



HAL
open science

Développement de microtechnologies pour l'étude du guidage axonal

Yohan Lecomte

► **To cite this version:**

Yohan Lecomte. Développement de microtechnologies pour l'étude du guidage axonal. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0093 . tel-02278820

HAL Id: tel-02278820

<https://theses.hal.science/tel-02278820v1>

Submitted on 4 Sep 2019

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

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

Thèse pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Ecole doctorale Science de la Vie et de la Santé (SVS)

Spécialité : **Neurosciences**

Présenté par

Yohan LECOMTE

Ingénieur Grenoble INP Phelma

**Développement de microtechnologies
pour l'étude du guidage axonal**

Préparée au sein de l'Institut Interdisciplinaire de NeuroSciences (IINS)

Sous la direction de **Vincent STUDER**

Thèse soutenue le 28 juin 2019,
devant le jury composé de :

Catherine VILLARD

Institut Pierre-Gilles de Gennes pour la microfluidique, Rapporteur

Charlie GOSSE

Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure, Rapporteur

Emilie PACARY

Neurocentre Magendie, Examineur

Olivier THOUMINE

Institut Interdisciplinaire de NeuroSciences, Président du jury

Olivier THEODOLY

Adhesion and Inflammation Lab, Examineur

Vincent STUDER

Institut Interdisciplinaire de NeuroSciences, Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens ici à remercier toutes les personnes qui ont permis que ma thèse puisse se réaliser.

Je commence par remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie particulièrement mes rapporteurs, Catherine Villard et Charlie Gosse. Merci aux autres personnes de mon jury, Emilie Pacary, Olivier Thoumine et Olivier Theodoly.

Je remercie ensuite Daniel Choquet d'avoir accepté que je fasse ma thèse dans son institut. Merci à Jean-Baptiste Sibarita pour m'avoir accueilli dans son équipe.

Je tiens à remercier particulièrement Vincent Studer, mon directeur de thèse, qui a logiquement eu un grand rôle dans ce projet. Il a été là pour me guider et m'accompagner tout au long de mon projet de thèse. Merci à toi, Vincent, de m'avoir fait confiance, m'avoir aidé par ta connaissance scientifique et pour ta gentillesse.

Je remercie toutes les personnes qui ont scientifiquement contribué à ce projet, de près ou de loin. Merci à Sonia Garel et Ludmilla Lokmane pour leur collaboration sur le projet des explants.

Merci à tous les membres de l'équipe Sibarita, je suis content d'avoir travaillé et passé de bons moments avec vous.

Je remercie Emeline, Sébastien et Pauline qui sont en charge des dissections. Merci à toutes les personnes de l'institut avec qui j'ai pu avoir des discussions. Travailler dans un institut interdisciplinaire a été très enrichissant. Merci à ceux qui ont permis que ces années de thèse soient agréables, surtout aux anciens doctorants qui m'ont donné des conseils sur ma rédaction.

Enfin je veux remercier ma famille et mes amis qui m'ont toujours soutenu, dans les bons moments comme dans les moments plus difficiles. Plus particulièrement, un grand merci à ma Maman qui m'a le plus soutenu et encouragé. Un merci spécial à mes relecteurs et une pensée émue à ma grand-mère Mamine, la meilleure d'entre eux.

Résumé

Le guidage axonal est un processus très important dans le développement du cerveau, permettant de lui donner sa structure et son organisation. La communauté scientifique des neurosciences lui porte un intérêt grandissant ces dernières années. Plusieurs outils appartenant au domaine des microtechnologies, que sont la microfluidique et le micropatterning, sont d'une aide importante pour étudier le guidage axonal *in vitro*. Ils permettent de confiner les neurones et leurs axones et de leur appliquer des gradients de molécules de guidage. Lors de ce travail de thèse, j'ai voulu développer un système pour étudier l'effet de gradients de molécules de guidage sur le guidage axonal. J'ai pour cela testé plusieurs configurations de dispositifs microfluidiques, de micromotifs (*micropatterns*) et de combinaisons de ces derniers.

Nous avons d'abord utilisé deux approches pour isoler les axones de neurones dissociés de leurs somas afin de pouvoir étudier, à haut débit, l'effet de l'environnement moléculaire sur les cônes de croissance des neurones. La première approche consistait à faire pousser des neurones sur des motifs (*patterns*) de différentes protéines. Elle a permis de montrer leur capacité d'adhésion spécifique sur ces motifs. La seconde consistait à ensemercer des neurones dans un dispositif microfluidique dans lequel, lors de leur pousse, les axones sont séparés des somas par des microcanaux. Nous avons ensuite étudié l'effet, sur les axones, de gradients de molécules de guidage. Pour commencer, nous avons mesuré l'effet de deux molécules de guidage : l'éphrine et la sémaphorine, en cultivant des neurones en présence de gradients patternés de ces deux molécules. Par la suite, nous avons étudié un autre modèle où les neurones sont plus proches de leur environnement *in vivo*, des explants poussant sur des motifs de laminine contenant un gradient. Pour aider au positionnement de l'explant, nous avons polymérisé des hydrogels. Ensuite, nous avons mis des explants à côté de gradients patternés d'éphrine. Enfin, nous avons cherché à obtenir un gradient soluble de molécules de guidage entretenu sur des temps longs, plus proche des gradients existant *in vivo*. Dans ce but, nous avons voulu fabriquer un dispositif microfluidique permettant d'appliquer un gradient soluble de molécules de guidage sur des neurones. Pour obtenir un gradient stable dans le temps, nous avons aussi cultivé des neurones à côté de cellules exprimant la nétrine, une autre molécule de guidage. Pour finir, nous avons cultivé des neurones et des glies dissociés pour étudier leurs interactions.

L'ensemble de ces recherches n'a pas permis d'obtenir un dispositif fiable pour étudier l'effet de molécules sur la pousse et le guidage des axones. Néanmoins, la configuration consistant en une coculture de neurones à proximité de cellules relargant de la nétrine nous a permis d'obtenir des premiers résultats encourageants. Nous avons ainsi mis au point un ensemble de méthodes qui pourront nous permettre de finaliser le développement d'un système pour étudier le guidage axonal, fonctionnel et efficace.

Mots-clés : guidage axonal, molécules de guidage, micropatterning, microfluidique, neurones dissociés, explants

Abstract

Axonal guidance is a very important process during brain development, allowing to give it its structure and organization. The neuroscience scientific community has a growing interest in it during the last years. Several tools belonging to the field of microtechnologies, microfluidics and micropatterning are of important help to study axonal guidance *in vitro*. They allow to confine neurons and their axons and to apply gradients of guidance molecules. During this thesis, my goal was to develop a system to study the effect of guidance molecules gradients on axonal guidance. For that, I tested several configurations of microfluidic devices, micropatterns and combinations of both.

First, we used two approaches to isolate dissociated neurons axons from their somas. Our goal was to study the effect of the molecular environment on neurons growth cones, with a high throughput. The first approach consisted in growing neurons on different proteins patterns. It also allowed to show their capacity to adhere on these patterns. The second one consisted in seeding neurons in a microfluidic device in which, during their growth, axons are separated from somas by microchannels. Then we studied the effect, on the axons, of guidance molecules gradients. To begin, we measured the effect of two guidance molecules: ephrin and semaphorin, by culturing neurons in the presence of patterned gradients of these two molecules. After that, we studied another model where neurons are closer from their environment *in vivo*, explants growing on laminin patterns containing a gradient. To help the explant positioning, we polymerized hydrogels. Then, we put explants next to patterned gradients of ephrin. Finally, we tried to obtain a soluble gradient of guidance molecules, over a long period of time (days), closer to existing gradients *in vivo*. In that goal, we wanted to build a microfluidic device enabling the application of a soluble gradient of guidance molecules on neurons. To obtain a constant gradient, we also cultured neurons next to cells expressing netrin, another guidance molecule. Finally, we cultured dissociated neurons and glial cells to study their interactions.

All these experiments did not allow to obtain a reliable device to study the effect of molecules on axons growth and guidance. Nevertheless, the configuration consisting in a coculture of neurons next to cells releasing netrin allows us to obtain promising preliminary results. We thus drew up a group of methods that will enable us to finalize the development of a system to study axonal guidance, functional and efficient.

Key words: axonal guidance, guidance molecules, micropatterning, microfluidics, dissociated neurons, explants

Title: Development of microtechnologies for the study of axonal guidance

Sommaire

Introduction	- 1 -
PARTIE 1 : Le guidage axonal et les microtechnologies.....	- 5 -
I. Neurone.....	- 7 -
1. Axone.....	- 9 -
2. Dendrite.....	- 9 -
3. Cône de croissance.....	- 10 -
II. Chimiotaxie et guidage axonal.....	- 12 -
1. Les molécules adhésives.....	- 14 -
2. Les molécules de guidage.....	- 15 -
3. Les morphogènes.....	- 20 -
III. Microtechnologies pour étudier le guidage axonal.....	- 22 -
1. Microfluidique / gradients solubles.....	- 22 -
2. Micropatterning / gradients patternés.....	- 45 -
PARTIE 2 : Matériel et méthodes.....	- 55 -
I. Dispositif expérimental LIMAP.....	- 57 -
II. Protocole de pégylation.....	- 60 -
1. PLL-PEG.....	- 60 -
2. PEG-SVA.....	- 60 -
3. Schott hydrogel.....	- 61 -
III. Fabrication d'une réplique de dispositif microfluidique AXIS.....	- 62 -
IV. Patterning d'une lamelle.....	- 62 -
V. Polymérisation d'hydrogels.....	- 65 -
VI. Culture de neurones.....	- 66 -
VII. Imagerie des neurones vivants.....	- 67 -
VIII. Marquage immunologique.....	- 67 -
IX. Electroporation.....	- 68 -
X. Autre matériel utilisé dans les expériences.....	- 69 -
PARTIE 3 : Résultats	- 71 -
I. Isoler les axones de neurones dissociés.....	- 76 -

1. <i>Isoler les axones par des motifs chimiques</i>	- 76 -
2. <i>Isoler les axones par des barrières physiques</i>	- 79 -
II. Améliorer la sensibilité au gradient.....	- 81 -
1. <i>Améliorer la précision des gradients - utilisation de gradients patternés</i>	- 81 -
2. <i>Augmenter la durée d'exposition au gradient</i>	- 94 -
III. Neurones et glies sur grilles de laminine	- 103 -
Conclusion	- 107 -
Bibliographie	- 111 -

Introduction

L'étude du système nerveux central, à différents niveaux, par exemple submicronique, cellulaire, à l'échelle d'un réseau de neurones, ou du cerveau entier, s'est fortement développée depuis les travaux de Ramon y Cajal, à la fin du 19^e siècle. Cela a été possible grâce, notamment, au développement des techniques de microscopie. Cependant, bien que certaines découvertes aient été faites, le fonctionnement du cerveau est loin d'être totalement compris. Il suscite un fort intérêt de la part des scientifiques ainsi que du grand public.

Le cerveau est un système complexe, dû, entre autres, à ses différentes fonctions, comme le transport et le traitement d'information, qui le différencient des autres organes. Il peut être étudié selon différents angles : par ses capacités à propager, transférer et répondre à un signal provenant d'un stimulus, ou par son interaction avec d'autres organes. Cependant, il ne faut pas perdre de vue que le cerveau, bien que relativement autonome, est intégré dans un système plus grand, le corps humain ou de l'animal. Les neurones, qui sont l'un de ses composants, doivent, eux aussi, être considérés comme des entités à part entière, avec leurs propres fonctions, qui sont intégrées dans un système plus grand, le système nerveux.

Plus particulièrement, le développement du cerveau, au stade embryonnaire, est une étape impressionnante. Comment les milliards de neurones arrivent-ils à se connecter entre eux d'une manière très précise pour donner un cerveau fonctionnel ? Quels mécanismes rendent possible l'aboutissement à un système si complexe ? Plusieurs molécules ayant un rôle dans le processus du guidage de l'axone ont été découvertes. Ces molécules sont de nature différente : des molécules de guidage en solution dans l'environnement de l'axone ou adsorbées sur le substrat, des protéines d'adhésion et des morphogènes. L'intégration de ces différents facteurs par le cône de croissance (la structure mobile située à la pointe de l'axone qui sonde l'environnement et indique à l'axone dans quelle direction tourner) engendre le guidage de l'axone. Ces molécules indiquent donc à l'axone du neurone quelle direction suivre pour atteindre sa zone cible. Leurs effets sur le guidage de l'axone sont très complexes, ils dépendent du type de neurone, de la présence seule ou combinée de chacune de ces molécules, et de plusieurs paramètres de l'environnement du cône de croissance.

Les microtechnologies sont des outils très utiles pour étudier les systèmes biologiques en général et le système nerveux en particulier. Elles sont en plein essor, surtout en ce qui concerne l'étude *in vitro* de systèmes biologiques, dont les neurones. Elles consistent en un ensemble de techniques de fabrication, à l'échelle du micromètre (entre quelques μm et quelques centaines de μm). Elles ont permis de développer des dispositifs pour étudier le guidage axonal.

Dans cette thèse de doctorat, nous nous intéressons à la pousse des neurones d'un point de vue morphologique et à l'échelle d'une cellule. Plus en détail, nous nous concentrons sur le guidage de l'axone. Pour cela, nous nous appuyons sur des microtechnologies, le microphotopatterning et la microfluidique.

Ce projet a été réalisé dans un institut interdisciplinaire. Il a été mené du point de vue d'un physicien utilisant des techniques de microfabrication pour étudier une question

de neuroscience, le guidage axonal. Des interactions avec des collaborateurs neuroscientifiques ont permis un dialogue entre ces deux disciplines.

Les expériences ont été réalisées sur des cellules nerveuses dissociées d'hippocampes, et des explants de cortex, d'embryon de rat. Ces cellules primaires sont différentes des lignées cellulaires qui sont des cellules immortalisées, pouvant se diviser quasiment à l'infini et qui ont des caractéristiques proches de celles des cellules cancéreuses. Les lignées se comportent de manière différente qu'*in vivo*. En revanche, les cellules primaires ont des caractéristiques plus proches de celles qu'elles peuvent avoir dans leur organe de provenance *in vivo*.

Les cellules primaires sont obtenues à partir d'une dissection d'hippocampes d'embryons de rats. Le rat est un modèle très utilisé en neurosciences en général et pour l'étude des cellules nerveuses *in vitro* en particulier. Il offre un bon ratio entre sa proximité anatomique à l'homme, sa facilité d'utilisation et ses caractères éthiques. L'hippocampe est une structure du cerveau largement utilisée dans la recherche sur le système nerveux central et pour l'utilisation de ses cellules primaires en particulier. Il joue un rôle dans la mémoire, la navigation et l'inhibition du comportement.

Les explants sont obtenus à partir d'une dissection de cortex d'embryons de rats. Le cortex est une structure du cerveau importante, très étudié, il est impliqué dans trois différents sens (auditif, visuel et somatosensoriel), la motricité et le langage.

Pour ce projet nous avons utilisé deux principales microtechnologies, le microphotopatterning et la microfluidique. Le micropatterning permet de réaliser des motifs (*patterns*) micrométriques de protéines sur une surface. Le photopatterning est une technique utilisant de la lumière pour créer un motif sur une surface. La microfluidique est le contrôle et la manipulation des fluides géométriquement contraints à petite échelle, typiquement sous le millimètre.

Je me suis servi de ces deux techniques, la première pour faire des motifs de protéines d'adhésion sur des lamelles de verre, pour ensuite faire pousser des neurones sur ces motifs, ainsi que pour polymériser des hydrogels servant à positionner plus facilement les explants et la deuxième pour fabriquer des dispositifs dans lesquels des neurones peuvent pousser et les écoulements sont contrôlés, ce qui permet de faire des gradients solubles.

Dans une première partie, j'introduirai les notions que j'utiliserai par la suite pour exposer mes résultats. Il s'agit des principes de base de la biologie du cerveau et son vocabulaire associé, des principes du guidage axonal et des molécules de guidage, ainsi que des techniques de microfabrication centrées sur les deux techniques que j'utiliserai par la suite : le micropatterning et la microfluidique.

Dans une deuxième partie, je décrirai les méthodes utilisées lors de ce projet. Celles-ci sont la méthode de microphotopatterning, que l'on peut aussi adapter pour fabriquer des dispositifs microfluidiques et polymériser des hydrogels, la technique de microscopie, qui a servi à prendre des images des neurones et les méthodes de culture de neurones ainsi que celles de biologie associées.

Ensuite, dans une troisième partie, je présenterai mes résultats expérimentaux concernant le guidage axonal étudié à l'aide de technologies de micropatterning, microfluidique et polymérisation d'hydrogels. Ces résultats portent sur l'isolation des axones de neurones dissociés grâce à deux outils : des micromotifs de protéines et un dispositif microfluidique ; le guidage d'axones d'explants, positionnés par des hydrogels, par des gradients patternés de protéines d'adhésion et de molécules de guidage ; la création de gradients solubles de molécules de guidage mis en place dans un dispositif

microfluidique ou par des cellules relargant la molécule et l'interaction de neurones et de cellules gliales dissociés.

Enfin je terminerai par une conclusion sur l'ensemble du travail réalisé, ce qu'il a apporté et les perspectives qu'il a ouvertes.

PARTIE 1 :

**Le guidage axonal et
les
microtechnologies**

Sommaire

I. Neurone.....	- 7 -
1. Axone.....	- 9 -
2. Dendrite.....	- 9 -
3. Cône de croissance	- 10 -
II. Chimiotaxie et guidage axonal	- 12 -
1. Les molécules adhésives	- 14 -
<i>a. Fibronectine.....</i>	<i>- 14 -</i>
<i>b. Laminine.....</i>	<i>- 15 -</i>
2. Les molécules de guidage.....	- 15 -
<i>a. Ephrines</i>	<i>- 15 -</i>
<i>b. Sémaforines</i>	<i>- 17 -</i>
<i>c. Nétrines.....</i>	<i>- 18 -</i>
<i>d. Slits.....</i>	<i>- 19 -</i>
3. Les morphogènes.....	- 20 -
<i>a. Wingless-related intégration site.....</i>	<i>- 21 -</i>
<i>b. Sonic hedgehog</i>	<i>- 21 -</i>
III. Microtechnologies pour étudier le guidage axonal.....	- 22 -
1. Microfluidique / gradients solubles.....	- 22 -
<i>a. Tests de coculture.....</i>	<i>- 23 -</i>
Tests de coculture classiques.....	- 23 -
Tests de coculture quantitatifs.....	- 27 -
<i>b. Tests pour des molécules diffusibles</i>	<i>- 29 -</i>
<i>c. Tests pour des molécules de guidage fixées au substrat.....</i>	<i>- 44 -</i>
2. Micropatterning / gradients patternés	- 45 -
<i>a. Photolithographie.....</i>	<i>- 46 -</i>
<i>b. Impression par microcontact.....</i>	<i>- 47 -</i>
<i>c. Patterning microfluidique</i>	<i>- 50 -</i>
<i>d. Patterning par ablation laser.....</i>	<i>- 52 -</i>
<i>e. Photopatterning.....</i>	<i>- 53 -</i>

I. Neurone

Le neurone est une des briques de base du système nerveux. C'est la cellule qui permet de transporter les informations dans le système nerveux. Un neurone mature est composé d'un soma, le corps cellulaire, duquel émergent plusieurs dendrites et un axone (figure 1.1). Le soma mesure environ 10 μm de diamètre, les dendrites peuvent mesurer plusieurs centaines de micromètres et l'axone jusqu'à plusieurs dizaines de centimètres, ces deux dernières structures ayant un diamètre d'environ 1 μm . Chaque neurone est connecté à plusieurs neurones, jusqu'à plusieurs milliers, par des synapses. L'information circule dans le neurone par un signal électrique, sous forme de potentiel d'action. Au niveau des synapses le signal est chimique, transporté par des neurotransmetteurs. La synapse est la zone de connexion entre deux neurones, appelés neurone présynaptique et neurone postsynaptique. À la membrane du neurone présynaptique, des vésicules libèrent les neurotransmetteurs. La membrane du neurone postsynaptique contient des récepteurs mobiles qui reconnaissent les neurotransmetteurs. Une fois qu'un certain nombre de récepteurs sont excités, un potentiel d'action est déclenché dans le neurone postsynaptique. La fente synaptique mesure entre 10 et 40 nm.

Le neurone, comme toutes les cellules eucaryotes, a une membrane plasmique qui contient une grande variété de protéines transmembranaires. L'intérieur de la cellule baigne dans le cytoplasme où sont immergés le noyau, contenant les gènes, ainsi que plusieurs organelles comme les mitochondries, qui produisent l'énergie, le réticulum endoplasmique, où les protéines sont synthétisées, et l'appareil de Golgi, où certaines protéines sont encapsulées dans des vésicules avant d'être excrétées par la cellule (figure 1.1). Le cytoplasme contient aussi des filaments, formant le cytosquelette de la cellule, qui sont les microtubules, l'actine et les filaments intermédiaires. Ce cytosquelette a un rôle prépondérant dans la dynamique de la cellule comme lors de l'adhésion, de la migration et de la polarisation. Les microtubules sont polymérisés à partir d'un centrosome et forment des fibres donnant un support à la forme de la cellule. Ils sont composés de dimères de tubulines α et β . Leur diamètre est d'environ 25 nm et leur longueur évolue du fait de leur dynamique correspondant à l'équilibre de polymérisation et dépolymérisation ayant lieu à leurs deux extrémités. Les filaments d'actine sont organisés en double hélice d'environ 8 nm de diamètre et formés de monomères d'actine globulaire. Comme les microtubules, ils sont polarisés et dynamiques. Ils sont utilisés, entre autres, lors de la traction de la cellule sur la matrice extracellulaire et donc de sa migration. Les filaments intermédiaires sont moins dynamiques que les microtubules et les filaments d'actine et ne sont pas polarisés. Ils servent de support structurel à la cellule.

Partie 1 : Le guidage axonal et les microtechnologies

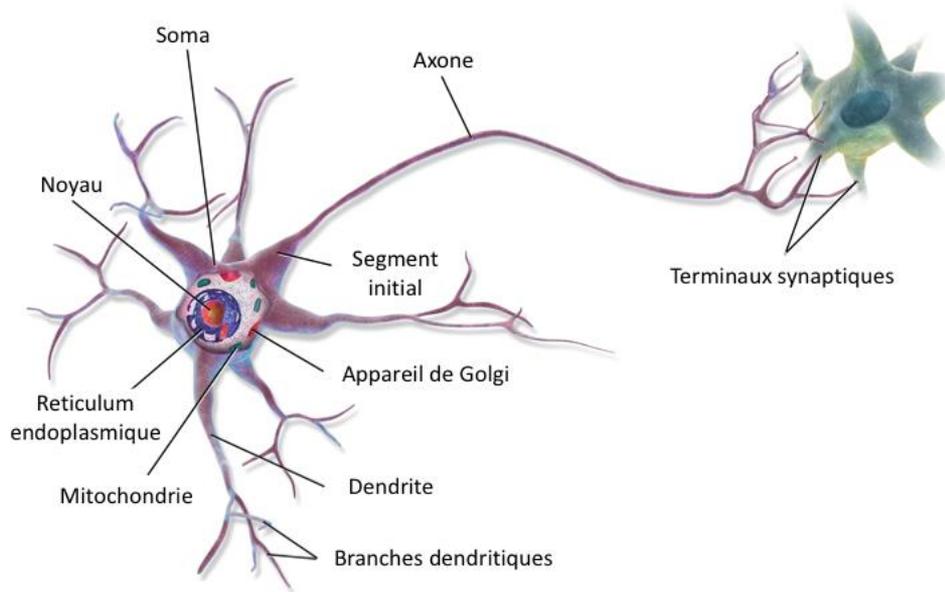


Figure 1.1 : **Schéma d'un neurone.** Adapté de Wikimedia Commons.

Le cerveau humain est composé de deux hémisphères comportant plusieurs régions. Ces deux côtés sont reliés entre eux et chacune de leur partie gérant la motricité contrôle la partie opposée du corps. Certaines zones du cerveau contiennent plus de somas, appelées la matière grise, d'autres plus d'axones et dendrites, appelées la matière blanche. Le cerveau est composé de neurones mais aussi d'un autre type de cellules : les cellules gliales.

Dans cette thèse, nous allons utiliser des neurones provenant de deux structures : l'hippocampe et le cortex. L'hippocampe est situé vers le centre du cerveau (figure 1.2), il a une forme rappelant celle de l'animal marin du même nom. Il est impliqué dans la mémoire, l'apprentissage, la navigation spatiale et l'inhibition du comportement. Le cortex est la couche superficielle du cerveau (figure 1.2), il est subdivisé en plusieurs zones. Il est impliqué dans la motricité, trois différents sens (auditif, visuel et somatosensoriel) et le langage.

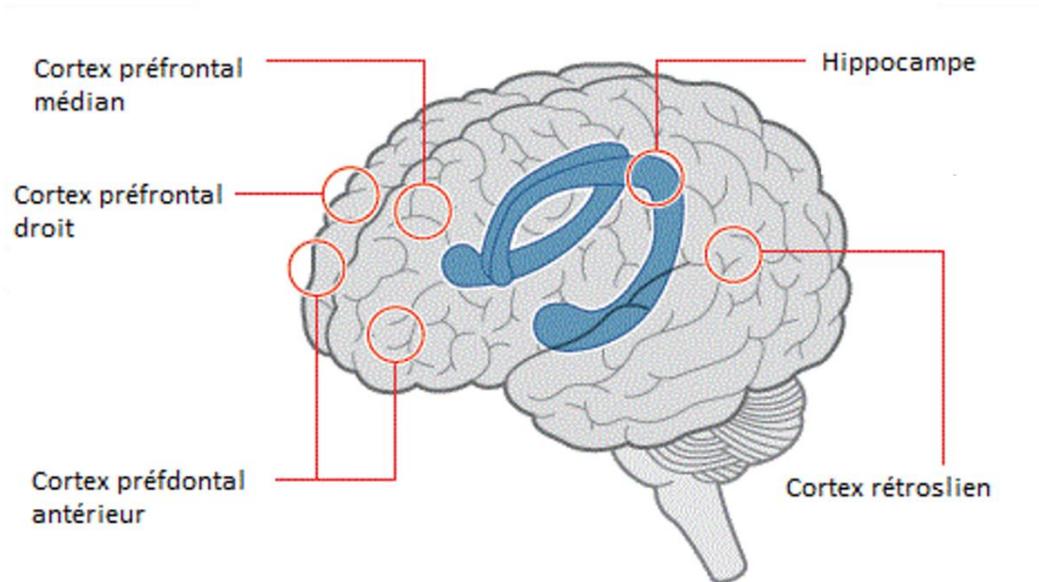


Figure 1.2 : **Schéma du cerveau humain avec l'hippocampe et le cortex mis en valeur.** L'hippocampe est représenté en bleu et le cortex est la couche superficielle en gris, plusieurs de ses zones sont pointées. Adapté de blog.cognifit.com

1. Axone

L'axone est la protubérance neuronale qui, avec la dendrite, est regroupé sous le nom de neurite. L'axone est le pôle transmetteur de potentiels d'action du neurone. Il est principalement composé d'un faisceau axial de microtubules et d'un réseau périphérique d'actine. L'axone a un aspect morphologique homogène et un diamètre constant, d'environ $1\ \mu\text{m}$, sur toute sa longueur. Cette dernière évolue en fonction du type de neurone et de son emplacement, de quelques centaines de micromètres à plusieurs dizaines de centimètres chez l'homme. La région de l'axone proche du soma est appelée le segment initial (AIS, *axonal initial segment*). Il est impliqué dans la polarisation du neurone. Le segment initial a une longueur de 30 à 40 μm .

À son extrémité, l'axone a souvent plusieurs branches, cette structure est appelée arborisation terminale, ce qui lui permet de connecter plusieurs neurones, souvent au niveau de leurs dendrites. La pointe de ces branches est appelée terminaison axonale ou bouton synaptique, elle constitue la partie pré-synaptique de la synapse.

2. Dendrite

La dendrite est un pôle récepteur de potentiels d'action du neurone. La dendrite, comme l'axone, contient un faisceau axial de microtubules et un réseau périphérique d'actine. La morphologie des dendrites, comme la densité de branchement, est fortement corrélée avec la fonction du neurone.

Les dendrites ont un rôle important d'intégration des signaux synaptiques et de détermination de l'étendue des potentiels d'action à produire. Ceux-ci se propagent le long des dendrites jusqu'au soma.

3. Cône de croissance

Le cône de croissance est une structure située à la pointe des neurites des neurones en développement. Il explore son environnement pour supporter la croissance d'un neurite vers sa cible. Sa forte dynamique et sa grande sensibilité envers les molécules de guidage jouent un rôle clé dans la pousse et la polarisation du neurone.

Les éléments du cytosquelette du cône de croissance lui donnent sa forme et il peut être séparé en trois zones (figure 1.3) [1 Dent]. La zone centrale contenant principalement des faisceaux de microtubules stables qui rentrent dans le cône de croissance à partir de la tige de l'axone. La zone intermédiaire, ou transitoire, fait d'un arc d'actine contenant de la myosine II, qui enferme les microtubules arrivant de la tige de l'axone et recevant le flux rétrograde d'actine venant de la zone périphérique. Enfin la zone périphérique qui est composée de lamellipodes et filopodes [2 Lowery]. Les filopodes sont les structures dominantes du cône de croissance, ce sont de fines extensions, cylindriques, étroites et fortement dynamiques, qui peuvent s'étendre à plusieurs micromètres du bord du cône de croissance. Ils contiennent des faisceaux de filaments d'actine qui leur donnent leur forme. La membrane entourant les filopodes contient des récepteurs et des molécules d'adhésion cellulaire qui sont importants pour la pousse et le guidage de l'axone. Les lamellipodes, situés entre les filopodes, sont des régions plates ayant un dense maillage d'actine. Ils sont souvent adjacents à la pointe du cône de croissance et sont positionnés entre deux filopodes ce qui leur donne une apparence de voile. Les nouveaux filopodes apparaissent généralement à partir de ces voiles situés entre les filopodes (figure 1.3).

La forte dynamique du cône de croissance lui permet de réagir à son environnement en changeant rapidement de direction en réponse à différents stimuli. Il y a trois étapes subies par le cône de croissance lors de la pousse de l'axone : la protrusion, l'engorgement et la consolidation [1 Dent]. Durant la protrusion il y a une rapide extension des filopodes et des lamellipodes le long de la pointe du cône de croissance. L'engorgement suit quand l'arc d'actine se réoriente vers les bords latéraux du cône de croissance puis que les microtubules de la zone centrale envahissent l'intérieur du cône de croissance [3 Suter]. Enfin, la consolidation se produit quand les filaments d'actine au cou du cône de croissance se dépolymérisent et les filopodes se rétractent. Ensuite, la membrane se rétracte aussi pour former un nouveau segment de la tige de l'axone autour du faisceau de microtubules.

La vitesse moyenne de pousse des axones *in vivo* (dans l'animal) est de 1 mm par jour.

Partie 1 : Le guidage axonal et les microtechnologies

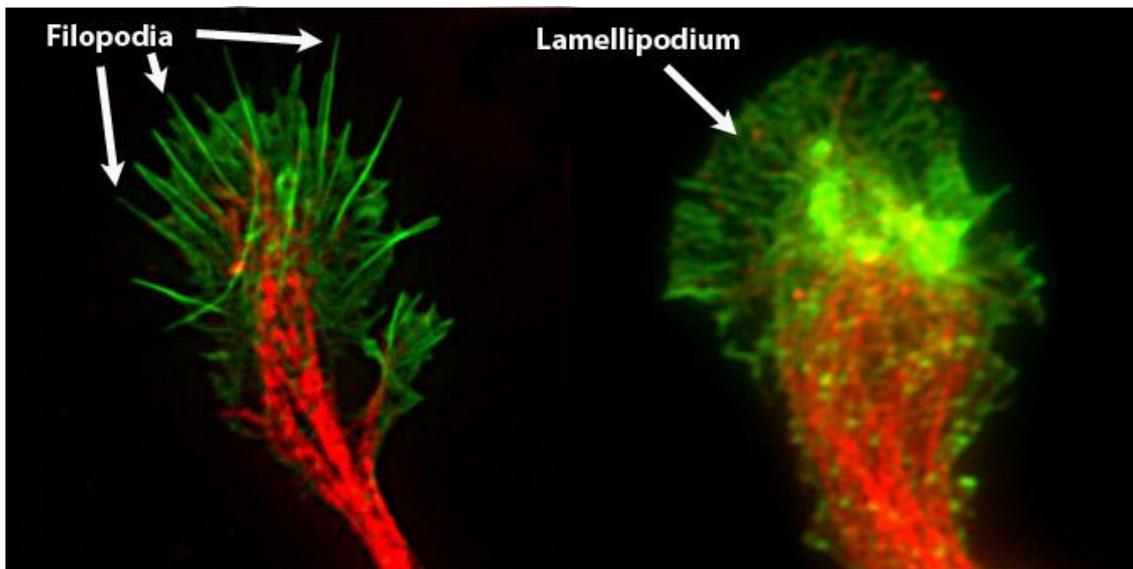
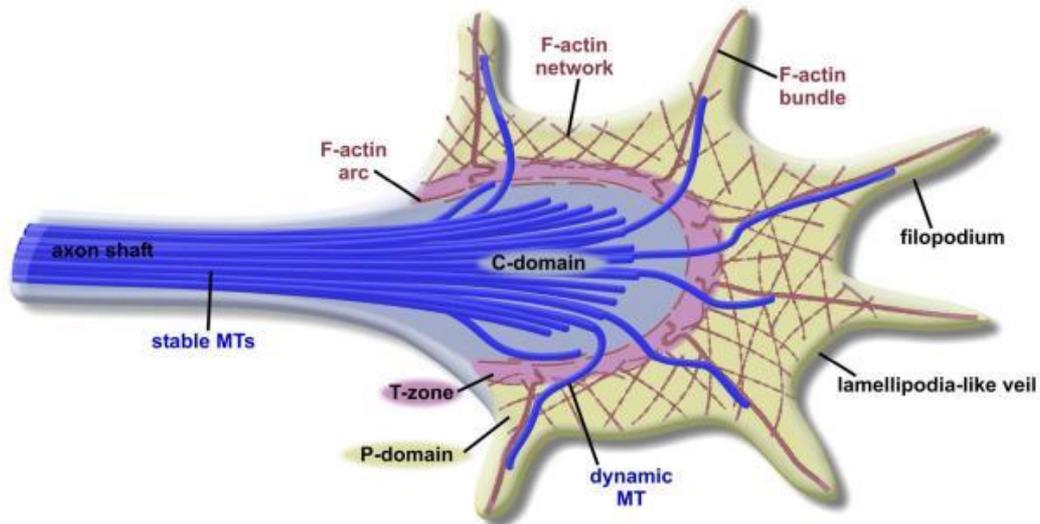


Figure 1.3 : **Schéma et photos d'un cône de croissance.** Haut : schéma d'un cône de croissance. Localisation de ses trois zones : centrale (C) avec des microtubules stables, transitoire (T) avec un arc d'actine, et périphérique (P) avec des lamellipodes, composés d'un maillage d'actine, et des filopodes, composés de faisceaux de filaments d'actine. Bas : photo de filopodes (à gauche) et de lamellipodes (à droite) de cônes de croissance. L'actine est marquée en vert et les microtubules en rouge. Source [2 Lowery] et wikipedia.

II. Chimiotaxie et guidage axonal

Le guidage axonal est le processus par lequel les axones sont guidés lors du développement du cerveau et de n'importe quelle zone nerveuse. Les axones suivent souvent un chemin précis dans le système nerveux pour atteindre leur cible. Le cône de croissance de l'axone explore son environnement et réagit aux signaux qui lui indiquent dans quelle direction pousser.

Il s'agit d'un processus de chimiotaxie, commun à un grand nombre de types cellulaires. La chimiotaxie est un phénomène complexe qui guide les cellules et en particulier les cônes de croissance des axones en développement. Elle consiste, pour les cellules ou les cônes de croissance, à détecter et suivre des gradients moléculaires. La chimiotaxie implique le couplage de trois phénomènes : la détection directionnelle (*directional sensing*), la motilité (*motility*) et la polarisation (*polarisation*) [4 Mortimer]. La détection directionnelle est la capacité d'une cellule de traduire un faible gradient de facteurs chimiotactiques présent à l'extérieur en un gradient d'activité intracellulaire significativement plus pentu, pour orienter spatialement sa réponse. La motilité est la génération d'un mouvement à travers la coordination spatiotemporelle de la dynamique du cytosquelette et de l'adhésion au substrat. Ces deux processus ont lieu dans le contexte de polarisation, qui est la capacité d'une cellule d'arranger des composants signalant clés en des régions persistantes et distinctes « avant » et « arrière » [4 Mortimer].

Les signaux guidant le cône de croissance lors de la pousse de l'axone sont de natures différentes :

- les molécules adhésives attachées au substrat, comme les protéines d'adhésion de la matrice extracellulaire (ECM, *Extra Cellular Matrix*) laminine et fibronectine [5 Evans]
- les molécules répulsives attachées au substrat, comme les slits et les éphrines
- les molécules chimiotactiques diffusibles, comme les molécules de guidage classiques nétrines et sémaphorines et comme les morphogènes Wnt (*Wingless-related integration site*) et Shh (*Sonic Hedgehog*) [6 Zou] (figure 1.4)

En prenant la métaphore d'une voiture se déplaçant pour atteindre sa destination, le cône de croissance navigue sur une route de protéines d'adhésion entourée de barrières, que sont les slits et éphrines, attachées au substrat et est dirigé par des panneaux de signalisation, les molécules de guidage diffusibles nétrines et sémaphorines et les morphogènes [2 Lowery].

Partie 1 : Le guidage axonal et les microtechnologies

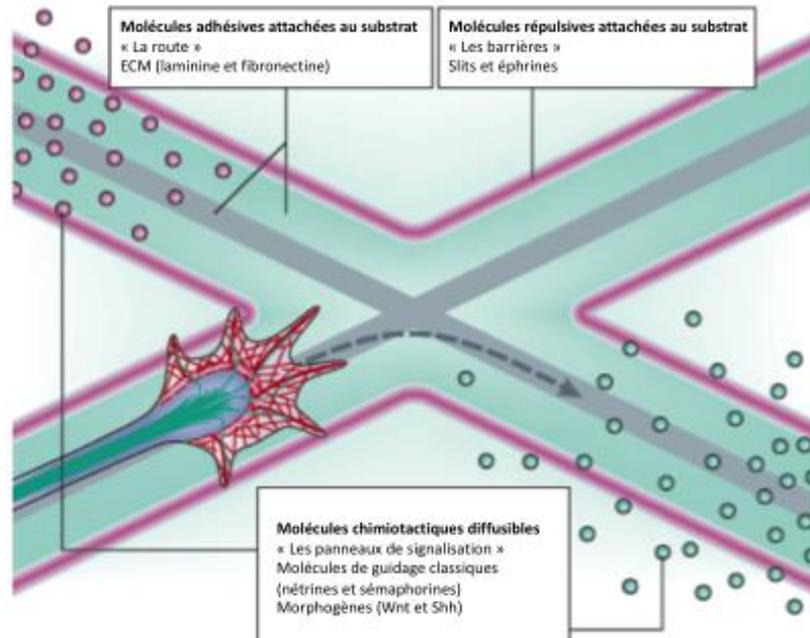


Figure 1.4 : **Schéma du guidage du cône de croissance.** Lors de sa progression le cône de croissance rencontre plusieurs types de signaux. Il se déplace sur une « route » faite de molécules adhésives, les protéines d'adhésion de la matrice extracellulaire, par exemple la laminine et la fibronectine. De plus, des molécules répulsives attachées au substrat peuvent empêcher le cône de croissance d'avancer et donc servir de « barrières » déterminant les bords de la route. Enfin, des molécules chimiotactiques diffusibles sont les « panneaux de signalisation » qui présentent des instructions directionnelles plus approfondies, elles incluent plusieurs molécules de guidage diffusibles, comme les nétrines et sémaphorines, ainsi que des morphogènes, comme Wnt et Shh. Les cercles verts et rouges sont interprétés respectivement comme des molécules attractives et répulsives. Adapté de [2 Lowery]

La chimiotaxie est réalisée par des gradients de molécules de guidage, bruités et de faible amplitude. Lors de la détection directionnelle le cône de croissance doit donc effectuer la réduction du bruit du signal, son amplification et l'adaptation à ce signal. Un gradient externe bruité et peu pentu est converti en un gradient d'activité interne moins bruité et plus pentu. L'adaptation consiste à ce que le gradient intérieur soit indépendant de la concentration basale en facteur de guidage du gradient extérieur, pour permettre au cône de croissance de répondre efficacement sur toute une gamme de concentration extérieure en molécule de guidage. Lors de la pousse de l'axone, le cône de croissance peut être plus ou moins polarisé. Lorsqu'il est faiblement polarisé il s'étale, cela se produit quand il doit interpréter une information de guidage complexe. Lorsqu'il est fortement polarisé il s'étire, cela se produit quand il se déplace sur un chemin bien défini, il est alors moins sensible aux molécules de guidage. Le cône de croissance peut aussi être polarisé le long d'un axe « gauche-droite » lorsqu'il tourne, il coordonne alors sa protrusion dans la direction du tournant et sa rétraction du côté opposé [4 Mortimer].

Un modèle du phénomène de détection directionnelle de la chimiotaxie des cônes de croissance a été proposé par [7 Morel], il décrit que les récepteurs aux neurotransmetteurs GABA (acide γ -aminobutyrique) des cônes de croissance sont sensibles à un gradient de ce neurotransmetteur. La distribution de récepteurs se réoriente et se polarise du côté où la concentration en GABA est la plus forte, ce qui fait tourner le cône de croissance dans cette direction. Les auteurs ont établi ce modèle suite à des expériences *in vitro* (expérience réalisée hors de l'animal, généralement sur une lamelle de verre) réalisées dans un dispositif microfluidique. Les facteurs chimioattractants attirent et les facteurs chimiorépulsifs repoussent les cellules.

