autorisation, le contexte réglementaire en France a induit un retard des connaissances et des savoir-faire dans le domaine des cellules souches embryonnaires humaines.

Dans notre projet, nous avons d'abord travaillé avec des cellules issues de lignées. Ces cellules nous ont permis d'étudier l'influence de nombreux facteurs topographiques sur le développement des neurones. Ensuite, nous avons utilisé des cellules souches neurales adultes humaines. Ces cellules ne peuvent donner que des types cellulaires neuraux (neurones, astrocytes, oligodendrocytes) et leur capacité de reproduction est limitée. Néanmoins, elles peuvent constituer une bonne alternative

thérapeutique à l'utilisation des cellules souches embryonnaires et leur utilisation permet donc de lever certaines objections d'ordre moral.

Les réglementations pour l'utilisation de ces cellules souches adultes sont identiques à celles du don d'organe. Le patient dont sont issues ces cellules doit donner son consentement libre et éclairé, et son anonymat est respecté. En France, le don d'organe est encadré par la loi du 19 décembre 2008 « loi relative à l'obtention et à l'utilisation de matériel corporel humain destiné à des applications médicales humaines ou à des fins de recherche scientifique ».

A l'avenir, pour le développement de notre stratégie thérapeutique, il serait très intéressant d'étudier les possibilités qu'offrent d'autres sources de cellules, tels que les tissus adipeux ou encore les cellules souches induites (iPS). De plus, si ces cellules permettaient des greffes autologues, elles seraient mieux acceptées. Pour le moment, ces cellules n'ont pas encore montré leur innocuité et les possibilités d'obtenir des neurones fonctionnels sont encore en cours d'étude.

Nanosciences et micro/nanotechnologies

Dans notre projet, nous avons étudié les interactions entre des cellules neuronales et des nano-objets, les nanotubes de carbone, afin de mieux comprendre leur influence sur la viabilité et le développement des neurones et évaluer les bénéfices qu'ils pourraient apporter si on les intégrait à des bioprothèses cérébrales. Ces études montrent que les nanosciences et nanotechnologies constituent un domaine interdisciplinaire et peuvent être utilisées pour des applications dans le domaine de la santé.

Il est largement reconnu que les nanotechnologies offrent un grand potentiel de développement technique et scientifique. Pour certains, elles représenteraient même une révolution technologique, comparable à celles que furent la machine à vapeur, l'électricité ou le transistor. Les nanosciences et les nanotechnologies sont à l'intersection entre plusieurs disciplines, comme la chimie, la physique, les sciences du vivant, les sciences des matériaux. Elles suscitent de nombreux espoirs pour des applications concrètes porteuses de progrès, comme dans le domaine de la microélectronique (miniaturisation), la santé (vectorisation de médicaments, capteurs implantés in vivo), l'énergie (surfaces nanostructurées pour les panneaux solaires). Dans l'industrie, on utilise déjà les nanotubes de carbone pour améliorer les propriétés de rigidité des matériaux, les nanoparticules d'argent pour créer des revêtements aux propriétés antibactériennes, ou encore les membranes céramiques pour filtrer l'eau.

Face aux potentiels technologiques et économiques ouverts grâce aux nanosciences et aux nanotechnologies, les Etats se livrent à une compétition intense. Depuis le lancement de la National Nanotechnology Initiative (NNI) aux Etats-Unis en 2000, presque tous les pays ont lancé un programme national de développement des nanotechnologies. En France, cela s'est traduit par d'importants programmes de financements dédiés aux nanotechnologies et à des investissements d'avenir pour la nanoélectronique, les équipements de recherche en nanotechnologies et pour les nanobiotechnologies.

Toute nouveauté, et particulièrement dans le domaine scientifique provoque des attitudes différentes selon les individus. Ceux qui sont favorables mettent en avant les progrès scientifiques attendus, et les retombées économiques, les opposants, sceptiques, s'appuyant parfois sur de mauvaises expériences du passé, mettent souvent en avant le principe de précaution, voire le catastrophisme de certaines applications possibles.

