



HAL
open science

Importance du microenvironnement dans les modèles cérébraux *in vitro* pour le criblage phénotypique

Véronique de Conto

► **To cite this version:**

Véronique de Conto. Importance du microenvironnement dans les modèles cérébraux *in vitro* pour le criblage phénotypique. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUS046 . tel-03767534

HAL Id: tel-03767534

<https://theses.hal.science/tel-03767534>

Submitted on 2 Sep 2022

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.

UNIVERSITE DE LILLE
Ecole Doctorale Biologie Santé

Année 2021

THESE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Discipline : Neurosciences

Présentée par

Véronique De Conto

INSERM U1172 « Troubles cognitifs dégénératifs et vasculaires »

HCS Pharma

**Importance du microenvironnement dans les modèles
cérébraux *in vitro* pour le criblage phénotypique**

Soutenue le 21 décembre 2021

Pr. Vincent Bérézowski, Université de Lille

Dr. Elodie Vandehaute, HCS Pharma

Dr. Catherine Villard, Institut Curie

Dr. Hélène Castel, Université de Rouen Normandie

Dr. Emilie Dejean, Celgene, a BMS company

Dr. Jean-Philippe Stephan, Institut de Recherches SERVIER

Directeur de thèse

Co-directrice de thèse

Rapporteure

Rapporteure

Examinatrice

Examineur, Président du jury

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux directeurs de thèse, Vincent Bérézowski et Elodie Vandenhaut. Merci pour tout ce que vous m'avez appris, pour votre bienveillance et votre soutien permanent. Elodie, merci d'avoir été là au quotidien, pour ta disponibilité et ton implication constante. Merci d'avoir partagé avec moi tes connaissances techniques et scientifiques. Vincent, même si nous nous voyions moins souvent nous avons su rester régulièrement en contact et j'ai aussi énormément appris de ta part. Tu m'as notamment beaucoup aidée à prendre du recul sur mes résultats, à faire de belles figures et je l'espère des jolies discussions.

Je tiens également à remercier tout particulièrement Nathalie Maubon. Merci pour ta confiance, et pour ton dévouement pour HCS Pharma. J'espère que tous tes efforts paieront bientôt et qu'HCS Pharma continuera de se développer en France et à l'étranger. Merci également d'avoir partagé avec moi ton expérience sur le processus de R&D dans l'industrie pharmaceutique.

Je remercie aussi Vaihere Cheung pour son aide technique. Tu as toujours été très consciencieuse et volontaire ; merci pour ton investissement.

Je remercie Grégory Maubon pour l'analyse d'images. Merci aussi pour ton aide en informatique et ton aide de manière générale dès que quelque chose « ne marche pas » (et avec moi c'est souvent, désolée pour ça !).

Je remercie aussi particulièrement Méryl Roudaut. Merci d'avoir partagé avec moi l'aventure de la thèse, même si tu as déjà fini depuis un an maintenant ! Merci aussi pour toutes ces discussions et ces bons moments partagés. Je suis très contente que tu nous ais rejoint sur Lille.

Je remercie Zied Souguir d'avoir partagé avec nous sa passion pour BIOMIMESYS®. Je remercie Julien Leriche pour la production des plaques et pour la mise en place du suivi qualité. Merci aussi à Océane Guyot et à Elise Mahieu pour votre sympathie.

Je remercie de manière générale tout l'équipe d'HCS Pharma, actuelle mais également les personnes qui sont parties vers de nouveaux horizons. Vous avez tous fait en sorte que ma thèse

se passe dans les meilleures conditions possibles. Venir au labo a toujours été un plaisir pour moi. Une pensée particulière pour Marie Lesaffre : nous avons commencé le même jour il y a quatre ans, au moment de l'ouverture du site de Lille. Merci pour ton grand soutien dans ces débuts où mon sujet de thèse était très incertain. Je te souhaite une belle et inoubliable expérience au Japon ! Je remercie aussi Thomas Meynard qui n'a malheureusement pas pu faire sa thèse à HCS Pharma : mais tu as su rebondir et je suis sûre que tu feras une autre très jolie thèse, bon courage pour ces 3 prochaines années !

Je remercie aussi l'équipe « Troubles cognitifs dégénératifs et vasculaires » de l'unité INSERM U1172. Je remercie particulièrement David Devos, Laura Mahoney Sanchez, Aurélie Jonneaux, Hind Bouchaoui et Flore Gouel pour leur aide sur mon western blot et mes dosages de protéines, et pour avoir partagé avec moi leurs connaissances sur les Lhmes et la maladie de Parkinson. Bon courage dans vos thèses pour Hind, Laura et Aurélie !

Je tiens aussi à remercier particulièrement Matthew Burbank, évaluateur préclinique à l'ANSM qui a répondu à toutes mes questions sur les tests précliniques nécessaires à l'obtention d'une AMM.