Le cône de croissance a des récepteurs qui reconnaissent les molécules de guidage et interprètent le signal en une réponse chimiotactique. Lorsqu'ils sentent une molécule, les récepteurs activent différentes molécules de signal dans le cône de croissance, ce qui, au final, affecte la morphologie du cytosquelette. Les chimioattractants inhibent le flux rétrograde des filaments d'actine et promeuvent leur polymérisation et leur extension alors que les chimiorépulsifs ont l'effet inverse, causant l'effondrement des filopodes et lamellipodes et la rétractation de l'axone [8 Govek]. Chacune de ces molécules de guidage a un effet différent suivant le type de neurone et sa présence seule ou combinée avec une autre molécule de guidage. Les molécules modulatrices, que sont les morphogènes, influencent la sensibilité du cône de croissance à certaines molécules de guidage. Le cône de croissance des axones en développement traite ces informations de guidage dans un système complexe d'interprétation et d'intégration de signaux pour assurer le guidage approprié [8 Govek].

Le substrat sur lequel les cônes de croissance migrent est complexe. Il est assez mou et recouvert de protéines d'adhésion. Il est composé des cellules environnantes et de la matrice extracellulaire. Les protéines d'adhésion fournissent des surfaces sur lesquelles les récepteurs des cônes de croissance peuvent adhérer [2 Lowery].

Les expériences *in vitro*, très utilisées pour étudier le guidage axonal, permettent de remplacer ce substrat et ainsi rendre les expériences plus simples. Mais il est vrai que la lamelle de verre est peu représentative du substrat sur lequel migrent les axones *in vivo* (dans l'animal) qui est plus mou. Il serait intéressant de travailler avec des substrats plus mous que le verre, par exemple des hydrogels.

1. Les molécules adhésives

a. Fibronectine

La fibronectine est une protéine d'adhésion de la matrice extracellulaire (ECM). Elle est très utilisée *in vitro* comme protéine d'adhésion pour un grand nombre de cellules. Lors du développement embryonnaire la fibronectine joue un rôle important dans la migration cellulaire, notamment dans la migration des neurones mais aussi dans leur pousse. La fibronectine engendre différents comportements, spécifiques au type cellulaire, de certaines populations de neurones. Les neurones du système nerveux périphérique (PNS, *Peripheral Nervous System*) (par exemple les neurones sensoriels et sympathiques) adhèrent et ont des neurites qui poussent sur la fibronectine alors que les neurones du système nerveux central (CNS, *Central Nervous System*) (par exemple les neurones de rétine, de moelle épinière et de l'hypothalamus) ne répondent pas d'une manière stable à la fibronectine [9 Rogers].

b. Laminine

La laminine est une autre protéine d'adhésion de la matrice extracellulaire. C'est la protéine de l'ECM qui favorise le plus la pousse axonale, elle induit une pousse rapide et extensive. De par cette caractéristique, elle est souvent utilisée *in vitro* pour servir de protéine d'adhésion pour la culture de neurones. La laminine favorise l'adhésion cellulaire, la pousse, la migration et la différenciation. Autant les neurones du PNS que ceux du CNS répondent à la laminine avec une forte adhésion et une pousse des neurites rapide [10 Kleinman]. La laminine a aussi l'effet de favoriser la régénération des neurites.

2. Les molécules de guidage

La question « comment le cône de croissance est-il guidé lors du développement du cerveau ? » se pose depuis la découverte du cône de croissance par Ramon y Cajal à la fin du 19^e siècle [11 Ramón y Cajal]. En 1963 Sperry a proposé une hypothèse de chimioaffinité, qui est devenue la base pour plusieurs modèles de guidage axonal. Il a suggéré que le cône de croissance portait des étiquettes moléculaires pour le diriger à sa destination en répondant à des gradients de molécules de guidage [12 Sperry]. A la fin des années 1980 et début des années 1990, une série de criblages génétiques et biochimiques ont identifié des protéines agissant d'une manière instructive qui peuvent activement attirer ou repousser les axones. Ce sont de ces études dont nous allons principalement parler dans cette partie. La pousse est contrôlée par l'action combinée sur le cône de croissance de molécules attractives et répulsives, par contact ou à distance via des facteurs sécrétés [13 Chilton]. Des données récentes ont révélé que dans certains contextes, des molécules considérées comme chimiorépulsives agissent de façon attractive et vice-versa, c'est par exemple le cas pour la nétrine, considérée comme attractive, mais qui peut agir de manière répulsive [14 Leonardo].

La description suivante des quatre principales familles de molécules de guidage va permettre, en plus d'exposer les grandes lignes de leurs modes de fonctionnement, de montrer la variété des techniques utilisées pour les identifier et les caractériser.

a. Ephrines

Depuis l'époque de Sperry, il était connu qu'une représentation topographique de la rétine de poulet existe dans le tectum (une zone du cerveau impliquée dans la vision), cartographiant le champ visuel en un champ neuronal défini. En termes de projections neuronales cela veut dire que les cellules de ganglion rétinale (RGC, *Retinal Ganglion Cells*) de la rétine nasale font des synapses dans le tectum postérieur alors que celles de la rétine temporale font des synapses dans le tectum antérieur (figure 1.5).

Dans un test de ligne, des explants de rétine de poulet sont mis en présence de lignes de membrane de cellules de tectum antérieur et postérieur, les axones émergents sont donc confrontés à un choix [15 Walter]. Les axones de neurones de rétine temporale ont une préférence pour les lignes de membrane de tectum antérieur, leur substrat naturel. Par contre, les axones de neurones de rétine nasale n'ont pas de préférence entre

les deux types de membranes. Les auteurs ont donc émis l'hypothèse qu'une molécule répulsive pour les axones de rétine temporale était exprimée par la membrane de tectum postérieur.

Il a plus tard été montré que cette molécule est liée à la membrane par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) car, après traitement de la membrane par phospholipase C spécifique au phosphatidylinositol (PI-PLC), elle perd son effet répulsif. Cette molécule a été isolée en comparant les points présents sur un gel d'électrophorèse dérivé de régions spécifiques du tectum avant et après traitement au PI-PLC [16 Drescher]. Cette molécule est maintenant connue sous le nom d'éphrineA5. Elle est exprimée en un gradient antéropostérieur croissant à travers le tectum.

Le fait de retirer l'expression d'éphrineA5 dans des souris KO mène les axones temporaux à aller trop loin dans les régions postérieures. L'éphrineA5 est donc essentielle pour un bon guidage des axones de la rétine pour obtenir une bonne cartographie [17 Frisen].

Aussi bien les éphrines que leur récepteur associé, le récepteur eph, sont divisés en deux familles, A et B. Les éphrineAs ont une ancre GPI, alors que les éphrineBs sont liées à la cellule par un domaine transmembranaire. Les protéines ephA et ephB sont des récepteurs tyrosine kinases, appelées ainsi pour leur attachement préférentiel à la famille des éphrineAs et éphrineBs respectivement [18 Pasquale]. Alors que les gradients de ephA et éphrineA déterminent la topographie le long de l'axe antéropostérieur du tectum, les gradients de ephB et éphrineB contrôlent le motif (*pattern*) de projection dorsoventrale, agissant comme chimioattractants via leur effet sur le branchement topographique (figure 1.5).

L'éphrineA5 a une masse molaire de 50 kDa et un coefficient de diffusion d'environ $40 \mu\text{m}^2/\text{s}$

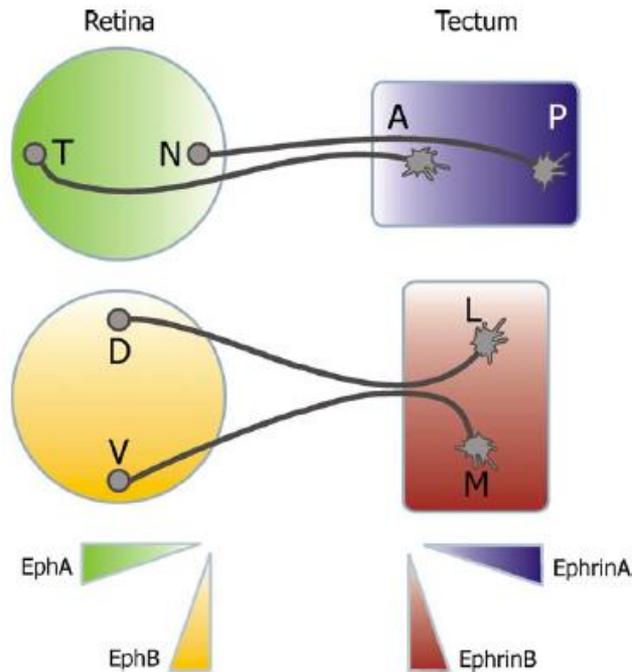


Figure 1.5 : **Carte topographique des projections des neurones de la rétine sur le tectum.** Elle est mise en place par des gradients opposés de récepteurs eph et de leurs ligands éphrines. Les axones de la rétine temporale (T) expriment un fort niveau de ephA (vert) et sont repoussés par un fort niveau d'éphrineA (bleu) dans le tectum postérieur (P) et donc ont leurs terminaisons du côté antérieur (A). Les axones de la rétine nasale (N) vont dans le tectum postérieur. Par contre, les axones ventraux (V) exprimant un fort niveau de ephB (jaune) sont attirés par un fort niveau d'éphrineB (rouge) dans le tectum médial (M). Les axones dorsaux (D) font leurs terminaisons dans le tectum latéral (L). Source [13 Chilton]

b. Sémaphorines

Les sémaphorines sont une large famille de protéines de signal, aussi bien sécrétées qu'attachées à la membrane. Elles sont divisées en huit classes parmi lesquelles les plus étudiées en termes de guidage axonal sont les sémaphorines sécrétées de classe 3 (sémaphorine3A-3G). Elles ont été identifiées comme un groupe de molécules avec des propriétés faisant effondrer (*collapse*) les cônes de croissance, ainsi les orthologues de poulet ont été originalement appelés collapsins [19 Luo]. Cette habilité à induire l'effondrement a été identifiée par l'utilisation de tests d'effondrement (*collapse assays*), dans lesquels les neurones cultivés sont exposés à un facteur supposé répulsif. Le degré auquel il induit un retardement ou un effondrement des cônes de croissance peut ensuite être facilement surveillé au cours du temps, tout comme leur rétablissement après l'avoir enlevé [20 Raper]. L'activité répulsive des sémaphorines agit sur une variété de types neuronaux *in vitro*, comme les neurones moteurs, olfactifs, de ganglions spinaux (DRG, *Dorsal Root Ganglion*) et de l'hippocampe [21 Chédotal]. Par exemple il a été observé que, dans la moelle épinière de poulet, la surexpression de sémaphorine3A engendrait une fasciculation et une pousse exubérante des axones de neurones moteurs dans des régions normalement non permissives [22 Moret]. Cette équipe a aussi observé que la sémaphorine3A en solution induisait l'effondrement des cônes de croissance de ces neurones.

Lors des tests d'effondrement mettant en présence des cônes de croissance et de la sémaphorine 3A, il a été observé une dépolymérisation des faisceaux de filament d'actine dans les filopodes suivi d'une baisse du nombre de filaments d'actine dynamiques dans la zone transitoire du cône de croissance, ce qui induit une diminution du comportement exploratoire des microtubules et leur effondrement sur les faisceaux de microtubule de la zone centrale [23 Dent]. Les lamellipodes se rétractent eux aussi et cessent leur motilité.

Les récepteurs identifiés en premier pour les sémaphorines de classe 3 sont les neuropilines, Npn1 et Npn2. Des preuves plus récentes impliquent que les neuropilines sont en réalité une évolution d'un complexe signalant, proche de la famille des plexines. Dans la drosophile, les plexines agissent comme récepteurs des sémaphorines, et cela a poussé la recherche de plexines des vertébrés. Plus d'une dizaine de plexines ont été découvertes et groupées en quatre sous-familles. Ces plexines des vertébrés ne s'attachent pas aux sémaphorines de classe 3.

La sémaphorine 3A a une masse molaire de 110 kDa et un coefficient de diffusion d'environ $50 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

c. Nétrines

Dans les organismes ayant un système nerveux bilatéral, il est essentiel qu'il y ait communication entre les deux moitiés. Ce lien est réalisé par des voies d'axones, appelées commissures, qui traversent la ligne médiane (*midline*) en des points définis. « Comment cette traversée est régulée ? » pose une des questions clé en neurobiologie. Premièrement, il doit y avoir une ségrégation entre les axones destinés à traverser et former des projections contralatérales et les axones devant continuer ipsilatéralement. Après que les axones contralatéraux aient été poussés à tourner vers la ligne médiane et à la traverser, ils doivent ensuite être repoussés pour continuer leur trajet de l'autre côté (figure 1.6). Il en découle que l'expression des facteurs attractifs et répulsifs et de leurs récepteurs doit être précisément régulée pour obtenir une bonne formation des commissures [13 Chilton].

Les nétrines des vertébrés ont été découvertes en cherchant un facteur chimioattractant. Il a été démontré *in vitro* qu'il émane de la plaque du plancher (*floor plate*), la zone située autour de la ligne médiane, et attire les axones commissuraux. Cela a été observé par test de coculture d'explants dorsaux et de plaque du plancher d'embryons de rats [24 Tessier-Lavigne]. Les axones viennent de neurones dans la moelle épinière dorsale et poussent de façon ventrale le long du bord latéral. Ils tournent à travers la colonne motrice vers la plaque du plancher et traversent la ligne médiane avant de tourner à 90° pour continuer longitudinalement. Plus tard, des extraits de cerveaux d'embryons de poulet ont été sélectionnés pour leur habilité à promouvoir la pousse axonale. Cette sélection est suivie d'un procédé biochimique pour purifier les protéines actives, appelées nétrine-1 et nétrine-2 [25 Serafini] [26 Kennedy]. Pour démontrer la chimioattraction et la distinguer d'un effet général promouvant la pousse, des cellules sécrétant de la nétrine sont placées à une distance définie d'un explant de neurones étudiés. En présence de ces cellules relargant la nétrine, les axones de l'explant de moelle épinière dorsale tournent vers les cellules plutôt que de simplement pousser plus rapidement.

DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*), une protéine transmembranaire, est exprimée sur les axones commissuraux de la moelle épinière des mammifères et est un récepteur

de la nétrine. Un anticorps de DCC bloque spécifiquement la pousse dépendante de nétrine-1 des axones commissuraux [27 Keino-Masu]. DCC est donc nécessaire pour induire l'effet attractif de la nétrine. Bien que la nétrine ait été initialement identifiée comme chimioattractant, elle peut aussi agir comme un répulsif via le récepteur UNC-5. Ce récepteur est exprimé lors du développement, chez le rat, au niveau des neurones moteurs de la moelle épinière [14 Leonardo].

Cependant, il a récemment été observé, grâce à des souris KO dans lesquels l'expression de nétrine-1 a été sélectivement retirée au niveau de la plaque du plancher, que nétrine-1 sert à aider à l'adhésion du cône de croissance mais que son gradient au niveau de la ligne médiane n'est pas indispensable pour que les axones des neurones commissuraux la traversent [28 Dominici], ce qui avait préalablement été affirmé.

La nétrine-1 et la nétrine-2 ont une masse molaire de 78 et 75 kDa respectivement et la nétrine-1 a un coefficient de diffusion d'environ $40 \mu\text{m}^2/\text{s}$. La nétrine-1 possède deux sites sur lesquels elle peut se lier à un récepteur DCC, elle est donc généralement liée à deux récepteurs DCC en même temps [29 Finci]. Par contre un seul de ces sites permet à la nétrine-1 de se lier au récepteur UNC-5.

d. Slits

L'identification des molécules slits a été possible grâce à des criblages génétiques réalisés sur la drosophile. Cet animal a été un outil puissant pour les neuro biologistes du développement, car son système nerveux central possède des commissures caractéristiques en forme d'échelles qui peuvent être rapidement scrutées pour déceler des défauts et les gènes mutés responsables identifiés. Un système basé sur la nétrine, similaire à celui des vertébrés, attire les axones des neurones commissuraux à la ligne médiane, pendant que le chimiorépulsif slit, produit à la ligne médiane, se fixe sur les récepteurs *Roundabout* (Robo) des axones qui ne la traversent pas ou l'ont déjà traversée, pour qu'ils en soient repoussés (figure 1.6). La source du chimiorépulsif slit, auquel Robo répond, est un ensemble de cellules gliales de la ligne médiane qui le sécrètent [30 Rothberg]. Les auteurs ont démontré cela après avoir examiné l'expression de slit dans les embryons de drosophile par marquage avec des anticorps, amplification génétique et hybridation *in situ*. Il a ensuite été montré que dans les mutants Robo les axones commissuraux sont insensibles à la répulsion de la ligne médiane et donc la traversent et retraversent plusieurs fois [31 Seeger]. Ainsi, un modèle simple en émergea : les axones exprimant Robo sont repoussés par slit à la ligne médiane. Dans les axones commissuraux, Robo est initialement exprimé faiblement, ce qui les rend insensibles à la répulsion à la ligne médiane. Une fois qu'ils l'ont traversée, Robo est exprimé fortement pour les empêcher de la retraverser. La molécule *Commisureless* (Comm) est aussi exprimée par les axones commissuraux et les glies de la ligne médiane des drosophiles. Elle enlève Robo de la surface de l'axone et l'empêche donc de donner son signal de répulsion, ce qui permet à l'axone de traverser la ligne médiane (figure 1.6) [32 Georgiou]. Dans les mutants Comm, les axones ne sont pas capables de traverser la ligne médiane. Chez les mammifères la molécule Rig-1 a le même effet que Comm, elle désensibilise l'axone à la répulsion de slit [33 Sabatier].

Slit a aussi un effet sur d'autres neurones. Par exemple il a été montré, *in vivo* (expérience réalisée dans l'animal vivant), que le slit1 a un effet répulsif sur les axones des neurones thalamocorticaux rostraux, ces neurones ont leurs somas dans le thalamus et projettent leurs axones dans le cortex. Par contre, lorsque le slit1 est combiné avec

nétrine-1, il génère une attraction [34 Bielle]. Les mêmes résultats ont été obtenus *in vitro* avec des neurones thalamiques mais aussi avec des neurones d'hippocampe [35 Dupin].

Le slit1 a une masse molaire de 100 kDa et un coefficient de diffusion d'environ 50 $\mu\text{m}^2/\text{s}$.

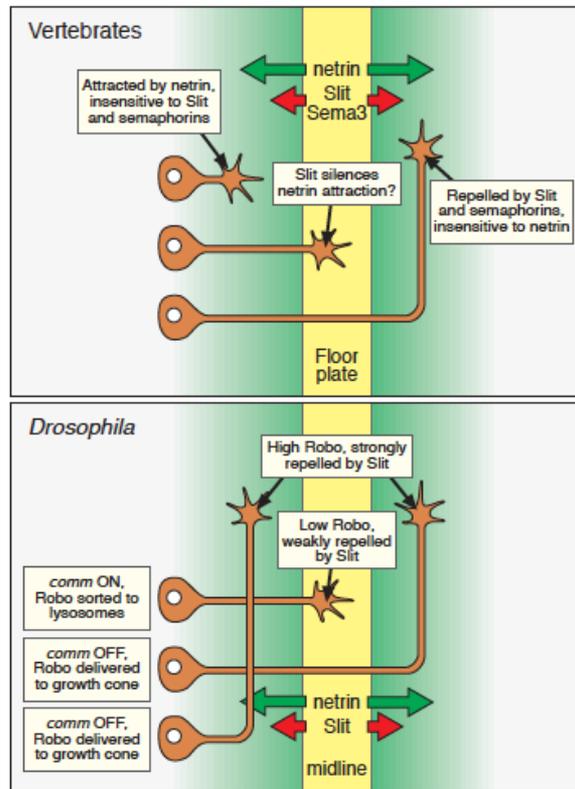


Figure 1.6 : **Schéma du changement de sensibilité des axones commissuraux à la ligne médiane.** Lorsqu'ils traversent la plaque du plancher les axones commissuraux de vertébré perdent leur sensibilité à la molécule attractive de la ligne médiane, la nétrine, et acquièrent une sensibilité aux répulsifs slit et sémaphorine. Les axones commissuraux de la drosophile deviennent aussi sensibles à slit seulement après la traversée. Cela semble refléter le rôle de Comm dans la régulation du trafic intracellulaire de Robo. Source [36 Dickson]

Ces molécules de guidage sont soit adhérentes au substrat, soit sous forme de gradients soluble. Les slits et éphrines sont généralement attachées au substrat alors que les sémaphorines et nétrines sont en solution.

3. Les morphogènes

Les morphogènes ont été caractérisés en fonction de leurs effets dans le début de la mise en place de motifs lors du développement. Ils sont de plus en plus étudiés pour leurs effets dans le guidage axonal.

a. Wingless-related intégration site

Les *Wingless-related integration site* (Wnts) sont des morphogènes sécrétés, deux de leurs caractéristiques sont particulièrement intéressantes en relation avec le guidage axonal : leur expression en gradients antéro-postérieurs et dorso-ventraux dans le tube neural et leur rôle dans la synaptogénèse [37 Ciani]. Il semble donc qu'ils aient un rôle successif ; d'abord de donner une information de positionnement aux axones puis de réguler la transition à un système nerveux fonctionnel. Par exemple, dans le guidage des axones commissuraux, Wnt a un rôle de chimioattractant via son récepteur Frizzled des axones rostraux. En termes de synaptogénèse, dans le cervelet, Wnt fonctionne comme un signal rétrograde qui module la formation et la maturation des synapses [37 Ciani].

b. Sonic hedgehog

Sonic hedgehog (Shh) est sécrété au niveau de la plaque du plancher en un gradient qui dirige la spécification des classes neuronales dans la moelle épinière ventrale. Il a été montré qu'il attire les axones commissuraux à la ligne médiane, grâce à des études d'explants et des tests *in vitro* de cônes de croissance qui tournent (*turning assays*) [38 Charron]. Shh semble donc jouer le même rôle que la nétrine, attirer les axones commissuraux. Cependant les deux molécules sont nécessaires car des souris déficientes de l'une ou l'autre ont des défauts dans le guidage des axones commissuraux. Le gradient de Shh dans la moelle épinière est très peu pentu. De plus, il a été montré *in vitro*, grâce à un dispositif microfluidique, que les axones commissuraux tournent en réponse à des gradients peu pentus de Shh et nétrine combinés, qui n'ont aucun effet sur les axones lorsqu'une seule molécule est présente [39 Sloan].

III. Microtechnologies pour étudier le guidage axonal

Les méthodes utilisées pour la découverte des molécules de guidage, comme les criblages génétiques et la purification biochimique, et celles utilisées pour la caractérisation de ces molécules, comme l'étude de souris KO, ont été efficaces dans ces buts de découverte et de caractérisation. Cependant, de nouvelles méthodes, plus simples et permettant de reproduire facilement les expériences, sont nécessaires pour mieux comprendre l'action de ces molécules. De nouvelles technologies sont utilisées, elles sont très utiles pour réaliser ces études, elles viennent du monde de la physique, ce sont les microtechnologies. Ces techniques permettent de fabriquer des formes, dans différents substrats, ayant une taille de l'ordre du micromètre. Elles offrent la possibilité de dépasser les limites des anciennes méthodes, telle leur mise en place compliquée et plutôt longue. Par exemple les expériences *in vivo* avec des souris KO nécessitent un environnement compatible avec des animaux vivants et des équipements spéciaux, et le temps nécessaire pour répliquer les expériences. Les microtechnologies sont utilisées, dans le cadre de l'étude du guidage axonal, pour créer *in vitro* des gradients solubles, ou adsorbés à la surface, de différentes molécules.

Grâce à ces méthodes, il est possible de générer un gradient de molécules de guidage et de contrôler sa pente, ce qui n'est pas possible avec les anciennes méthodes. Cela est intéressant car, comme vu précédemment, il a été montré que les facteurs de guidages sont présents en forme de gradients dans le système nerveux en développement.

Plusieurs microtechnologies peuvent être employées pour étudier le guidage axonal. Les plus utilisées sont la microfluidique et le micropatterning. Une combinaison de ces deux techniques peut aussi s'avérer intéressante. Nous allons, dans cette partie, voir comment les déclinaisons de ces deux méthodes ont été utilisées pour étudier le guidage axonal.

1. Microfluidique / gradients solubles

La microfluidique met à disposition un outil idéal pour manipuler précisément de petits volumes de liquide, typiquement du nanolitre au microlitre. Plusieurs types de dispositifs microfluidiques ont été imaginés pour permettre d'étudier l'effet de molécules diffusives sur le guidage des axones, en appliquant des gradients contrôlés dans l'espace et dans le temps, à des neurones.

La microfluidique permet d'appliquer des microécoulements sur les cellules ainsi que de créer des gradients contrôlés de molécules. Les gradients solubles peuvent être créés grâce au fait que les écoulements sont laminaires (l'ensemble du fluide s'écoule dans la même direction, il n'y a pas de turbulence) dans les canaux microfluidiques. Les dispositifs microfluidiques sont très souvent fabriqués en PDMS (polydiméthylsiloxane) qui est un silicone transparent donc compatible avec la microscopie utilisée ensuite. Le PDMS est simple à utiliser, il est possible de lui donner n'importe quelle forme. Cela s'explique par le fait que le PDMS est d'abord liquide, on peut donc le couler dans un moule avant de le chauffer pour qu'il durcisse. Les dispositifs microfluidiques dans lesquels il est

possible d'ensemencer des neurones dissociés ou de déposer des explants et de les contraindre physiquement ou de créer un gradient liquide ou adsorbé, sont des outils efficaces pour l'étude du guidage axonal.

Un test de guidage axonal idéal devrait permettre aux gradients de molécules d'être totalement contrôlés dans l'espace et dans le temps, être facilement compatible avec les différentes méthodes de culture de neurones et avec l'imagerie des cellules vivantes et permettre des acquisitions à haut débit.

Nous allons avoir un aperçu non exhaustif de ces différents tests microfluidiques.

a. Tests de coculture

Tests de coculture classiques

L'une des plus anciennes méthodes utilisées pour étudier le guidage axonal *in vitro* est le test de coculture. Dans sa première version il consiste à cultiver un explant contenant des neurones en développement avec un tissu cible dans une matrice semi-solide comme un gel de collagène. L'attraction ou la répulsion est souvent déduite de la distribution finale et de la longueur des axones. La première utilisation de cette méthode a permis de montrer que les axones de ganglions de Remak sont plus attirés par des explants de peau, de rein ou de cœur que par des explants de colonne vertébrale [40 Ebendal]. Pour cela les auteurs ont encapsulé des explants de ganglion de Remak à côté d'explants de différents organes dans du collagène (figure 1.7).

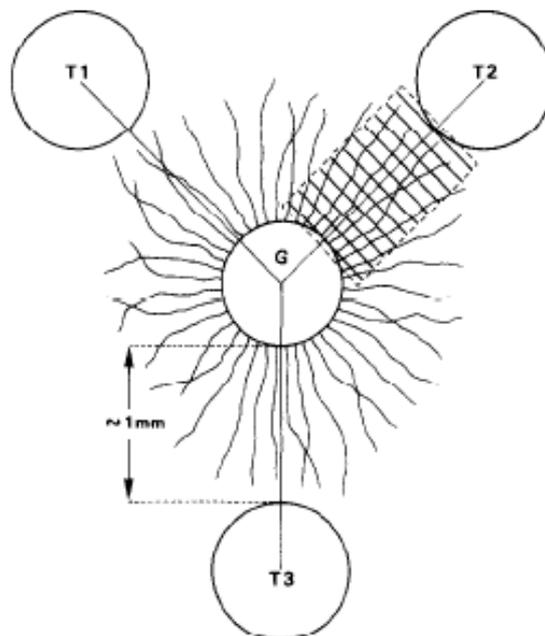


Figure 1.7 : **Schéma de l'expérience de coculture.** Un explant de ganglion de Remak (G) est placé entre trois explants d'organes différents (T1, T2 et T3) dans du collagène. Source [40 Ebendal]

L'une des études pionnières a été réalisée sur le guidage des axones de ganglions trigéminaux. Un explant de ganglion trigéminal d'embryon de souris est mis en coculture

Partie 1 : Le guidage axonal et les microtechnologies

dans du collagène avec d'un côté un explant de champs des moustaches (*whisker field*), une partie cible pour ses axones, et de l'autre côté un explant contrôle de bourgeon de membre antérieur (*forelimb bud*), une partie non connectée par ses axones [41 Lumsden]. Les auteurs ont montré que les axones de l'explant de ganglion sont attirés par l'explant de *whisker field* même lorsque le facteur de croissance des nerfs (NGF, *Nerve Growth Factor*) est bloqué par de l'anti-NGF. Le NGF était considéré comme un chimioattractant qui aurait pu expliquer le guidage de ces axones. Ils mettent alors en évidence la présence d'un nouvel agent chimioattractant produit par le *whisker field*.

Une autre étude utilisant le même principe de coculture d'explant a été utilisée pour étudier les axones commissuraux de la moelle épinière. Des explants dorsaux de moelle épinière sont cultivés dans du collagène avec des explants de la plaque du plancher du même embryon de rat (figure 1.8) [24 Tessier Lavigne]. Les axones commissuraux de l'explant dorsal poussent en direction de l'explant de la plaque du plancher. Les auteurs viennent donc de montrer qu'un chimioattractant relargué par la plaque du plancher attire spécifiquement les axones commissuraux, il sera plus tard appelé nétrine.

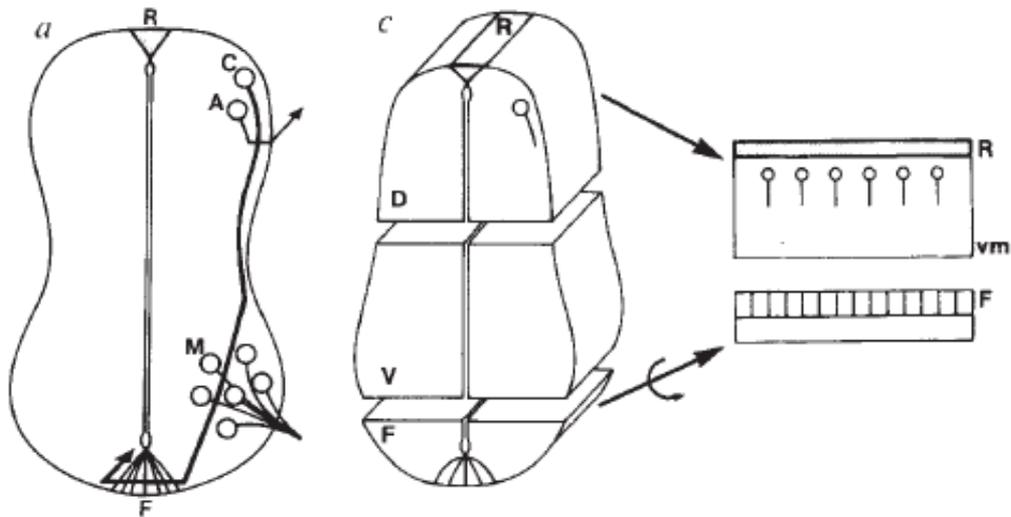


Figure 1.8 **Schéma de la moelle épinière de l'embryon de rat et du protocole expérimental.** a) Schéma d'une section transverse de la moelle épinière d'un embryon de rat E12 (12 jours après conception) montrant la localisation des trois premières classes de neurones différenciés et de leurs trajectoires supposées. Les neurones moteurs (M) se différencient dans la région ventrale de la moelle épinière et étendent leurs axones vers leurs muscles cibles. Les neurones commissuraux (C) et les interneurones (A) se différencient dans la région dorsale de la moelle épinière, adjacente à la région du toit (*roof plate*) (R). Les interneurones projettent leurs axones latéralement pour rejoindre le fascicule ipsilatéral latéral (flèche). Les axones commissuraux poussent ventralement le long de la marge latérale de la moelle épinière jusqu'à la colonne motrice, ils changent ensuite leur trajectoire et traversent directement la colonne motrice naissante jusqu'à la plaque du plancher (*floor plate*) (F). Puisque ces axones paraissent se diriger vers la plaque du plancher à travers un environnement cellulaire qui ne contient pas de chemin préformé, il semble possible qu'ils soient guidés par des molécules chimioattractantes sécrétées par la plaque du plancher. Après avoir traversé la ligne médiane de la moelle épinière au niveau de la plaque du plancher, les axones commissuraux tournent à 90° pour former des projections longitudinales dans le fascicule controlatéral ventrolatéral (flèche). c) Schéma du protocole expérimental. Chaque section de moelle épinière d'embryon de rat E11 est disséquée en trois portions : un « explant dorsal » (D) comprenant le tiers ou la moitié dorsale, un « explant de la plaque du plancher » (F) comprenant le cinquième le plus ventral et l'« explant ventral sans plaque du plancher » restant (V) qui contient la plupart des neurones moteurs. Les explants sont ensuite incrustés dans une matrice de collagène dans l'orientation appropriée, les explants dorsaux et de la plaque du plancher sont cultivés comme indiqué : l'explant dorsal est placé avec son côté le plus ventral (vm) faisant face au côté le plus ventral de l'explant de la plaque du plancher. Source [24 Tessier-Lavigne]

L'identification et le clonage des gènes codant pour des facteurs de guidage ont mené à une version modifiée du test de coculture dans lequel des explants sont cultivés avec des cellules transfectées (dans lesquelles de l'ADN a été introduit) exprimant le facteur d'intérêt (figure 1.9).

Le premier test de ce genre a consisté à cultiver un explant de moelle épinière dorsal d'embryon de rat, incrusté dans du collagène, avec son côté ventral faisant face à un agrégat de cellules COS sécrétant nétrine-1 ou nétrine-2 [26 Kennedy]. Les auteurs ont observé que les cellules COS exprimant nétrine-1 stimulent la pousse des axones du côté ventral de l'explant, d'une manière comparable à la stimulation de la pousse de ces axones par un explant de plaque du plancher. Les cellules exprimant nétrine-2 stimulent plus faiblement la pousse de ces mêmes axones. Ils ont ensuite mis des agrégats de cellules

COS exprimant nétrine-1 ou nétrine-2 à côté d'un explant de moelle épinière dorsal, parallèlement à l'axe dorsoventral original. Ils ont alors observé que les agrégats de cellules attirent les axones, avec toujours un effet plus fort des cellules exprimant nétrine-1 qui attirent les axones lorsqu'elles sont placées à moins de 280 μm de l'explant, par rapport à 160 μm pour les cellules exprimant nétrine-2. Les cellules exprimant nétrine-1 ont un effet légèrement inférieur à un explant de plaque du plancher qui attire les axones situés à moins de 330 μm . Ils en déduisent que nétrines-1 et nétrine-2 forment des gradients autour de la plaque du plancher par lesquels les axones commissuraux sont attirés.

Dans une autre expérience, un explant de moelle épinière dorsale d'embryon de rat est incrusté dans du collagène et cultivé à côté de cellules COS exprimant nétrine-1 [42 Corset]. Les auteurs ont montré que la pousse des axones des neurones commissuraux de l'explant est dirigée vers les cellules COS sources de nétrine-1 et que ces axones peuvent être marqués par l'anticorps anti récepteur A2b, ce qui indique, avec d'autres résultats, que la nétrine nécessite ce récepteur pour fonctionner. A2b est un récepteur, associé à la membrane, de l'adénosine qui induit l'accumulation de cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*, adénosine monophosphate cyclique). Dans cette étude il est aussi montré que le récepteur A2b interagit avec DCC et donc que la fonction de nétrine-1 de promouvoir la pousse et/ou l'attraction peut nécessiter un complexe récepteur contenant DCC et A2b.

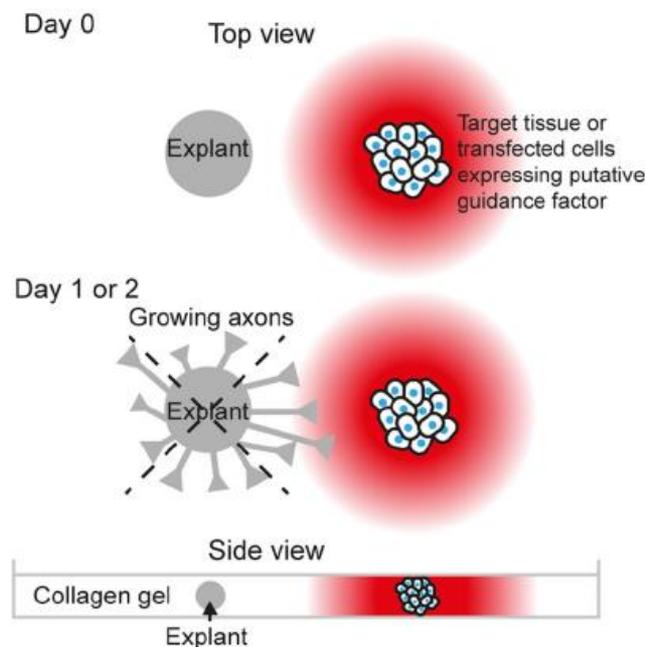


Figure 1.9 : **Test de coculture classique.** Un explant incrusté dans un gel de collagène est exposé à un tissu cible ou à des cellules transfectées relargant un facteur de guidage supposé. Source [43 Dupin]

Les avantages de ce test de coculture sont, entre autres, la visualisation directe du résultat et la possibilité de tester un grand nombre d'axones dans la même expérience. Cependant, les conclusions sur la nature du guidage de la molécule dépendent de la

symétrie de l'explant et son positionnement près des cellules cibles est délicat. L'imagerie des axones en train de pousser est difficile et donc la conclusion est déduite de l'état final de l'explant un ou deux jours après le début de l'expérience. De plus, la concentration exacte de molécules relarguée par les cellules et la forme du gradient sont toutes deux inconnues [43 Dupin].

Tests de coculture quantitatifs

Pour aller plus loin dans la compréhension de l'action des facteurs de guidage, il est nécessaire de pouvoir établir un gradient stable et durable de ces facteurs.

Pour aller dans ce sens, un dispositif a été créé pour générer des gradients en surface, précis, reproductibles et stables. Des lignes de molécules de guidage de quantité croissante sont imprimées sur un gel de collagène dans lequel des explants sont incrustés. Après trois heures, un gradient lisse est créé par diffusion des molécules dans les espaces entre les lignes et il reste stable au minimum douze heures (figure 1.10) [44 Rosoff]. Les auteurs ont montré, en utilisant cette méthode, que les neurones d'un explant de ganglion spinal (DRG, *Dorsal Root Ganglion*) répondent à un gradient de NGF (ayant un coefficient de diffusion dans le collagène de $8.10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$), leurs axones sont attirés par celui-ci, avec une forte sensibilité mais dans une gamme de concentration restreinte. Néanmoins cette méthode ne permet pas de créer des gradients ayant une pente de plus de 0,4% (la pente du gradient étant définie comme l'évolution relative de la concentration sur la longueur typique du cône de croissance, $10 \mu\text{m}$).

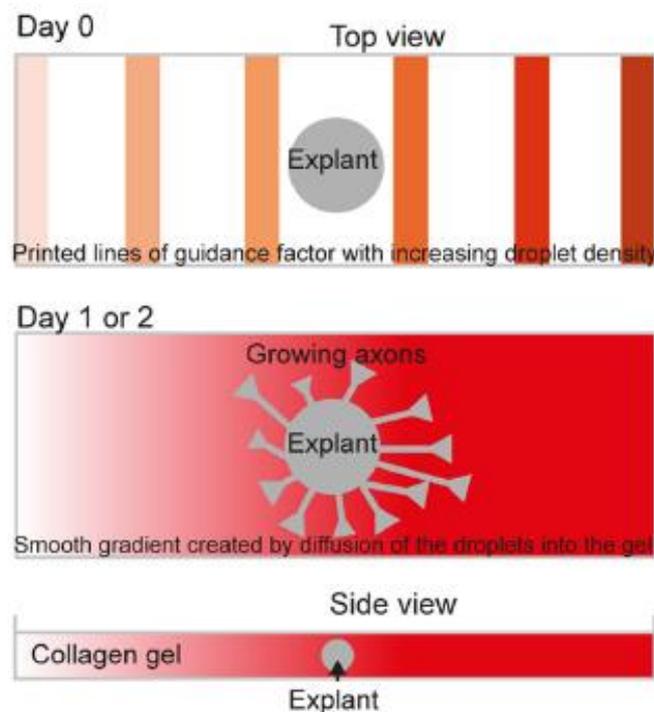


Figure 1.10 : **Schéma du dispositif générant un gradient lisse.** Un explant est incrusté dans du collagène sur lequel sont imprimées des bandes de molécules de densité croissante. Après quelques heures la diffusion des molécules crée un gradient lisse. Un jour plus tard, le gradient lisse de la molécule est toujours présent et les axones provenant de l'explant ont réagi à ce gradient. Source [43 Dupin]

Un autre dispositif microfluidique, plus simple et moins cher a été créé. Il est composé de deux compartiments, une source et un récepteur, séparés par une barrière de 1 mm de large. Du collagène contenant des explants est mis dans le compartiment récepteur et du collagène, dans lequel est dissoute une molécule de guidage, est coulé dans le compartiment source. Après 1h, un gradient se crée au niveau de la barrière, il reste stable pendant deux jours (figure 1.11). Un gradient jusqu'à 1,2% de pente peut être créé [45 Pujic]. Grâce à ce dispositif il a été observé une attraction des axones de neurones d'un explant de DRG par un gradient de NGF et une répulsion des axones de neurones d'un explant de bulbe olfactif par un gradient de slit2.