Certains aspects indésirables de ces nouvelles technologies ne sont niés par personne. Il est démontré que les nanoparticules peuvent franchir les barrières qui séparent l'extérieur de l'intérieur de l'organisme. Par ailleurs on ne connaît pas non plus avec précision les effets de ces nanoparticules au niveau toxicologique, ni leurs effets sur l'environnement lorsqu'ils sont en fin de vie.

Un autre problème soulevé concerne la sécurité des travailleurs amenés à synthétiser et manipuler ces nanomatériaux. Ces domaines étant nouveaux, il manque encore de données et d'études pour pouvoir être sûr que les risques seront tous maîtrisés. Leurs possibles effets toxicologiques sont en cours d'étude et ces recherches sont bien entendu prioritaires. Ces études sont d'ailleurs souvent encouragées par les instances de financement de la recherche, elles s'avèrent très complexes et longues, du fait de la grande variabilité des nano-objets étudiés. La recherche fondamentale a ici un rôle majeur à jouer pour améliorer la connaissance de ces objets, anticiper les risques qui y sont liés, mieux les comprendre pour mieux les maîtriser et au bout, mieux les utiliser.

Les questions sanitaires s'accompagnent aussi de questions éthiques, liées à l'impact des nanotechnologies sur les modes de vie, les libertés et la nature de l'homme. De nombreuses évolutions technologiques seront issues de l'exploitation convergente des nanotechnologies biotechnologies, technologies de l'information et sciences cognitives (on parle communément de « convergence NBIC ». Cette convergence amène par exemple au développement massif de puces RFID (Radio frequency identification) qui pourront être utilisées pour suivre les individus, ce qui peut porter atteinte aux libertés individuelles. La mise au point de dispositifs électroniques actifs et implantables dans le corps humain pourront représenter un moyen d'augmenter les performances de l'humain. Cela pose une question sur l'essence même de l'être humain.

Ces utilisations potentielles des nanotechnologies nécessitent d'être identifiées et les questions sanitaires et éthiques qui y sont liées se doivent d'être discutées collectivement.

Des débats sont ouverts au niveau des Etats et des institutions et des initiatives sont prises.

En 2001, un colloque organisé aux Etats-Unis par la National Science Fondation (NSF), intitulé *Converging Technologies for improving human performance* a présenté la convergence NBIC comme un moyen à long terme de modifier les capacités physiques et intellectuelles d'un être humain. En réaction à ces annonces, la commission européenne a publié en 2004 un rapport proposant un encadrement éthique du développement des « technologies de convergence » qui selon celui-ci doivent servir à protéger l'intérêt général et non à chercher à améliorer l'humain. Un processus « de dialogue international pour le développement responsable des nanotechnologies et des technologies convergentes » a été mis en place. Il est ouvert à tous les pays et a pour objectif d'anticiper les conflits

économiques, éthiques potentiels entre pays. Il vise aussi à instaurer une gouvernance mondiale des technologies de convergence.

A l'échelle européenne, un observatoire des nanotechnologies a été développé. Il est constitué d'experts de différentes disciplines et rapporte les changements induits par les nanotechnologies sur différents plans : techniques, environnemental et sanitaire, éthique, sociétal, économique. En France, un débat public a été organisé en 2009 par les pouvoirs publics afin de dégager les pistes d'un développement responsable des nanotechnologies. Celui-ci a mis en évidence le manque d'informations du grand public tant du point de vue scientifique que du point de vue des enjeux sociétaux liés aux nanotechnologies. De plus, les débats ont parfois été volontairement perturbés, certains le jugeant factice car le gouvernement aurait mis en place ce débat après la prise de décisions sur ce sujet. Les scientifiques doivent prendre toute leur part dans ces débats, en expliquant de manière transparente au grand public les enjeux, les applications possibles, ainsi que les risques et comment les prévenir.