Muchas gracias tambien a Elisa L. J. Moya. Estoy muy feliz de haberte conocido y haber podido compartir todos estos momentos de la tesis pero también de la vida en general. Gracias por tu amistad, y gracias por la miniaturización del prototipo de BHE ;) ¡Conserva tu motivación y tu ambición, te deseo una linda carrera profesional!

I also thank Roberta Bilardo. I have overcome my fears in English thanks to you! It was a real pleasure to share your secondment in Lille with you. I wish you all the best.

Je remercie aussi toutes les personnes qui m'ont soutenue, ma famille et mes amis. Merci particulièrement à ceux qui m'ont aidé pour la relecture de mon travail : mes parents, Sophie et Raphaël, et Béa pour le résumé vulgarisé. Merci aussi à JojoLaFrite pour les chocolats d'encouragement :D Et surtout merci à Raphaël de m'avoir soutenue au point d'en devenir Ch'ti ;)

Je remercie aussi l'Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) pour avoir financé cette thèse.

LISTE DES PRESENTATIONS ET DES POSTERS

- Présentation orale : « **Development of a cerebral *in vitro* 3D model including matricial microenvironment for drug discovery in Parkinson's disease** » Véronique De Conto, Zied Souguir, Nathalie Maubon, Elodie Vandehaute, Vincent Berezowski. Congrès 2019 de la Société Cerveau de Maladie Cérébrovasculaire (SCMC), Lille, 28-29 mars 2019.
- Présentation orale : « **Development of a cerebral *in vitro* 3D model including matricial microenvironment for drug discovery in Parkinson's disease** » Véronique De Conto, Zied Souguir, Nathalie Maubon, Elodie Vandehaute, Vincent Berezowski. Colloque annuel des doctorants en biologie – santé de Lille (Journée André Verbert), Lille, 10 septembre 2019.
- Présentation orale : « **In vitro culture conditions impact on the phenotype and the neurotoxic response of SH-SY5Y cells** » Véronique De Conto, Vaihere Cheung, Grégory Maubon, Zied Souguir, Nathalie Maubon, Elodie Vandehaute, Vincent Berezowski. Congrès 2021 de la Société Cerveau de Maladie Cérébrovasculaire (SCMC), Visioconférence, 28 mai 2021.
- Webinar : « **3D cerebral in vitro models in BIOMIMESYS® Brain** » Véronique De Conto, Vaihere Cheung, Grégory Maubon, Zied Souguir, Elodie Vandehaute, Nathalie Maubon. Visioconférence, 1 et 3 juin 2021.
- Poster « **Neurotoxicity assesement : comparison between SH-SY5Y and iPSC-derived cells** » Véronique De Conto, Elodie Vandehaute, Alexandre Fouassier, Dietmar Hess, Thomas Palm, Nathalie Maubon. Congrès ELRIGfr, Strasbourg, 23-24 mai 2018.
- Poster « **A groundbreaking 3D culture technology for HCS : BIOMIMESYS® hydrosccaffold™** » Nathalie Maubon, Marie Lesaffre, Véronique De Conto, Elodie Vandehaute, Zied Sougir. SLAS 2019, Washington, DC, 2-6 février 2019.

- Poster : « **Importance of matricial and cellular microenvironments in *in vitro* models for drug discovery in Parkinson's disease** » *Véronique De Conto, Vaihere Cheung, Grégory Maubon, Zied Souguir, Nathalie Maubon, Elodie Vandehaute, Vincent Bérézowski*. Colloque Neurofrance 2021, Visioconférence, 19-21 mai 2021.
- Article : De Conto, V., Cheung, V., Maubon, G., Souguir, Z., Maubon, N., Vandehaute, E., and Bérézowski, V. (2021). In vitro differentiation modifies the neurotoxic response of SH-SY5Y cells. *Toxicol In Vitro* 77, 105235.

LISTE DES FORMATIONS

Catégorie : Action collective ou de diffusion de la culture scientifique

- ❖ Implication dans les activités de l'EDBSL

Catégorie : Gestion de projet

- ❖ Mener sa thèse en mode projet (17 décembre 2019 - 10 janvier 2020)
- ❖ Bien gérer ses données de recherche, on s'y met ! (4 avril 2019 - 24 avril 2019)

Catégorie : Management

- ❖ Les enjeux humains de la gestion de projet (15 janvier 2019)
- ❖ Les fondamentaux du management (29 - 30 avril 2019)

Catégorie : Communication

- ❖ Practice makes perfect - oral (03 mars 2020 - 30 juin 2020)

Catégorie : Conférences

- ❖ Conférence de rentrée : L'esprit critique (24 octobre 2019 - 24 octobre 2019)

Catégorie : Ethique et intégrité scientifique

- ❖ La réglementation des innovations biomédicales : quelle place pour le droit de l'Union européenne ? (17 octobre 2019 - 17 octobre 2019)
- ❖ Conférence débat sur l'intégrité scientifique avec le Dr Hervé Maisonneuve (13 mars 2019)
- ❖ Journée doctorale - formation en éthique pour une conduite responsable en recherche (15 mars 2019) Atelier : Engagement du citoyen en recherche