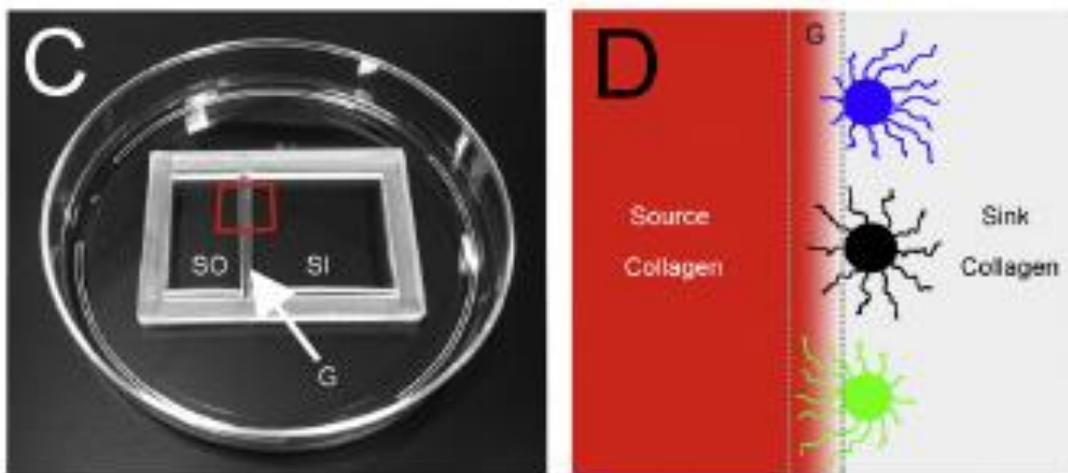


Figure 1.11 : **Dispositif à deux compartiments.** C) Photo du dispositif final en PDMS à deux compartiments, source (SO) et récepteur (SI) séparés par une barrière (G) de 1 mm de large. D) Schéma de la région dans le carré rouge en C, montrant la position des explants répondant à un gradient formé dans la région G. Si les explants sont cultivés avec une molécule attractive dans le collagène source, les neurites vont généralement pousser comme montré en vert. Si les explants sont cultivés avec une molécule répulsive dans le collagène source, les neurites pousseront généralement comme montré en bleu. Si la concentration en molécule est égale dans les deux compartiments, les neurites pousseront généralement comme montré en noir. Source [45 Pujic]

Un dispositif microfluidique a été créé pour contourner le problème du positionnement des explants pouvant être rencontré avec les tests de coculture classiques. Il consiste en une chambre centrale entourée par deux compartiments contenant les explants des tissus cibles étudiés. Les neurones dissociés d'intérêt, qui peuvent être peu nombreux, sont ensemencés dans un gel dans la chambre centrale (figure 1.12). Ce dispositif est compatible avec l'imagerie des cellules vivantes [46 Tharin]. Les auteurs ont observé la pousse préférentielle des neurones moteurs cortico-spinaux vers un explant de moelle épinière plutôt que vers un explant de cervelet.

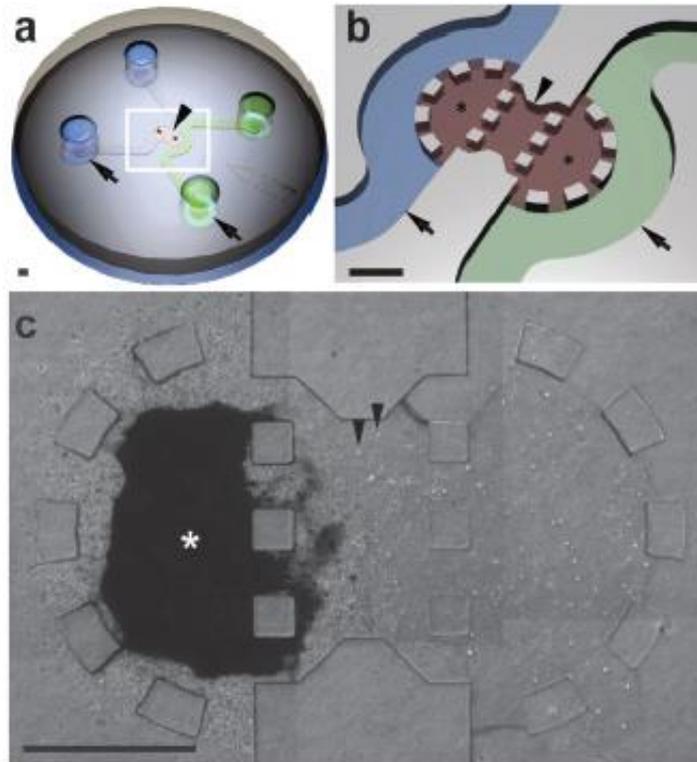


Figure 1.12 : **Dispositif microfluidique de coculture d'explants et de neurones dissociés.** a) Schéma du dispositif montrant les canaux pour le milieu (flèches), les puits pour les explants (astérisques) et le puits pour les neurones dissociés (pointe de flèche). b) Agrandissement du rectangle blanc en a. c) Image en lumière blanche de neurones moteur corticaux dissociés (pointes de flèche) et d'un explant de moelle épinière (astérisque), ensemencés dans le dispositif. Barre d'échelle 1 mm. Source [46 Tharin]

Bien que la distinction entre un effet trophique (la nutrition des neurones) et un effet de guidage soit encore difficile à réaliser avec ces tests, ils représentent une avancée importante dans l'évaluation quantitative du guidage axonal.

b. Tests pour des molécules diffusibles

L'un des dispositifs microfluidiques créé pour étudier l'effet de gradients solubles de molécules de guidage sur la pousse des axones est la chambre de Dunn. Elle consiste en une chambre centrale circulaire et une chambre extérieure en forme d'anneau, séparées par un pont en forme d'anneau. La lamelle sur laquelle sont cultivées les cellules est placée à l'envers sur la chambre de Dunn (figure 1.13). La hauteur entre le bas du pont et la lamelle de verre (20 μm) ainsi que la largeur du pont (1 mm) sont fixées, donc le profil du gradient peut être calculé : il est quasiment linéaire. En fonction de la masse moléculaire de la molécule utilisée, le gradient peut rester stable pendant plusieurs heures [47 Zicha]. La chambre de Dunn a été développée au départ pour étudier la chimiotaxie de neutrophiles.

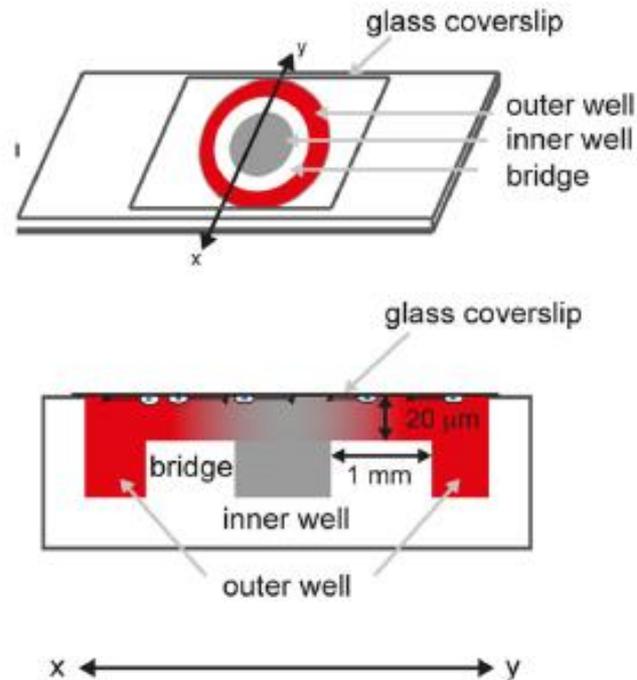


Figure 1.13 : **Schéma de la chambre de Dunn. La molécule d'intérêt est mise dans le puits extérieur.** La lamelle de verre sur laquelle les neurones sont cultivés est posée à l'envers sur la chambre. Les neurones au niveau du pont sont soumis à un gradient presque linéaire. Source [43 Dupin]

Cette chambre de Dunn a été utilisée la première fois pour cultiver des neurones et étudier une molécule de guidage axonale par une étude [48 Maden] montrant que l'acide rétinoïque est un agent chimiotactique attractif pour les neurites des neurones de tube neural dorsal d'embryons de poulet.

Par la suite, la chambre de Dunn est devenue un outil reconnu pour les études de guidage axonal, notamment grâce à la possibilité qu'elle offre de visualiser, en temps réel, la réponse de plusieurs neurones. Par exemple, il a été montré, en utilisant la chambre de Dunn, que lorsque le facteur neurotrophe dérivé de la glie (GDNF, *Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*) et l'éphrineA5 sont présents en gradients opposés, ils coopèrent pour induire une attraction, vers le côté fort en GDNF, des axones moteurs de la colonne motrice latérale [49 Dudanova]. Il a aussi été observé, par utilisation de la chambre de Dunn, que les axones de neurones commissuraux d'embryons de rat, soumis à un gradient de Shh (*Sonic hedgehog*), tournent rapidement vers la forte concentration de Shh [50 Yam]. Cependant, ce dispositif est limité à l'étude de cellules dissociées et n'est pas très flexible, la stimulation par la molécule d'intérêt ne peut pas être facilement contrôlée dans le temps et la forme du gradient, presque linéaire, ne peut pas être modifiée.

Pour contourner ces limites, d'autres dispositifs microfluidiques ont été développés. Un des premiers dispositifs développés pour le guidage des neurones consiste en un microcanal en forme de Y, contenant une région de choix libre et une région de choix forcé, dans lequel est distribué un écoulement de milieu de culture. Le point de choix forcé est localisé à l'embranchement du microcanal en forme de Y. Les neurones sont placés dans la région de placement qui jouxte la région de choix libre où ils rencontrent une gamme de concentration avant d'arriver dans la région de choix forcé où

ils ne peuvent choisir qu'entre deux environnements (figures 1.14 et 1.15). La pente et le profil du gradient sont quantifiés et dépendent de la vitesse des écoulements dans les microcanaux, cette vitesse étant réglée à l'aide d'une pompe à seringue [51 Wittig]. Avec ce dispositif, les auteurs ont observé que les neurites d'explants de ganglion spiral de rat cochlea néonatal poussent préférentiellement vers le milieu contenant de la neurotrophine-3 (NT-3), par rapport au milieu n'en contenant pas, ce qui avait déjà été observé auparavant. Ce dispositif est compatible avec la culture d'explant et de neurones dissociés et il est réutilisable.

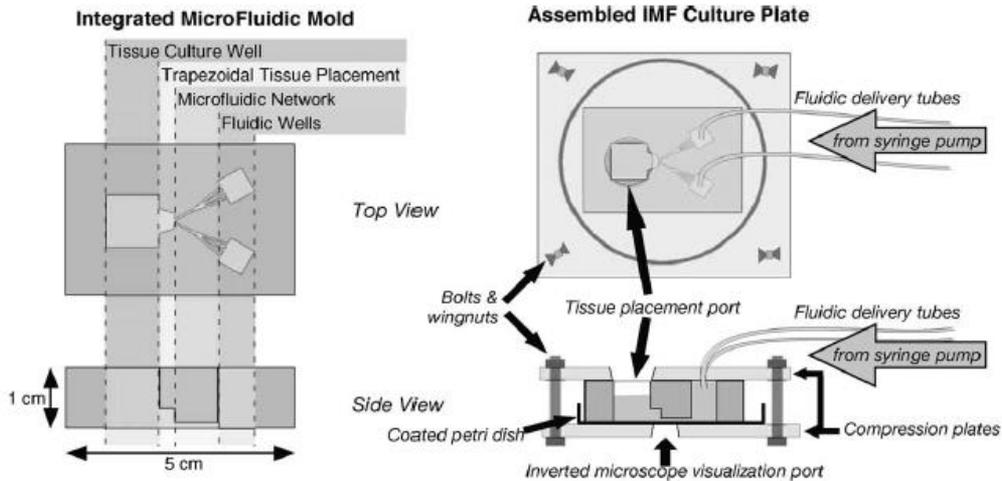


Figure 1.14 : Schéma du dispositif microfluidique et de la plaque de culture assemblée, intégrant le dispositif microfluidique. A gauche, le dispositif microfluidique qui est moulé à partir de PDMS. Les régions d'intérêt sont indiquées au-dessus du schéma : le puits de culture du tissu, la région trapézoïdale de placement du tissu, le réseau microfluidique et les puits fluidiques. A droite, la plaque de culture assemblée, contenant le dispositif microfluidique. Deux plaques de plexiglas compressent le dispositif microfluidique sur une boîte de pétri de 60 mm de diamètre recouverte d'une couche de laminine. Le milieu de culture est distribué par une pompe à seringue à travers des tubes fluidiques dans le dispositif microfluidique. Source [51 Wittig]

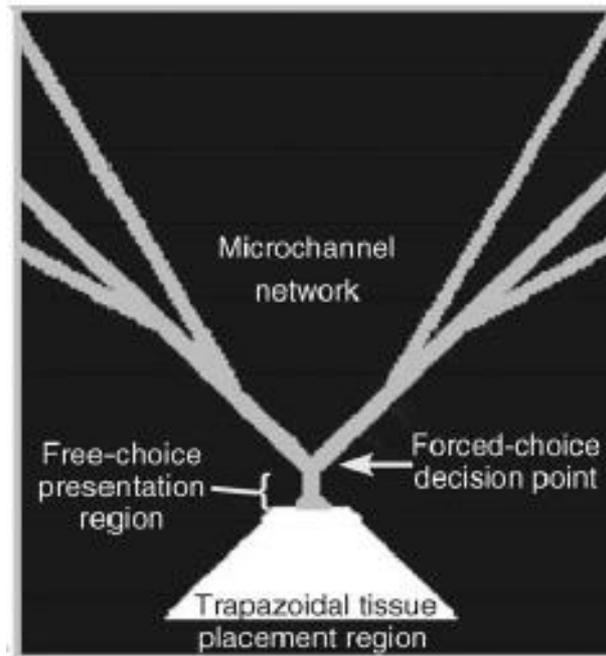


Figure 1.15 : **Masque de microfabrication photolithographique.** Les régions en gris définissent les microcanaux de 50 μm d'épaisseur et la région blanche définit la zone de 500 μm d'épaisseur. Les régions d'intérêt sont indiquées : la région trapézoïdale de placement du tissu, la région de choix libre, le point de décision de choix forcé et le réseau de microcanaux. Source [51 Wittig]

Dans ce dernier dispositif, les neurones sont exposés à un écoulement, que leurs axones remontent, et donc subissent une contrainte de cisaillement qui peut entraîner l'effondrement des cônes de croissance.

Pour contourner cette limitation, et donc s'affranchir des contraintes de cisaillement, plusieurs techniques ont été imaginées.

Le générateur de gradients composites utilise des structures de micropuits pour protéger les neurones des contraintes de cisaillement. L'incorporation de valves pneumatiques, en plus d'un réseau de microcanaux permettant un mélange, offre la possibilité de générer des gradients de différentes formes et pentes (figure 1.16). Ces gradients peuvent être linéaires ou en forme de N et cela peut être des gradients de molécules de guidage ou de protéines d'adhésion [52 Joanne Wang].

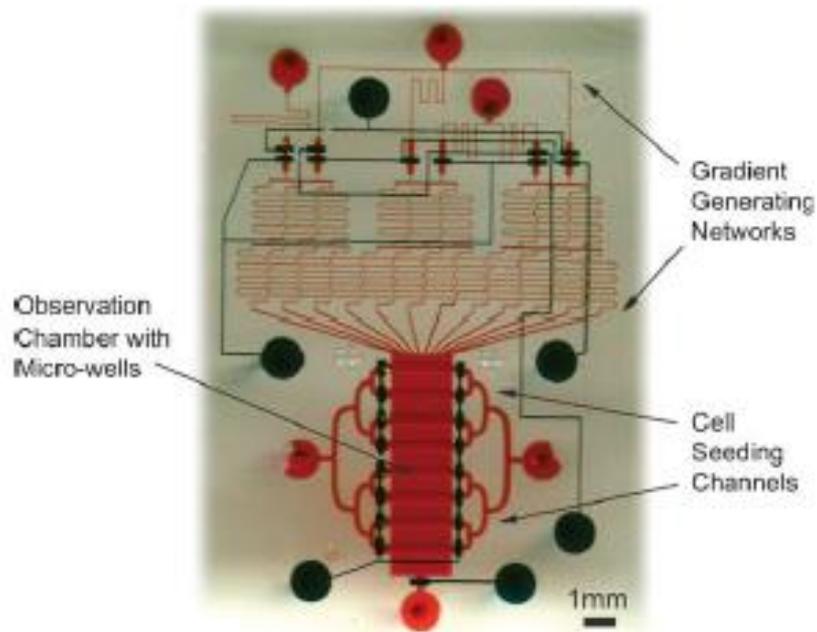


Figure 1.16 : **Photo du générateur de gradient composite.** Il est composé de deux parties : une puce microfluidique en PDMS et une lamelle de verre. La puce microfluidique est composée de deux couches : la couche du bas (en rouge) a un réseau générateur de gradient, un réseau symétrique d'ensemencement de cellules et une chambre d'observation, la couche du haut (en bleu) contient des valves pneumatiques qui peuvent laisser passer ou bloquer l'écoulement d'un canal spécifique de la couche du bas. La lamelle de verre est gravée avec une série de micropuits (rouge foncé). Source [52 Joanne Wang]

Le dispositif *le Massif* a été créé : il est composé d'un réseau microfluidique permettant un mélange et donc générateur de gradients, suivi d'une chambre dans laquelle le gradient s'établit, celui-ci est de forme linéaire (figure 1.17). Le réseau microfluidique est similaire à celui du générateur de gradient composite [52 Joanne Wang] mais il est beaucoup plus grand. L'écoulement dans le dispositif est généré par la gravité, en remplissant les deux puits d'entrée et en vidant régulièrement le puits de sortie. Du fait du grand nombre de microcanaux dans le mélangeur la résistance globale est grande, l'écoulement dans la chambre du gradient est donc faible ce qui implique que les neurones sont soumis à de faibles contraintes de cisaillement. Le gradient linéaire est stable sur une période de 24h [39 Sloan].

Dans les petits canaux le Pe (nombre de Péclet, voir page 41) est plus faible que dans la chambre, c'est aussi le cas pour le Re (nombre de Reynold, voir page 41). Dans chaque petit canal la diffusion est importante par rapport à la convection car le fluide s'écoule lentement dans des canaux de taille micrométrique, ce qui permet à la concentration en molécule de s'équilibrer. Pour les mêmes raisons, la viscosité est importante par rapport à l'inertie du fluide. Dans la chambre, la diffusion est faible par rapport à la convection car la chambre est de grande taille et car le Re reste inférieur à 1 ce qui veut dire que l'écoulement est laminaire et qu'il n'y a pas de mélange à cause de turbulences, ce qui permet au gradient de rester stable dans le temps.

Partie 1 : Le guidage axonal et les microtechnologies

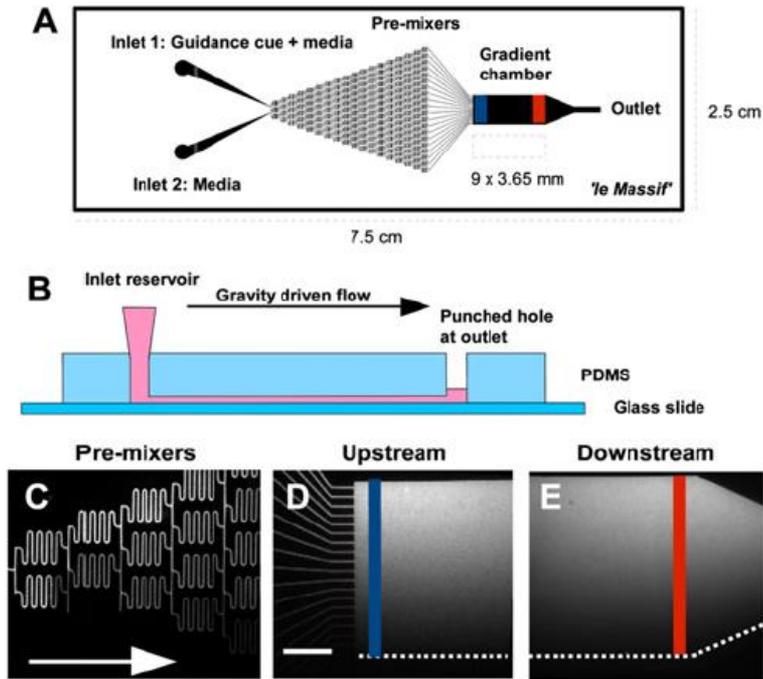


Figure 1.17 : **Schéma du dispositif le Massif qui peut générer des gradients linéaires peu pentus** A) Schéma du dispositif. La ligne bleue représente la limite amont de la chambre du gradient et la ligne rouge la limite aval. Le dispositif génère des gradients linéaires de concentration en utilisant un réseau de pré-mélangeurs, dans lequel une concentration connue de molécules est ajoutée dans le réservoir de l'entrée 1 et du milieu de culture dans celui de l'entrée 2. B) Schéma en coupe du dispositif. Les réservoirs d'entrée, remplis de liquide, engendrent un écoulement de la gauche vers la droite où le liquide s'accumule dans le trou de sortie. C-E) Le gradient est visualisé avec du dextran fluorescent. Quand les écoulements des entrées 1 et 2 convergent, les concentrations sont mélangées et divisées au niveau de 18 marches successives dans le pré-mélangeur (C), générant 20 concentrations différentes qui entrent dans la chambre du gradient (D). La forme du gradient se lisse rapidement par diffusion pour devenir continue en maintenant son profil général jusqu'à la région aval (E) où le liquide coule jusqu'à la sortie. Source [39 Sloan]

Une autre plateforme microfluidique consiste en un réservoir de culture cellulaire constamment nourri latéralement par deux séries de petits canaux appelés microjets, ce qui donne un gradient stable à la surface du réservoir (figure 1.18). Grâce à ces microjets, dirigés vers le haut, les neurones ne subissent pas de fortes contraintes de cisaillement. Le gradient, qui est linéaire, est stable pendant au moins 4h [53 Bhattacharjee].

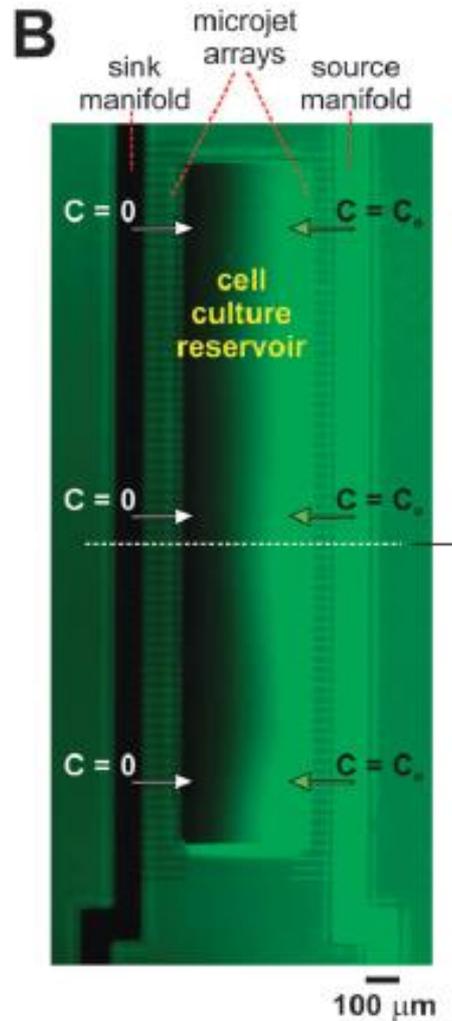


Figure 1.18 : **Image pseudocouleur du dispositif à microjets.** Il est constitué d'un réservoir de culture cellulaire, de deux canaux : source et récepteur et d'une série de microjets reliant les canaux au réservoir. Ici est observé le profil du gradient de fluorescéine obtenu 4h après ajout de milieu avec fluorescéine dans le canal source et de milieu sans fluorescéine dans le réservoir et le canal récepteur. Source [53 Bhattacharjee]

Un dispositif a été créé dans lequel des neurones sont cultivés dans un gel 3D physiologique de collagène. Il est composé de trois canaux : un pour les cellules, un pour le milieu avec molécule de guidage et un pour le milieu sans molécule. Les corps cellulaires des neurones sont positionnés contre l'hydrogel et leurs neurites poussent dans ce gel avant d'être exposés à un gradient. Ce gradient s'établit dans l'hydrogel après 30 min et peut être stable pendant deux jours (figure 1.19). Cette méthode permet aussi de réduire les contraintes de cisaillement [54 Kothapalli].

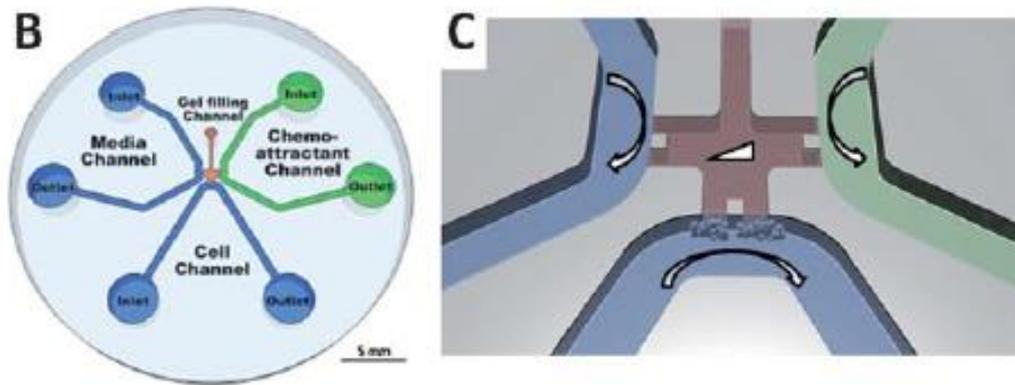


Figure 1.19 : **Schéma du dispositif microfluidique développé pour étudier le guidage des neurites dans une matrice 3D soumise à un gradient de molécules de guidage.** B) Du collagène est injecté dans le canal de remplissage du gel et laissé polymérisé. La molécule de guidage est ajoutée dans le canal de gauche et du milieu dans le canal de droite, ce qui crée un gradient dans le collagène. Les neurones sont placés dans le canal des cellules pour répondre à ce gradient. C) L'écoulement des milieux dans les trois canaux et le gradient de la molécule de guidage dans le collagène sont mis en évidence. Source [54 Kothapalli]

Un cinquième dispositif microfluidique permettant de contourner les contraintes de cisaillement a été imaginé. Deux canaux microfluidiques, d'un dispositif en forme de Y, sont séparés de la chambre de culture cellulaire par une membrane microporeuse agissant comme une barrière hydraulique (figure 1.20). Les microcanaux peuvent générer un gradient dans la chambre où les neurones sont cultivés [7 Morel].

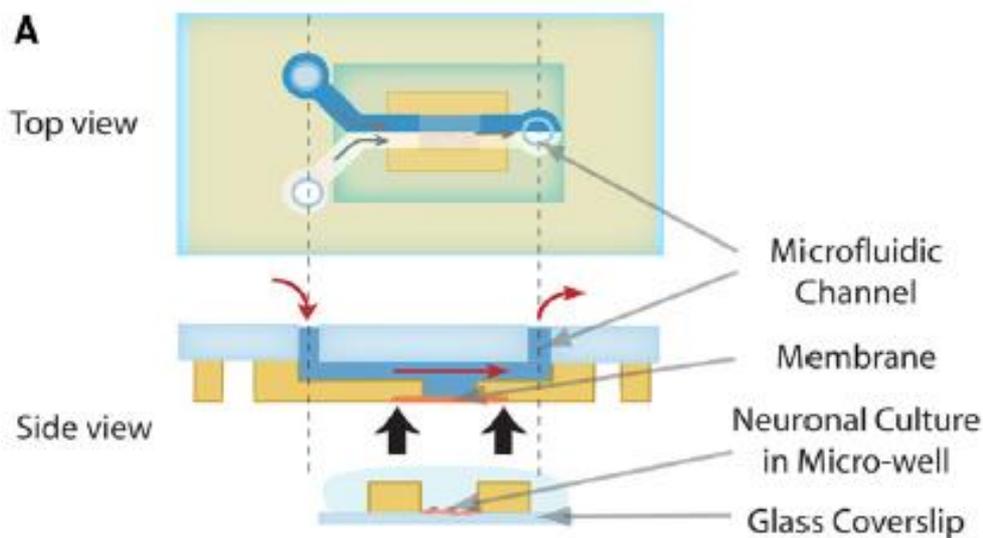


Figure 1.20 : **Schéma du dispositif en Y.** Vue de dessus et de côté de ce dispositif. Deux microcanaux sont mis en contact avec un micropuits de culture cellulaire par une membrane microporeuse. L'écoulement dans les deux canaux génère un gradient fluide sans contrainte de cisaillement dans le micropuits. Les éléments d'intérêt sont spécifiés sur le côté du schéma : les canaux microfluidiques, la membrane, la culture de neurones dans le micropuits et la lamelle de verre. Source [7 Morel]

Contrairement aux différents tests de coculture, ces cinq dispositifs microfluidiques permettent de créer un gradient quantifié et stable. En plus des contraintes de cisaillement, l'utilisation des dispositifs microfluidiques soulève un autre problème : les neurones sont sensibles et difficiles à maintenir en vie pendant plusieurs jours dans des microenvironnements fermés avec peu d'échanges de gaz et de nutriments. Il faut donc souvent adapter spécifiquement le dispositif. Dans la configuration créée par [53 Bhattacharjee] les neurones sont cultivés dans un réservoir ouvert (figure 1.18). Les neurones peuvent aussi être cultivés directement dans le dispositif s'ils poussent dans un hydrogel 3D physiologique, comme du collagène dans [54 Kothapalli] (figure 1.19). Dans la configuration développée par [7 Morel] les neurones sont d'abord cultivés dans le micropuits ouvert avant d'être mis sous le système microfluidique, seulement au moment de l'expérience (figure 1.20).

La plupart des dispositifs microfluidiques développés pour étudier le guidage axonal ont été utilisés pour des preuves de concept. [51 Wittig] ont observé que les neurites d'explant de ganglion spiral de rat cochlea néonatal poussent préférentiellement vers le milieu contenant de la neurotrophine-3 (NT-3). [53 Bhattacharjee] ont observé que les axones de cortex de souris sont attirés par un gradient de nétrine. [54 Kothapalli] ont observé une attraction de la nétrine-1 sur des axones de neurones d'hippocampe de souris et une répulsion de slit-2 sur ces mêmes axones ainsi que sur ceux de neurones de DRG. Par contre, certains des dispositifs microfluidiques ont permis de faire avancer les connaissances sur le guidage axonal. Par exemple, [52 Joanne Wang] ont montré qu'un gradient de laminine module la réponse de neurones de la moelle épinière de *Xenopus* à un gradient de facteur neurotrophique issu du cerveau (BDNF, *Brain-Derived Neurotrophic Factor*). [39 Sloan] ont montré que les axones commissuraux sont attirés par des gradients peu pentus de Shh et nétrine combinés. [7 Morel] ont montré le processus de polarisation, amplification du signal et filtrage des récepteurs GABA (acide gamma-aminobutyrique) dans le cône de croissance, au niveau de la molécule unique.

Un dispositif, créé par [7 Morel] et ayant subi quelques modifications, a été utilisé pour étudier l'activité combinatoire de slit1 et nétrine-1 sur des neurones de thalamus et d'hippocampe [35 Dupin]. Les auteurs ont montré qu'une faible concentration de slit1 engendre une attraction des axones de neurones thalamiques par un gradient de nétrine-1, alors que ce gradient de nétrine-1 seul n'a pas d'effet chimiotactique. Ils ont montré que d'une manière similaire, une faible concentration de slit1 engendre une attraction ou une répulsion des axones de neurones hippocampiques par un gradient de nétrine-1, suivant que le substrat est respectivement de la PLL-laminine ou de la PLL (poly-L-lysine, un polymère synthétique utilisé comme facteur d'attachement qui améliore l'adhésion des cellules) seule (figure 1.21).

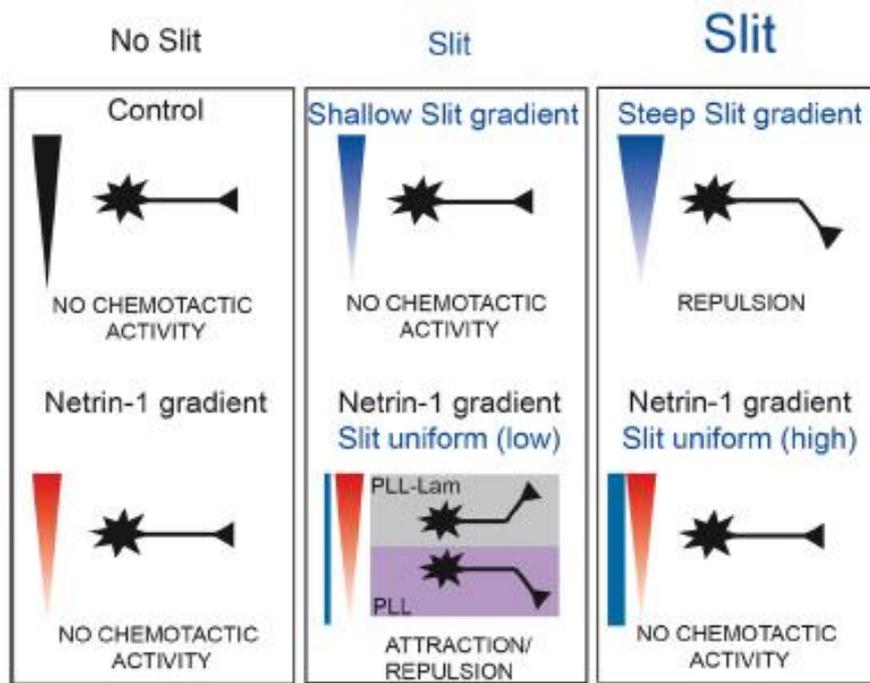


Figure 1.21 : Schéma de l'action d'une faible concentration de slit1 combiné à un gradient de nétrine-1 sur le guidage des axones de neurones d'hippocampe. Alors qu'un faible gradient de nétrine-1 n'a pas d'effet chimiotactique sur les axones hippocampiques, lorsque ce gradient est combiné à une faible concentration uniforme de slit1, il génère une attraction pour les neurones poussant sur un substrat de PLL-laminine et une répulsion pour les neurones poussant sur un substrat de PLL seule. Source [35 Dupin]

Partie 1 : Le guidage axonal et les microtechnologies

	Ref	Forme / Pente / Extension gradient	Valeur de récolleme nt	Nombre de Reynold et Péclet	Moléc ules	Consommation en molécules par expérience	Modèle guidage axonal	Matéri aux	Disponi bilité commer ciale	Facilité d'utilis ation
Gradients imprimés sur collagène	Rosoff 2004 [44]	Exponentiel 0,4% 10X20 mm ²	X	X	NGF	Dizaines ng	Explants DRG	Collagè ne	Non	++
Chambre de diffusion à 2 compartiments	Pujic 2013 [45]	Linéaire 1,2% 1X30 mm ²	X	X	NGF Slit2	NGF Dizaines ng Slit2 Centaines ng	Explants DRG et OB	PDMS Collagè ne	Non	+++
Coculture explants et neurones dissociés	Tharin 2012 [46]	X	X	X	X	X	Dissociés GSMN Explants Moelle épinrière et cervelet	PDMS Collagè ne	Non	++
Chambre de Dunn	Zicha 1991 [47]	Quasi linéaire Anneau de 20 mm ²	Seulement diffusion	X	FMLP	Centaines pg	Neutrophile s	Verre	Oui*	+++
Chambre de Dunn RA	Maden 1998 [48]	Quasi linéaire Anneau de 20 mm ²	Seulement diffusion	X	RA	Dizaines ng	Dissociés Tube neural	Verre	Oui*	+++

Partie 1 : Le guidage axonal et les microtechnologies

	Ref	Forme / Pente / Extension gradient	Valeur de l'écoulem ent	Nombre de Reynold et Péclet	Moléc ules	Consommation en molécules par expérience	Modèle guidage axonal	Matéri aux	Disponi bilité comm erciale	Facilité d'utilis ation
Chambre de Dunn GDNF et EphrineA5	Dudan ova 2010 [49]	Quasi linéaire Anneau de 20 mm ²	Seulemen t diffusion	X	GDNF Ephri neA5	GDNF Quelques ng EphrineA5 Dizaines ng	Dissociés Colonne moteur latérale	Verre	Oui*	+++
Chambre de Dunn Shh	Yam 2009 [50]	Quasi linéaire Anneau de 20 mm ²	Seulemen t diffusion	X	Shh	Dizaines ng	Dissociés Commissura ux	Verre	Oui*	+++
Microcanal en Y	Wittig 2005 [51]	<i>Step-like gradient</i> 100X200 µm ²	33 µl/h	Re = 0,18	NT-3	Dizaines ng	Explants Ganglion spiral	PDMS	Non	+
Générateur de gradients composites	Joanne Wang 2007 [52]	Linéaire En forme de N 2X7 mm ²	56,7 nl/min	Re = 3,86.10 ⁻³ Pe = 143	BDNF <i>Lami nine</i>	BDNF Centaines pg <i>Laminine</i> <i>Dizaines µg</i>	Dissociés Moelle épineière	PDMS Verre	Non	+
Le Massif	Sloan 2015 [39]	Linéaire 0,3-2,2% 3,65X9 mm ²	Engendré par gravité	Re < 1	Shh Nétri ne-1	Shh Centaines ng Nétrine-1 Dizaines ng	Dissociés Commissura ux	PDMS	Non	++

Partie 1 : Le guidage axonal et les microtechnologies

	Ref	Forme / Pente / Extension gradient	Valeur de récolleme nt	Nombre de Reynold et Péclet	Moléc ules	Consommation en molécules par expérience	Modèle guidage axonal	Matéri aux	Disponi bilité commere ciale	Facilité d'utilis ation
Dispositif à microjets	Bhatta charjee 2010 [53]	Linéaire 3-8% 0,2X1,2 mm ²	Négligeabl e sur les neurones	X	Nétri ne-1	Dizaines pg	Dissociés Cortex	PDMS	Non	+
Gradient dans collagène	Kothap alli 2011 [54]	Quasi linéaire 3-4% 500X800 µm ²	ND	ND	Nétri ne-1 Slit2	Nétrine-1 Centaines ng Slit2 Dizaines ng	Dissociés Hippocam pe et DRG	PDMS Collagè ne	Non	++
Dispositif en Y avec membrane	Morel 2012 [7]	Exponentiel 1X1 mm ²	Négligeabl e sur les neurones	X	GABA	Quelques ng	Dissociés Moelle épineière	PDMS Membra ne	Non	++
Dispositif en Y avec membrane	Dupin 2015 [35]	Linéaire 2% 1 X 1 mm ²	Négligeabl e sur les neurones	X	Nétri ne-1 Slit1	Nétrine-1 quelques ng Slit1 Centaines pg	Explants thalamus Dissociés Hippocam pe	PDMS Membr ane	Non	++

Tableau 1 : Tableau des informations techniques présentes dans les différents articles

Partie 1 : Le guidage axonal et les microtechnologies

NGF : Facteur de croissance des nerfs (*Nerve Growth Factor*)

DRG : Ganglion spinal (*Dorsal Root Ganglion*)

OB : Bulbe olfactif (*Olfactory bulb*)

CSMN : Neurones moteur cortico-spinaux (*Corticospinal motor neurons*)

FMLP : N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine

RA : Acide rétinoïque (*Retinoic acid*)

GDNF : Facteur neurotrophe dérivé de la glie (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*)

Shh : *Sonic hedgehog*

NT-3 : Neurotrophine-3

BDNF : Facteur neurotrophique issu du cerveau (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*)

GABA : acide γ -aminobutyrique

X : Non concerné

ND : information non disponible

* La chambre de Dunn est disponible commercialement sous le nom de DCC 100 Dunn chamber chez Hawksley (Londres, Royaume-Uni).

Le nombre de Reynold caractérise un écoulement, plus particulièrement la nature de son régime (de Stokes, laminaire, transitoire ou turbulent). Il représente le rapport de l'inertie du fluide et de sa viscosité.

Il est défini ainsi : $Re = \frac{VL}{\nu}$ avec V la vitesse du fluide [m/s], L la dimension caractéristique [m] et ν la viscosité cinématique du fluide [m^2/s].

Et comme $\nu = \frac{\mu}{\rho}$ avec μ la viscosité dynamique du fluide [Pa.s ou kg/(m.s)] et ρ la masse volumique du fluide [kg/m^3].

Alors $Re = \frac{\rho VL}{\mu}$

Si le nombre de Reynold d'un écoulement est inférieur à 1, c'est un écoulement de Stokes. Le fluide s'écoule lentement dans un lieu étroit ou il est très visqueux et les effets visqueux dominant sur les effets inertiels. Lorsque le nombre de Reynolds est inférieur à 2000, l'écoulement est laminaire. Les lignes de courant sont bien identifiées et parallèles et l'effet de la viscosité s'atténue au fur et à mesure que l'on s'éloigne des parois.

Pour calculer les nombres de Reynold présents dans le tableau, les liquides sont assimilés à l'eau en ce qui concerne leur viscosité donc $\mu = 1.10^{-3}$ Pa.s = 1.10^{-3} kg/(m.s) et $\rho = 1000$ kg/m^3 . Ainsi $\nu = 1.10^{-6}$ m^2/s .

Le nombre de Péclet représente le rapport du transfert de masse par convection et du transport de masse par diffusion.

Il est défini ainsi : $Pe = \frac{VL}{D}$ avec V la vitesse du fluide, L la dimension caractéristique et D le coefficient de diffusion [m^2/s].

Dans ce tableau sont regroupées les principales caractéristiques de l'ensemble des expériences de microfluidique, décrites dans cette partie, mettant en place un gradient.

Dans ces expériences plusieurs types de gradients ont été créés : des gradients linéaires dans la plupart des cas, mais aussi des gradients exponentiels [7, 44] et *step-like* (comme-échelonnés) [51]. Ces gradients ont des pentes différentes, allant de 0,3% [39] à

8% [53]. Cette large gamme de pentes permet de tester plusieurs modes de guidage des axones par des molécules de guidage. Les axones peuvent avoir un comportement différent suivant la pente du gradient.