La question de la gouvernance des nanotechnologies est récente, elle reste encore à préciser, afin que les nanotechnologies se développent en adéquation avec les attentes de la société.

Dans notre projet, nous avons étudié l'effet des nanotubes de carbone sur la viabilité des cellules neuronales. Ces études nous ont permis de mieux comprendre comment ces nano-objets influencent le développement de ces cellules. Nous avons aussi prévu de réaliser des études sur l'éventuelle toxicité des nanotubes de carbone disposés sur nos bioprothèses in vivo.

Nous avons également pris toutes les précautions pour ne pas entrer en contact avec les nano-objets lorsque ceux-ci sont en suspension (port d'équipements de protection adaptés, travail sous hotte aspirante, mesure du taux de particules dans l'atmosphère autour de l'expérimentateur).

L'expérimentation animale

Nous avons réalisé de nombreuses études in vitro pour optimiser nos bioprothèses. Il était devenu nécessaire d'en étudier les effets in vivo. Pour cela nous en avons implanté dans le cerveau du rat, que nous avons choisi comme modèle animal pour cette première série d'études.

Pour comprendre et étudier la complexité des phénomènes biologiques, le recours au modèle animal est nécessaire. Comme ceux des êtres humains, les organismes des animaux sont constitués de cellules et de tissus. Les animaux possèdent les mêmes grands systèmes physiologiques (digestif, respiratoire, nerveux, circulatoire, ...) que l'homme, les processus qui se passent dans le corps humain sont identiques à ceux de l'animal. Leurs études chez l'animal sont transposables en grande partie chez l'homme. Ainsi, les études sur l'animal servent à la découverte des causes des maladies et des possibilités de traitement, elles servent aussi pour garantir l'efficacité et la sécurité d'emploi des médicaments et des denrées alimentaires. De nombreuses avancées de la médecine n'ont pu être

obtenues que grâce aux expériences sur les animaux, comme par exemple pour la transplantation d'organes

Les associations de défense des animaux, le fait que de nombreuses personnes possèdent un animal de compagnie, et les travaux de recherches sur les animaux ont contribué à faire évoluer notre vision de l'animal. Il est aujourd'hui reconnu que l'animal est un être sensible, capable de souffrir et de se souvenir de la douleur et du stress subis. Si le recours à l'expérimentation animale reste nécessaire, son utilisation doit être limitée autant que faire ce peu. Le chercheur doit préalablement envisager toutes les méthodes de substitution possibles. Il existe de méthodes alternatives, comme l'imagerie, la modélisation mathématique, les expériences sur cultures de cellules in vitro. Ces méthodes alternatives sont aussi utilisées car elles peuvent être d'un coût moindre.

Ces notions se sont développées et répandues depuis environ 50 ans. En 1959, Russel et Burch, qui font figure de pionniers dans les réflexions portant sur la place du chercheur vis-à-vis de l'expérimentation animale, ont publié un livre intitulé « The Principles of Human experimental Technique ». Dans ce livre, ils exposent une règle, dite des « **3R** », visant à réduire le recours à l'expérimentation animale :

- **Replace** (remplacer) : remplacer les expériences sur les animaux par des expériences in vitro chaque fois que cela est possible (cultures de tissus in vitro, modélisations in silico)
- **Reduce** (réduire) : réduire au minimum indispensable le nombre d'animaux utilisé.
- **Refine** (améliorer) : améliorer les conditions de traitement des animaux et les techniques opératoires, pour réduire la souffrance et le stress des animaux

Faute de repères et de critères simples, ces aspects ne sont pas toujours aisés à évaluer. En effet, à partir de quand les expériences sur les animaux sont-elles justifiées ? La mesure de la souffrance des animaux n'est pas non plus une tâche aisée, surtout pour les petits animaux tels que les murins. Le gain en connaissances que l'on peut attendre des expériences est tout aussi complexe à évaluer car, en recherche fondamentale qui plus est, le résultat des recherches apparaît plusieurs années après leur début.

Pour aider les chercheurs, bon nombre d'Etats, dont la France ont mis en place une législation visant à encadrer très précisément toutes les composantes de l'expérimentation animale. La législation en vigueur en France est conforme aux directives de la communauté économique européenne (décret n°2001-131 6 février 2001). Des règles de bonnes pratiques expérimentales précises doivent également être respectées.

Dans notre projet, nous nous sommes inscrits dans cette réglementation. Le modèle animal du rat a été identifié, compte-tenu de la phase exploratoire dans laquelle se situe notre projet, comme étant le plus pertinent, et nous avons limité le nombre d'animaux utilisé. Nous pensons avoir poussé au maximum nos expériences in vitro afin de ne réaliser ensuite que les expériences in vivo les plus pertinentes et indispensables pour progresser dans nos recherches. Les animaux ont été traités en respectant toutes

les bonnes pratiques recommandées, notamment en termes de réduction des souffrances (anesthésie générale, traitements antidouleurs, bonnes conditions de vie).

Le cerveau

L'objectif à long terme de notre projet est la reconstruction de tissus cérébraux lésés chez l'être humain. Cet objectif ambitieux, encore lointain, concerne le plus mystérieux et fascinant de nos organes. En effet, il est le siège, de l'intelligence, des sentiments, de la conscience et pour les croyants de l'âme. L'esprit est-il distinct du cerveau ou l'esprit est-il assimilable au cerveau? La manière dont le cerveau et l'esprit sont reliés suscitent de nombreuses discussions philosophiques, religieuses et scientifiques.

Le développement des connaissances sur le cerveau notamment grâce à l'imagerie fonctionnelle nous a permis de mieux comprendre son fonctionnement et de progresser dans l'élaboration de nouvelles thérapies. Les découvertes dans le domaine des neurosciences ont permis des progrès extraordinaires. Un exemple éblouissant est celui du traitement des symptômes de la maladie de Parkinson, par la stimulation de certaines aires cérébrales à l'aide d'électrodes implantées dans le cerveau. Plusieurs milliers de patients gravement handicapés ont déjà été traités par cette technologie, ce qui leur a permis de retrouver dans la plupart des cas une autonomie importante. L'association des technologies à la médecine ouvre de nouvelles perspectives, porteuses d'espoirs. Ainsi, il apparaîtrait possible d'interfacer le cerveau avec des ordinateurs pour commander des objets à distance, au moyen de bras mécaniques (que l'on peut aussi nommer exosquelette) dirigés par la pensée. Cela permettrait de compenser le déficit moteur de certains patients lourdement handicapés.

Cependant, tout ce qui touche le cerveau est sujet sensible, voire tabou. Les interventions sur le cerveau sont particulièrement redoutées et sont perçues comme pouvant représenter un risque d'atteinte à l'intégrité intellectuelle de la personne. Le degré d'acceptation pour un patient de l'intervention sur son cerveau dépend bien sûr du degré de handicap ou de souffrance qu'elle comblerait (balance bénéfice-risque).

Le développement des connaissances sur le fonctionnement du cerveau ouvre aussi la porte à des dérives potentielles, utilisant ces techniques à des fins jugées « non humanistes », à l'insu ou au détriment des personnes. L'utilisation des données issues de l'imagerie fonctionnelle permettant de voir quelles aires sont actives lorsqu'une personne ment ou bien l'enregistrement des activités cérébrales liées à la pensée en sont des exemples qui peuvent faire redouter des dérives.

Il est parfois difficile de distinguer au niveau des informations propagées par l'ensemble des médias, ce qui relève du progrès scientifique et des espérances qui en découlent, et de ce qui relève du fantastique, entre ce qui est de l'ordre du possible et ce qui est de l'ordre de l'imaginaire. En cela, il apparaît primordial d'informer des réalités scientifiques et d'initier des réflexions d'ordre éthique et

philosophique. Les neurosciences ont en effet cette particularité de bouleverser notre façon de penser et de nous penser, ce qui rend les réflexions encore plus complexes.