Deux grandes stratégies ont été utilisées pour créer un gradient, la simple diffusion des facteurs de guidage [44, 45, 47-50] ou la mise en place d'un écoulement [7, 35, 39, 51-54]. Un gradient par diffusion est simple à mettre en place mais cette stratégie comporte des inconvénients : la mise en place lente du gradient car les concentrations doivent s'équilibrer et la stabilité dans le temps du gradient qui est faible. Par contre, un écoulement est plus difficile à mettre en place et il peut modifier le comportement des neurones, si les contraintes de cisaillement sont trop élevées ; il est donc important que cet écoulement soit faible. Mais cette méthode a plusieurs avantages : le gradient s'établit plus rapidement et il reste stable plus longtemps. Dans les expériences utilisant un écoulement, le nombre de Reynolds est inférieur à 1, c'est donc un écoulement de Stokes, ce qui veut dire que les effets visqueux dominent sur les effets inertiels.

Différentes molécules de guidage ont été testées, seules [7, 44, 47, 48, 50-53] ou combinées [35, 39, 45, 49, 54] avec une deuxième molécule. La quantité de molécule nécessaire pour réaliser une expérience est faible, de quelques dizaines de picogrammes [53] à plusieurs centaines de nanogrammes [39, 45, 54].

Deux grands modèles de neurones ont été étudiés : des neurones dissociés [7, 35, 39, 46, 48-50, 52-54] et des explants [35, 44-46, 51]. Les explants sont plus robustes et peuvent être positionnés. Ces neurones dissociés ou d'explants proviennent de différentes parties du système nerveux.

Les matériaux les plus utilisés pour fabriquer ces dispositifs microfluidiques sont le PDMS et le verre. Ces matériaux sont simples à utiliser, le PDMS est très utilisé car il est possible de le façonner selon la forme souhaitée. De plus, il est transparent, ce qui est pratique pour l'imagerie par microscopie et il permet les échanges de gaz, qui sont essentiels pour la culture cellulaire. Dans certaines de ces expériences les neurones sontensemencés dans du collagène [44-46, 54], une protéine de la matrice extracellulaire. Deux dispositifs [7, 35] utilisent une membrane poreuse pour séparer le réservoir dans lequel poussent les neurones de l'écoulement générant le gradient, cela permet aux neurones de ne subir aucune contrainte de cisaillement.

Seule la chambre de Dunn est disponible commercialement, ce qui en a fait un dispositif assez utilisé pour étudier le guidage axonal [48-50]. Cependant ce dispositif est basique, il génère un gradient par diffusion et ne permet pas de contrôler sa forme ni sa pente. Les autres dispositifs sont plus évolués, plusieurs permettent de donner au gradient la forme et la pente souhaitée, mais seules les équipes les ayant développés les utilisent.

Les différentes approches ont une facilité d'utilisation plus ou moins grande. La chambre de Dunn [47-50] est très simple à utiliser, elle ne nécessite aucune connectique. On peut dire la même chose de la chambre de diffusion à 2 compartiments [45]. A l'inverse le microcanal en Y [51], le générateur de gradients composites [52] et le dispositif à microjets [53], sont plus compliqués à utiliser car ce sont des dispositifs microfluidiques qui nécessitent des microtuyaux.

L'idée développée par Morel [7] et reprise par Dupin [35] est intéressante, l'innovation repose sur l'utilisation d'une membrane qui permet de séparer les neurones de l'écoulement tout en les exposant au gradient, les neurones ne subissent ainsi aucune contrainte de cisaillement tout en réagissant au gradient de molécule. L'écoulement permet d'obtenir un gradient précis et stable dans le temps.

Ces travaux ont servis de point de départ à mon travail de thèse. Pour moi, il est intéressant de créer des gradients solubles sans écoulement et qui puissent être appliqués sur des temps longs. Pour cela j'ai utilisé deux stratégies, un dispositif microfluidique AXIS et un dispositif microfluidique avec des membranes en hydrogel (voir résultats I.2, II.1.b et II.2.a).

c. Tests pour des molécules de guidage fixées au substrat

Certaines molécules de guidage se trouvent adhérentes au substrat sur lequel les neurones poussent. Elles agissent sur les cônes de croissance en complément des molécules diffusibles. Plusieurs tests *in vitro* ont été imaginés pour étudier l'effet de ces molécules qui adhèrent au substrat.

Un des premiers tests effectués pour étudier des molécules fixées au substrat a été le test de ligne. Le premier de ce genre a été développé dans les années 1980 pour expérimenter la préférence des axones sur différentes préparations de membranes cellulaires. Des bandes alternantes de deux types de membranes cellulaires sont créées sur une surface en utilisant une matrice en silicone contenant des microcanaux parallèles. Les fragments de la membrane de type A sont déposés sur un filtre, qui est posé sur la matrice en silicone et sont aspirés sur le filtre par application d'un vide dans les microcanaux. Après avoir retiré le filtre de la matrice, des fragments de la membrane de type B sont déposés sur le filtre et aspirés sur les bandes ne contenant pas de membrane de type A. Ainsi une alternance de bandes de types A et B est formée sur le filtre (figure 1.22) [15 Walter]. Les neurones poussant sur ces tapis sont confrontés à deux types de substrat différents. Si les axones ont une préférence pour l'un ou l'autre des substrats, une croissance en forme de ligne sur le substrat préféré pourra être observée après un ou deux jours. Ce substrat a été utilisé par les auteurs pour mieux comprendre l'établissement de la carte topographique dans le système rétino-tectal des poulets. Ils ont observé que les axones temporaux de rétine préfèrent pousser sur les lignes de membrane de tectum antérieur par rapport à celles de tectum postérieur, alors que les axones nasaux de rétine ne montrent pas de préférence entre ces deux substrats. Ils ont aussi observé dans une autre étude [55 Walter] qu'en chauffant les fragments de membrane de tectum postérieur, les axones temporaux n'ont plus de préférence pour les membranes de tectum antérieur, ce qui montre que les membranes de tectum postérieur ont un composant répulsif pour les axones temporaux.

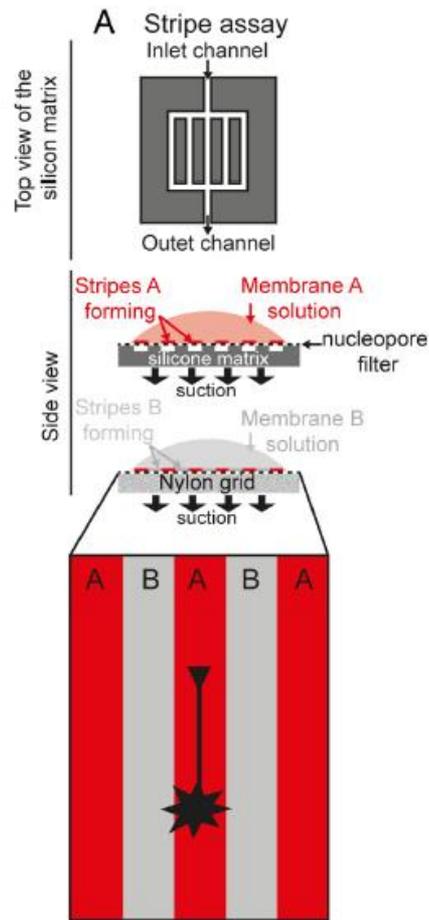


Figure 1.22 : **Schéma du test de lignes.** Des bandes alternées de deux types de membranes sont créées par aspiration successive des deux types de membranes sur un filtre, le premier à travers des microcanaux et le deuxième sans microcanaux. Si les neurones ont une préférence pour l'un des substrats, une pousse des axones en ligne sur un type de membrane sera observée. Source [43 Dupin]

Les autres techniques permettant d'obtenir des molécules fixées au substrat sont des techniques de patterning, elles seront développées dans la partie suivante.

2. Micropatterning / gradients patternés

Le micropatterning est la technique qui permet de réaliser un micromotif (*micropattern*), un motif, de taille micrométrique, sur un substrat. Le micromotif est souvent composé de protéines (on parle alors d'un motif de protéines) mais peut aussi être fait d'autres molécules. Un micromotif de protéines est composé de protéines adsorbées au substrat.

Lorsque les protéines patternées sont des protéines d'adhésion, des cellules peuvent être déposées sur le substrat patterné et les cellules adhéreront uniquement sur les motifs.

Il existe plusieurs techniques pour réaliser des micromotifs : photolithographie, impression par microcontact, déposition dans des dispositifs microfluidiques, ablation laser et photopatterning.

a. Photolithographie

La photolithographie, qui est utilisée dans l'industrie des semi-conducteurs pour faire des motifs métalliques dans les microcircuits électroniques, a été appliquée au micropatterning de protéines. La photolithographie consiste à transférer des formes géométriques d'un masque sur un substrat. Pour la photolithographie utilisant de la résine photosensible (*photoresist*), une couche de cette résine est appliquée sur la surface puis insolée sélectivement à travers un masque contenant le motif par de la lumière UV (ultraviolet). Pour une résine photosensible positive, les zones exposées à la lumière deviennent plus solubles dans une solution de révélateur que les zones non exposées. A l'inverse, pour une résine photosensible négative, les zones exposées deviennent insolubles au révélateur. Le motif de résine en résultant peut alors agir comme un masque pour patterner la molécule d'intérêt. La résine est ensuite éliminée par la technique de *lift-off* (sonication dans un bain d'acétone) pour exposer la surface restante (figure 1.23). Une autre molécule peut ensuite être incubée sur le substrat pour se fixer sur les zones non occupées par la première molécule. Ces deux molécules peuvent être l'une adhésive et l'autre antiadhésive pour former un micro motif d'adhésion pour des cellules [56 Yap].

Cette technique a été utilisée pour la première fois pour faire des motifs d'alkylsilane, définissant des zones de faible adhésion cellulaire, et d'aminosilane, définissant une zone favorisant l'adhésion [57 Kleinfeld]. Les auteurs ont fait pousser des neurones de moelle épinière d'embryon de souris et des neurones de cervelet de rat périnataux, qui, sur les zones d'aminosilane, avaient une morphologie similaire à celle de ces mêmes neurones cultivés sur un substrat classique de PDL (poly-D-lysine). Les neurones de cervelet ont pu être confinés sur des lignes de moins de 10 μm de large, et maintenu jusqu'à douze jours *in vitro*.

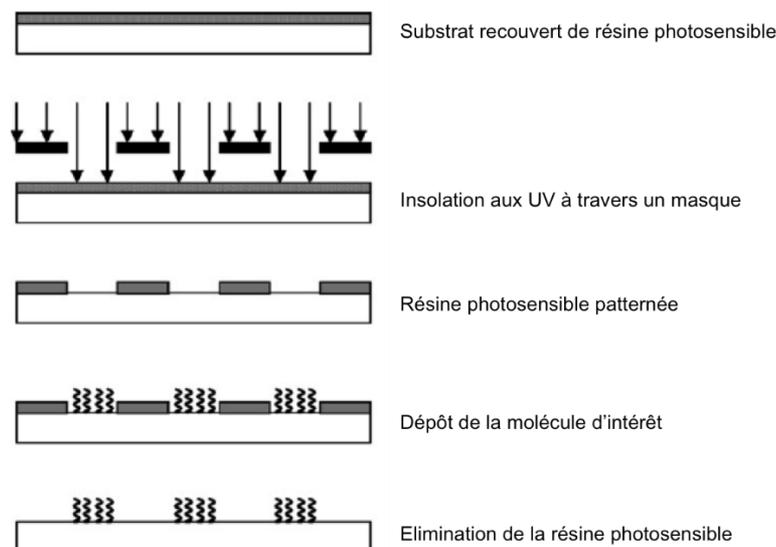


Figure 1.23 : Schéma du principe de photolithographie utilisant de la résine photosensible. Adapté de [56 Yap]

Partie 1 : Le guidage axonal et les microtechnologies

La photolithographie peut produire des motifs précis avec une résolution sous le micron. Cependant, elle nécessite une salle blanche et des équipements onéreux, ce qui la rend peu pratique pour les biologistes. De plus, les substances chimiques utilisées dans le procédé sont toxiques pour les cellules et peuvent dénaturer les biomolécules.

b. Impression par microcontact

L'impression par microcontact (*microcontact printing*) consiste à utiliser un tampon, ayant le relief du motif souhaité, souvent en PDMS, recouvert de la protéine d'intérêt, que l'on vient appuyer sur la surface à patterner (figures 1.24 et 1.25). Elle a été développée au début des années 1990 et utilisée la première fois pour faire des motifs de monocouche auto-assemblée (SAM, *self-assembled monolayer*) d'alkanethiols sur une surface d'or [58 Kumar].

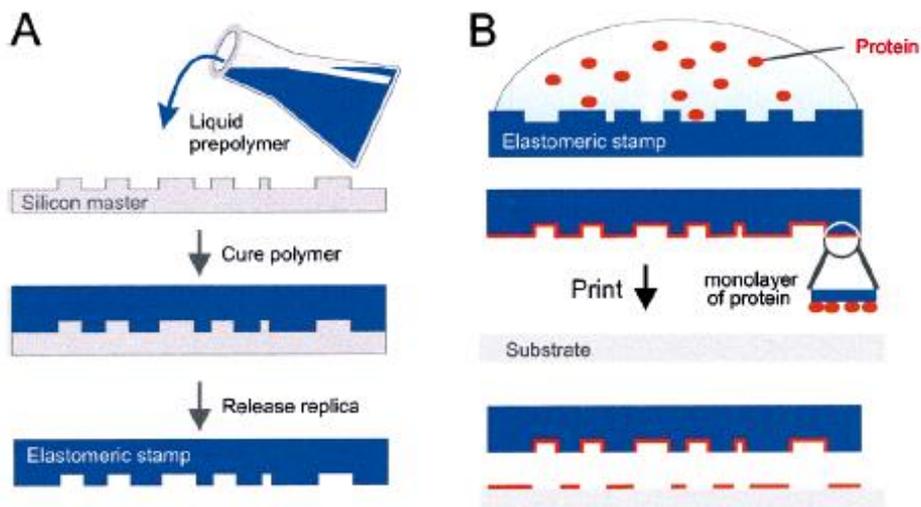


Figure 1.24 : **Schéma du principe d'impression par microcontact.** A) Fabrication du tampon. Un prépolymère liquide, souvent du PDMS, est versé sur un moule en silicium microfabriqué, puis chauffé. B) Après être retiré du moule, le tampon est recouvert de la solution de protéine. Le tampon est ensuite mis en contact avec le substrat. Le transfert a seulement lieu au niveau des zones de contact entre le tampon et le substrat. Source [59 Bernard]

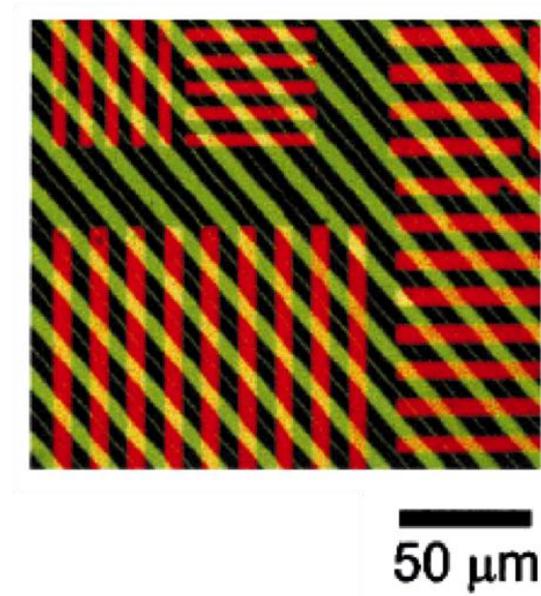


Figure 1.25 : **Images en fluorescence de protéines** imprimées par microcontact. Deux protéines fluorescentes ont été imprimées successivement sur le même substrat de verre en utilisant deux tampons en PDMS différents. Source [59 Bernard]

La technique d'impression par microcontact a été utilisée pour faire des motifs en forme de lignes de gradients discontinus de PLL (poly-L-lysine) ou de laminine/PLL (figure 1.26) [60 Fricke]. Les auteurs ont montré, en ensemençant des neurones de cortex d'embryons de rat sur ces motifs, que les gradients de ces deux protéines d'adhésion dirigent l'adhésion des neurones, contrôlent la pousse des neurites et guident une grande majorité des axones. Cette approche s'est montrée très efficace pour guider les axones de neurones multipolaires.

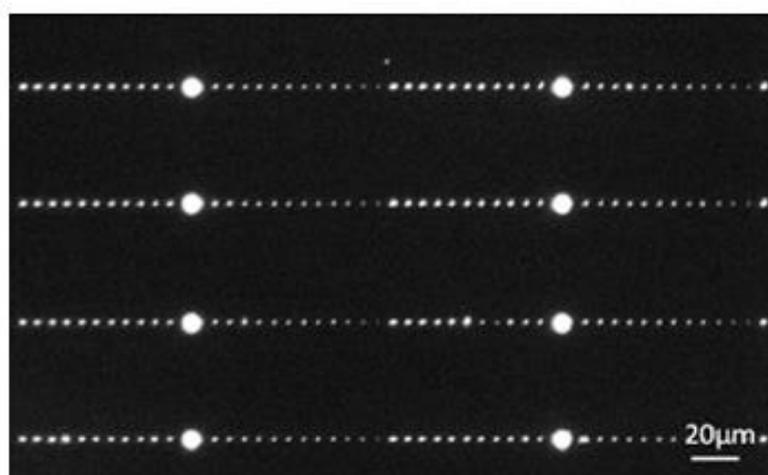


Figure 1.26 : **Image fluorescente des motifs en forme de ligne de gradient discontinu de laminine/PLL FITC.** Source [60 Fricke]

Partie 1 : Le guidage axonal et les microtechnologies

Des gradients discontinus peuvent aussi être réalisés grâce à une impression par microcontact. Des motifs de points et de lignes de taille et d'espacement variables peuvent être utilisés pour créer un gradient discontinu (figure 1.27) [61a von Philipsborn]. L'avantage de cette technique est que les motifs sont stables sur une longue période. Son utilisation a permis de comprendre comment la zone où les axones de RGC (ganglion rétinale) temporaux de poulet s'arrêtent, est définie dans un gradient d'éphrine fixé au substrat [62b von Philipsborn].

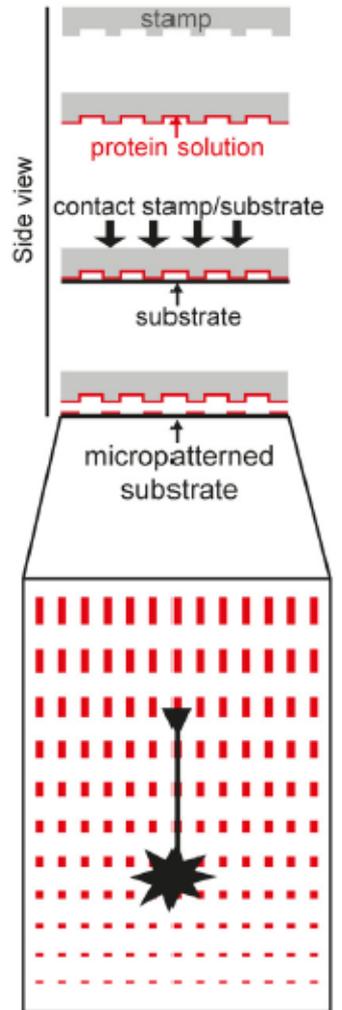


Figure 1.27 : **Schéma du test pour un gradient discontinu de molécules fixées au substrat.** Un gradient discontinu est produit par impression par microcontact. Dans cet exemple, les neurones sont soumis à un motif de rectangles ayant une taille de plus en plus grande. Source [43 Dupin]

L'impression par microcontact a l'avantage de ne pas nécessiter de salle blanche, ni d'équipements spéciaux de lithographie, sauf pour la fabrication du moule pour le tampon. Mais le tampon peut ensuite être utilisé une centaine de fois sans dégradation de ses performances. Cette technique est simple à utiliser mais ne permet pas d'avoir une résolution plus fine que 500 nm [63 Perl] [59 Bernard] ni d'aligner avec précision deux motifs. Cette méthode ne permet pas de réaliser facilement plusieurs motifs de formes différentes puisqu'il faut fabriquer un nouveau tampon pour chaque motif. Elle ne permet pas de déposer différentes concentrations de protéines simultanément. Il n'est pas non plus possible de faire des gradients continus par impression par microcontact.

c. Patterning microfluidique

Le patterning microfluidique consiste à utiliser un dispositif microfluidique, formé par un moule en PDMS scellé à un substrat, ayant un réseau de microcanaux de la forme du motif désiré, dans lequel est ajoutée la molécule d'intérêt, qui se fixe sur le substrat au niveau des microcanaux. Cette technique a été développée pour réaliser de fines structures en polymère tout en s'affranchissant des limites de la photolithographie : la destruction, en général, de la structure du moule ou le fait que les structures fabriquées ne sont pas assez régulières pour la plupart des applications [64 Kim]. Un précurseur de polymère est mis en contact avec une extrémité du réseau microfluidique, formé par un moule de PDMS fixé sur un substrat, qui va le remplir par capillarité. Après avoir polymérisé le précurseur, le moule est retiré, ce qui laisse une couche de polymère patterné (figure 1.28).

La technique de patterning microfluidique a été utilisée pour faire des motifs stables de gradients continus de laminine et de PLL. Un dispositif microfluidique à trois canaux reliés par des microcanaux a été utilisé, il permet de produire une variété de motifs uniformes et gradients de PLL et laminine par la combinaison d'écoulements laminaires, diffusion et adsorption [65 Millet]. Des neurones d'hippocampe de rat postnatal sont ensuiteensemencés sur ces motifs. Un gradient de laminine, réalisé par diffusion, attire les neurites vers le côté fort en laminine. Un gradient combiné de laminine et PLL, réalisé par écoulement laminaire créé par aspiration, restreint la pousse des neurones sur une zone de plus forte concentration au centre des deux gradients superposés.

Partie 1 : Le guidage axonal et les microtechnologies

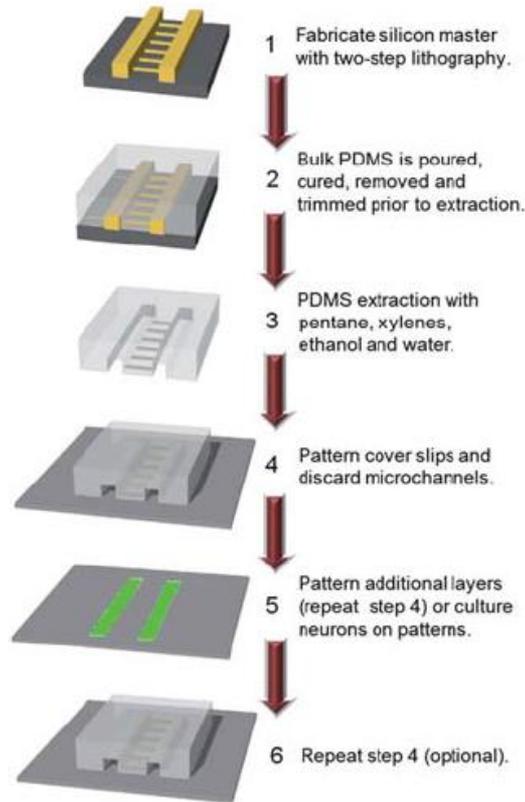


Figure 1.28 : **Schéma de la technique de patterning microfluidique.** 1) Un moule en silicium est fabriqué par lithographie. 2) Du PDMS est versé, cuit et décollé. 3) Le PDMS est extrait, pour éliminer les composants résiduels, dans des solvants. 4) La lamelle est patternnée en faisant couler la molécule dans les microcanaux puis le PDMS est retiré. 5) L'étape de patterning peut être répétée, la lamelle est prête pour recevoir les neurones. Source [65 Millet]

Un mixer microfluidique à gradient peut aussi être utilisé, il permet de générer un gradient continu de protéines, comme la laminine, avec une bonne précision. Après adsorption de ces protéines sur une surface recouverte de PLL, les neurones sontensemencés et cultivés sur ces gradients fixés à la surface (figure 1.29) [66 Li]. Des gradients à deux molécules ont aussi été créés en utilisant cette méthode. Grâce à cette dernière, les auteurs ont montré que les axones de RGC dorsaux étaient attirés par un gradient de laminine et repoussés par un gradient de CSPG (*chondroïtin sulfate proteoglycan*), tous deux fixés à la surface, lorsqu'ils sont présentés seuls. Lorsque ces deux molécules sont présentes en gradients opposés, la pousse des axones est fortement dirigée, alors que lorsqu'elles sont présentes en gradients parallèles, la pousse des axones est uniforme. La création de ces gradients nécessite un écoulement relativement rapide dans les canaux, donc l'ensemencement des cellules ne peut pas être fait avant l'adsorption des protéines.

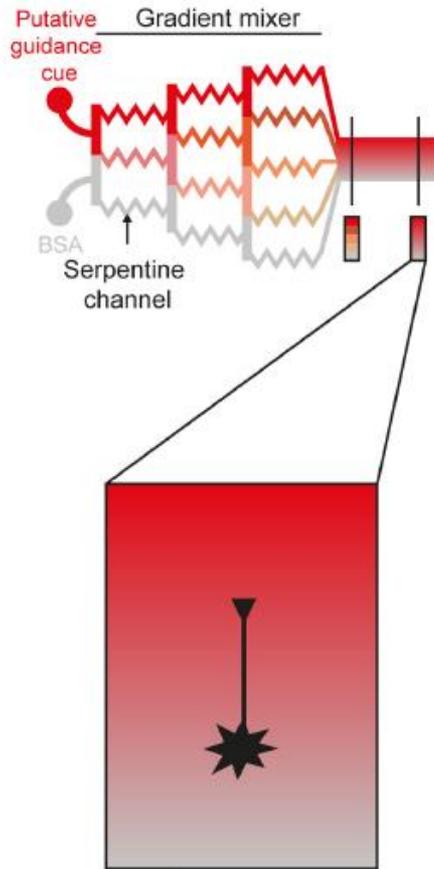


Figure 1.29 : **Schéma du test pour un gradient continu de molécules fixées au substrat.** Un gradient continu peut être formé dans une solution par un mixer de gradient. Les protéines sont adsorbées dans un canal final. Dans cet exemple un gradient de protéines est adsorbé sur une couche de PLL recouvrant la surface et des neurones sont ensemencés sur ce gradient. Source [43 Dupin]

d. Patterning par ablation laser

Le patterning par ablation laser consiste à retirer localement, à l'aide d'un laser, une couche antiadhésive pour ensuite y faire adhérer des protéines (figure 1.30).

Cette technique a été utilisée pour faire des pores dans une matrice d'acide polylactique avec un laser pulsé [67 McCullen]. Puis des cellules souches dérivées d'adipeux, humaines, ont été ajoutées sur ces matrices et leur viabilité et prolifération ont été examinées. Les cellules ont été capables d'adhérer et de proliférer sur ces matrices ayant subi une ablation laser.

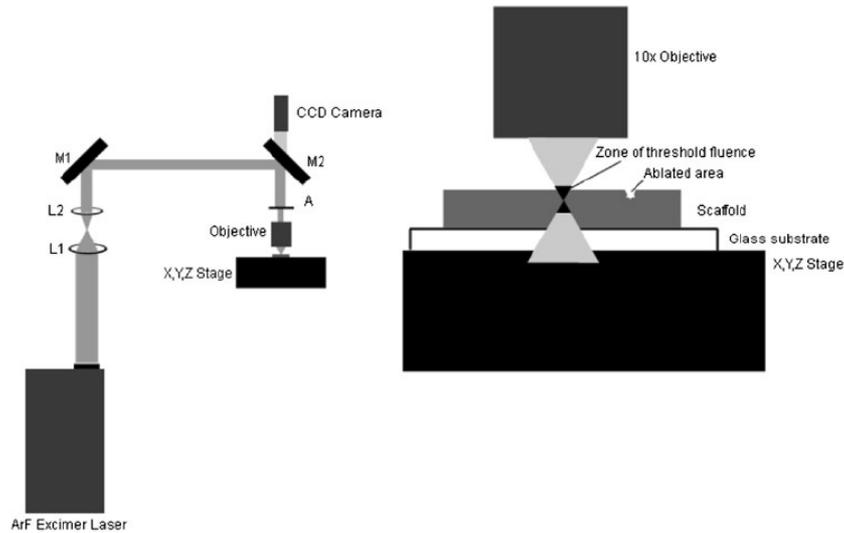


Figure 1.30 : Schéma de la technique de patterning par ablation laser utilisée pour faire des pores dans une matrice. A gauche, le schéma optique. Le faisceau d'un laser excimer pulsé est concentré à travers deux lentilles télescopiques (L1 et L2), réfléchi par deux miroirs (M1 et M2), réduit par une ouverture (A) et focalisé sur le haut de la matrice avec un objectif 10X. A droite, zoom sur la platine du microscope, le substrat et l'objectif. Source [67 McCullen]

La technique d'ablation par laser a été utilisée pour faire des motifs en forme de ligne, en retirant localement une couche unique de graphène sur du verre, avant d'appliquer une couche de PDL [68 Lorenzoni]. Des neurones d'hippocampes d'embryons de rat, ensemencés sur cette surface, montrent une préférence, dans leur adhésion et leur pousse, pour les zones où le graphène est présent.

e. Photopatterning

Le photopatterning est une méthode utilisant une insolation de lumière pour retirer localement, selon la forme d'un motif, une couche antiadhésive et ensuite y ajouter des protéines. Une des molécules antiadhésives les plus utilisées est le PEG (Polyéthylène glycol) qui a un très fort effet répulsif pour les protéines et les cellules. Il est constitué de longues protéines appelées brosses de PEG. Elles peuvent être dégradées par une lumière spécifique, souvent sous l'effet d'un photoinitiateur. Un masque ou une projection de lumière contrôlée permet de gérer la localisation et la forme du motif. Le photopatterning, lorsqu'il n'utilise pas de masque, permet de changer facilement de motif. Cette technique sans masque utilise souvent une matrice de micromiroirs (DMD, *Digital Micromirror Device*), ces miroirs sont contrôlés pour former le motif désiré.

Cette technique, basée sur un DMD, a été utilisée pour générer des motifs contenant plusieurs concentrations de protéines, en immobilisant, sur une surface de verre recouverte de BSA (*Bovine Serum Albumin*, albumine de sérum bovin) des molécules marquées par fluorescence via photoblanchiment (*photobleaching*, perte irréversible de fluorescence d'une molécule) (figure 1.31) [69 Waldbaur]. Les auteurs ont montré que les capacités de leur technique, comme la rapidité et la possibilité d'avoir plusieurs niveaux de gris sur un motif, sont supérieures par rapport à celles d'autres techniques de patterning.

Partie 1 : Le guidage axonal et les microtechnologies

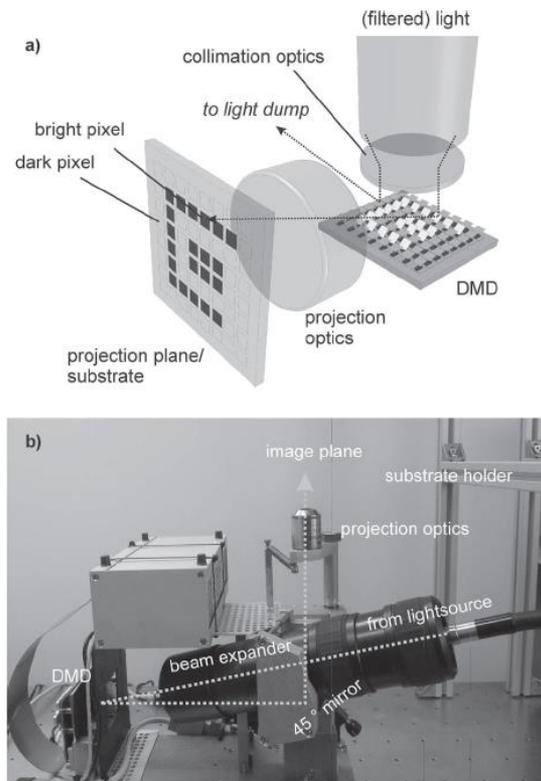


Figure 1.31 : **Schéma et photo du dispositif expérimental.** a) Schéma simplifié du système. La lumière est projetée sur un DMD qui l'envoie, pour les miroirs en position « on », sur l'échantillon. b) Système expérimental avec le chemin optique en pointillé. Pour projeter l'image sur l'échantillon, le support du substrat, sur la droite, est placé au-dessus des optiques de projection. Source [69 Waldbauer]

La technique de photopatterning a beaucoup d'avantages, la rapidité de réalisation des motifs, la possibilité de faire un motif à plusieurs niveaux de gris et donc des gradients et la possibilité de faire des motifs superposés de plusieurs molécules avec une grande précision. C'est pour cela que nous avons utilisé cette méthode de patterning lors des expériences décrites dans cette thèse.

Ces microtechnologies, la microfluidique et le patterning, sont des outils très utiles pour l'étude du guidage axonal. Leur grand avantage est qu'elles permettent de créer des gradients de molécules, pour l'une solubles et pour l'autre adsorbés au substrat.

Pour les expériences réalisées dans ce travail de thèse, j'ai utilisé certains types de ces deux microtechnologies : une technique de photopatterning pour créer des motifs de protéines sur des surfaces antiadhésives et pour polymériser des hydrogels, une technique de microfluidique pour créer un gradient de molécules diffusibles et une technique de coculture de neurones dissociés et de cellules relargant une molécule de guidage.

PARTIE 2 :

Matériel et méthodes

Sommaire

I. Dispositif expérimental LIMAP	- 57 -
II. Protocole de pégylation.....	- 60 -
1. PLL-PEG.....	- 60 -
2. PEG-SVA.....	- 60 -
3. Schott hydrogel.....	- 61 -
III. Fabrication d'une réplique de dispositif microfluidique AXIS	- 62 -
IV. Patterning d'une lamelle	- 62 -
V. Polymérisation d'hydrogels.....	- 65 -
VI. Culture de neurones	- 66 -
VII. Imagerie des neurones vivants.....	- 67 -
VIII. Marquage immunologique	- 67 -
Fixation :	- 67 -
Perméabilisation :	- 67 -
Marquage :	- 67 -
IX. Electroporation.....	- 68 -
X. Autre matériel utilisé dans les expériences	- 69 -

Dans cette partie, nous allons décrire les méthodes ainsi que le matériel utilisés pour ce travail de thèse.

I. Dispositif expérimental LIMAP

La description et le protocole d'utilisation générale du dispositif expérimental LIMAP peuvent se retrouver dans [70 Strale].

Le dispositif expérimental du LIMAP (*Light Induced Molecular Adsorption of Proteins*, adsorption moléculaire de protéines induite par la lumière) a été imaginé et construit par des personnes de l'équipe avant mon arrivée. Il permet de faire des motifs (*patterns*) de molécules adsorbées sur une lamelle de verre. Grâce à celui-ci, je peux faire des motifs de protéines d'adhésion, comme la laminine, pour ensuite faire pousser des neurones sur ces derniers.

Ce dispositif expérimental est constitué d'un microscope inversé à épifluorescence Nikon Ti-E (Nikon Instrument, Champigny sur Marne, France), d'une caméra EMCCD 512 X 512 pixels Evolve 512 (Photometrics, Tucson, AZ, USA), d'un DMD (*Digital Micromirror Device*, matrice de micromiroirs, Texas Instrument DLP Discovery), d'un laser UV continu d'une longueur d'onde de 375 nm et d'une puissance maximum de 70 mW (*iBeam smart-Compact Diode Laser*, Toptica Photonics AG, Graefelding, Germany), d'un diffuseur holographique d'angle 10° et de 50 mm de diamètre (Edmund Optics, York, UK), de deux lentilles 20 mm bi-convexe silice fondue UV (*UV Fused Silica bi-convex*, Thorlabs, Newton, NJ, USA) et de deux miroirs diélectriques qui ont une couche de protection pour les UV (*UV-coated*) BB2-E01 (Thorlabs). Le DMD est une matrice de 1920 X 1080 micromiroirs, d'une taille de 10,8 X 10,8 μm chacun, pouvant indépendamment passer d'une orientation de -12° à une autre de +12° par rapport à la surface du DMD. La fréquence maximale de chaque miroir, autour de 10 kHz, permet de générer des motifs binaires indépendants, à haut débit. La fenêtre du DMD est couverte d'argon pour une meilleure transmission entre 320 et 400 nm (UV). L'un des principaux points critiques de ce dispositif expérimental est l'alignement correct du DMD avec le chemin optique défini par le microscope.

Le faisceau laser UV continu est focalisé par une lentille 20 mm sur le diffuseur holographique pour obtenir une distribution de lumière homogène et sans speckle. Après le diffuseur, une autre lentille, identique à la première, est placée pour étendre le faisceau laser, le collimer, le rendre homogène et de 2cm de diamètre. Il est alors envoyé sur le DMD avec un angle d'incidence correspondant au double de l'angle d'inclinaison des miroirs du DMD (24°) en utilisant une paire de miroirs diélectriques. En fonction de l'orientation de chaque micromiroir, contrôlée par ordinateur et indépendante, l'image modulée spatialement est amenée sur le chemin d'illumination arrière du microscope, à travers un système relai d'imagerie 4f (lentilles f_1 , f_2 et f_3 , $f_1 = f_2 = 150$ mm bi-convexe silice fondue UV, et $f_3 = 200$ mm tube de lentille bi-convexe silice fondue UV, Thorlabs) qui ne change pas le grossissement de l'image. Un diaphragme d'ouverture est centré sur le plan focal de f_1 et f_2 pour isoler l'ordre de diffraction central du DMD. Le plan miroir du DMD est conjugué avec le plan image du microscope, après réflexion sur un miroir dichroïque UV haute réflexion en dessous de 405 nm et haute transmission dans toute la gamme visible (Semrock, IDEX Corporation Lake Forest, IL, USA), placé dans la tour à filtre du microscope (figure 2.1).

Partie 2 : Matériel et méthodes

La taille de chaque miroir du DMD est de $10,8 \times 10,8 \mu\text{m}$, dans le plan image la taille de miroir équivalente est égale à $10,8 \mu\text{m}$ divisé par M , où M est le grossissement de l'objectif : 10X (Nikon Plan Fluor) et 20X (Nikon Plan Apo Vc) pour mes expériences. Tous les motifs d'illumination UV sont projetés en tant qu'image binaire de 758×758 pixels. Dans cette condition, et indépendamment de M , le champ d'illumination UV du DMD correspond au champ de vue de notre caméra EMCCD 512×512 pixels. La taille réelle du motif UV plein champ projeté sur le plan de l'échantillon du microscope dépend uniquement de M , et est égale à $820 \times 820 \mu\text{m}$ pour $M = 10\text{X}$ et $410 \times 410 \mu\text{m}$ pour $M = 20\text{X}$. Les motifs d'illumination en nuances de gris, codés sur 8 bits, sont projetés comme une séquence de 255 images binaires, générées à partir d'une image TIFF 8 bits, non compressée, de 758×758 pixels. Cette séquence d'images est générée de telle sorte que chaque pixel de l'image d'origine, avec un niveau de gris n , avec $0 < n < 255$, est en position « on » pour les n premières images de la séquence et en position « off » pour les $255 - n$ motifs suivants. La puissance d'illumination dans le champ de vue entier du microscope, pour un motif entièrement blanc ($n = 255$) de 758×758 pixels, est mesurée pour chaque objectif. Elle est de 7,8 et 6,47 mW pour les objectifs 10X et 20X respectivement, à la puissance maximum du laser (70 mW). La dose d'illumination peut ainsi être contrôlée indépendamment pour chaque pixel du champ de vue.

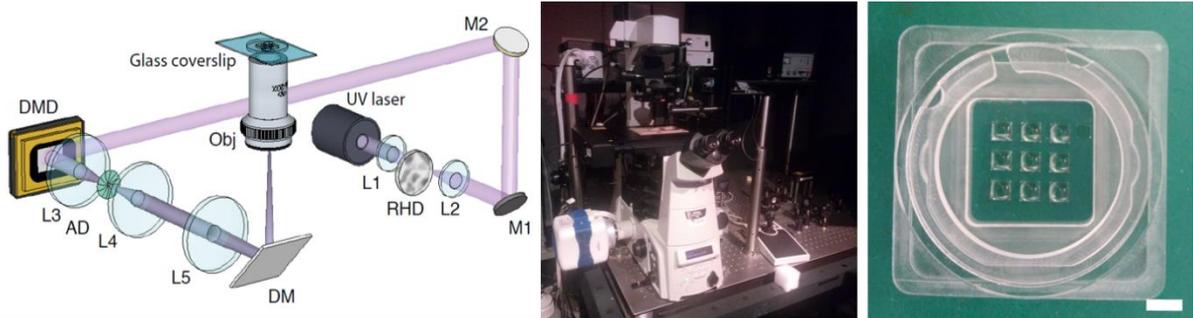


Figure 2.1 : **Schéma optique et photo du dispositif expérimental LIMAP et photo d'une lamelle.** A gauche, le schéma optique du système LIMAP. L1, L2, L3, L4 et L5 : lentilles. M1, M2 : miroirs. RHD : diffuseur holographique. AD : diaphragme d'ouverture. DM : miroir dichroïque. Obj : objectif. Au centre, la photo du dispositif expérimental. Sur la gauche est présent le microscope sur lequel est branchée la caméra et sur la droite, sur la table optique, sont présents le laser ainsi que les éléments optiques mettant en forme le faisceau laser. A droite, la photo d'une lamelle 9 puits dans un porte-échantillon. Echelle 5 mm. Source du schéma optique [68 Strale]

Ce système est contrôlé par un programme Matlab, permettant de gérer le laser et le DMD, développé dans l'équipe, ainsi que par MetaMorph pour la partie imagerie (microscope et caméra) (figure 2.2).