Des initiatives existent visant à amener l'ensemble des citoyens à exprimer leur avis sur les enjeux éthiques, sociétaux et juridiques des neurosciences, comme la délibération citoyenne « Meetings of minds » en 2006, ou encore des auditions publiques. Il est primordial d'y faire intervenir non seulement des citoyens mais aussi des professionnels de différents horizons : juristes, philosophes, chercheurs en sciences sociales et en psychologie, médecins, qui apportent des éléments de réflexion et d'analyse précis.

Notre projet de recherche se situe dans une phase très en amont de l'utilisation thérapeutique humaine. Néanmoins, il est important de le situer d'ores et déjà dans un contexte applicatif et de se poser des questions sur les possibilités de son acceptation par la société. Par exemple, un des points critiques dans nos recherches est l'utilisation de cellules souches adultes humaines issues de biopsies de patients. Acceptera-t-on de recevoir dans son cerveau des cellules neurales issues d'un donneur ? Une piste, pour éviter cette interrogation et le potentiel rejet est l'utilisation de cellules souches provenant du patient lui-même. Cette piste reste pour le moment hypothétique.

Une limite à la réparation du corps humain ?

Avec notre projet, nous nous inscrivons dans une optique thérapeutique à long terme de réparer les effets d'un traumatisme du cerveau. Cette stratégie est une stratégie de réparation qui n'en est qu'à ses débuts. Néanmoins elle peut susciter des débats. La santé de l'humain représente des enjeux sociaux, économiques et politiques énormes. En effet, elle est la première préoccupation de l'homme et quoi de plus naturel comme aspiration à vivre mieux, soulagé voire libéré de la souffrance physique de la vieillesse et du handicap ? La santé est un sujet des plus sensibles et une priorité à laquelle l'homme est prêt aux plus grands efforts financiers. Le financement de la santé est un véritable choix de société. Les avancées de la médecine s'appuyant sur les nouvelles technologies ne cessent de s'étendre. Muscles, peau, vaisseaux artificiels, valves cardiaques, lentilles de contact, remplacement du cristallin, prothèses de la hanche, implants dentaires, prothèses de chirurgie esthétique, ... les stratégies ayant aujourd'hui recours à l'utilisation de la technologie, dont les nanotechnologies, de biomatériaux, parfois combinés à des cellules souches sont devenues courantes et on estime qu'aujourd'hui, 3 à 4 millions de patients sont concernés en France. Ces stratégies pourraient s'étendre à de nouveaux organes, comme le cerveau. Ces exemples de substitution alimentent cependant l'image d'un corps humain en pièces rapportées et remplaçables, l'image d'un corps « composite ».

Ces techniques de réparation du corps pleines de promesses et auxquelles tout le monde adhère posent néanmoins au moins trois questions :

- la première concerne le risque pour l'humain de devenir dépendant de ces prothèses et d'y avoir recours pour autre chose qu'un réel besoin thérapeutique, perdant ainsi de son autonomie et de son adaptabilité à son environnement naturel et d'avoir d'effets non prévus indésirables.

- la deuxième concerne le coût de ces nouvelles thérapies, ouvrant aussi la question de l'accès aux soins. Jusqu'à présent, dans au moins certains pays, l'homme a mis en place des moyens mutualisés pour créer une solidarité pour l'accès aux soins. Qu'en sera-t-il si les stratégies thérapeutiques mises au point auront des coûts démultipliés ? Resteront-elles accessibles à tous ? Est-ce que cela induira une médecine à plusieurs vitesses ? Les améliorations globalement apportées seront-elles en adéquation avec le coût payé par la société ?

- la troisième question est celle de la limite de l'utilisation de stratégies pour réparer l'humain. Jusqu'où l'homme est-il prêt à aller pour réparer son corps ? Individuellement, certainement très loin. Mais la société doit-elle et pourra-t-elle fixer une limite entre réparation et amélioration pour tempérer les souhaits individuels ? Sur un plan thérapeutique, comment déterminer le seuil de souffrance ou de handicap qui rend normal voir obligatoire une intervention de réparation ?

L'idée que les nouvelles technologies pourront changer et améliorer l'humain est portée par le mouvement transhumaniste. Selon les transhumanistes, l'homme doit promouvoir les techniques qui lui permettront de devenir transhumains. Ce passage au transhumain est selon eux la récompense du développement technologique et de l'adaptation de l'homme à ce développement. Ils relaient l'idée que la nature humaine ne serait pas figée mais pourrait au contraire muter en s'appuyant sur les sciences et les technologies. Pour cela, ils soutiennent le développement et la convergence de techniques telles que la nanotechnologie, la biotechnologie, la science cognitive et les techniques de l'information et de la communication.

Un exemple d'ambition transhumaniste est la création d'une intelligence artificielle dont les capacités dépasseraient celle des humains. Les transhumanistes cherchent à dépasser la nature biologique humaine.

La question de l'amélioration de l'humain est déjà présente au quotidien. Dopage pour améliorer ses performances sportives ou encore prise de médicaments pour améliorer ses capacités de concentration, l'homme cherche à atteindre des performances qui sont au-delà de ce que la nature lui permet d'atteindre. L'augmentation de la performance amènerait à un nouveau standard obligeant toute la population à suivre le mouvement, au risque de marginaliser ceux qui n'y adhéreraient pas et au risque de ne pas maîtriser ces évolutions qui se retourneraient alors contre l'homme.

L'idée d'une gouvernance internationale qui fixerait des limites éthiques aux pratiques liées à l'amélioration de l'humain n'est pas d'actualité.

Pour un développement acceptable, et profitable à l'homme de toutes ces nouvelles techniques, il sera pourtant nécessaire que les institutions nationales et internationales fixent des cadres et exercent un

contrôle pour éviter les dérives et aussi pour ne pas créer de nouvelles inégalités entre les individus et entre les pays.

La place et le rôle du chercheur dans la société

Dans ce paragraphe, nous présentons quelques pistes de réflexions sur le rôle du chercheur dans la société et nous montrons un exemple d'action menée dans le cadre de ce projet de thèse.

Le chercheur se trouve en 1^{ère} ligne face aux nombreux défis scientifiques et techniques, et aux questions éthiques qu'ils soulèvent et dont nous avons montré certains aspects.

Une des premières missions du chercheur est d'apporter de nouvelles connaissances dans son domaine de recherche. Ses recherches pourront avoir des retombées économiques et influencer la société.

Le chercheur a aussi une autre mission, celle de transmettre, d'expliquer et de partager ses connaissances. Cette mission, il l'accomplit d'abord sur un plan « scientifique », en écrivant et publiant des articles, organisant et participant à des colloques. Il les transmet aussi au niveau universitaire lorsqu'il enseigne.

En tant qu'expert il doit aussi prendre part aux commissions et observatoires, visant à suivre l'état des connaissances sur des critères techniques, environnementaux, sanitaires et éthiques, ainsi que participer aux groupes de travail dans le but d'éclairer la société et le législateur.

Le chercheur doit aussi prendre toute sa part dans la communication avec le public. Cette mission est complexe car il s'adresse à des personnes majoritairement étrangères à son domaine. Il doit être capable d'exposer les résultats de ses travaux et de les expliquer de façon claire et compréhensible par le plus grand nombre. Sa communication doit être objective étayée par des faits vérifiables et doit permettre une relation de confiance avec le grand public et ainsi contribuer à éviter ensuite les prises de position polémiques. Elle doit être accompagnée d'une transparence sur :

- les applications des recherches envisagées qu'il ne doit pas « survendre »
- sur les modes de prise de décisions économiques et politiques (financements alloués, thématiques soutenues, ...).