Partie 2 : Matériel et méthodes

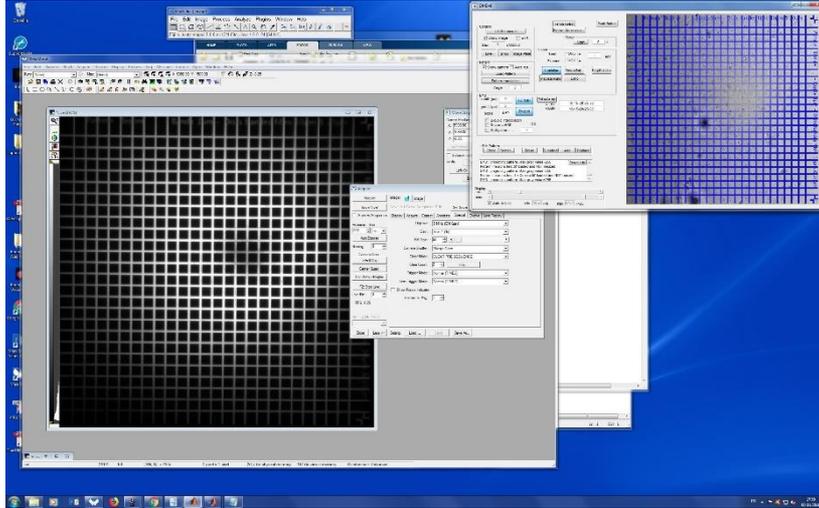


Figure 2.2 : Image de l'écran d'ordinateur sur lequel sont visibles les logiciels contrôlant le dispositif expérimental LIMAP. En haut à droite, la fenêtre du programme Matlab qui contrôle le laser et le DMD, le motif projeté sur le DMD est en bleu. A gauche, la fenêtre du logiciel MetaMorph qui gère la caméra et le microscope, l'image captée par la caméra est le motif projeté sur une lamelle de verre.

Une version de ce système de patterning est commercialisé par la société Alvéole (Paris, France), sous le nom de PRIMO, qui est contrôlé par le logiciel Leonardo développé par l'entreprise. Certaines expériences réalisées lors de ce travail de doctorat l'ont été avec un système PRIMO, qui est basé sur le même schéma optique et a des caractéristiques similaires au LIMAP.

II. Protocole de pégylation

La pégylation consiste à créer une couche de Poly Ethylène Glycol (PEG) dont les broches sont greffées sur un substrat. Cette couche est antiadhésive autant pour les protéines que pour les cellules. Les procédures suivantes sont réalisées en salle blanche.

1. PLL-PEG

Des lamelles de verre 22 X 22 mm NEXTERION #1.5H Glass D263 (SCHOTT Technical Glass Solution, Jena, Allemagne) sont utilisées. Les lamelles sont activées grâce à 5 min de traitement au plasma d'air (Harrick Plasma, Ithaca, NY, USA). Un carré de Poly(diméthylsiloxane) (PDMS) de 20 X 20 mm et de 250 μm d'épaisseur avec 9 trous carrés de 3 X 3 mm (pochoir) est découpé dans un film de silicone transparent (BISCOHT-6240, Rogers Corporation Carol Stream, IL, USA) avec un Robo Craft « *Pro vinyl cutter* » (Graphtec, Irvine, CA, USA) et placé sur la lamelle. Elle est alors appelée **lamelle à 9 puits** (figure 2.1 droite). Dans chaque puits de 3 X 3 mm, 5 μl d'une solution de Poly-L-lysine-graft-Poly(éthylène glycol) (PLL-g-PEG (PLL(20)-g[3,5]-PEG(5)), SuSoS AG, Dübendorf, Suisse) à 0,1 mg/ml dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) est incubé pendant 1 h (figure 2.3). Chaque puits de la lamelle est rincé 3 fois au PBS.

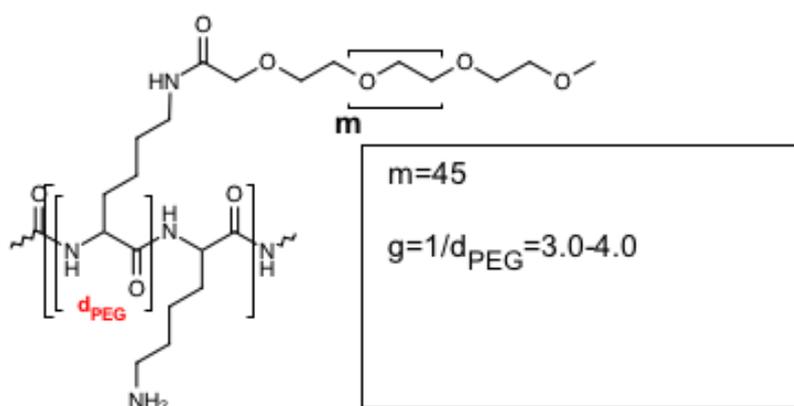


Figure 2.3 : **Schéma moléculaire du PLL(20)-g[3,5]-PEG(5)**. La fonction PLL a une masse molaire de 20 kDa et la fonction PEG une masse molaire de 5 kDa. Source www.susos.com

2. PEG-SVA

Le début du protocole précédent est utilisé, jusqu'à obtenir les **lamelles à 9 puits** (figure 2.1 droite). Ensuite les lamelles sont placées dans une enceinte fermée avec 50 μl de (3-Aminopropyl)triéthoxysilane (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) et un

dessiccateur (Sigma-Aldrich) pendant une heure au minimum. Une solution de Poly(éthylène glycol)-Succinimidyl Valerate, MW 5000 Da (PEG-SVA, Laisan Bio, Arab, AL, USA) à 228,6 mg/ml dans du tampon carbonate à 10 mM pH>8, est incubée dans chaque puits pendant 1 h (figure 2.4). Chaque puits de la lamelle est rincé 3 fois au PBS.

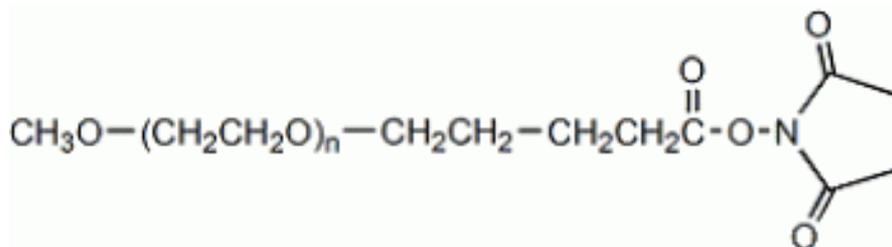


Figure 2.4 : Schéma moléculaire du PEG-SVA. Source www.nanocs.net

3. Schott hydrogel

Une lamelle rectangulaire NEXTERION slide H (SCHOTT Technical Glass Solution), qui est recouverte d'une couche d'hydrogel de PEG (figure 2.5), est découpée avec une pointe de diamant pour obtenir une lamelle de 22 X 22 mm. Un carré de PDMS de 20 X 20 mm et de 250 μm d'épaisseur avec 9 trous carrés de 3 X 3 mm est découpé dans un film de silicone transparent avec un Robo Craft « *Pro vinyl cutter* » et placé sur la lamelle. Dans chaque puits de 3 X 3 mm, 5 μl d'une solution de PBS sont incubés pendant 10 min, pour hydrolyser les groupes fonctionnels NHS (N-Hydroxysuccinimide).

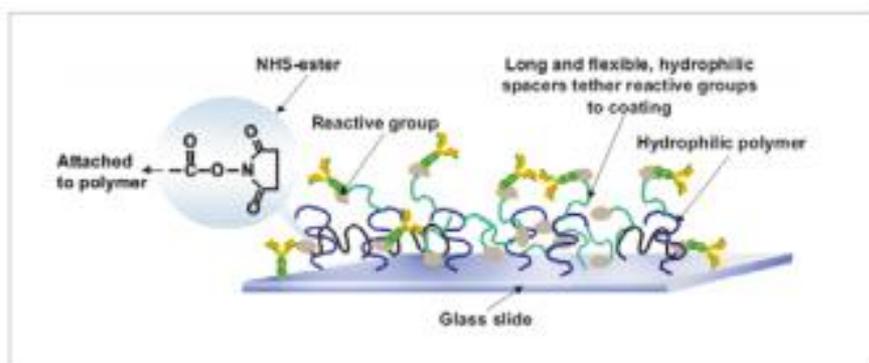


Figure 2.5 : Schéma des molécules composant la couche d'hydrogel. Source www.schott.com

Ces trois protocoles ont été utilisés de manière chronologique au cours de l'avancement de ma thèse. Lors de mon arrivée dans le laboratoire, le protocole utilisant du PLL-PEG était employé. Nous avons plus tard mis au point le protocole utilisant le PEG-SVA, qui offre une meilleure isolation des axones sur des motifs de laminine. Nous avons ensuite utilisé des lamelles schott hydrogel avec lesquelles nous observé la meilleure isolation des axones sur des motifs rectilignes de laminine.

III. Fabrication d'une réplique de dispositif microfluidique AXIS

Pour fabriquer notre dispositif, nous avons moulé un dispositif AXIS commercial (Millipore, Burlington, MA, USA) avec de la colle photosensible NOA (*Norland Optical Adhesive*, Norland Products, Cranbury, NJ, USA), en injectant cette colle dans un dispositif AXIS posé sur une lame de verre. Après insolation aux UV la colle durcit et après avoir retiré le dispositif on obtient un moule de celui-ci. Du PDMS (Sylgard, Dow Corning, Midland, MI, USA) est coulé sur le moule et après 1 h au four à 70°C il est démoulé. Le dispositif en PDMS ainsi formé est activé 5 min au plasma d'air en même temps qu'une lamelle de verre 22 X 22 mm. Le dispositif est posé sur la lamelle, sur laquelle il adhère. Rapidement, 20 µl d'une solution de PLL-PEG à 0,1 mg/ml dans du PBS sont ajoutés et incubés pendant 1 h. Le dispositif est rincé 5 fois au PBS.

IV. Patterning d'une lamelle

Une lamelle pégylée à 9 puits de 22x22mm est placée dans un porte échantillon en plexiglas fabriqué dans le laboratoire (figure 2.6 étape 1). Celui-ci est positionné sur la platine du microscope. 5 µl d'une solution de photoinitiateur 4-benzoylbenzyl-triméthylammonium chloride (synthèse customisée par Sigma-Aldrich sous-traitée à SinoChem, China) à 14,5 mg/ml dans du PBS sont incubés dans un puits (figure 2.6 étape 2). Un motif est insolé aux UV (figure 2.6 étape 3). Les molécules du photoinitiateur, activées par les UV, clivent localement les chaînes de PEG, d'une manière dépendante de la dose d'UV et de la concentration du photoinitiateur. Après un rinçage au PBS, 5 µl de la protéine d'intérêt sont incubés (figure 2.6 étape 4). La protéine va s'adsorber sur la zone qui a été exposée aux UV. Ensuite la protéine est rincée trois fois au PBS. Une deuxième étape de patterning et incubation de protéine peut être réalisée, si nécessaire (figure 2.6 étapes 5 et 6).

Ce protocole est adaptable à différentes tailles de puits, en modifiant les volumes de photoinitiateur puis de protéine à incuber.

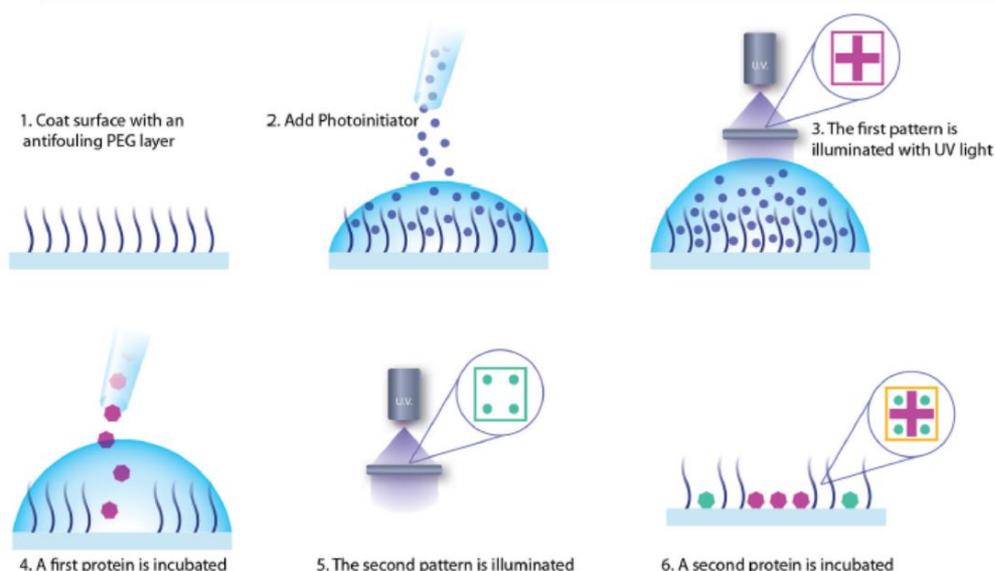


Figure 2.6 : **Schéma des différentes étapes de patterning.** Etape 1 : une lamelle recouverte d'une couche de PEG est utilisée. Etape 2 : une solution de photoinitiateur est ajoutée. Etape 3 : un premier motif, ici en forme de croix, est insolé aux UV. Etape 4 : la première protéine d'intérêt est incubée, elle se fixe sur les zones révélées par l'insolation. Etape 5 : Un deuxième motif est insolé. Etape 6 : la deuxième protéine est incubée, elle se fixe sur les nouvelles zones révélées par la deuxième insolation. Source [69 Strale]

Les rayons UV agissent sur la benzophénone (le photoinitiateur) en créant des radicaux libres qui initient le processus de dégradation du polymère [71 Pinto]. Ces radicaux combinés à l'oxygène clivent les chaînes de polymères. Les auteurs [71 Pinto] ont décrit et quantifié cette réaction de photodégradation sur un polymère plastique, le polystyrène. La même réaction se produit avec les brosses de PEG.

La réaction supposée de photoscission est présentée en figure 2.7. Sous l'effet des UV, des radicaux sont créés sur la benzophénone. Celle-ci réagit avec le PEG pour lui arracher un hydrogène et ainsi former un radical. Le PEG radicalaire réagit ensuite avec une molécule de dioxygène qui se lie sur le PEG au niveau du radical. Des réactions similaires ont été montrées par d'autres équipes [71 Pinto]. La suite de la réaction est une supposition de notre part. Un atome d'hydrogène pourrait s'ajouter au niveau du dioxygène sur cette molécule. Enfin les liaisons pourraient se réorganiser pour couper la molécule de PEG et donner une terminaison vinyloxy d'un côté et une fonction alcool de l'autre ainsi qu'une molécule de dioxygène (figure 2.7).

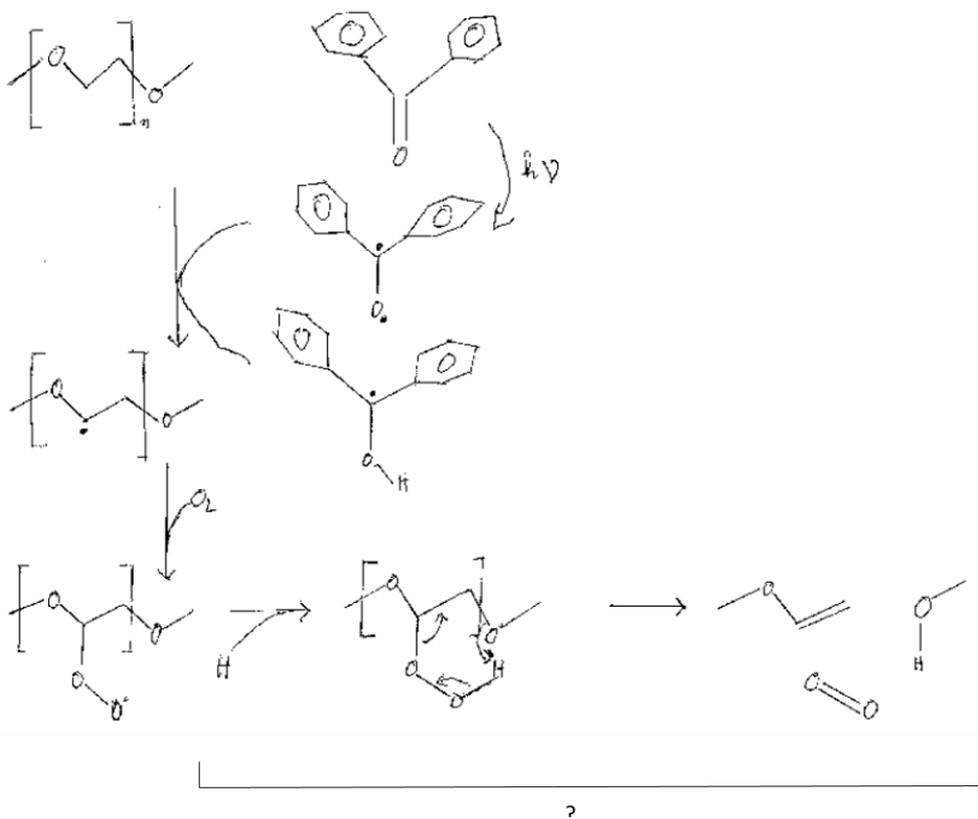


Figure 2.7 : Réaction supposée de photocission du PEG par les UV, la benzophénone et le dioxygène. Les UV créent des radicaux sur la benzophénone qui en forme un sur le PEG par réaction. Sur l'atome de carbone du PEG portant le radical une molécule de dioxygène vient se fixer. Nous supposons ensuite qu'un atome d'hydrogène vient s'ajouter sur l'oxygène puis que les liaisons se réarrangent pour couper la molécule de PEG et libérer une molécule de dioxygène.

Pour les premières expériences nous n'avons pas imposé d'environnement spécifique à la lamelle lors de l'étape d'insolation et nous avons parfois observé une déplétion au centre du motif (zone où les protéines n'adhèrent pas), surtout sur les motifs ayant une grande surface et à forte puissance d'insolation aux UV (plus de 1000 mJ/mm^2) (figure 2.8 A). Nous avons résolu ce problème en perfusant de l'oxygène ou du carbogène pendant l'insolation grâce à un couvercle de boîte de pétri 35 mm, percé pour laisser passer un petit tuyau amenant de l'oxygène ou du carbogène (mélange de O_2 à 95% et CO_2 à 5%), emboîté sur le porte échantillon (figure 2.8 B). Sans apport supplémentaire d'oxygène que celui présent dans l'air environnant, la réaction de photodégradation ne pouvait pas avoir lieu sur toute la surface du motif par manque d'oxygène.

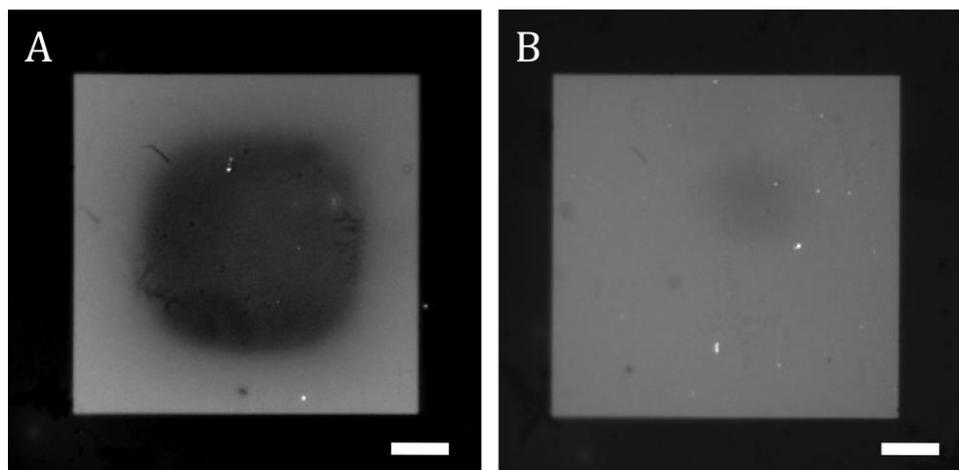


Figure 2.8 : **Images en fluorescence d'un motif de protéine A 647 en forme de carré insolé** A) à l'air, B) sous carbogène. Barre d'échelle 100 μm .

V. Polymérisation d'hydrogels

Un certain volume, suivant la hauteur de l'hydrogel désirée, d'une solution de 4-arm PEG Acrylate MW 10 000 (Laysan Bio Inc, Arab, AL, USA) à 5 mg/ml et de photoinitiateur à 7,25 mg/ml, est ajouté dans un puits d'une lamelle pégylée. Un motif, correspondant à la forme de l'hydrogel voulue, est insolé. L'action des UV sur la solution d'hydrogel et de photoinitiateur la polymérise. La perfusion d'argon réduit fortement la concentration d'oxygène, ce qui permet de polymériser l'hydrogel plus rapidement et sur la hauteur totale de la solution. Ensuite la solution non polymérisée doit être rincée au minimum cinq fois au PBS.

L'oxygène a un effet ralentisseur sur la photopolymérisation d'hydrogels. Sa présence induit une zone morte (*dead zone*) située dans la partie haute de la solution d'hydrogel, dans laquelle l'hydrogel ne peut pas polymériser. La hauteur de cette zone dépend de la concentration en oxygène [72 Pasturel] [73 Tumbleston]. Par contre l'oxygène a un effet accélérateur sur la photoscission des chaînes de PEG.

VI. Culture de neurones

Les principales cellules utilisées pour les expériences réalisées pendant ce doctorat sont des neurones dissociés d'hippocampe d'embryon de rat. Des embryons de rat E18 sont disséqués pour récupérer l'hippocampe, les neurones de celui-ci sont dissociés, d'abord dans de la trypsine (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) à 0,05% puis mécaniquement à l'aide d'une pipette pasteur, avant d'être ensemencés sur une lamelle de verre patternée avec des protéines d'adhésion, dans du milieu neurobasal complet [neurobasal (Gibco) complété avec du supplément neuronal SM1 (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada), et de la glutamine (Gibco)] avec les antibiotiques pénicilline et streptomycine (PS, Gibco).

Pour une partie du projet, des expériences de coculture de cellules COS-7 et neurones dissociés ont été réalisées. Des cellules COS-7 (lignée de cellules fibroblastes originaires de rein de singe, Thermo Fisher Scientific) sont électroporées avec un plasmide codant pour la nétrine-1 et un plasmide codant pour la GFP (voir IX Electroporation, page 66). Elles sont ensuite ensemencées sur une lamelle contenant un motif de fibronectine (Sigma-Aldrich) dans du milieu DMEM (Gibco). Après un jour à l'incubateur des motifs de protéines d'adhésion sont réalisés à côté des cellules COS. Des neurones dissociés d'hippocampe sont alors ensemencés dans du milieu neurobasal complet contenant les antibiotiques pénicillines et streptomycine.

Pour une expérience, nous voulions avoir des cellules gliales en même temps que les neurones d'hippocampe. Pour cela, nous avons ensemencé les mêmes neurones d'hippocampe dans du milieu neurobasal complet dans lequel nous avons ajouté 3% de sérum de cheval (*Horse serum*) (Gibco). Ce milieu permet aux glies se trouvant avec les neurones après la dissection, de proliférer en même temps que les neurones. Dans du milieu neurobasal complet seul, les glies meurent et seuls les neurones prolifèrent.

Des explants de cortex de rat E18 ont aussi été utilisés, provenant des mêmes embryons de rat. Les cortex sont obtenus par dissections et découpés pour obtenir des explants d'environ 150 μm de diamètre qui sont positionnés à l'aide d'une paire de pinces sur des motifs de laminine présents sur une lamelle de verre, dans le même milieu que pour les neurones dissociés.

VII. Imagerie des neurones vivants

Les neurones vivants, dissociés ou explants, sur les lamelles de verre sont imagés avec un dispositif de microscopie à contraste de phase. Il est constitué d'un microscope inversé à épifluorescence Nikon Ti-E équipé d'une lumière blanche et d'un condenseur, avec un objectif à contraste de phase 20X (Nikon Plan Fluor) ou 10X (Nikon Plan Fluor), placé dans un incubateur The Box (Life Imaging Services, Bâle, Suisse) pour contrôler la température (37°C), l'humidité (100%) et la concentration de CO₂ (5%) et d'une caméra EMCCD 512 X 512 pixels Evolve 512.

VIII. Marquage immunologique

Fixation :

La lamelle sur laquelle sont les cellules est rincée au Tyrode (solution de D+ glucose, NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂ et HEPES). Les cellules sont ensuite fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4% (Sigma-Aldrich) pendant 12 min. Puis 3 rinçages au PBS sont effectués.

Perméabilisation :

Une solution de Triton x100 0,1% (Sigma-Aldrich) et BSA (albumine de sérum bovin, *Bovine Serum Albumin*) 1% (Sigma-Aldrich) dans du PBS est incubée pendant 30 min. Le Triton permet de rendre perméables les membranes des cellules. La BSA bloque les interactions non spécifiques.

Marquage :

L'anticorps primaire, dans une solution de BSA 1% dans PBS, à la dilution souhaitée, est incubé pendant la nuit (*overnight*) à 4°C. 3 rinçages au PBS sont effectués. L'anticorps secondaire, à la dilution souhaitée dans la solution de BSA, est incubé 1h à température ambiante. 3 rinçages au PBS sont effectués.

La lamelle, avec les cellules fixées et marquées, peut être stockée pendant plusieurs mois dans du PBS à 4°C.

Les cellules sont ensuite imagées avec le même système que pour les neurones vivants avec en plus des lasers pour exciter la fluorescence des anticorps.

IX. Electroporation

Dans certaines expériences des explants sont mis en coculture avec des cellules COS-7 exprimant la nétrine. Pour cela, les cellules sont électroporées pour qu'elles incorporent de l'ADN codant pour la nétrine-1 et qu'ainsi elles sécrètent de la nétrine-1. Elles sont coélectroporées avec un plasmide codant pour la GFP pour visualiser les cellules ayant incorporées l'ADN de nétrine-1. Le plasmide codant pour la nétrine-1 est pGNET1-myc pMT21, c'est un don de Sonia Garel (IBENS, Paris) et celui codant pour la GFP est α cat GFP WT. L'électroporation est une technique de transfection qui consiste à faire des pores dans les cellules pour permettre à de l'ADN d'entrer dans les cellules.

Les cellules à électroporer, qui sont dans une flasque, sont comptées. Le milieu est aspiré puis les cellules sont rincées au PBS ou au milieu de culture sans sérum. 2 ml de trypsine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) sont ajoutés avant que la flasque ne soit mise à l'incubateur pendant environ 10 min. La trypsine va couper les protéines membranaires d'adhésion des cellules. Lorsque les cellules sont décollées de la boîte, au moins 4 ml de milieu DMEM (Gibco) contenant du sérum de veau foetal (SVF) (Eurobio, Les Ulis, France) est ajouté. Le sérum contenant des protéines en excès par rapport aux protéines membranaires, inhibe l'effet de la trypsine sur ces dernières. Ce milieu est aspiré puis soufflé sur la flasque pour décoller le maximum de cellules. Le milieu contenant les cellules est mis dans un tube de 15 ml. Il est centrifugé 5 min à 1000 RPM. Le milieu est aspiré sans que le culot ne le soit. Le culot est resuspendu dans du milieu d'électroporation (Cell line nucleofector kit, Lonza, Bâle, Suisse), puis l'ADN est ajoutée. Il faut 1 million de cellules dans 100 μ l de milieu avec 1 μ g d'ADN. 100 μ l de ce milieu contenant les cellules et l'ADN sont mis dans une cuve d'électroporation, l'électroporation est faite avec la machine Amaxa Nucleofector II (Lonza) en utilisant le programme COS-7 W001 (le constructeur ne communique pas les paramètres de ses programmes). Rapidement quelques centaines de μ l de milieu DMEM contenant du sérum sont ajoutés. Les cellules peuvent ensuite êtreensemencées.

X. Autre matériel utilisé dans les expériences

Lors de mes expériences, en plus des molécules citées précédemment, j'ai utilisé les protéines suivantes :

- rmNétrine-1 (R&D systems, Mineapolis, MN, USA)
- rmSlit1 (R&D systems)
- rmEphrineA5/Fc (R&D systems)
- rmSémaphorine3A/Fc (R&D systems)
- Laminine (*Laminin from EHS sarcoma (mouse)*) (Roche, Mannheim, Allemagne)
- PLL-PEG TritC (SuSos AG, Dübendorf, Suisse)
- Protéine A couplée au fluorophore Alexa647 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Fibrinogène couplé au fluorophore Alexa488 (Thermo Fischer Scientific)
- Laminine (Roche) conjuguée avec le fluorophore Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific)
- GFP (Sigma-Aldrich)
- Dextran (*Tetramethylrhodamine neutral dextran*) (Thermo Fisher Scientific)

Partie 2 : Matériel et méthodes

PARTIE 3 :

Résultats

Sommaire

I. Isoler les axones de neurones dissociés	- 76 -
1. Isoler les axones par des motifs chimiques.....	- 76 -
2. Isoler les axones par des barrières physiques	- 79 -
II. Améliorer la sensibilité au gradient	- 81 -
1. Améliorer la précision des gradients - utilisation de gradients patternés	- 81 -
<i>a. Gradients patternés d'éphrine et sémaphorine</i>	<i>- 82 -</i>
<i>b. Gradients patternés dans dispositif AXIS</i>	<i>- 84 -</i>
<i>c. Motifs serrure et roue avec gradient.....</i>	<i>- 87 -</i>
<i>d. Hydrogels autour du motif serrure.....</i>	<i>- 89 -</i>
<i>e. Motif gradient d'éphrine.....</i>	<i>- 92 -</i>
2. Augmenter la durée d'exposition au gradient.....	- 94 -
<i>a. Dispositif microfluidique avec membrane en hydrogel.....</i>	<i>- 94 -</i>
<i>b. Neurones en coculture avec des cellules COS.....</i>	<i>- 96 -</i>
III. Neurones et glies sur grilles de laminine.....	- 103 -

Pour réaliser cette thèse nous nous sommes basés sur des travaux faits dans notre équipe par Isabelle Dupin [35 Dupin] et avons voulu améliorer la méthode utilisée dans ces travaux. Ils consistaient à exposer des neurones à des gradients solubles de nétrine-1 et slit1 et d'étudier leurs réactions à ces gradients en termes de vitesse et de direction de pousse. Les gradients étaient générés dans un dispositif microfluidique en forme de Y dans lequel les neurones sont dans une chambre séparée de l'écoulement par une membrane (figure 3.1). Ces expériences ont permis de montrer qu'une faible concentration de slit1 activait la réponse chimiotactique d'un gradient de nétrine-1 de faible concentration maximum (100 ng/ml) sur des axones hippocampiques et thalamiques.

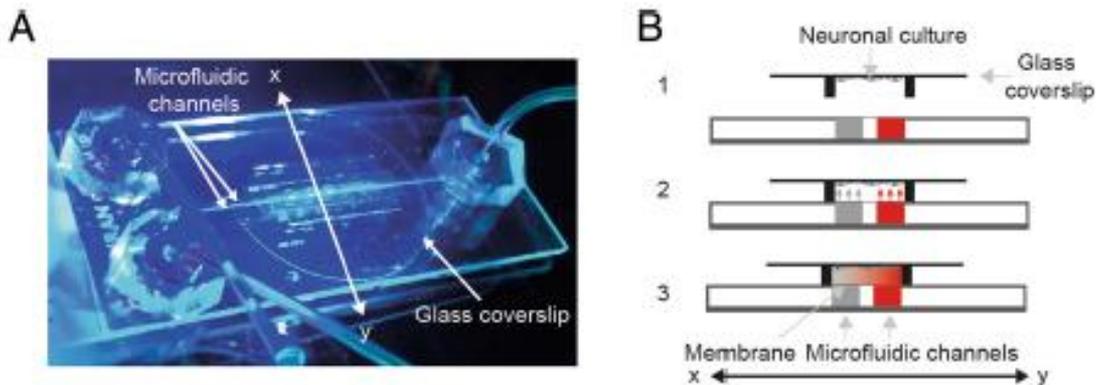


Figure 3.1 : **Schéma du dispositif microfluidique.** A) Vue du dessus du dispositif. Il est composé de deux microcanaux qui lui donnent une forme de Y. B) Vue de côté du dispositif. Les neurones sont cultivés dans un micropuits et la lamelle de culture neuronale est mise en contact avec les microcanaux à travers une membrane poreuse permettant la diffusion de molécules de guidage, lors de l'expérience. Un gradient se forme dans le micropuits. Source [35 Dupin]

Les résultats de ces expériences sont encourageants mais les réponses observées restent faibles et très bruitées. Au-delà de la variabilité biologique intrinsèque aux échantillons, des limitations du système expérimental peuvent en être la cause :

- 1) le nombre de cônes de croissance isolés est trop petit.
- 2) l'effet de réponse des neurones est trop faible. Ce dernier point peut avoir deux origines : les gradients de molécules de guidage sont trop variables (dans le temps et/ou dans l'espace) et/ou le temps d'exposition au gradient est trop court.

Nous avons cherché, dans ce travail de thèse, à développer de nouvelles méthodes pour dépasser ces deux limitations.

L'obtention de cônes de croissances isolés en nombre suffisant est une problématique importante et compliquée. Nous souhaitons obtenir des cônes de croissance isolés pour pouvoir étudier leur mobilité propre et ainsi le guidage axonal plus généralement. Des obstacles à l'obtention de cônes isolés sont le *crossstalk* (interférence) et la fasciculation (axone qui pousse le long d'un autre axone).

L'utilisation de neurones dissociés d'hippocampe a soulevé un autre problème : il est nécessaire qu'il y ait une grande densité de neurones pour qu'ils survivent [74 Brewer] et poussent bien, mais cette densité importante rend difficile l'obtention de cônes de croissance isolés.

Nous avons donc essayé d'améliorer notre dispositif expérimental afin de contourner ces limitations. Nous l'avons d'abord amélioré pour obtenir plus de cônes de croissance isolés (résultats exposés dans la partie I. Isoler les axones de neurones dissociés).

- Soit en utilisant des motifs (*patterns*) de protéine d'adhésion en forme de grille faits avec le dispositif expérimental LIMAP sur lesquels nous avonsensemencé des neurones dissociés. Ces premiers résultats sont présentés dans la partie I.1 Isoler les axones par des motifs chimiques.
- Soit par l'utilisation d'un dispositif mis au point par [75 Taylor] qui est efficace pour isoler les axones de neurones dissociés. Ces résultats sont présentés dans le paragraphe I.2 Isoler les axones par des barrières physiques.

Pour obtenir des gradients de plus grande précision et stables dans le temps, auxquels nous pouvons exposer les neurones plus longtemps, nous avons réalisé des expériences à l'aide de molécules de guidage patternées ou solubles (résultats exposés dans la partie II. Améliorer la sensibilité au gradient).

Nous avons d'abord utilisé des gradients de molécules patternées, pour qu'ils soient précis (résultats exposés dans la partie II.1 Améliorer la précision des gradients – utilisation de gradients patternés).

Pour commencer nous avons soumis des neurones dissociés à des gradients patternés de molécules de guidage. Ces résultats sont présentés dans la partie II.1.a Gradients patternés d'éphrine et sémaphorine.

Nous avons ensuite réalisé des expériences en utilisant des explants car nous savons que ce modèle fonctionne, il a été utilisé avec succès dans [35 Dupin]. Nous avons vu que les neurones dissociés étaient un modèle intéressant sur des motifs en forme de grille mais il est compliqué de les exposer à un gradient. Les explants génèrent spontanément des cônes de croissance isolés, leurs axones ne subissent pas autant le phénomène de fasciculation auquel les axones de neurones dissociés peuvent être exposés. De plus, pour pouvoir exposer des cônes de croissances à des gradients patternés, il est nécessaire de pouvoir positionner les neurones à proximité de ces gradients pour que seuls les axones soient en contact avec les gradients. Les explants permettent cela. Les premiers résultats utilisant les explants sont présentés dans la partie II.1.c Motifs serrure et roue avec gradient.

Pour nos expériences il est crucial de pouvoir placer les explants avec précision à proximité du gradient car celui-ci est peu étendu. Nous avons développé une méthode de polymérisation d'hydrogels, par notre dispositif LIMAP. Ces derniers sont efficaces pour placer les explants. Ces résultats sont exposés dans la partie II.1.d Hydrogels autour du motif serrure.

Ensuite nous avons cherché à exposer les cônes de croissance à des gradients de molécules de guidage sur des temps longs (quelques jours) en utilisant des gradients solubles de molécules (résultats exposés dans la partie II.2 Augmenter la durée d'exposition au gradient).

Pour cela nous avons développé un dispositif microfluidique avec une membrane en hydrogel, devant permettre d'établir un gradient soluble dans une chambre centrale

Partie 3 : Résultats

dans laquelle sont ensemencés des neurones. Ces résultats sont présentés dans la partie II.2.a Dispositif microfluidique avec membrane en hydrogel.

Finale­ment, toujours dans l'idée de gé­né­rer des gra­di­ents de molé­cules de guidage sur des temps longs, nous avons réalisé des expériences de coculture de neurones dissociés sur des motifs en forme de grille et de cellules COS relargant de la nétrine. Ces résultats sont exposés dans la partie II.2.b Neurones en coculture avec des cellules COS.

Lors des expériences de coculture nous avons observé des cellules qui se déplaçaient sur le motif et connectaient des neurites entre eux. Intrigués par ce phénomène nous avons cherché à identifier la nature de ces cellules. Ces résultats sont présentés dans la partie III. Neurones et glies sur grilles de laminine.

I. Isoler les axones de neurones dissociés

1. Isoler les axones par des motifs chimiques

J'ai tout d'abord voulu vérifier que le dispositif expérimental LIMAP pouvait faire des motifs (*patterns*) de protéines permettant de guider la pousse des neurites. Pour cela, j'ai d'abord fait pousser des neurones dissociés d'hippocampe d'embryon de rat sur des motifs en forme de grille ou de lignes de différentes protéines : PLL-PEG TritC et PLL-PEG TritC avec laminine (figure 3.2). J'ai choisi de faire des motifs de forme rectiligne dans le but de séparer les neurites (surtout l'axone) et les isoler. Les motifs en forme de grille permettent, en plus d'isoler les cônes de croissance, de forcer l'orientation de ces cônes lors de la pousse de l'axone (ils peuvent seulement tourner à gauche ou à droite avec un angle de 90°). Cela permettra, par la suite, d'appliquer des molécules de guidage à ces axones et de mesurer leurs effets. Ces expériences sont réalisées sur des lamelles recouvertes d'une couche de PLL-PEG, que nous appelons lamelles PLL-PEG.

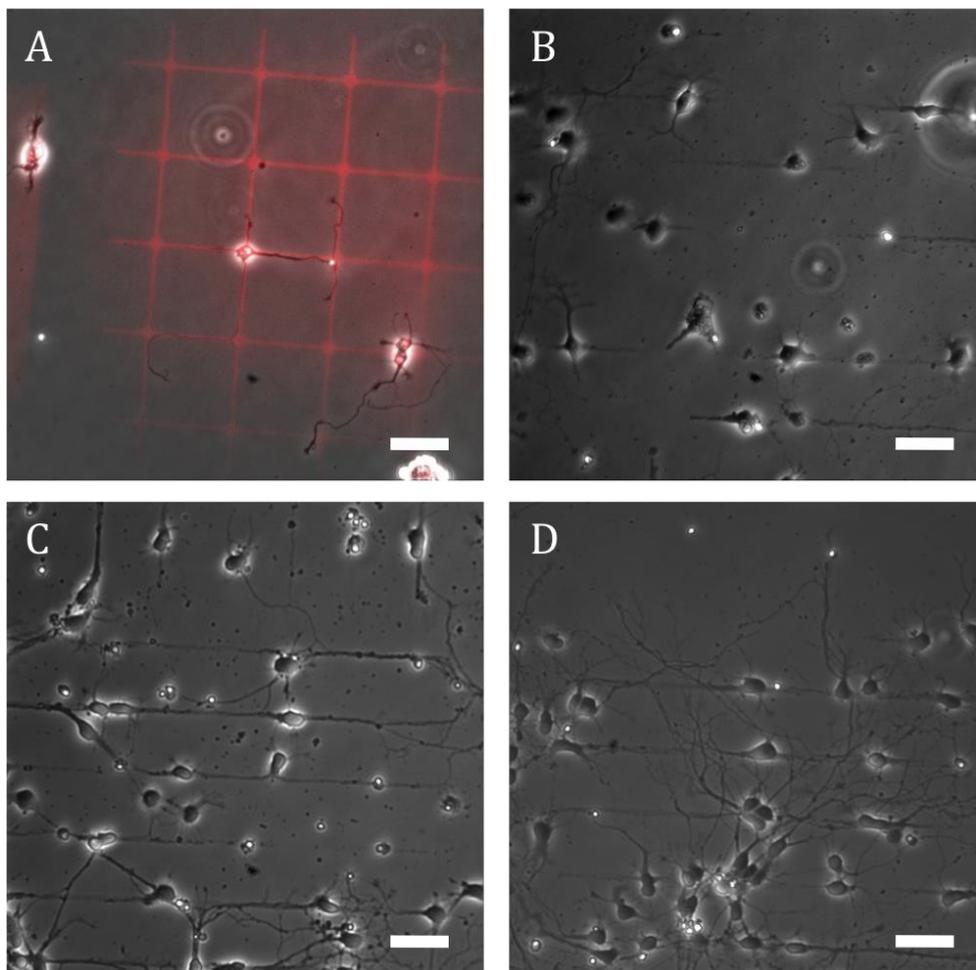


Figure 3.2 : **Images de neurones dissociés sur des motifs en forme de grille ou ligne.** A) Superposition d'images en contraste de phase et en fluorescence (en rouge) de neurones dissociés sur un motif en forme de grilles de PLL-PEG TritC et laminine. B, C, D) Images en contraste de phase de neurones dissociés sur un motif en forme de lignes B) sans protéines, C) de PLL-PEG TritC, D) de PLL-PEG TritC et laminine. Barre d'échelle : 50 µm.

J'ai comparé la pousse et le guidage des neurones dissociés dans quatre conditions différentes (figure 3.2) : deux conditions de forme de motif (grille et lignes) et trois conditions de protéines (sans protéine (figure 3.3 B), PLL-PEG TritC (figure 3.3 C) et PLL-PEG TritC avec laminine (figure 3.3 D)). Les neurones arrivent à adhérer et à pousser spécifiquement sur les motifs dans ces quatre conditions, même si certains neurites passent d'une ligne à l'autre en traversant une zone recouverte de PLL-PEG. Les neurones poussent mieux sur des motifs de PLL-PEG TritC (figure 3.2 C) et de PLL-PEG TritC avec laminine (figure 3.2 D) que sur des motifs sans protéine (figure 3.2 B).

Sur 12 motifs en forme de grille de PLL-PEG TritC et laminine (figure 3.2 A) réalisés sur deux lamelles différentes, 11 ont des neurones qui suivent le motif, aucun neurone n'a adhéré sur le dernier motif. Sur 2 motifs en forme de lignes sans protéines (figure 3.2 B) réalisés sur deux lamelles différentes, les 2 ont des neurones qui suivent le motif. Sur 4 motifs en forme de lignes de PLL-Peg TritC (figure 3.2 C) réalisés sur deux lamelles différentes, les 4 ont des neurones qui suivent le motif. Sur 12 motifs en forme de lignes de PLL-PEG TritC et laminine (figure 3.2 D) réalisés sur deux lamelles différentes, les 12 ont des neurones qui suivent le motif.

Il peut paraître étonnant que les neurones poussent sur le PLL-PEG TritC (figure 3.2 C) alors qu'ils ne poussent pas sur la couche de PLL-PEG. Une explication possible pourrait être que le PLL-PEG TritC s'accroche au substrat, révélé après photoscission du PLL-PEG, par son fluorophore et donc présente en surface la partie PLL sur laquelle les neurones adhèreraient (figure 3.3 C). Une autre interprétation possible est que le PLL-PEG TritC est moins dense, ce qui laisserait la place aux neurones d'adhérer. Ou peut-être que les neurones adhèrent sur le fluorophore. Nous avons d'abord vu que les neurones poussent mal ou très lentement sur des motifs sans protéines (figure 3.2 B). Nous avons donc essayé d'incuber de la PLL, un polypeptide d'adhésion très utilisé pour la culture neuronale, sur ces motifs. Cependant elle se fixe sur toute la surface, sur le motif mais aussi dans les zones recouvertes de PLL-PEG, en dehors du motif (voir figure 3.8). Ainsi les neurones adhèrent et poussent sur toute la lamelle et ne suivent pas les motifs. Nous avons alors essayé d'utiliser une protéine PLL couplée à plusieurs chaînes de PEG et avons observé que les neurones adhéraient et poussaient sur un motif de cette protéine (figure 3.2 C). En ajoutant de la laminine (une protéine d'adhésion favorisant la pousse des neurones) sur les motifs de PLL-PEG TritC on observe que les neurones poussent plus rapidement (figure 3.2 D).

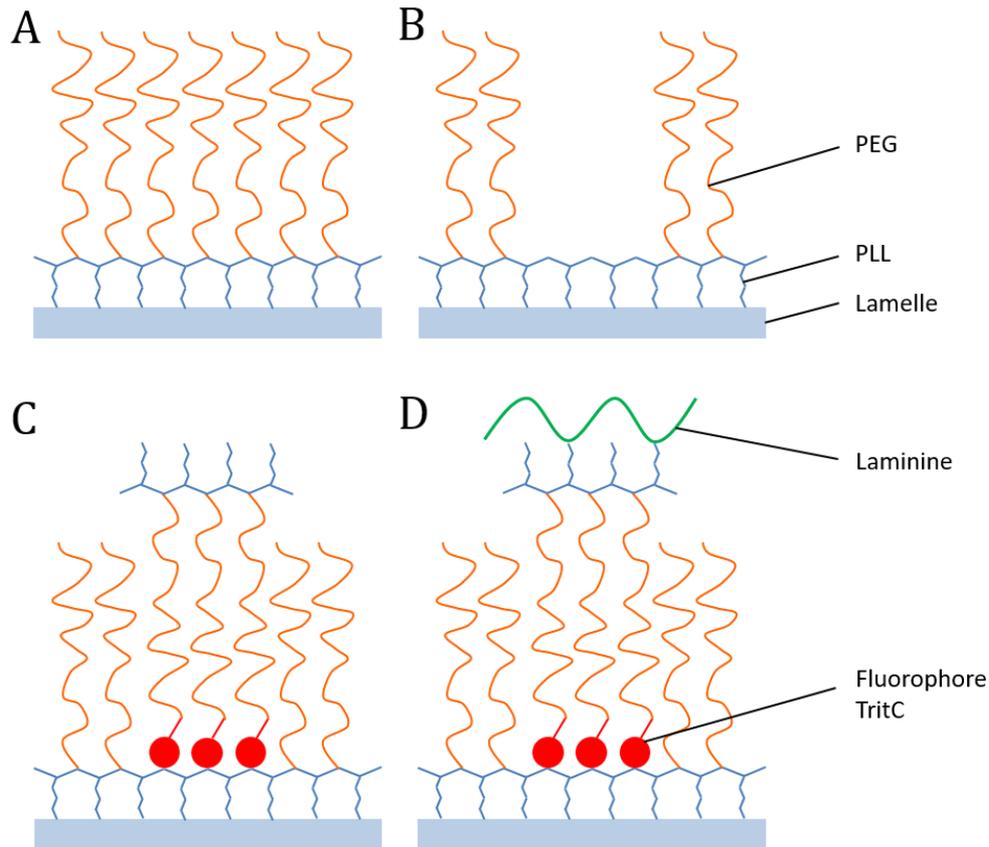


Figure 3.3 : Schéma moléculaire des étapes de patterning du PLL-PEG TritC et de la laminine. A) Lamelle recouverte d'une couche de PLL-PEG. B) Même échantillon après insolation d'un motif. C) Même échantillon après incubation de PLL-PEG TritC. D) Même échantillon après incubation de laminine.

Pour cette expérience, comme la laminine n'est pas directement marquée, nous ne pouvons pas être certains qu'elle soit présente sur les motifs. Cependant, nous observons que les neurones poussent plus rapidement sur des motifs de PLL-PEG TritC avec laminine (figure 3.2 D) que sur des mêmes motifs sans laminine (figure 3.2 C). Ce qui laisse supposer que la laminine est bien présente au niveau des motifs. De plus, nous avons par la suite fait des motifs de laminine conjuguée avec un fluorophore Alexa 488 (voir figures 3.11, 3.13 et 3.16) sur lesquels les neurones suivent les motifs.

Le dispositif expérimental LIMAP permet donc bien de faire des motifs de protéines que les neurones suivent lors de leur pousse. Ces motifs rectilignes permettent d'isoler des axones, même si parfois plusieurs axones fasciculent (poussent le long des autres) sur une seule ligne ou passent d'une ligne à l'autre. Cependant, les neurones dissociés, dans des puits ouverts, ne survivent pas plus de sept jours *in vitro* sur nos motifs et sont assez fragiles, ce qui peut poser un problème pour certaines expériences. De plus, pour étudier le guidage axonal plus facilement il faudra pouvoir positionner les neurones pour appliquer des gradients de molécules de guidage aux axones.

2. Isoler les axones par des barrières physiques

Nous voulions isoler les axones des corps cellulaires des neurones pour pouvoir ensuite appliquer un gradient patterné de protéines d'adhésion ou de molécules de guidage à ces axones. Nous voulions aussi pouvoir amener les axones à un endroit précis, sur ce gradient. Dans ce but, nous avons utilisé une réplique d'un dispositif commercial AXIS, développé par [75 Taylor] (figure 3.4) dans lequel nous faisons pousser des neurones dissociés. Ce dispositif permet de faire pousser les axones dans des microcanaux de 5 μm de haut, 10 μm de large et 450 μm de long pour qu'ils atteignent un autre compartiment et ainsi de séparer les axones des somas, ces derniers ne pouvant pas traverser les microcanaux.

Pour cultiver des neurones dans ce dispositif et faire pousser leurs axones dans les microcanaux et sur des motifs en sortie des microcanaux, après avoir posé le dispositif en PDMS sur une lamelle de verre propre, j'ai incubé de la PLL dans le compartiment supérieur, qui permettra aux somas des neurones d'adhérer, et du PLL-PEG dans le compartiment inférieur. Ensuite, j'ai mis en place les motifs souhaités dans le canal inférieur, en continuité des microcanaux. J'ai, par exemple, fait des motifs de laminine en forme de lignes en continuité des microcanaux, (figure 3.5). Les neurones dissociés sont ensuiteensemencés dans le canal supérieur et une différence de volumes de milieu de culture est mise en place entre les deux compartiments. Un volume plus élevé est mis dans le canal où les neurones ont étéensemencés pour créer un écoulement dans les microcanaux du compartiment supérieur vers le compartiment inférieur et ainsi guider les axones dans les microcanaux lors de leur pousse.

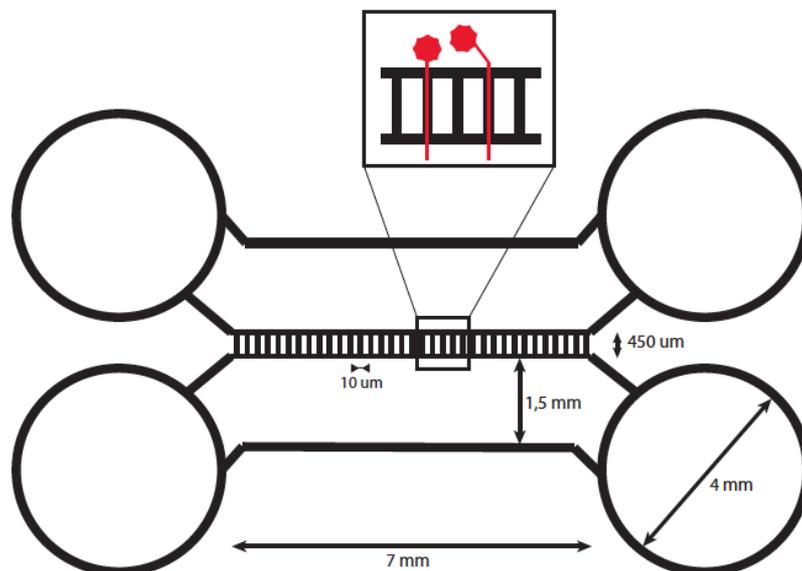


Figure 3.4 : **Schéma du dispositif AXIS.** Les neurones sontensemencés dans le canal supérieur et les axones poussent dans les microcanaux pour atteindre le canal inférieur. Les dimensions caractéristiques du dispositif sont indiquées.

Nous avons commencé par créer des motifs de PLL-PEG TritC et laminine en forme de lignes en continuité des microcanaux (figure 3.5 A). Puis nous avonsensemencé des neurones dissociés dans le canal supérieur.

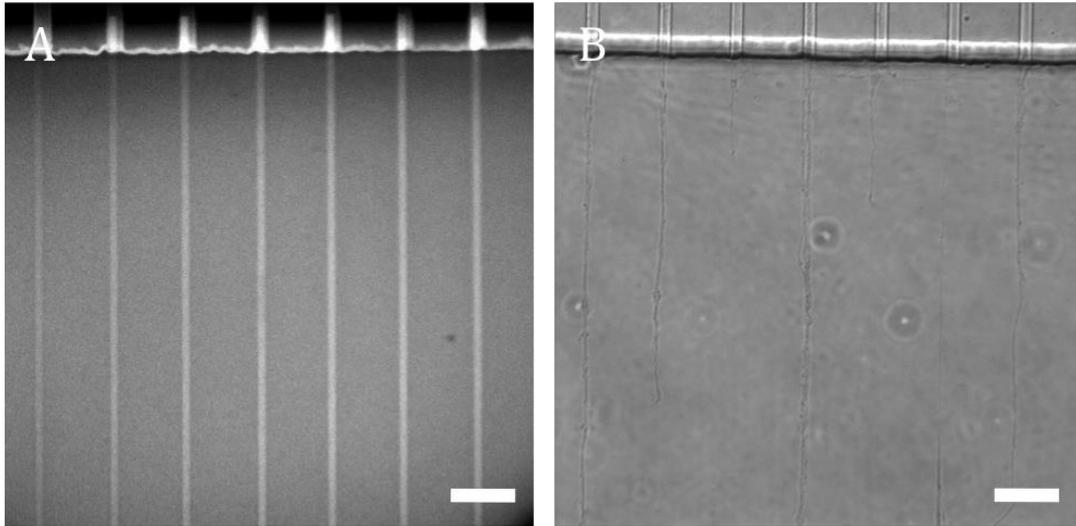


Figure 3.5 : **Images d'axones dans un dispositif AXIS sur des motifs en forme de ligne de PLL-PEG TritC et laminine.** A) Image en fluorescence du motif en forme de lignes de PLL-PEG TritC et laminine dans un dispositif AXIS. B) Image en contraste de phase de neurones dans un dispositif AXIS avec leurs axones poussant sur des motifs en forme de lignes de PLL-PEG TritC et laminine. Barre d'échelle 50 µm.

Sur les motifs de laminine en forme de lignes en continuité des microcanaux dans un dispositif AXIS répliqué, les axones poussent spécifiquement sur les motifs (figure 3.5).

J'ai réalisé cette expérience dans 25 dispositifs AXIS. Il y a eu une contamination aux bactéries dans 3 dispositifs. Dans 10 dispositifs aucuns axones n'a atteint le canal inférieur, soit car les neurones avaient une mauvaise adhésion soit car ils mourraient avant de l'atteindre. Dans 3 dispositifs les axones n'ont pas suivi les lignes. Dans 9 dispositifs les axones ont suivi les lignes.

Dans ce dispositif AXIS nous aimerions pouvoir isoler les axones avec un seul axone par microcanal mais souvent plusieurs poussent dans un seul microcanal. Pour remédier à ce problème, il serait intéressant de créer un dispositif ayant la même géométrie mais avec des microcanaux plus étroits.

Ce dispositif fonctionne bien pour isoler les axones et son utilisation pourrait nous permettre d'étudier le guidage axonal s'il est possible d'appliquer des gradients aux axones en sortie des microcanaux. Nous exposerons ces expériences dans la partie suivante.

Nous avons ainsi vu que les neurones dissociés sont capables de pousser sur des motifs réalisés par notre dispositif expérimental LIMAP ou encore à l'intérieur de dispositifs microfluidiques et qu'il est possible d'isoler leurs axones en utilisant ces méthodes.

II. Améliorer la sensibilité au gradient

1. Améliorer la précision des gradients - utilisation de gradients patternés

Avec le dispositif expérimental LIMAP il est possible de faire des motifs en forme de gradients. Nous avons montré que plus la dose d'UV augmente, plus la quantité de protéines patternées augmente et nous avons mesuré la relation entre ces deux grandeurs (figure 3.6 A), ce qui nous permet de faire des gradients. Pour y parvenir, nous contrôlons le temps d'exposition de chaque pixel (miroirs du DMD) du système d'illumination UV de façon indépendante. Pour réaliser ces gradients patternés les miroirs sont en position « on » sur toute la zone du gradient au début de l'insolation puis ils passent en position « off » les uns après les autres le long du gradient au cours de l'insolation. Avec cette méthode, des gradients de différentes formes peuvent être réalisés : par exemple linéaires, exponentiels et logarithmiques (figure 3.6 B). Ces gradients patternés, réalisés par cette méthode, sont d'une grande précision (figure 3.6 C).

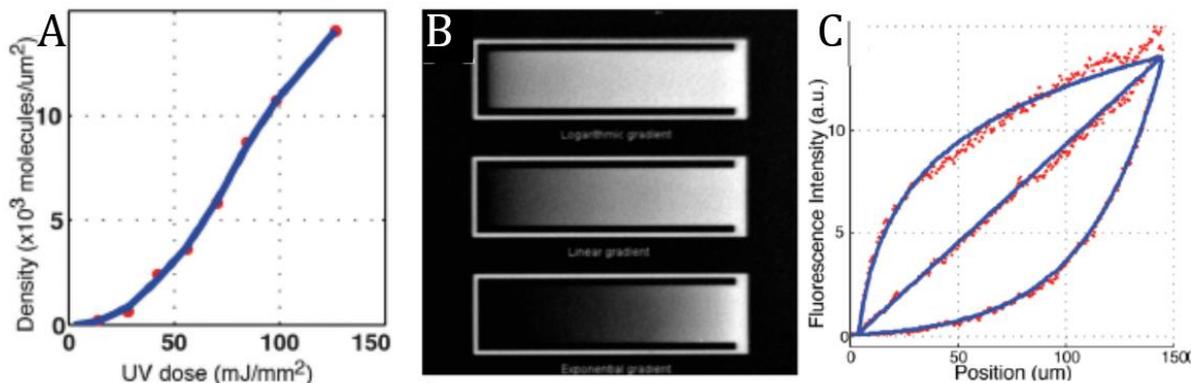


Figure 3.6 : **Graphique de la densité de molécules patternée en fonction de la dose d'UV et image et graphique de différents gradients fait par LIMAP.** A) Profil de la densité de molécules en fonction de la dose d'UV. Cette relation est quasiment linéaire. B) Image en fluorescence de trois types de gradients de GFP patternés : logarithmique (haut), linéaire (milieu) et exponentiel (bas). C) Profil de l'intensité de la fluorescence (carrés rouges) de chaque gradient patterné en B. Le profil théorique attendu est tracé en bleu. Source [70 Strale]

a. Gradients patternés d'éphrine et sémaphorine

Pour étudier l'effet des molécules de guidage sur la pousse des neurones dissociés et sur le guidage de leurs axones, nous avons fait des motifs de protéine A couplée au fluorophore Alexa647 (que nous appellerons par la suite protéine A 647) (figure 3.7 B) en forme de gradients sur lesquels nous avons incubé deux molécules de guidage : l'éphrineA5 ou la sémaphorine3A, toutes deux ayant un fragment Fc (figure 3.7 C). Ce fragment Fc se fixe sur la protéine A (figure 3.7 C). Nous avons ensuite ajouté de la PLL et de la laminine pour donner un substrat d'adhésion aux neurones (figure 3.7 D). Ces expériences sont réalisées sur des lamelles PLL-PEG. La PLL adhère partout sur le substrat de PLL-PEG et la laminine se fixe sur la PLL (figure 3.7 D). Les neurones peuvent donc adhérer sur tout le substrat (figure 3.8).

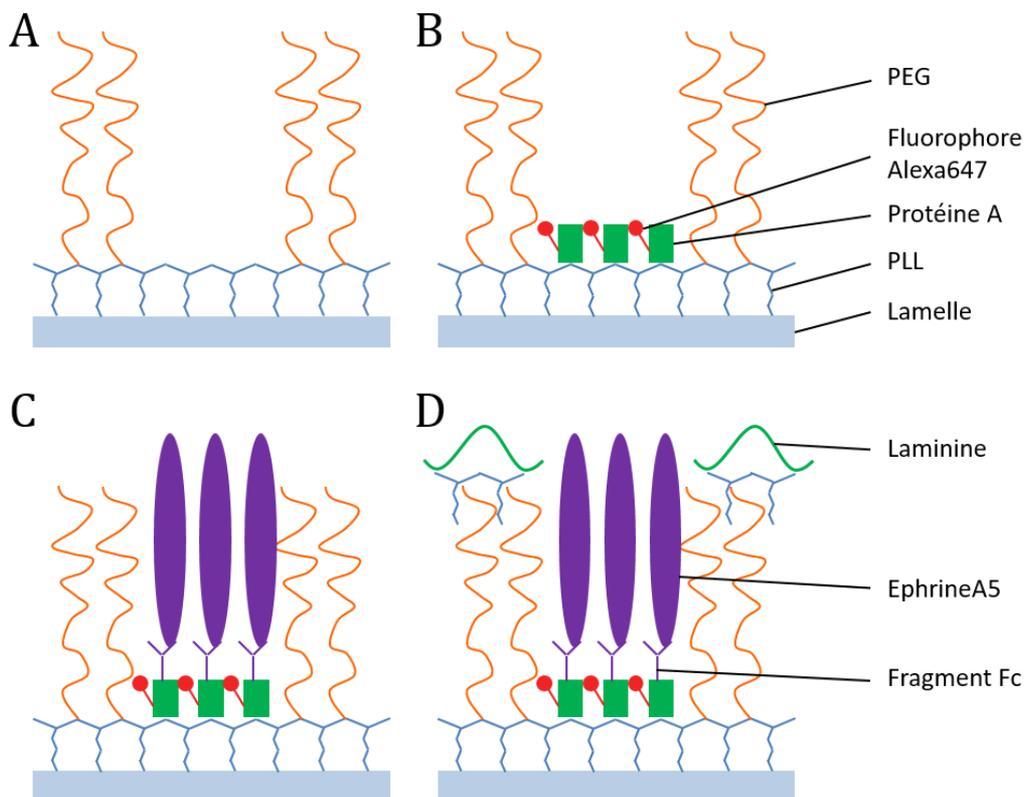


Figure 3.7 : **Schéma moléculaire des étapes de patterning de la protéine A 647, de l'éphrineA5-Fc, de la PLL et de la laminine.** A) Lamelle recouverte d'une couche de PLL-PEG après insolation d'un motif. B) Même échantillon après incubation de protéine A 647. C) Même échantillon après incubation d'éphrineA5-Fc. D) Même échantillon après incubation de PLL et de laminine. La même configuration est utilisée avec la sémaphorine3A-Fc, en la substituant à l'éphrineA5-Fc.

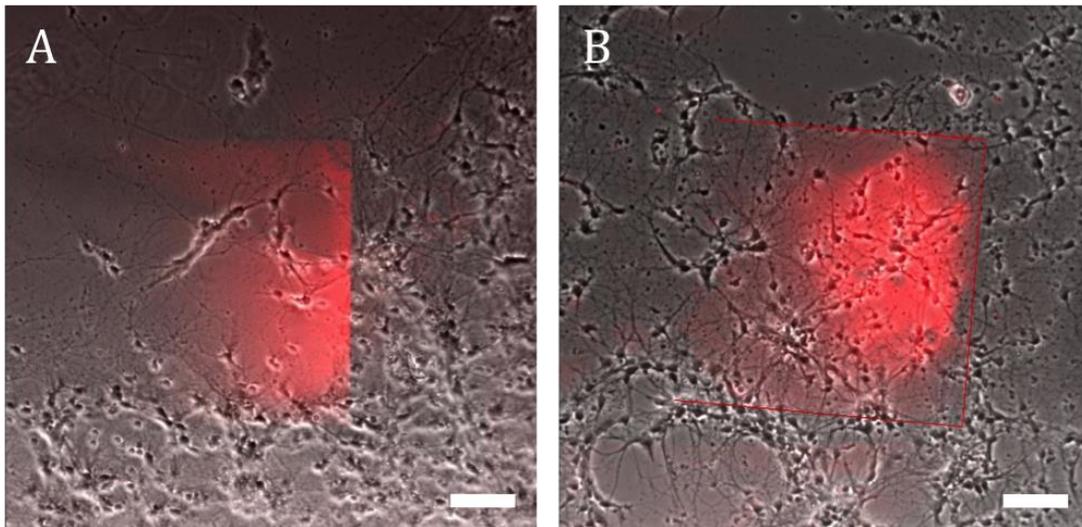


Figure 3.8 : **Images de neurones dissociés en présence d'un gradient d'éphrine et de sémaphorine, à DIV 7.** Superposition d'une image en contraste de phase et d'une image en fluorescence de neurones dissociés sur un motif de A) protéines A 647 et éphrineA5-Fc en forme de gradient carré, B) protéines A 647 et sémaphorine3A-Fc en forme de gradient carré (avec ses délimitations représentées par des traits rouges). Barre d'échelle 100 μm .

Les neurones évitent le motif d'éphrineA5 (figure 3.8 A) mais ne réagissent pas au motif de sémaphorine3A (figure 3.8 B), après avoir été cultivés en présence de ces gradients 7 jours *in vitro* (DIV 7, *Days In Vitro*). Cette expérience a seulement fonctionné sur une lamelle qui avait trois fois la condition avec éphrine et deux fois celle avec sémaphorine. Je n'ai pas réussi à reproduire cette expérience sur 3 autres lamelles, j'ai eu des problèmes d'adhésion et de pousse des neurones. Sur les trois conditions avec éphrine j'ai observé une répulsion du motif et sur les deux conditions avec sémaphorine je n'ai observé aucun effet. L'inconvénient de ces expériences est que les neurones sont ensemencés sur un substrat homogène ce qui fait que leurs axones ne sont pas isolés. Il est donc très compliqué de quantifier un effet de guidage sur les cônes de croissance. De plus l'éphrine semble agir sur les somas des neurones qui adhèrent difficilement sur le motif d'éphrine. Dans ces conditions, il est difficile d'étudier l'effet de cette molécule de guidage sur les axones.

Partie 3 : Résultats

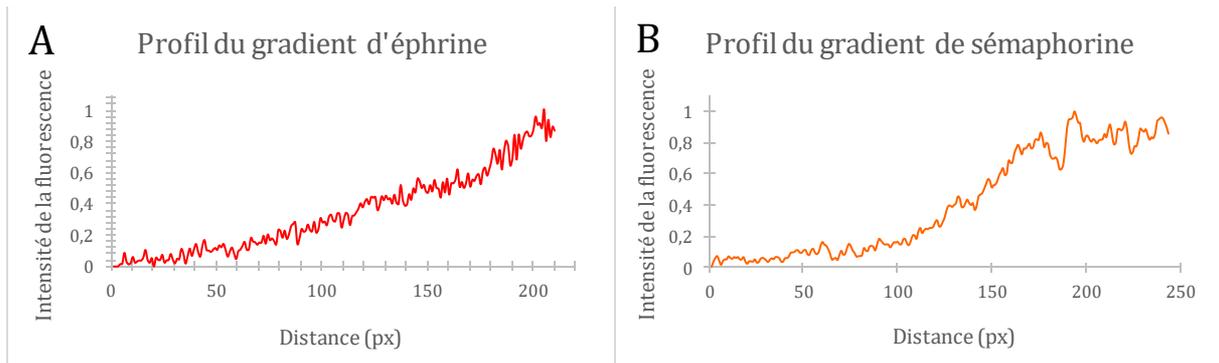


Figure 3.9 : **Graphique du profil des gradients d'éphrine et de sémaphorine de la figure 3.8.** A) Gradient d'éphrine de la figure 3.8 A. Le gradient est linéaire avec une faible pente dans une première partie puis toujours linéaire mais avec une pente plus forte dans une deuxième partie et exponentiel dans une dernière partie B) Gradient de sémaphorine de la figure 3.8 B. Le gradient est linéaire avec une faible pente dans une première partie puis exponentiel dans une deuxième partie avant d'atteindre un plateau.

Le gradient d'éphrine (figure 3.8 A) a un profil contenant plusieurs régimes (figure 3.9 A). Il est linéaire avec une faible pente pour commencer puis sa pente augmente et reste linéaire et sur sa dernière partie le gradient devient exponentiel. Le gradient de sémaphorine (figure 3.8 B) contient lui aussi plusieurs régimes. Il est linéaire avec une faible pente sur sa première partie puis exponentiel avant d'atteindre un plateau. Ce motif en forme de gradient a des défauts, surtout sur sa partie droite, du côté fort du gradient (figure 3.8 B), aussi observables sur le profil du gradient (figure 3.9 B). Ces défauts peuvent venir des étapes de pégylation, de patterning ou d'ensemencement des neurones. Avant la pégylation il est possible que quelques poussières soient restées sur la lamelle, ce qui donnerait des défauts dans la couche de PLL-PEG. Il est possible que lors de l'étape d'incubation des protéines les rinçages n'aient pas été suffisamment efficaces. Il est aussi possible que lors de l'étape de patterning ou d'ensemencement des neurones j'aie touché la surface de la lamelle avec le cône de la pipette.

Il aurait été intéressant de vérifier que l'éclairage de la lampe à mercure soit homogène sur tout le champ de vue, pour être sûr que les motifs en forme de gradients sont bien tels qu'on les observe sur les images en fluorescence. Pour cela il faudrait utiliser une lamelle fluorescente, prendre une image en fluorescence de cette lamelle et mesurer l'intensité en différents points pour vérifier qu'elle soit homogène sur toute l'image. Nous avons supposé que notre lampe à mercure avait un éclairage homogène. En effet, en prenant des images de motifs homogènes sur une grande surface nous n'avons pas observé d'hétérogénéité (voir partie matériel et méthode figure 2.7 B).

b. Gradients patternés dans dispositif AXIS

Pour appliquer un gradient à des axones de neurones mais pas à leurs somas, nous avons réutilisé notre dispositif AXIS pour appliquer un gradient patterné aux axones en sortie des microcanaux. Nous avons fait des motifs en forme de lignes prolongées par un gradient, avec les lignes de ce motif en continuité des microcanaux (figure 3.10), de

laminine et fibrinogène couplé au fluorophore Alexa488 (que nous appellerons par la suite fibrinogène 488).

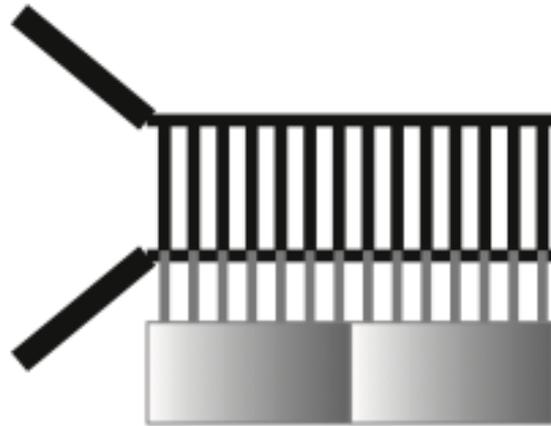


Figure 3.10 : Schéma de l'expérience de neurones dans un dispositif AXIS avec leurs axones poussant sur des motifs en forme de lignes prolongées par des gradients. Des motifs en forme de lignes prolongées par un gradient, représentés en gris pour les lignes et en nuances de gris pour les gradients, sont créés, dans le canal inférieur, en continuité des microcanaux du dispositif AXIS. La partie la plus forte du gradient est située sur la droite.

Nous avons ensuiteensemencé des neurones dissociés dans le canal supérieur d'un dispositif AXIS patterné avec de la laminine et du fibrinogène 488, comme schématisé sur la figure 3.10.

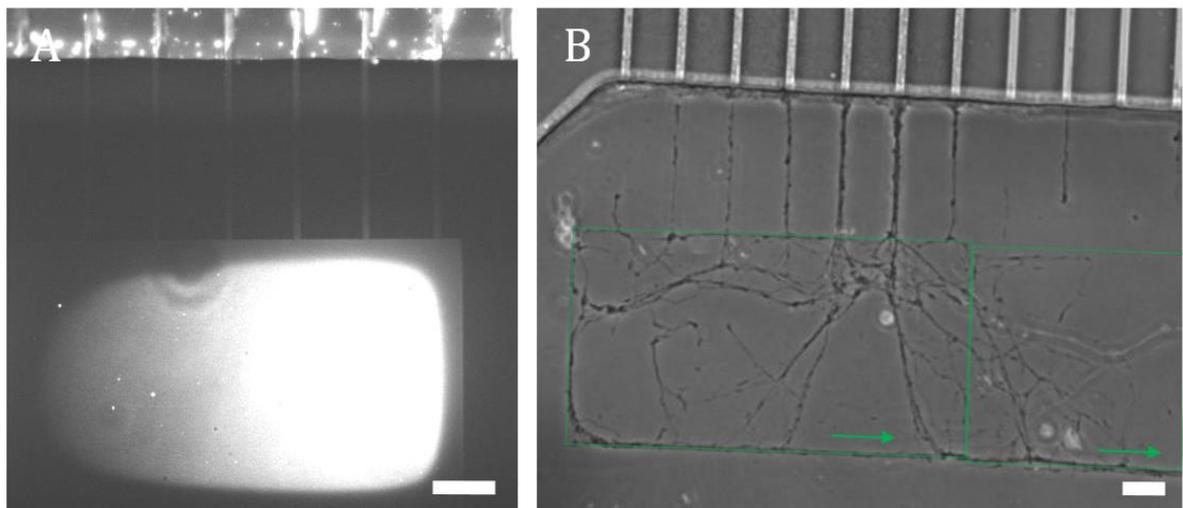


Figure 3.11 : Images d'axones dans un dispositif AXIS sur des motifs en forme de lignes suivies par un gradient de laminine et fibrinogène 488. A) Image en fluorescence du motif en forme de lignes prolongées par un gradient de laminine et fibrinogène 488 dans un dispositif AXIS. B) Image en contraste de phase de neurones dans un dispositif AXIS avec leurs axones poussant sur des motifs en forme de lignes prolongées par un gradient de laminine et fibrinogène 488, à DIV 8. L'emplacement des deux gradients est matérialisé par les rectangles verts. Les flèches indiquent la direction du gradient. Barre d'échelle 50 μm .

Partie 3 : Résultats

Sur un motif de laminine et fibrinogène 488 en forme de lignes en continuité des microcanaux prolongées par un gradient, après 8 jours *in vitro* (DIV 8) les axones suivent les motifs mais ne semblent pas réagir au gradient de laminine (figure 3.11). Il est peut-être trop peu pentu.

J'ai réalisé cette expérience dans 17 dispositifs. Dans 3 dispositifs il y a eu une contamination aux bactéries. Dans 2 dispositifs les axones n'ont pas atteint les patterns. Dans 3 autres dispositifs ils n'ont pas suivi les lignes. Dans 4 dispositifs ils ont suivi les lignes sans atteindre les gradients. Dans 2 dispositifs ils ont atteint les gradients et ont poussé le long du gradient, dans les deux directions. Et dans 3 dispositifs ils ont poussé sur le gradient sans le suivre.

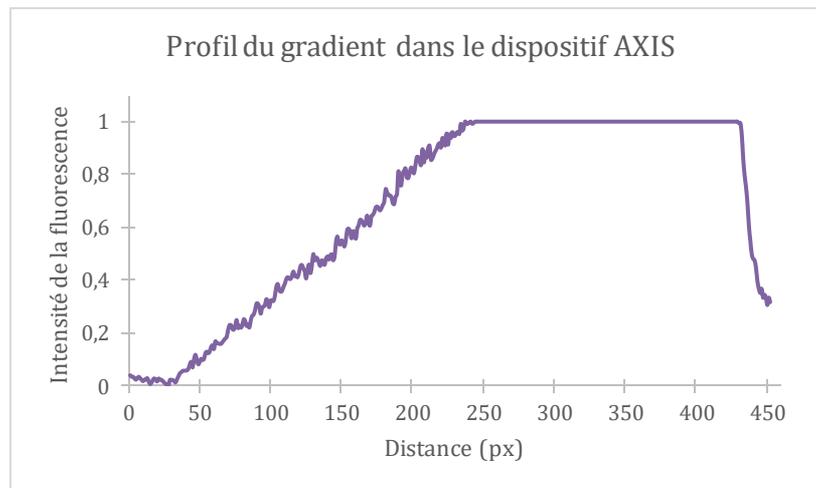


Figure 3.12 : **Graphique du profil du gradient de laminine et fibrinogène 488 de la figure 3.11 A.** Le gradient est linéaire sur sa première moitié puis l'image est saturée sur la deuxième moitié du gradient.

Nous pouvons observer que le gradient de l'image de la figure 3.11 A est linéaire sur sa première moitié (figure 3.12). Sur la deuxième moitié du gradient l'image est saturée, il n'est donc malheureusement pas possible de connaître son profil. Puis il décroît sur le bord, nous observons d'ailleurs qu'au niveau de chaque bord du motif en forme de gradient est présente une zone de plus faible intensité (figure 3.11 A).

La qualité du motif en forme de gradient est donc moyenne (figure 3.11 A). Le fait que les motifs soient dans un dispositif rend difficile l'obtention d'une bonne qualité. Une partie du problème vient du rinçage du dispositif après les différentes étapes (la pégylation, l'insolation et l'incubation des différentes protéines) qui est moins bon que dans un puits ouvert à cause de la petite taille des canaux. Par simplicité, nous faisons les rinçages avec une pipette, il n'y a donc pas une grande pression dans les canaux. Ainsi, comme le nombre de Reynolds est faible, l'écoulement est laminaire, le rinçage est donc peu efficace proche des parois et des surfaces où la vitesse de l'écoulement est nulle.

Cette réplique de dispositif AXIS est donc efficace pour isoler les axones par rapport aux somas des neurones mais la qualité des motifs, notamment des gradients, ne nous permet pas de continuer dans cette voie.

Une perspective pour continuer avec un dispositif similaire serait d'utiliser un dispositif dans lequel le canal inférieur serait ouvert, ce qui permettrait, je l'espère, d'obtenir des motifs de meilleure qualité.

Les neurones dissociés constituent un modèle *in vitro* robuste en neurosciences. Par contre, il est compliqué d'obtenir des cônes de croissance qui arrivent sur un gradient patterné. De plus, ces modèles sont assez éloignés des processus ayant lieu *in vivo*. C'est pourquoi, pour s'en rapprocher, dans le cadre du guidage axonal, nous avons utilisé un nouveau modèle : des explants de cortex d'embryon de rat. Ces tissus conservent une partie de l'organisation spatiale tridimensionnelle des neurones, en opposition avec les neurones dissociés qui n'ont plus aucune organisation. De plus, un des problèmes de l'utilisation de neurones dissociés pour nos expériences de guidage axonal sur des motifs est qu'ils ne peuvent pas être positionnés où on le souhaite, sur une partie du motif, ils peuvent adhérer sur tout le motif. Par contre, les explants peuvent être positionnés sur une partie du motif, ce qui permet d'avoir une autre partie du motif sur laquelle se trouvent seulement les neurites qui poussent hors de l'explant. Nous savons qu'un modèle utilisant des explants fonctionne, car il a été utilisé avec succès dans [35 Dupin], il permet d'obtenir des cônes de croissance isolés.

c. Motifs serrure et roue avec gradient

En utilisant ce type de tissu, nous avons décidé de le faire adhérer et pousser sur un motif de laminine conjuguée avec le fluorophore Alexa488 (que nous appellerons par la suite laminine 488) en forme de serrure, avec un gradient à l'extrémité de cette serrure (figure 3.13 A), en positionnant l'explant sur le cercle de la serrure. Ces expériences sont réalisées sur des lamelles ayant une couche de PEG-SVA, que nous appelons lamelles PEG-SVA.

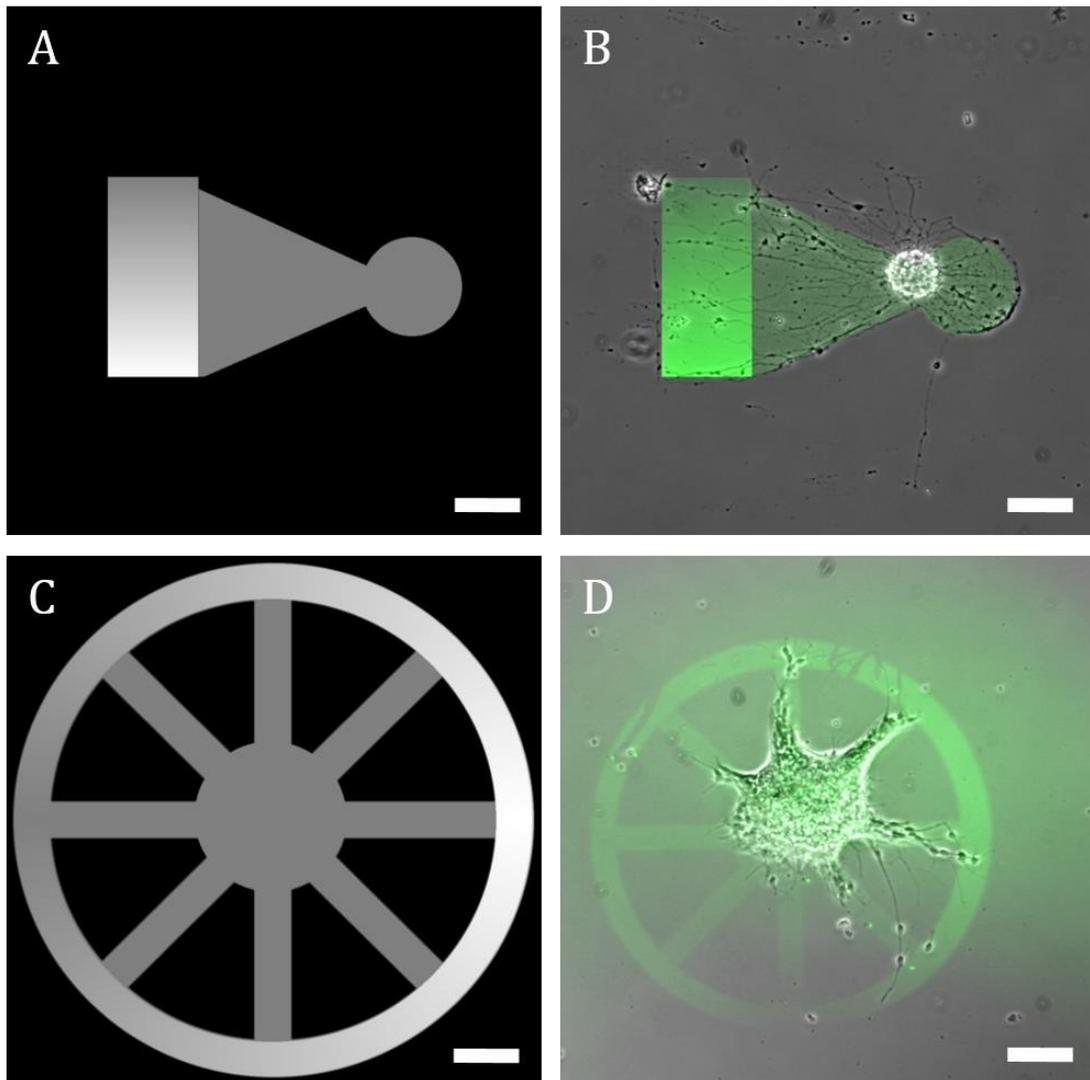


Figure 3.13 : **Images des motifs en forme de serrure prolongée par un gradient et de roue avec un gradient circulaire et images d'un explant sur ces motifs.** A) Image du motif en forme de serrure prolongée par un gradient. B) Superposition d'une image en contraste de phase d'un explant sur ce motif de laminine 488 et d'une image du motif insolé, à DIV 3. C) Image du motif en forme de roue avec un gradient circulaire. D) Superposition d'une image en contraste de phase et d'une image en fluorescence d'un explant sur ce motif de laminine 488, à DIV 1. Barre d'échelle 100 μm .