Le scientifique pour sa communication, peut être amené à prendre part à l'univers médiatique. L'univers médiatique demande cependant souvent d'être bref, concis (plage radio consacrée de quelques minutes pour une interview, une colonne dans un journal...). En lui demandant d'être bref, le chercheur délivre une information forcément incomplète, ou extrêmement simplifiée, qui peut créer tous types d'émotion, dont bien entendu la peur et émotions et réflexions ne s'accordent pas toujours. Un moyen serait aussi d'avoir la possibilité de vérifier la véracité des articles écrits après une interview. Ce sujet est très sensible pour les journalistes.

Pour toutes ces raisons, il est primordial de développer et d'entretenir la culture scientifique, mais surtout l'esprit critique et d'analyse des citoyens et ce dès l'école bien sûr, mais aussi tout le long de la vie. Cela ne doit pas être fait dans l'objectif de faire adhérer les citoyens aux projets des scientifiques

mais pour les aider à dépister des tentatives de manipulation, et à se forger leurs propres opinions, libres et éclairées.

Dans cette optique, j'ai participé pendant ma thèse au projet « Nanoécole ». Ce projet a pour ambition d'éveiller la curiosité des jeunes, collégiens et lycéens, à la science et aux controverses qu'elle peut susciter. Il a été initié par Christophe Vieu en 2006. Mon projet de thèse se prêtant particulièrement bien à cet exercice, j'ai participé en collaboration avec les enseignants de physique-chimie et biologie du lycée Saint Sernin de Toulouse, à la construction d'un programme pédagogique pour des lycéens en classe de seconde. J'ai aussi partagé avec les élèves mon quotidien de doctorante y compris au laboratoire. Par ailleurs, dans le cadre de ce projet nous avons aussi organisé un débat autour des questions bioéthiques soulevées par ma thématique de recherche.

J'espère que ces actions ont contribué à rapprocher les jeunes avec le monde de la science et à avoir suscité chez eux des réflexions personnelles sur la science et la controverse.

Bilan

La recherche s'inscrit dans la société, qui a beaucoup d'attentes parfois contradictoires qui peuvent générer des conflits de diverses natures. Pour les limiter voire les éviter la recherche doit être transparente, et s'exercer dans un cadre. Le chercheur doit participer à la définition de ce cadre qui ne doit pas être perçu par lui comme une contrainte mais une aide surtout dans les questions de bioéthique. Ce cadre et la transparence seront les meilleurs alliés du chercheur pour qu'il puisse travailler en confiance et en accord avec la société.

A travers ces réflexions, j'espère finalement avoir montré que la recherche scientifique est porteuse d'espoirs, et qu'il est possible d'accompagner la découverte et l'innovation sans pour autant la brider, dans un environnement réfléchi et régulé par le questionnement éthique et la mise en place de réglementations acceptées et conformes aux valeurs d'une société.

Sources

- Vers un commerce du corps humain ? Xavier Dijon (FUNDP, Namur), *Le Journal des Tribunaux*, 9 septembre 2006, n° 6233, pp. 501-504.

- Introduction générale aux comités d'éthique en expérimentation animale, Communication présentée par Claude MILHAUD, mars 2003,

<http://academieveterinaire.free.fr/bulletin/pdf/2003Numero1/p48-52.pdf>

- Le génie tissulaire, du rêve à la réalité : applications aux grands brûlés, François Auger, http://132.210.161.89/amlfc/Pages/Congres_med_amb/10e-2002/auger.html

- www.transhumanism.org

- <http://www.legifrance.gouv.fr/>

- Les nanotechnologies et l'éthique – Politique et stratégies – Commission mondiale d'éthique des connaissances scientifiques et des technologies, 2008.

- L'homme réparé, espoirs, limites et enjeux de la médecine régénérative. Hervé Chneiweiss, Editions Plon.