L'explant adhère sur le motif de laminine 488 et l'on constate que des neurites poussent préférentiellement sur ce motif (figure 3.13 B). Par contre, les neurites ne réagissent pas au niveau du gradient de laminine, ils ne tournent pas sur le gradient.

J'ai essayé de faire cette expérience sur 48 motifs en forme de serrure prolongée par un gradient, sur 6 lamelles différentes, mais seul 16 explants ont adhérents sur un pattern. Sur ces 16 explants 6 sont morts, 6 n'ont pas eu d'axones qui ont atteint le gradient et 4 ont eu des axones qui ont atteint le gradient sans être impactés par celui-ci.

Un inconvénient de cette expérience est qu'il est assez compliqué de placer l'explant sur le cercle de la serrure. Nous reviendrons sur ce point et proposerons une méthode pour faciliter le placement des explants.

J'ai aussi mis des explants sur des motifs de laminine 488 en forme de roue entourée par un gradient circulaire (figure 3.13 C). Je voulais voir si les axones qui atteignent le gradient de laminine allaient pousser du côté du gradient fort en laminine (figure 3.13 D). Ces expériences sont réalisées sur des lamelles schott hydrogel.

L'explant pousse bien sur le motif, autant les somas que les axones sortant de l'explant (figure 3.13 D). Les axones atteignent le gradient du côté le plus fort en laminine, on ne peut donc pas observer l'effet du gradient.

J'ai essayé de réaliser cette expérience sur 54 motifs en forme de roue entourée par un gradient circulaire, sur 6 lamelles différentes. Seul 8 explants adhèrent sur le motif dont 5 sur le disque central et 3 sur le gradient circulaire. Ceux adhérant sur le gradient circulaire poussent des deux côtés. Sur les 5 adhérant sur le disque central 3 n'ont pas d'axones atteignant le gradient et 2 atteignent le gradient et poussent des deux côtés.

Ainsi, comme précédemment avec le motif en forme de serrure prolongée par un gradient, il est compliqué de placer l'explant sur le motif, ici au centre de la roue. Nous n'avons donc pas poursuivi cette expérience.

d. Hydrogels autour du motif serrure

Le principal problème rencontré lors de ces expériences est qu'il est compliqué de positionner les explants sur le cercle de la serrure ou au centre de la roue et il leur faut un certain temps pour adhérer. Ils peuvent donc bouger après avoir été placés sur le motif. J'ai alors créé des structures en hydrogels en forme de demi-anneau autour du cercle de la serrure pour positionner plus facilement les explants et les maintenir en place (figures 3.14 et 3.15). Ces hydrogels, constitués de 4-arm PEG acrylate, sont polymérisés avec le dispositif expérimental LIMAP. Une solution de 4-arm PEG acrylate et de photoinitiateur (PLPP, Alvéole) est ajoutée dans un puits de la lamelle. Cette solution est insolée avec LIMAP avec le faisceau UV mis en forme de demi-cercle ce qui polymérise un hydrogel extrudé de forme demi-annulaire (figures 3.14 A et B et 3.15 A). La solution est ensuite rincée. Après cela, un motif de laminine 488 en forme de serrure est aligné sur la structure en hydrogel (figures 3.14 C et 3.15 B) à l'aide du logiciel du système LIMAP. Ces expériences sont réalisées avec des lamelles PEG-SVA.

Partie 3 : Résultats

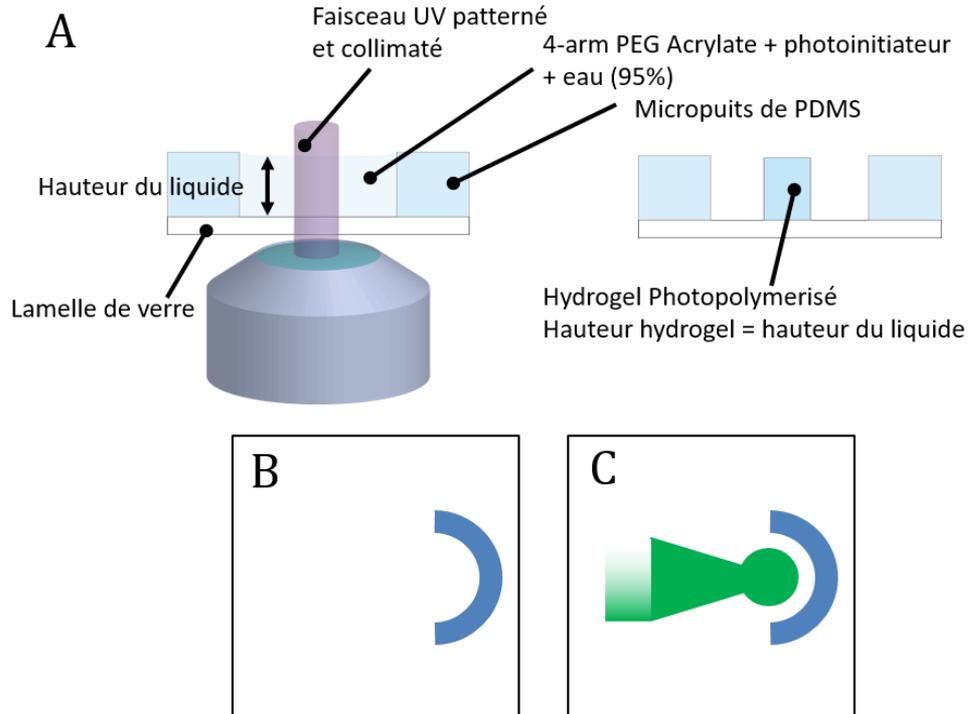


Figure 3.14 : **Schéma de la polymérisation d'hydrogels et schéma d'un hydrogel en forme de demi-anneau autour du motif serrure.** Les hydrogels sont polymérisés avec le dispositif expérimental LIMAP. La solution de 4-arm PEG acrylate mélangée au photoinitiateur est incubée sur la lamelle. Cette solution est insolée par le faisceau UV. B, C) Etapes de fabrication de la lamelle pour l'expérience d'explant sur un motif en forme de serrure entourée d'un hydrogel en forme de demi-cercle. B) L'hydrogel en forme de demi-cercle est polymérisé. C) Le motif en forme de serrure est par la suite aligné sur l'hydrogel et insolé.

Pour cette expérience les hydrogels en forme de demi-anneau sont d'abord polymérisés sur la lamelle et ensuite le motif de laminine 488 en forme de serrure est créé (figures 3.14 B et C et 3.15 A et B). En faisant l'inverse, le motif avant l'hydrogel, de la solution de 4-arm PEG acrylate peut se fixer sur le motif et rendre l'adhésion de l'explant et la pousse des axones plus difficile.

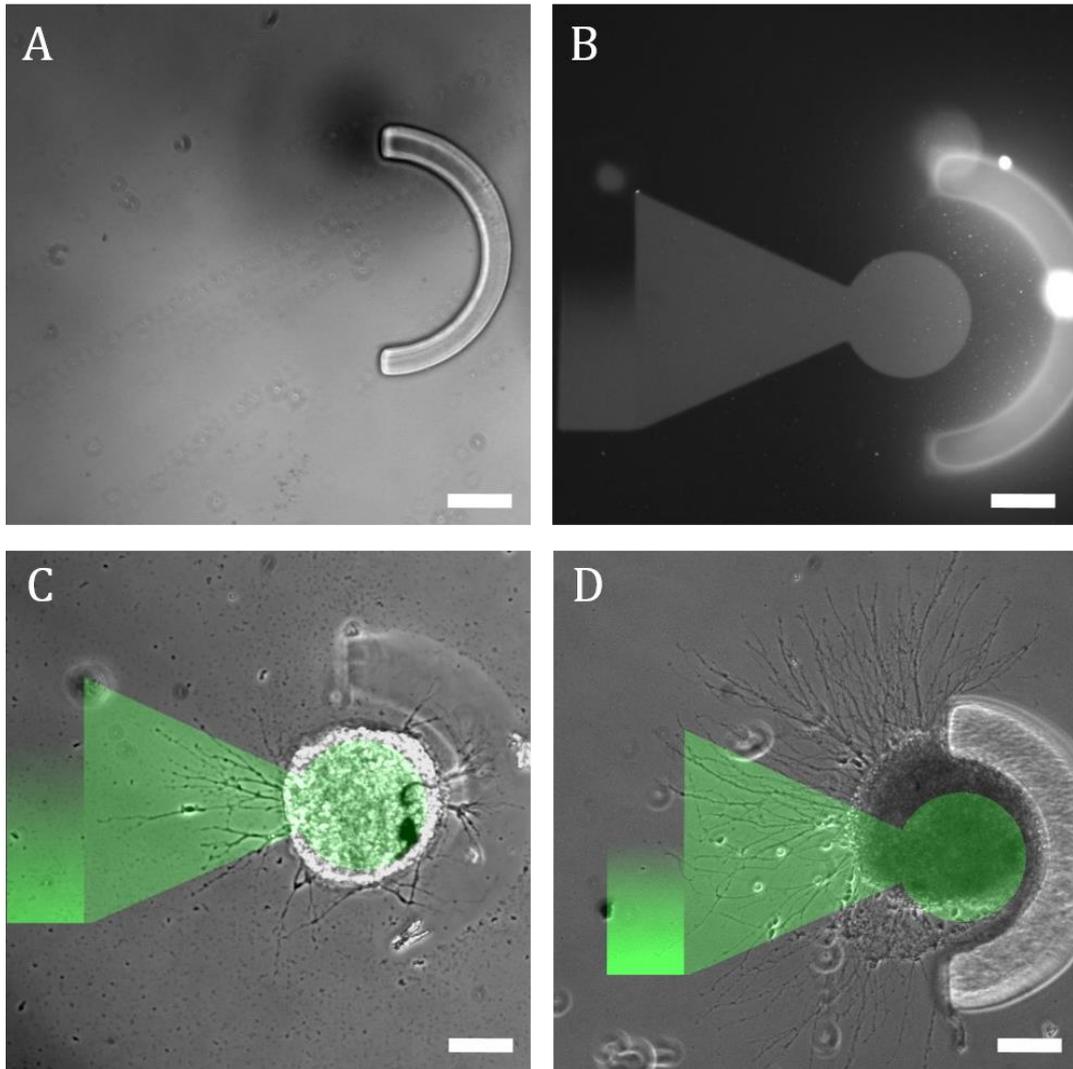


Figure 3.15 : **Images d'hydrogel en forme de demi-anneau et motif en forme de serrure prolongée par un gradient.** A) Image en contraste de phase d'un hydrogel en forme de demi-cercle. B) Image en fluorescence d'un motif de PLL FITC en forme de serrure avec gradient et d'un hydrogel en forme de demi-cercle entourant le cercle de la serrure. C, D) Superposition d'une image en contraste de phase d'un explant sur un motif de laminine en forme de serrure avec gradient dont le cercle est entouré par un hydrogel en forme de demi-anneau et d'une image du motif insolé, pour deux expériences C) à DIV 2, D) à DIV 3. Barre d'échelle 100 μm .

Les hydrogels sont d'une grande aide, ils facilitent fortement le placement des explants. Ceux-ci peuvent être positionnés à l'intérieur de ces hydrogels en forme de demi-cercle et y rester lors des déplacements de la lamelle.

Les explants poussent bien sur le motif, même si parfois les neurites sortent du motif et poussent sur le PEG (figure 3.15 D). Ici, ils n'atteignent pas le gradient de laminine (figure 3.15 C), ou lorsqu'ils l'atteignent ne tournent pas préférentiellement d'un côté du gradient (figure 3.15 D).

J'ai essayé de réaliser cette expérience sur 112 motifs de laminine en forme de serrure prolongée par un gradient dont le cercle est entouré par un hydrogel, sur 16 lamelles différentes. 7 n'ont pas adhéré. 12 ont été contaminés par des bactéries. 61 sont morts ou n'ont pas eu de neurites qui ont poussé. 32 ont eu des axones qui ont poussés

mais n'ont pas atteint le gradient. 3 ont atteint le gradient sans tourner au niveau de ce gradient.

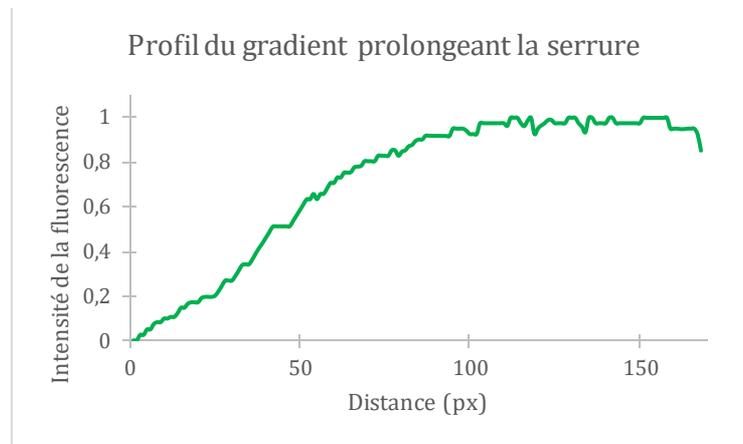


Figure 3.16 : **Graphique du profil du gradient de PLL FITC de la figure 3.15 B.** Le gradient est linéaire dans une première partie puis logarithmique dans une deuxième partie avant d'atteindre un plateau.

Le gradient de PLL FITC (figure 3.15 B) a un profil contenant plusieurs régimes (figure 3.16). Il commence par être linéaire puis sa pente augmente et il devient logarithmique avant d'atteindre un plateau.

e. Motif gradient d'éphrine

Afin d'observer si l'éphrine avait le même effet de répulsion sur les axones de cortex que sur les axones d'hippocampe, j'ai fait pousser des explants sur un cercle de PLL FITC entouré d'un hydrogel en forme de demi-anneau, en face d'un gradient d'éphrine A5-Fc sur de la protéine A couplée au fluorophore Alexa647, le tout recouvert de laminine (figure 3.17). L'intérêt par rapport à la géométrie de l'expérience précédente, avec un motif en forme de serrure prolongée par un gradient, est de réduire la distance entre l'explant et le motif en forme de gradient. Ces expériences sont réalisées sur des lamelles PEG-SVA.

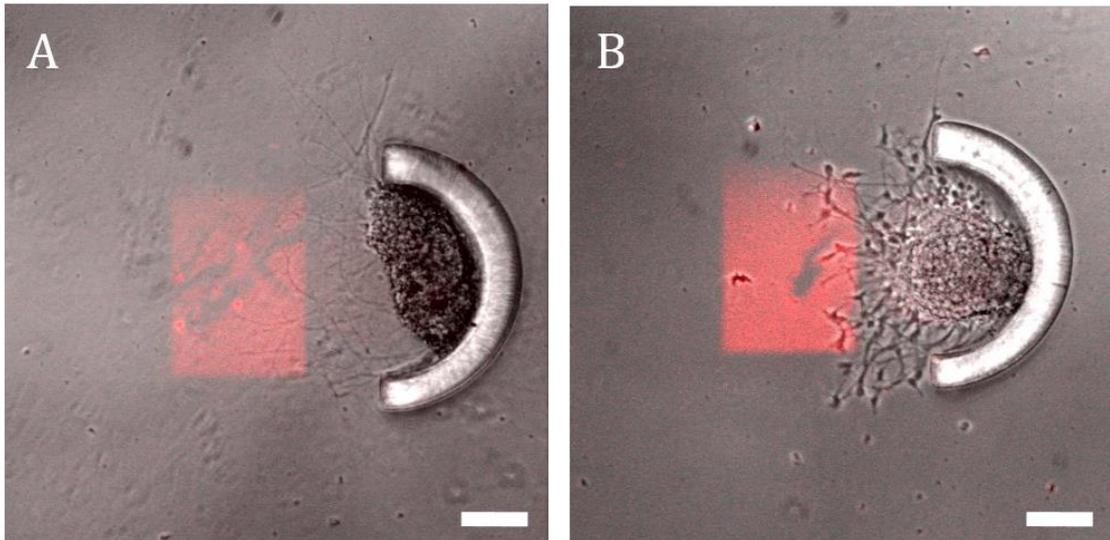


Figure 3.17 : Superposition d'une image en contraste de phase et d'une image en fluorescence d'un explant poussant à côté d'un gradient de protéine A 647 et d'éphrineA5-Fc, à DIV 3. Barre d'échelle 100 μm .

Certains axones atteignent les gradients patternés d'éphrineA5 (figure 3.17). Les axones d'explant de cortex ne semblent pas repoussés par l'éphrineA5 car ils n'évitent pas le gradient, ni ne tournent préférentiellement sur ce gradient du côté faible en éphrine.

J'ai réalisé cette expérience sur 87 explants présents à côté d'un motif d'éphrine en forme de gradient, sur 13 lamelles différentes. 5 n'ont pas adhéré sur le cercle de PLL FITC entouré par l'hydrogel. 42 sont morts ou n'ont pas eu d'axones qui ont poussés. 8 ont eu des axones qui ont poussés atteindre le gradient. 32 ont eu des axones qui ont atteint le gradient d'éphrine mais aucun n'a changé de direction au niveau de ce gradient.

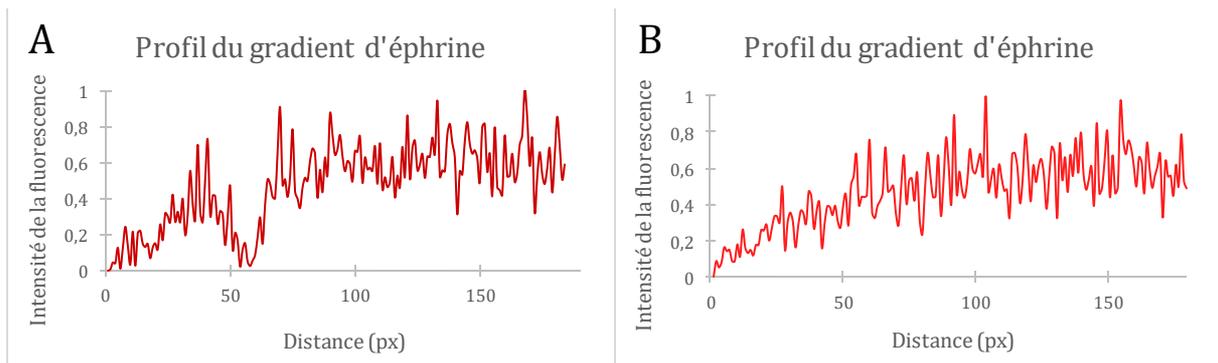


Figure 3.18 : Graphique du profil des gradients d'éphrine 3.17. A) Gradient d'éphrine de la figure 3.17 A. Le gradient semble logarithmique avant d'atteindre un plateau B) Gradient d'éphrine de la figure 3.17 B. Le gradient est logarithmique avant d'atteindre un plateau.

Les deux gradients d'éphrine de la figure 3.17 sont logarithmiques avant d'atteindre un plateau (figure 3.18). Pour le gradient de la figure 3.17 A ce n'est pas complètement sûr car il a plusieurs défauts qui se repercutent sur son profil (figure 3.18

A) mais la tendance semble logarithmique. Ces défauts proviennent probablement des pinces qui m'ont permis de positionner l'explant qui auraient touché la lamelle au niveau du motif en forme de gradient. Le gradient de la figure 3.17 B est logarithmique (figure 3.18 B). Il a aussi un défaut qui vient sûrement des pinces qui ont touché le motif lors du positionnement de l'explant.

Les explants ont un grand atout au niveau du positionnement et de la séparation des axones et des somas, par rapport aux neurones dissociés. De plus, ils ont une meilleure viabilité *in vitro*. Ils nous ont permis de développer des bases de systèmes pour l'étude du guidage axonal, en les faisant pousser à côté de motifs en forme de gradients. Malheureusement nous n'avons pas observé de façon claire et reproductible un effet de guidage par un gradient patterné de protéine. Les outils, que sont le patterning, les hydrogels et la microfluidique, ont besoin d'être adaptés pour obtenir un dispositif efficace qui permettra d'étudier le guidage des axones d'explants.

2. Augmenter la durée d'exposition au gradient

Une piste d'investigation pour augmenter la sensibilité des neurones aux gradients de molécules de guidage, patternés ou solubles, est de les appliquer sur des temps plus longs allant jusqu'à quelques jours. Nous voulons étudier l'effet de ces molécules, lorsqu'elles sont présentes de façon prolongée, sur la pousse et le guidage des axones.

a. Dispositif microfluidique avec membrane en hydrogel

Le but de cette expérience est de créer un gradient fluide dans la chambre centrale d'un dispositif microfluidique pour ensuite y cultiver des neurones sur des motifs et observer l'effet de différentes molécules de guidage. Pour cela, j'ai fabriqué des dispositifs microfluidiques de la façon suivante. Sur une lamelle, j'ai collé un pochoir de PDMS en forme de T (en noir sur la figure 3.19 A et B) sur lequel j'ai déposé un deuxième pochoir avec 5 trous qui créent 5 puits (en vert sur la figure 3.19 A). J'ai ensuite polymérisé avec une faible dose d'UV (250 mJ/mm^2), avec le dispositif expérimental LIMAP, des hydrogels de 4-arm PEG Acrylate en forme de rectangle des deux côtés de la chambre centrale pour créer des membranes poreuses (en bleu clair sur la figure 3.19 A et B). Puis j'ai polymérisé avec une forte dose (900 mJ/mm^2) des hydrogels (en bleu foncé sur la figure 3.19 A et B), sur les bords des canaux centraux, pour réduire la taille de ces canaux et ainsi accélérer la vitesse du fluide près de la membrane. Les zones fortement polymérisées ne laissent pas passer un marqueur fluorescent (de la GFP purifiée) de taille inférieure aux molécules de guidage. Le dispositif est enfin mis sur un agitateur rocker, qui va le pencher alternativement de gauche à droite et de droite à gauche, ce qui va créer un écoulement alternativement dans un sens et dans l'autre dans les microcanaux et donc le long de la membrane par effet de la gravité. Cela permet d'homogénéiser la concentration de molécule dans les canaux et ainsi d'assurer une concentration constante à l'interface liquide/membrane. La géométrie de ce dispositif permet de faire un gradient

soluble (en vert sur la figure 3.19 B), ou deux gradients solubles opposés, dans la chambre centrale. Ces expériences sont réalisées sur des lamelles schott hydrogel.

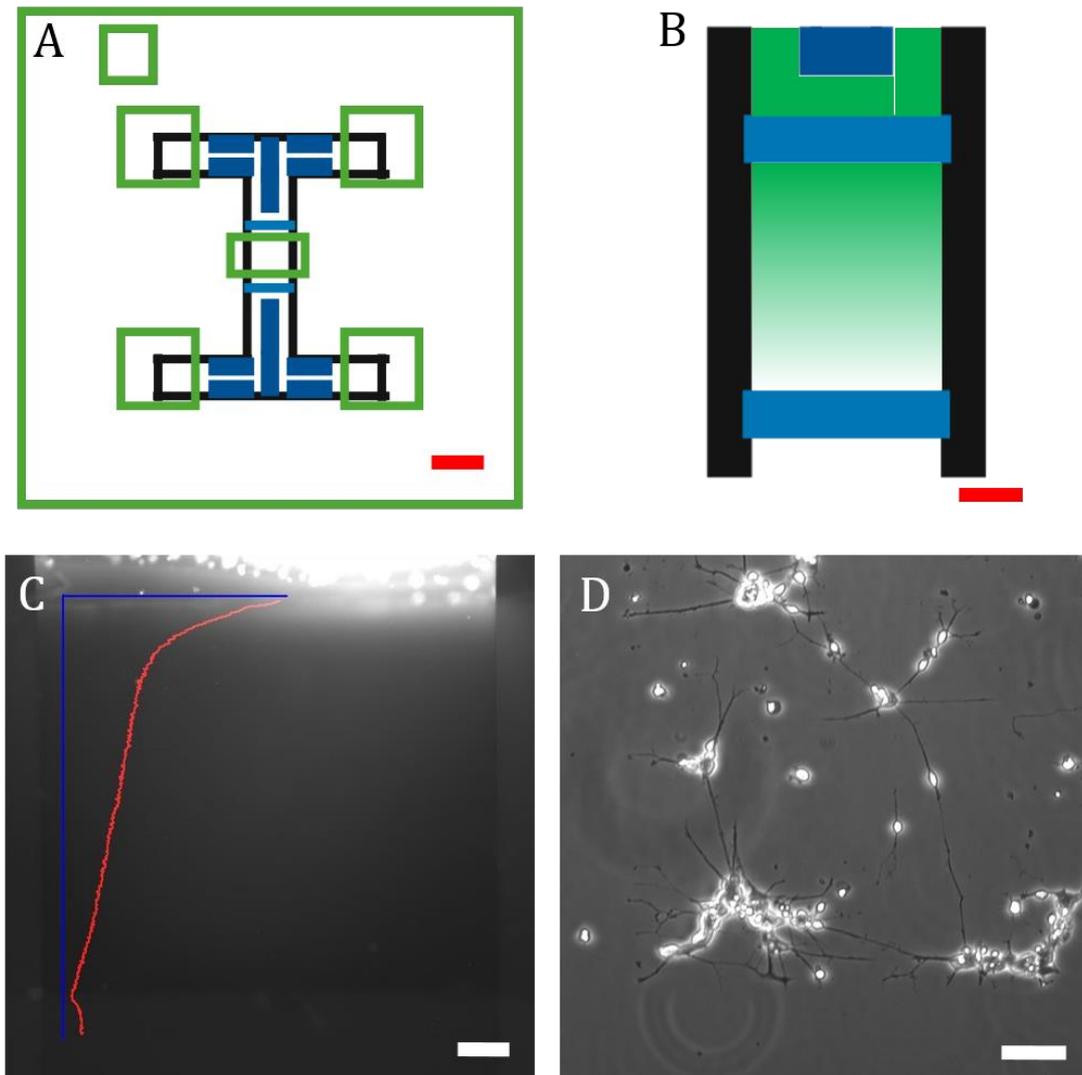


Figure 3.19 : **Schéma du dispositif microfluidique et images d'un gradient fluorescent et de neurones dans la chambre centrale.** A) Schéma du dispositif microfluidique. Noir : pochoir en PDMS du dessous. Vert : pochoir en PDMS du dessus. Bleu foncé : hydrogel polymérisé avec une forte dose. Bleu clair : hydrogel polymérisé avec une faible dose. Barre d'échelle 2 mm. B) Zoom de la partie centrale du dispositif. Le fluorophore (représenté en vert) est ajouté dans le canal supérieur et un gradient s'établit dans la chambre centrale. Barre d'échelle 0,5 mm. C) Image en fluorescence de GFP dans la chambre centrale de la puce microfluidique 1h après l'avoir ajouté dans le canal supérieur sur laquelle est superposé le graphique de l'intensité de la fluorescence en fonction de la distance à la membrane. Barre d'échelle 200 μm . D) Image en contraste de phase de neurones dans la chambre centrale d'un dispositif microfluidique sur un motif en forme de grilles de laminine 488, soumis à un gradient de slit1 (la concentration la plus forte est située en haut de l'image), à DIV 1. Barre d'échelle 50 μm .

J'ai testé le dispositif avec de la GFP ou du dextran fluorescent dans le canal supérieur, pour observer, en mesurant la fluorescence, le gradient qui se forme dans la chambre centrale (figure 3.19 C). La GFP a une masse molaire de 27 kDa et le dextran de

70 kDa. Le slit1 a une masse molaire de 100 kDa. La masse molaire de la GFP est donc légèrement inférieure à celle du slit1. Celle du dextran est très proche de celle du slit1.

La molécule fluorescente parvient à traverser partiellement la membrane mais sa concentration est très faible dans la chambre centrale (figure 3.19 C). Un léger gradient s'établit dans la chambre centrale mais son amplitude est faible du fait que peu de molécules fluorescentes parviennent à traverser la membrane, qui est donc peu poreuse. L'intensité du gradient la plus forte, contre la membrane, est très faible par rapport à la concentration dans le canal supérieur.

J'ai effectué cette expérience dans 4 dispositifs en ajoutant de la GFP et dans 1 dispositif en ajoutant du dextran. Dans ces 5 dispositifs j'ai observé un faible gradient fluorescent dans la chambre centrale.

J'ai ensuiteensemencé des neurones dans la chambre centrale sur des motifs de laminine 488 en forme de grilles. Ils adhèrent et poussent bien sur le motif. J'ai alors créé un gradient de slit1 en ajoutant du slit1 dans le canal supérieur (figure 3.19 D). Le gradient de slit1 présent ne semble pas avoir d'effet sur la pousse des neurones (figure 3.19 D).

J'ai réalisé cette expérience dans 16 dispositifs. J'ai eu des problèmes de survie des neurones dans ces dispositifs. Dans 7 dispositifs les neurones sont morts avant que je ne puisse enregistrer des vidéos. Dans 4 dispositifs les neurones sont morts pendant que j'enregistre des vidéos mais avant que j'ajoute du slit. Dans 2 dispositifs les neurones sont morts après ajout du slit. Et dans 3 dispositifs les neurones poussent sans être impactés par le gradient de slit.

Je peux alors, en supposant que le ratio entre la concentration dans le canal et la concentration dans la chambre au niveau maximum du gradient est le même pour le slit1 et la GFP, donner une estimation de la concentration en slit1 dans la chambre centrale contre la membrane (au niveau maximum du gradient). Sur une image du dispositif, 1 h après avoir ajouté de la GFP dans le canal du haut, je mesure une intensité de la fluorescence 8 fois inférieure dans la chambre centrale près de la membrane que dans le canal supérieur. Comme, lors de mes expériences, j'ajoute du slit1 à 1 µg/ml dans le canal supérieur, je peux estimer que la concentration au niveau maximum du gradient est de 125 ng/ml. Nous aurions alors un gradient de slit1 inférieur à celui mis en place par [35 Dupin], qui a une concentration à son niveau maximum en slit1 de 200 ng/ml et qui repousse les axones de neurones d'hippocampe. Ces mêmes auteurs ont observé qu'un gradient de slit1 avec une concentration à son niveau maximum de 40 ng/ml n'a pas d'effet sur l'orientation des axones. Cela pourrait expliquer pourquoi nous n'observons aucun effet du gradient de slit1 sur l'orientation des axones lors de leur pousse.

b. Neurones en coculture avec des cellules COS

Notre objectif dans cette partie du projet est de créer un gradient soluble de nétrine, une molécule de guidage axonale, qui soit constant sur un temps long, jusqu'à plusieurs jours, ce qui est plus proche de l'environnement *in vivo*. Le but est de mesurer l'effet d'un gradient de nétrine soluble sur les axones de neurones dissociés. Pour faire ce gradient j'ai utilisé des cellules relargant de la nétrine-1.

Cette idée nous a été inspirée par le travail de [34 Bielle] dans lequel des explants de thalamus sont mis en culture à proximité de cellules COS relargant du slit1 ou de la nétrine-1. Les auteurs ont montré que les axones d'un explant de thalamus sont repoussés

par les cellules COS exprimant slit1 et ne sont pas affectés par les cellules relargant nétrine-1 mais sont attirés par un mélange de cellules relargant slit1 et de cellules relargant nétrine-1. Cette méthode avait été précédemment utilisée par [76 Gil]. Nous avons utilisé cette configuration expérimentale pour essayer de créer un gradient sur des temps très longs, de plusieurs jours.

Pour réaliser cette expérience, j'ai d'abord fait un motif de fibronectine en forme de rectangle, sur lequel j'ai ensemencé, dans du milieu DMEM, des cellules COS-7 (lignée de cellules fibroblastes originaires de rein de singe) électroporées avec un plasmide codant pour la nétrine-1 et un plasmide codant pour la GFP, qui sert de marqueur pour visualiser les cellules électroporées. Après une nuit à l'incubateur, j'ai fait des motifs de laminine 488 en forme de grille (avec des lignes de 3 µm d'épaisseur séparées de 15 µm) à côté des cellules. J'ai ensuite ensemencé des neurones dissociés dans du milieu neurobasal complet qui vont adhérer sur les grilles de laminine 488 (figure 3.20 A). Ainsi, les cellules électroporées relarguent de la nétrine-1 qui devrait former un gradient soluble à proximité des neurones. Des vidéos sont enregistrées après un jour *in vitro*. Ces expériences sont réalisées sur des lamelles schott hydrogel.

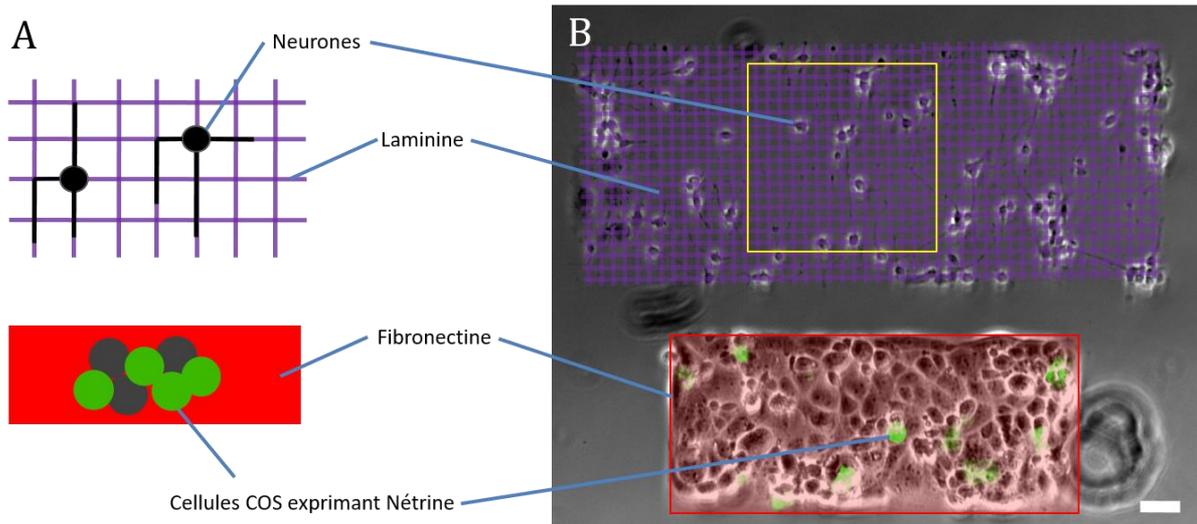


Figure 3.20 : **Schéma et images de l'expérience de coculture.** A) Schéma de l'expérience de coculture. Les neurones poussent sur un motif de laminine 488 en forme de grille. Les cellules COS sont électroporées pour exprimer la nétrine-1 et la GFP, elles adhèrent sur un motif de fibronectine en forme de rectangle. B) Superposition d'une image en contraste de phase et d'une image de fluorescence GFP (en vert) de neurones en coculture avec des cellules COS, à DIV 1. Sur l'image sont représentés le motif de laminine 488 en forme de grille en violet, le motif de fibronectine en forme de rectangle en rouge et le carré dans lequel seront comptés les axones en jaune. Barre d'échelle 50 µm.

Les cellules COS-7 ne semblent pas souffrir de l'étape de patterning en leur présence ni du changement de milieu par du neurobasal complet, car elles sont toujours vivantes et se divisent lors de l'enregistrement des vidéos (figure 3.20 B).

Le taux d'électroporation des cellules COS est faible, on l'observe par le fait que peu de cellules expriment la GFP, ce qui doit induire un faible relargage de nétrine. Je calcule ce taux en comptant les cellules COS fluorescentes et celles qui n'expriment pas la GFP, sur les motifs de fibronectine (figure 3.20 B). Sur les 7 expériences réalisées avec cette

Partie 3 : Résultats

configuration, sur 2 lamelles différentes, j'obtiens un taux moyen de cellules transfectées de 11%. Ce taux est relativement faible, notre protocole d'électroporation n'est pas très efficace.

Il faudrait améliorer le taux de transfection mais aussi vérifier que le protocole ne modifie pas le ratio, que les cellules transfectées n'adhèrent pas moins bien que les cellules non transfectées sur le motif de fibronectine.

J'ai ensuite compté les axones, en fonction de leur orientation et de leur longueur. La méthode de comptage des axones consiste à dénombrer les cônes de croissance des neurites dans les différentes orientations (gauche, droite, haut et bas) (figure 3.21 A) et la longueur des neurites (comptée en pas de grille faisant 15 μm) dans chaque orientation (figure 3.21 B), dans un carré de 240 μm X 240 μm (représenté en jaune dans les figures 3.20 B et 3.21). Je compte les axones dans un carré de 240 X 240 μm , qui a ses côtés plus petit que la largeur du motif en forme de grille, pour m'affranchir des effets de bord.

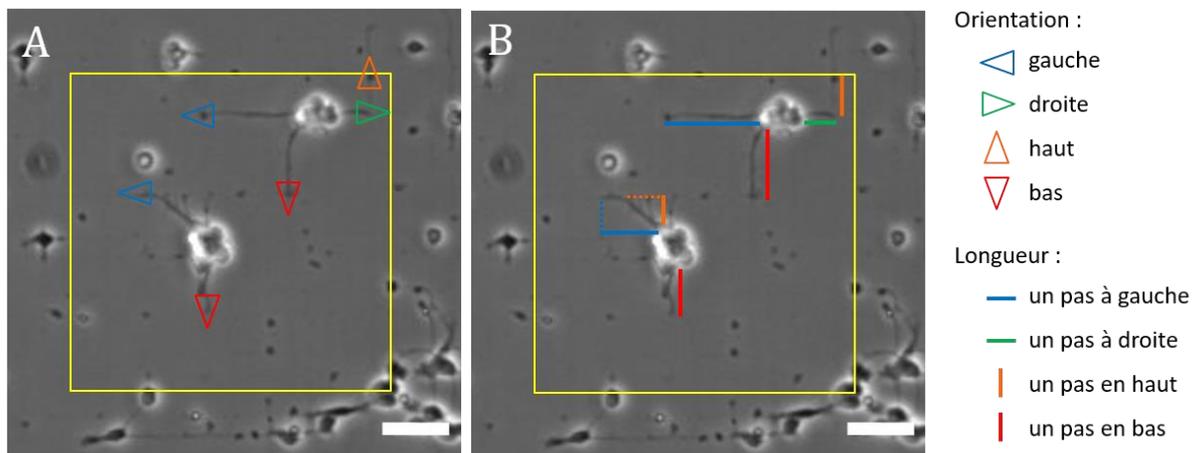


Figure 3.21 : **Principe du comptage des axones.** A) Image en contraste de phase des neurones sur une grille de laminine 488. Le carré jaune délimite la zone dans laquelle les axones sont comptés. Les triangles indiquent l'orientation des axones, à gauche en bleu, à droite en vert, en haut en orange et en bas en rouge. B) Même image en contraste de phase des neurones sur une grille de laminine 488. Les traits indiquent la longueur des axones. La longueur de chaque axone est comptée en pas de grille de 15 μm . Barre d'échelle 50 μm .

Pour l'image de la figure 3.21, le comptage donne les valeurs suivantes :

	Gauche	Droite	Horizontal	Haut	Bas	Vertical
Orientation finale	2	1	3	1	2	3
Longueur	6	1	7	2	5	7

Tableau 2 : Tableau de comptage des axones. Le nombre d'axones dans chaque orientation est répertorié ainsi que leurs longueurs. Ici sont indiquées les valeurs pour l'image de la figure 3.21.

La même méthode de comptage est appliquée à des images de neurones sur des motifs de laminine 488 en forme de grille en absence de cellules COS-7 relargant une molécule. Cette configuration sert de contrôle, elle permet de cultiver les neurones sur le même motif de laminine en forme de grille sans les exposer à une molécule de guidage.

Partie 3 : Résultats

Cette expérience a été réalisée sur 74 motifs de laminine 488 en forme de grille, sur 11 lamelles différentes. Sur 11 motifs les neurones sont morts avant que je puisse prendre des vidéos et sur 5 les axones étaient très petits. Sur les 58 vidéos enregistrées, 33 ont été gardées pour l'analyse, les 25 autres ayant une densité de neurones trop faible ou trop élevée.

Il aurait été intéressant de faire un contrôle avec des cellules COS-7 non électroporées pour vérifier que ces cellules n'ont pas d'impact sur le guidage des axones. Un contrôle similaire a été effectué par [34 Bielle] qui n'ont observé aucun effet de cellules COS n'exprimant aucune molécule de guidage sur la pousse des axones d'un explant de thalamus.

Nous calculons ensuite les ratios horizontal/vertical, gauche/droite et haut/bas de l'orientation finale et de la longueur des images de neurones en présence de cellules COS relargant de la nétrine-1 et des images de neurones sans COS. Nous obtenons alors les résultats suivant (figure 3.22 et 3.24).

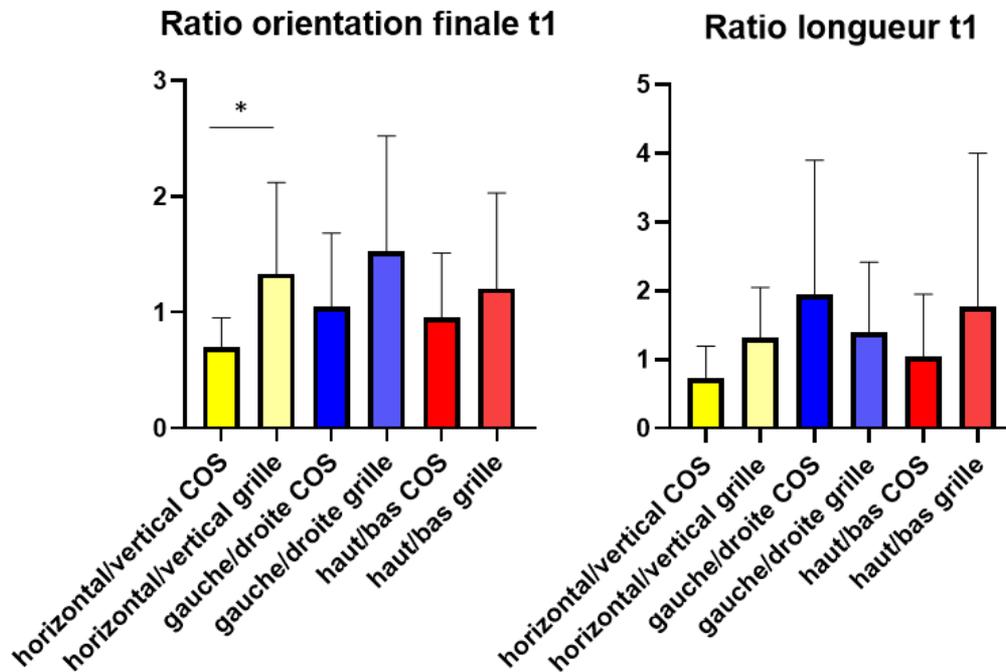


Figure 3.22 : **Graphique des ratios à t1.** Moyennes des ratios de l'orientation finale des axones des expériences avec COS et celles avec seulement des neurones sur grilles de laminine. Ratios horizontal/vertical, gauche/droite et haut/bas. Moyennes des mêmes ratios pour la longueur des axones. La différence des ratios horizontal/vertical de l'orientation finale avec et sans COS donne avec le t-test $p=0,04$. La différence des ratios horizontal/vertical de la longueur avec et sans COS donne $p=0,05$. $N = 7$ images pour la condition avec COS et $N = 33$ images pour la condition sans COS. * : $p<0,05$.

Partie 3 : Résultats

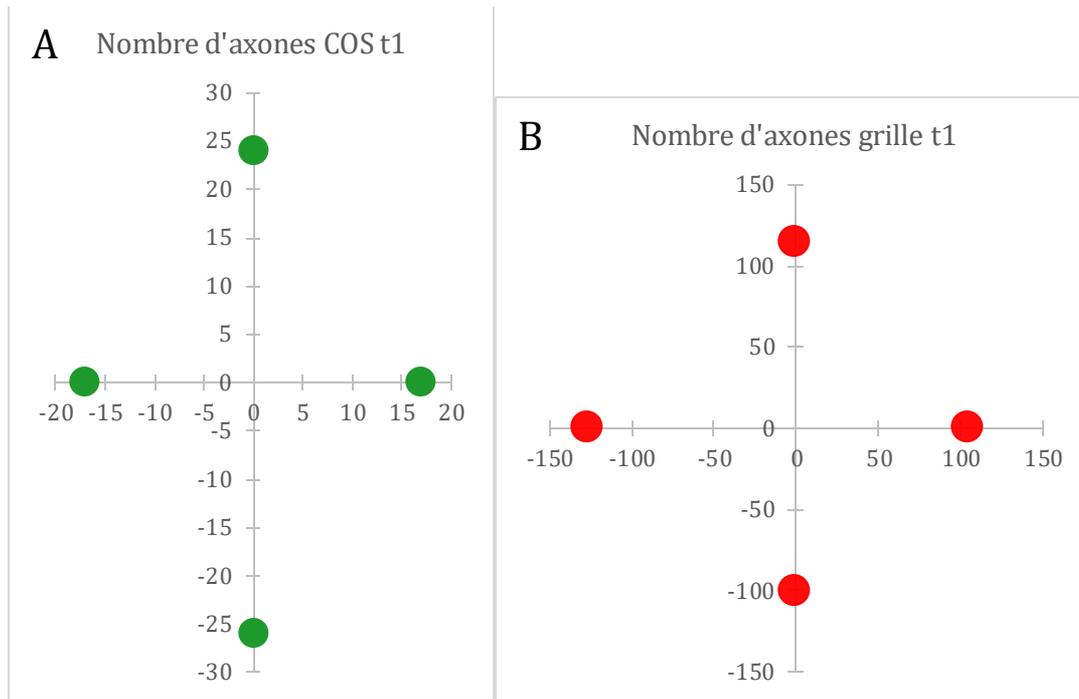


Figure 3.23 : **Graphique du nombre total d'axones dans chaque direction à t1.** A) Nombre total d'axones dans chacune des 4 directions sur les 7 images avec cellules COS. Il y a 17 axones orientés vers la gauche, 17 vers la droite, 24 vers le haut et 26 vers le bas. B) Nombre total d'axones dans chacune des 4 directions sur les 33 images sans cellules COS. Il y a 126 axones orientés vers la gauche, 105 vers la droite, 114 vers le haut et 101 vers le bas.

Les ratios, calculés à partir de l'orientation et de la longueur des axones mesurées sur la première image de chaque vidéo, sont légèrement différents entre les images de neurones en présence de cellules COS-7 relargant de la nétrine-1 et celles sans ces cellules (figure 3.22). Il est possible qu'il y ait un effet de la nétrine-1 relarguée par les cellules COS puisqu'il y a plus d'axones orientés verticalement qu'horizontalement pour la condition avec cellules COS (le ratio horizontal/vertical est inférieur à 1, barre jaune foncé). De plus, la différence entre les ratios horizontal/vertical de la condition avec COS et de celle sans COS est légèrement significative avec le t-test ($p=0,04$). Mais, par contre, il y a autant d'axones orientés vers le haut que vers le bas dans la condition avec cellules COS (barre rouge foncé), ce qui contredit l'hypothèse d'un effet attractif de la nétrine.

En ce qui concerne la longueur des axones, on observe la même tendance que pour l'orientation (figure 3.22). La longueur verticale est plus grande que celle horizontale pour les neurones cultivés en présence de cellules COS-7 relargant de la nétrine (barre jaune foncé). La différence entre les ratios horizontal/vertical de la condition avec COS et de celle sans COS est presque significative ($p=0,05$). Par contre, comme pour l'orientation, la longueur vers le haut est la même que celle vers le bas (barre rouge foncé).

La différence entre les ratios gauche/droite de la condition avec COS et de celle sans cellules COS, autant pour l'orientation finale que pour la longueur, n'est pas significative. Cela est aussi le cas pour les ratios haut/bas.

Le nombre total d'axones dans chaque direction est d'un ordre de grandeur différent entre les expériences avec cellules COS et celles sans cellules COS (figure 3.23). Cela s'explique par la différence du nombre d'expérience effectuée pour chaque configuration.

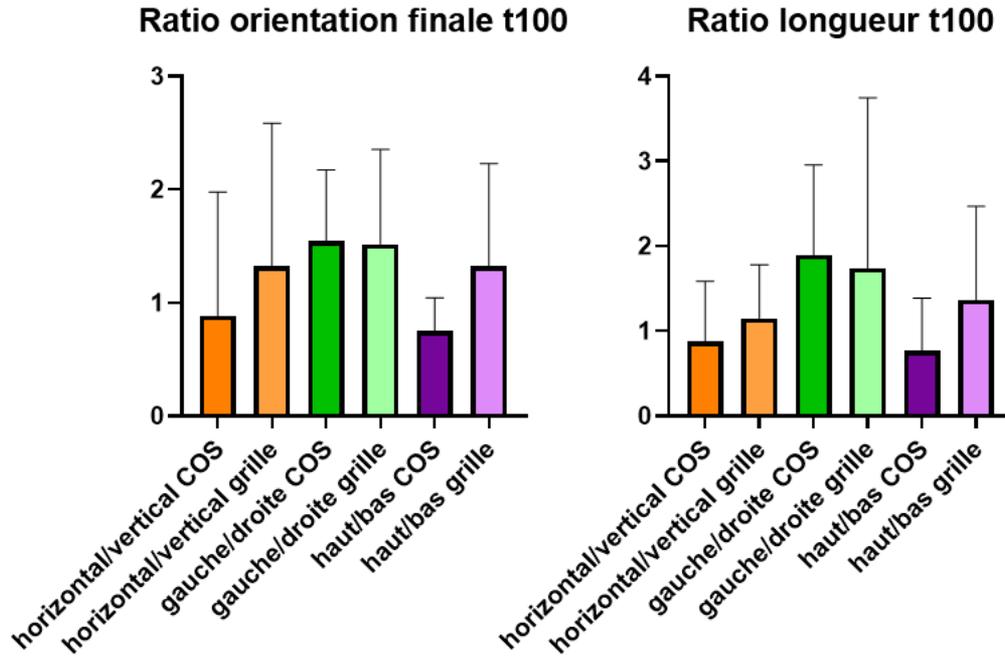


Figure 3.24 : **Graphique des ratios à t100.** Moyenne des mêmes ratios que sur la figure 3.22, calculés à partir d'images provenant des mêmes vidéos que celles utilisées pour obtenir la figure 3.22, prises 100 min, soit 1h40, plus tard.

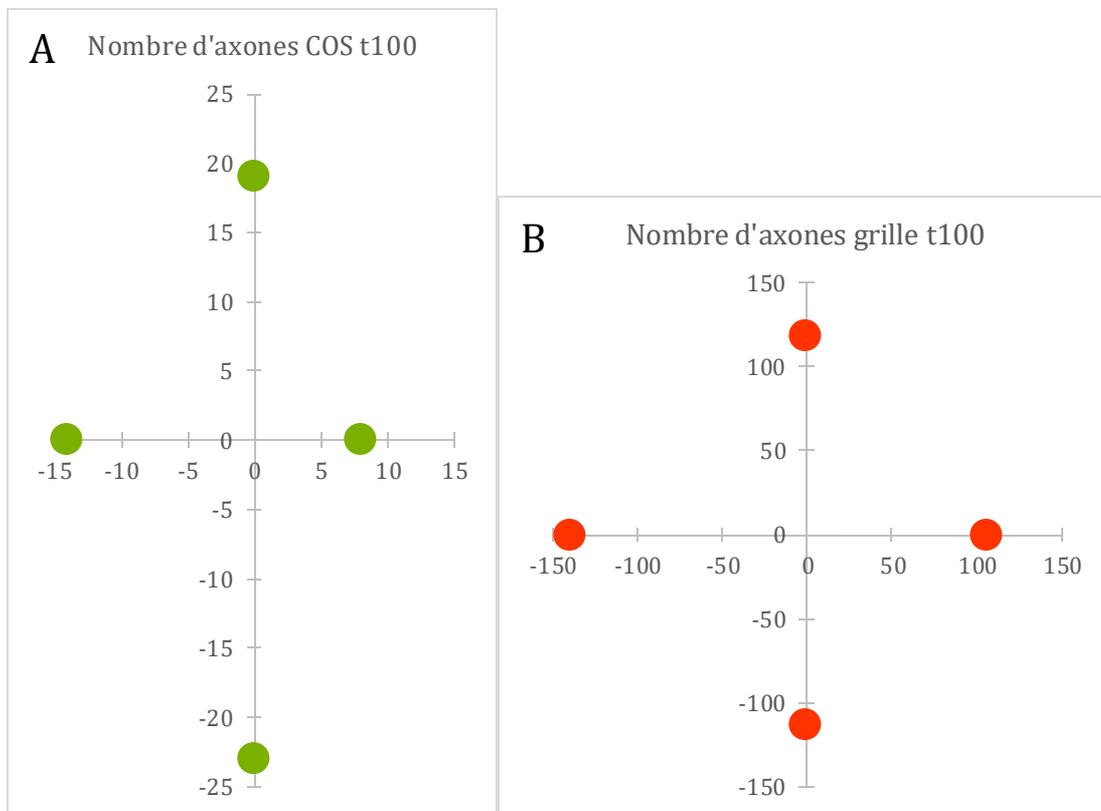


Figure 3.25 : **Graphique du nombre total d'axones dans chaque direction à t100.** A) Nombre total d'axones dans chacune des 4 directions sur les 7 images avec cellules COS. Il y a 14 axones orientés vers la gauche, 8 vers la droite, 19 vers le haut et 23 vers le bas. B) Nombre total d'axones dans chacune des 4 directions sur les 33 images sans cellules COS. Il y a 139 axones orientés vers la gauche, 107 vers la droite, 118 vers le haut et 113 vers le bas.

Partie 3 : Résultats

Les ratios, calculés à partir de l'orientation et de la longueur des axones mesurés sur la centième image de chaque vidéo (1h40 après son début), sont là encore légèrement différents entre les images de neurones en présence de cellules COS-7 relargant de la nétrine-1 et celles sans ces cellules (figure 3.24). Cependant, la différence est plus faible qu'entre ces mêmes ratios à t1 (figure 3.22). Ici, à t100, aucune des différences entre ratio n'est significative. On peut tout de même noter que le ratio horizontal/vertical est toujours inférieur à 1 pour les neurones en présence de cellules COS relargant de la nétrine, autant en ce qui concerne l'orientation finale que la longueur (figure 3.24, barres orange foncé). De même, le ratio haut/bas est inférieur à 1 pour la condition avec cellules COS pour l'orientation et la longueur (barre violet foncé).

Comme précédemment, à t1, le nombre total d'axones n'est pas du même ordre de grandeur entre les expériences avec cellules COS et celles sans cellules COS (figure 3.25).

Tous ces résultats, bien que faibles et peu significatifs, sont compatibles avec une attraction vers le bas, où sont présentes les cellules COS relargant de la nétrine-1.

Néanmoins, cet effet, bien que faible et à reproduire, semble montrer que la méthode de l'expérience fonctionne. Cette méthode permet de créer un gradient sur un temps relativement long. Elle donne aussi la possibilité de faire une quantification précise et donc de pouvoir observer un effet possible d'une molécule de guidage. De plus, elle est simple à réaliser car ne nécessite pas de microfluidique donc pas de connectique. Elle pourrait alors être reproduite dans une plaque 96 puits. Cela donnerait la possibilité d'augmenter rapidement le nombre d'expériences réalisées et de tester plusieurs molécules de guidage, relarguées par des cellules COS, lors d'une même expérience. Il serait donc possible de faire du criblage de molécules de guidage sur des neurones.

Pour poursuivre cette expérience et avoir la possibilité d'observer un effet significatif de la nétrine, il faudrait, en premier lieu, améliorer l'étape d'électroporation pour obtenir un meilleur taux de transfection.

III. Neurones et glies sur grilles de laminine

Nous avons observé, lors des expériences précédentes, sur une vidéo de neurones dissociés sur des motifs de laminine en forme de grilles, une cellule qui se déplaçait sur cette grille et qui connectait deux neurites (figure 3.26).

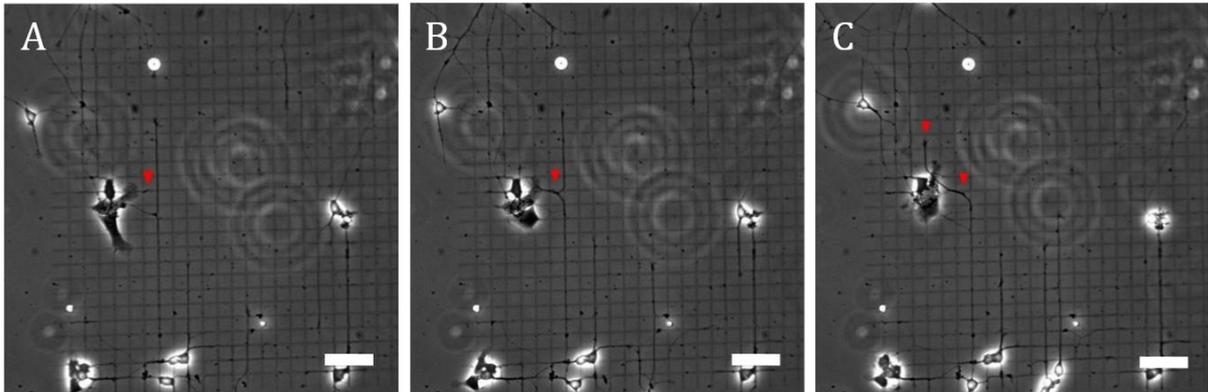


Figure 3.26 : **Images de neurones sur un motif de laminine en forme de grille avec une cellule tirant sur un axone.** A) Image en contraste de phase de neurones sur un motif de laminine en forme de grille à l'instant t. La flèche rouge montre un filopode de la cellule se dirigeant vers un axone. B) Même image à t + 42 min. La flèche rouge montre le filopode de la cellule qui tire sur l'axone. C) Même image à t + 174 min. La flèche rouge de droite montre l'endroit où le filopode de la cellule a tiré sur l'axone, celle de gauche montre le cône de croissance de cet axone. Barre d'échelle 50 μm .

Nous avons cherché à identifier la nature de ces cellules qui semblent avoir un effet très important sur la pousse et le guidage des axones. Nous présumons que cela pouvait être des microglies. Pour étudier cela, nous avons reproduit cette expérience en ensemençant des neurones dissociés sur des motifs de laminine 488 en forme de grille dans un milieu qui permet la prolifération des glies avec les neurones. Après avoir fait des acquisitions de time lapse (figure 3.27 A et B), nous avons fixé les cellules et les avons marquées avec un anticorps reconnaissant les microglies, anti-Iba1. Nous les avons aussi marquées avec l'anticorps anti-MAP2 qui reconnaît les microtubules (figure 3.27 C). Ces expériences sont réalisées sur des lamelles schott hydrogel.

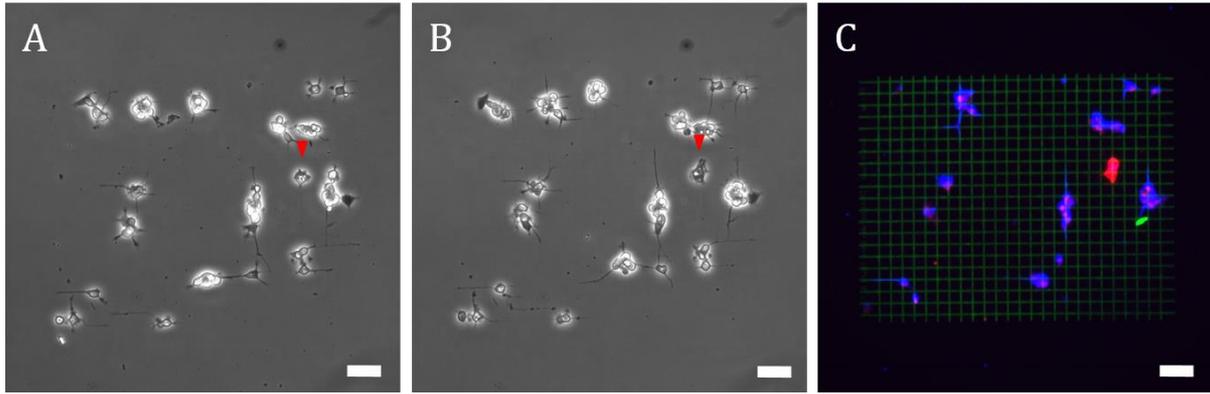


Figure 3.27 : **Images de neurones et d'une microglie sur un motif en forme de grille** A, B) Images en contraste de phase de neurones et glies sur un motif de laminine 488 en forme de grille, 6 h après l'ensemencement A) à l'instant t. B) à l'instant t + 46 min. C) Images des neurones et des glies marqués avec Iba1 (en rouge) et MAP2 (en bleu) sur un motif de laminine 488 (en vert). La flèche rouge en A et B montre la microglie. Barre d'échelle 50 μ m.

Sur les times lapses je n'ai pas observé de cellules connectant deux neurites entre elles. Par contre, j'ai observé des cellules très motiles, au phénotype similaire à celui que nous cherchons à caractériser, mais elles ne sont ensuite pas marquées par Iba1. Sur 32 vidéos j'ai comptabilisé 69 cellules très motiles (figure 3.28). J'ai, dans le même temps, comptabilisé 14 cellules marquées par l'anticorps Iba1 mais aucune de ces cellules ne se déplace (figure 3.28). Les cellules marquées par cet anticorps spécifique aux microglies ne se déplacent pas sur les motifs en forme de grilles.

J'ai réalisé cette expérience sur 54 motifs de laminine 488 en forme de grille, sur 7 lamelles. J'ai gardé 32 positions pour l'analyse, les 22 autres ayant une densité en neurones trop faible ou trop forte.

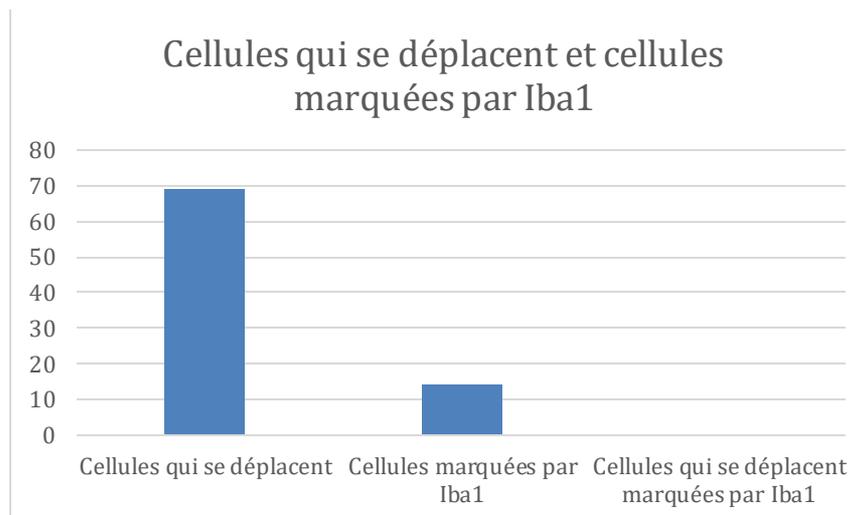


Figure 3.28 : **Graphique du nombre de cellules qui se déplacent sur les motifs en forme de grilles et de cellules marquées par l'anticorps Iba1**. Ces valeurs ont été obtenues par l'analyse de 32 vidéos.

Partie 3 : Résultats

Notre hypothèse est donc probablement fautive et des investigations nouvelles (en dehors du cadre de cette thèse) doivent être effectuées. Ces observations suggèrent néanmoins que les motifs de type « grille » que nous avons proposés, avec des dimensions bien choisies : des lignes de 3 μm d'épaisseurs séparées de 15 μm (en s'inspirant notamment des travaux de l'équipe de C. Villard [77 Tomba]) sont bien adaptés pour l'investigation des mécanismes élémentaires de formation des réseaux neuronaux. En effet, ils permettent une bonne adhésion des corps cellulaires et l'alignement des neurites sur les lignes de la grille.

Conclusion

Les résultats obtenus sont encourageants dans la mise au point d'un système pour étudier le guidage axonal *in vitro*.

Premièrement, nous avons expérimenté l'isolement des axones de neurones dissociés. Pour cela, nous avons d'abord observé la pousse des neurones dissociés sur des motifs de protéines en forme de grille. Nous avons pu vérifier que les neurones peuvent adhérer et que leurs axones peuvent pousser sur des motifs créés par notre technique de microphotopatterning LIMAP. Ensuite, nous avons ensemencé des neurones dans des dispositifs microfluidiques à deux compartiments reliés par des microcanaux, permettant de séparer les axones des somas. Cette configuration est efficace pour isoler les axones mais ne permet pas d'aller plus loin dans nos expériences de guidage axonal à cause de la grande difficulté à créer des motifs à l'intérieur de ce dispositif.

Deuxièmement, nous avons mis des neurones dissociés en présence de gradients patternés de molécules de guidage pour étudier l'effet de ces molécules sur les axones. Nous avons d'abord fait pousser des neurones sur une lamelle contenant des gradients d'éphrine et de sémaphorine patternés. Les neurones semblent éviter l'éphrine et ne pas réagir à la sémaphorine.

Nous avons ensuite utilisé des explants, qui sont un modèle plus proche de la réalité physiologique. Nous les avons exposés à des gradients patternés de protéines d'adhésion ou de molécules de guidage, pour étudier leur réaction à ces gradients. Nous avons d'abord mis ces explants sur des motifs de laminine en forme de serrures prolongées par un gradient. Les explants adhèrent et ont des axones qui poussent sur le motif. Par contre il est difficile de positionner ces explants. Nous avons donc fabriqué des structures d'alignement des explants, en polymérisant des hydrogels. Elles permettent de positionner facilement l'explant sur la région du motif souhaitée. Après un positionnement facile sur les motifs, les axones sortant de l'explant poussent sur le motif de laminine et atteignent le gradient de laminine. Cependant les axones ne tournent pas au niveau de ce gradient. Par la suite, nous avons mis des explants à côté de gradients patternés d'éphrine. Les axones sortant de l'explant arrivent à pousser sur le motif d'éphrine et ne semblent pas être repoussés par cette molécule.

Troisièmement, nous avons mis des neurones dissociés en présence de gradients solubles de molécules de guidage. Nous avons d'abord fabriqué un dispositif microfluidique à base d'hydrogels dans lequel il est possible de créer un gradient dans sa chambre centrale. Cependant le gradient est très faible et lorsqu'il est composé de slit, les axones des neurones ensemencés dans la chambre centrale ne montrent pas de réaction, ils ne tournent pas.

Nous avons ensuite fait une coculture de neurones et de cellules COS électroporées pour relarguer de la nétrine1 et ainsi mettre en place un gradient soluble. Les neurones semblent s'aligner sur l'axe perpendiculaire au gradient, mais cet effet est faible. Les neurones étant peu guidés, il est possible que le gradient de nétrine créé par les cellules COS soit trop faible.

Quatrièmement, nous avons ensemencé des neurones et des cellules gliales dissociées sur des motifs de laminine en forme de grilles pour étudier l'interaction entre

ces deux populations. Nous avons fixé et marqué ces cellules avec un anticorps reconnaissant les microglies. Les cellules qui se déplacent sur le motif et que nous avons vu connecter des neurites entre eux ne sont pas marquées par l'anticorps, elles ne semblent donc pas être des microglies.

Lors de cette thèse, j'ai mis au point plusieurs outils afin de pouvoir mieux étudier le guidage axonal. Pour cela, j'ai utilisé différentes techniques : le microphotopatterning, la microfluidique et la polymérisation d'hydrogels, ainsi que des combinaisons de ces techniques. Le microphotopatterning permet de faire des motifs de protéines de taille micrométrique. La microfluidique rend possible la fabrication de dispositifs ayant des microcanaux dans lesquels des neurones peuvent être ensemencés et pousser. La polymérisation d'hydrogels permet de créer des espaces dans lesquels des explants peuvent être positionnés. Ces outils m'ont permis de développer des modèles expérimentaux avec lesquels les axones des neurones peuvent être isolés et exposés à des gradients de molécules de guidage. L'isolation des axones permet une quantification de l'effet de gradients de molécules sur leur guidage.

Nous avons utilisé deux modèles biologiques, qui ont leurs avantages et leurs inconvénients, lors de nos expériences : des neurones dissociés d'hippocampe et des explants de cortex. Les neurones dissociés sont faciles à manipuler mais il est plus compliqué d'isoler leurs axones pour les exposer à des molécules de guidage, ce qui rend difficile l'analyse et la quantification des effets de ces molécules de guidage sur ces axones. De plus, ils ne survivent pas plus de sept jours *in vitro* sur nos motifs, sont fragiles, et il est très compliqué de les placer sur une seule partie du motif. Les explants, quant à eux, sont plus difficiles à manipuler car leur dissection est plus longue mais il est plus simple d'isoler leurs axones et ainsi de quantifier l'effet des molécules de guidage. Ils peuvent survivre plus longtemps que les neurones dissociés et il est possible de les placer sur une zone précise du motif mais il a pour cela fallu développer une méthode pour fabriquer des barrières en hydrogel qui les maintiennent en place.

Nous avons créé deux types de gradients lors de nos travaux : des gradients patternés et des gradients solubles. Les gradients patternés ont l'avantage d'être d'une grande précision et facilement reproductibles. Les gradients solubles, eux, peuvent être constant sur un temps long, par contre ils sont moins précis (à cause de la diffusion des molécules en solution) et moins reproductibles.

De nombreux obstacles existent pour la réalisation d'un dispositif efficace pour l'étude du guidage axonal en général et du guidage d'axones d'explants en particulier, du fait de la complexité du système biologique et des outils utilisés pour l'étudier. Les techniques de photopatterning, microfluidique et polymérisation d'hydrogels doivent être précisément adaptées pour le succès du développement d'un tel dispositif. Lors de cette thèse, nous avons réussi à faire pousser des explants à côté de gradients patternés de molécules d'adhésion ou de molécules de guidage. Cela a été possible grâce à l'utilisation d'hydrogels polymérisés qui maintiennent l'explant sur une zone du motif. Ce résultat ouvre la voie à un développement plus approfondi de ce modèle d'explants en présence de gradients. Pour aller plus loin, un dispositif plus abouti pour l'étude du guidage axonal serait un dispositif microfluidique dans lequel des explants seraient positionnés près de gradients de molécules de guidage patternés, tout en étant soumis à un gradient de molécules de guidage soluble.

Le photopatterning, la microfluidique et la polymérisation d'hydrogel nous ont permis de proposer des dispositifs simples et parallélisables qui ont rendu possible l'obtention de résultats préliminaires sur l'étude du guidage axonal. Pour obtenir un système d'étude du guidage axonal, efficace et permettant la reproduction des expériences, il est nécessaire de poursuivre le développement de l'une de ces configurations expérimentales. La plus aboutie est la coculture de neurones dissociés et de cellules COS-7 relargant de la nétrine-1. Ces expériences sont simples à réaliser, permettent de quantifier avec simplicité la pousse et l'orientation des axones, grâce au motif en forme de grille, et mettent en place un gradient sur une longue durée. Cette configuration pourrait être adaptée pour une coculture d'explants et de cellules COS. Un explant pourrait être positionné à côté d'un motif de laminine en forme de grille, sur lequel les axones sortants de l'explant pourraient pousser. A proximité de ce motif, des cellules COS, relargant une protéine de guidage, pourraient être placées. Cette configuration expérimentale pourrait être reproduite dans une plaque 96 puits, ce qui donnerait la possibilité de réaliser un criblage de molécules de guidage. Cette évolution est possible car cette configuration expérimentale ne requiert pas de microfluidique, donc ni tuyauterie, ni pompe, elle nécessite seulement un robot pipeteur et une plaque multipuits. Par contre, cette configuration serait compliquée à mettre en place avec des explants car leur dissection et surtout leur placement prendrait beaucoup de temps. Il serait donc plus intéressant de réaliser ces expériences avec des neurones dissociés, qui sont tout de même un modèle efficace. D'ailleurs, ce projet, de reproduire dans une plaque 96 puits une coculture de neurones dissociés et de cellules relargant une molécule de guidage, fait l'objet d'une ANR avec l'entreprise Alvéole et Olivier Thoumine, membre de notre institut (IINS).

J'espère que ce projet sera poursuivi dans le laboratoire et qu'un tel dispositif, permettant d'étudier de manière simple et reproductible le guidage axonal, sera un jour obtenu.

Bibliographie

- [1] Dent EW and Gertler FB. (2003) Cytoskeletal Dynamics and Transport in Growth Cone Motility and Axon Guidance. *Neuron*. **40**:209–227
- [2] Lowery LA and Van Vactor D. (2009) The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nature reviews Molecular cell biology*. **10**:332–343
- [3] Suter DM and Forscher P. (2000) Substrate–Cytoskeletal Coupling as a Mechanism for the Regulation of Growth Cone Motility and Guidance. *Journal of Neurobiology*. **44**:97–113
- [4] Mortimer D et al. (2008) Growth cone chemotaxis. *Trends in Neurosciences*. **31**:90–98
- [5] Evans AR et al. (2007) Laminin and fibronectin modulate inner ear spiral ganglion neurite outgrowth in an *in vitro* alternate choice assay. *Developmental Neurobiology*. **67**:1721–1730
- [6] Zou Y and Lyuksyutova AI. (2007) Morphogens as conserved axon guidance cues. *Current Opinion in Neurobiology*. **17**:22–28
- [7] Morel M et al. (2012) Amplification and Temporal Filtering during Gradient Sensing by Nerve Growth Cones Probed with a Microfluidic Assay. *Biophysical Journal*. **103**:1648-1656
- [8] Govek, EE et al. (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes & Development*. **19**:1–49
- [9] Rogers SL et al. (1989) The Role of Fibronectin in Neural Development. *Developmental Neuroscience*. **11**:248–265
- [10] Kleinman HK et al. (1990) Laminin in Neuronal Development. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **580**:302–310
- [11] Ramón y Cajal S. (1890). Notas anatómicas I. Sobre la aparición de las expansiones celulares en la médula embrionaria. *Gac. Sanit. Barc*. **12**:413–419
- [12] Sperry RW. (1963) Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **50**:703-710
- [13] Chilton JK. (2006) Molecular mechanisms of axon guidance. *Developmental Biology*. **292**:13–24
- [14] Leonardo ED et al. (1997) Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature*. **386**:833-838

- [15] Walter J et al. (1987) Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons *in vitro*. *Development*. **101**:685-696
- [16] Drescher U et al. (1995) *In vitro* guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell*. **82**:359-370
- [17] Frisén J et al. (1998) Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) Is Essential for Proper Retinal Axon Guidance and Topographic Mapping in the Mammalian Visual System. *Neuron*. **20**:235-243
- [18] Pasquale EB. (2005) Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **6**:462-475
- [19] Luo, Y et al. (1993) Collapsin: A protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell*. **75**:217-227
- [20] Raper JA and Kapfhammer JR. (1990) The enrichment of a neuronal growth cone collapsing activity from embryonic chick brain. *Neuron*. **4**:21-29
- [21] Chédotal A et al. (1998) Semaphorins III and IV repel hippocampal axons via two distinct receptors. *Development*. **125**:4313-4323
- [22] Moret F et al. (2007) Semaphorin and Neuropilin Co-Expression in Motoneurons Sets Axon Sensitivity to Environmental Semaphorin Sources during Motor Axon Pathfinding. *Development*. **134**:4491-4501
- [23] Dent EW et al. (2004) Netrin-1 and Semaphorin 3A Promote or Inhibit Cortical Axon Branching, Respectively, by Reorganization of the Cytoskeleton. *Journal of Neuroscience*. **24**:3002-3012
- [24] Tessier-Lavigne M et al. (1988) Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature*. **336**:775-778
- [25] Serafini T et al. (1994) The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell*. **78**:409-424
- [26] Kennedy TE et al. (1994) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell*. **78**:425-435
- [27] Keino-Masu K et al. (1996) Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell*. **87**:175-185
- [28] Dominici C et al. (2017) Floor-Plate-Derived Netrin-1 Is Dispensable for Commissural Axon Guidance. *Nature*. **545**:350-354
- [29] Finci LI et al. (2014) The crystal structure of netrin-1 in complex with DCC reveals the bi-functionality of netrin-1 as a guidance cue. *Neuron*. **83**:839-849

- [30] Rothberg JM et al. (1990) Slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes & Development*. **4**:2169–2187
- [31] Seeger M et al. (1993) Mutations affecting growth cone guidance in drosophila: Genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron*. **10**:409–426
- [32] Georgiou M and Tear G. (2002) Commissureless is required both in commissural neurones and midline cells for axon guidance across the midline. *Development*. **129**:2947–2956
- [33] Sabatier C et al. (2004) The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell*. **117**:157-169
- [34] Bielle F et al. (2011) Emergent growth cone responses to combinations of Slit1 and Netrin 1 in thalamocortical axon topography. *Current Biology*. **21**:1748-1755
- [35] Dupin I et al. (2015) Subrepellent doses of Slit1 promote Netrin-1 chemotactic responses in subsets of axons. *Neural Development*. **10**:5
- [36] Dickson BJ. (2002) Molecular Mechanisms of Axon Guidance. *Science*. **298**:1959–1964
- [37] Ciani L and Salinas PC. (2005) WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity: Signalling in neural development. *Nature Reviews Neuroscience*. **6**:351–362
- [38] Charron F et al. (2003) The Morphogen Sonic Hedgehog Is an Axonal Chemoattractant that Collaborates with Netrin-1 in Midline Axon Guidance. *Cell*. **113**:11–23
- [39] Sloan TFW et al. (2015) Integration of Shallow Gradients of Shh and Netrin-1 Guides Commissural Axons. *PLOS Biology*. **13**:e1002119
- [40] Ebendal T and Jacobson CO. (1977) Tissue explants affecting extension and orientation of axons in cultured chick embryo ganglia. *Experimental cell research*. **105**:379-387
- [41] Lumsden AGS and Davies AM. (1983) Earliest sensory nerve fibres are guided to peripheral targets by attractants other than nerve growth factor. *Nature*. **306**:786-788
- [42] Corset V et al. (2000) Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor. *Nature*. **407**:747–750
- [43] Dupin I et al. (2013) Investigating axonal guidance with microdevice-based Approaches. *The Journal of Neuroscience*. **33**:17647-17655
- [44] Rosoff WJ et al. (2004) A new chemotaxis assay shows the extreme sensitivity of axon to molecular gradients. *Nature Neuroscience*. **7**:678-682

- [45] Pujic Z and Goodhill GJ. (2013) A dual compartment diffusion chamber for studying axonal chemotaxis in 3D collagen. *Journal of Neuroscience Methods*. **215**:53-59
- [46] Tharin S et al. (2012) A microfluidic device to investigate axon targeting by limited numbers of purified cortical projection neuron subtypes. *Integrative Biology*. **4**:1398-1405
- [47] Zicha D et al. (1991) A new direct-viewing chemotaxis chamber. *Journal of Cell Science*. **99**:769-775
- [48] Maden M et al. (1998) Retinoic acid as a chemotactic molecule in neuronal development. *International Journal of Developmental Neuroscience*. **16**:317-322
- [49] Dudanova I et al. (2010) GDNF acts as chemoattractant to support ephrinA-induced repulsion of limb motor axons. *Current Biology*. **20**:2150-2156
- [50] Yam PT et al. (2009) Sonic hedgehog guides axons through a noncanonical, Src-family-kinase-dependent signaling pathway. *Neuron*. **62**:349-362
- [51] Wittig JH Jr et al. (2005) A reusable microfluidic plate with alternate-choice architecture for assessing growth preference in tissue culture. *Journal of Neuroscience Methods*. **144**:79-89
- [52] Joanne Wang C et al. (2008) A microfluidics-based turning assay reveals complex growth cone responses to integrated gradients of substrate-bound ECM molecules and diffusible guidance cues. *Lab on a Chip*. **8**:227-237
- [53] Bhattacharjee N et al. (2010) A neuron-benign microfluidic gradient generator for studying the response of mammalian neurons towards axon guidance factors. *Integrative Biology*. **2**:669-679
- [54] Kothapalli CR et al. (2011) A high-throughput microfluidic assay to study neurite response to growth factor gradients. *Lab on a Chip*. **11**:497-507
- [55] Walter J et al. (1987) Avoidance of posterior tectal membranes by temporal retinal axons. *Development*. **101**:909-913
- [56] Yap FL and Zhang Y. (2007) Protein and cell micropatterning and its integration with micro/nanoparticles assembly. *Biosensors and Bioelectronics*. **22**:775-788
- [57] Kleinfeld D et al. (1988) Controlled outgrowth of dissociated neurons on patterned substrates. *Journal of Neuroscience*. **8**:4098-4120
- [58] Kumar A and Whitesides GM. (1993) Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol "ink" followed by chemical etching. *Applied Physics Letters*. **63**:2002-2004

- [59] Bernard A et al. (2000) Microcontact Printing of Proteins. *Advanced Materials*. **12**:1067-1070
- [60] Fricke R et al. (2011) Axon guidance of rat cortical neurons by micro contact printed gradients. *Biomaterials*. **32**:2070–2076
- [61a] von Philipsborn AC et al. (2006) Microcontact printing of axon guidance molecules for generation of graded patterns. *Nature Protocols*. **1**:1322–1328
- [62b] von Philipsborn AC et al. (2006) Growth cone navigation in substrate-bound ephrin gradients. *Development*. **133**:2487–2495
- [63] Perl A et al. (2009) Microcontact Printing: Limitations and Achievements. *Advanced Materials*. **21**:2257–2268
- [64] Kim E et al. (1995) Polymer microstructures formed by moulding in capillaries. *Nature*. **376**:581–584
- [65] Millet LJ et al. (2010) Guiding neuron development with planar surface gradients of substrate cues deposited using microfluidic devices. *Lab on a Chip*. **10**:1525-1535
- [66] Li GN et al. (2008) Multi-Molecular Gradients of Permissive and Inhibitory Cues Direct Neurite Outgrowth. *Annals of Biomedical Engineering*. **36**:889–904
- [67] McCullen SD et al. (2011) Laser Ablation Imparts Controlled Micro-Scale Pores in Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Annals of Biomedical Engineering*. **39**:3021–3030
- [68] Lorenzoni M et al. (2013) Simple and effective graphene laser processing for neuron patterning application. *Scientific Reports*. **3**
- [69] Waldbaur A et al. (2012) Maskless Projection Lithography for the Fast and Flexible Generation of Grayscale Protein Patterns. *Small*. **8**:1570–1578
- [70] Strale PO et al. (2016) Multiprotein Printing by Light-Induced Molecular Adsorption. *Advanced Materials*. **28**:2024–2029
- [71] Pinto LFA et al. (2013) Photodegradation of Polystyrene Films Containing UV-Visible Sensitizers. *Journal of Research Updates in Polymer Science*. **2**:39-47
- [72] Pasturel A et al. (2018) Tailoring 3D cell culture templates with common hydrogels. *bioRxiv*.
- [73] Tumbleston JR et al. (2015) Continuous liquid interface production of 3D objects. *Science*. **347**:1349–1352
- [74] Brewer GJ and Cotman CW. (1989) Survival and growth of hippocampal neurons in defined medium at low density: advantages of a sandwich culture technique or low oxygen. *Brain Research*. **494**:65–74

[75] Taylor AM et al. (2005) A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nature Methods*. **2**:599–605

[76] Gil V and Río JA. (2012) Analysis of axonal growth and cell migration in 3D hydrogel cultures of embryonic mouse CNS tissue. *Nature Protocols*. **7**:268–280

[77] Tomba C. (2014) Primary brain cells in *in vitro* controlled microenvironments. PhD manuscript.