Catégorie : Poursuite de carrière

- ❖ Docteurs et carrière internationale (27 novembre 2019 - 27 novembre 2019)
- ❖ Atelier Bioaddoct : Private vs Public (02 décembre 2019 - 2 décembre 2019)
- ❖ Atelier Bioaddoct : Et toi, que fais-tu après ta thèse ? session : Accompagnement des jeunes docteurs vers le premier emploi (18 octobre 2018)

Formations dispensées par l'Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT)

- ❖ Le brevet comme source d'information (12 mars 2019, Paris)
- ❖ Chercheurs, comment valoriser le fruit de vos recherches ? (16 octobre 2018, Paris)
- ❖ Comment gérer son projet, principes clefs et cas pratiques (05 juin 2019, Paris)
- ❖ Comment créer de la coopération ? (23 novembre 2018, Paris)

Sommaire

REMERCIEMENTS	2
LISTE DES PRESENTATIONS ET DES POSTERS	4
LISTE DES FORMATIONS	5
LISTE DES FIGURES.....	14
LISTE DES TABLEAUX	17
LISTE DES ABREVIATIONS	18
RESUME	21
ABSTRACT	23
INTRODUCTION : Contexte scientifique	25
1. La recherche et le développement de nouveaux médicaments	25
1.1. Les molécules thérapeutiques	26
1.2. La sélection de molécules d'intérêt	28
1.2.1. Le criblage in silico	28
1.2.2. Le criblage in vitro à haut débit	28
1.2.2.1. Le criblage à haut débit basé sur la cible (HTS)	28
1.2.2.2. Le criblage phénotypique à haut contenu (HCS).....	29
1.2.2.3. Contrôle qualité.....	32
1.2.2.1. Identification et confirmation des molécules d'intérêt (criblages primaires et secondaires) 32	
1.3. L'évaluation préclinique pharmacologique, pharmacocinétique et toxicologique .33	
1.3.1. Objectifs et définitions des paramètres étudiés.....	33
1.3.1.1. Les tests pharmacologiques	33
1.3.1.2. Les tests pharmacocinétiques	34

1.3.1.3.	Tests toxicologiques	36
1.3.2.	Optimisation des hits (Hit to Lead)	37
1.3.3.	Optimisation des leads.....	38
1.3.4.	Développement préclinique animal	39
1.4.	Les tests cliniques.....	43
1.4.1.	Phase I : Innocuité et pharmacocinétique chez l'Homme	43
1.4.2.	Phase II : Efficacité et tolérance.....	43
1.4.3.	Phase III : test à grande échelle	44
1.4.4.	Autorisation de mise sur le marché et Phase IV (pharmacovigilance)	44
1.5.	Les échecs en phase clinique impliquant le Système Nerveux Central (SNC)	45
1.5.1.	Les taux de succès dans les différentes phases de développement d'un médicament 45	
1.5.2.	Le SNC : une double difficulté pour les candidats-médicaments	47
1.5.2.1.	Problème d'efficacité	47
1.5.2.2.	Problème de toxicité	47
1.5.3.	Hypothèse sur ce fort taux d'échec	48
2.	Le SNC : un système complexe mettant en jeu cellules et matrice extracellulaire en conditions physiologiques et pathologiques.....	50
2.1.	Organisation et fonction des cellules du SNC	50
2.1.1.	Anatomie générale du SNC	50
2.1.2.	Les neurones	51
2.1.2.1.	Anatomie des neurones	51
2.1.2.2.	Transmission du signal.....	53
2.1.2.3.	Les neurotransmetteurs	54

2.1.2.4.	La différenciation neuronale	56
2.1.3.	Les cellules gliales	61
2.1.3.1.	Les astrocytes	62
2.1.3.2.	Les cellules microgliales.....	64
2.1.3.3.	Oligodendrocytes	65
2.1.4.	La barrière hémato-encéphalique	65
2.2.	La matrice extracellulaire cérébrale (MEC).....	67
2.2.1.	Composition et élasticité de la MEC cérébrale	67
2.2.2.	Structure de la MEC cérébrale	70
2.2.3.	Interactions matrice-cellules	71
2.2.4.	Synthèse et remodelage continu de la MEC.....	72
2.2.5.	Fonction de la MEC cérébrale	75
2.2.5.1.	La régulation de l'homéostasie	75
2.2.5.2.	La modulation des facteurs de croissance	75
2.2.5.3.	La prolifération et migration cellulaires	76
2.2.5.4.	La croissance des neurites.....	77
2.2.5.5.	Impact sur l'activité neuronale et les connexions synaptiques	77
2.2.5.6.	La mécanotransduction	78
2.3.	Exemple de la maladie de Parkinson : une mort neuronale influencée par son microenvironnement.....	79
2.3.1.	Symptômes de la maladie de Parkinson	79
2.3.2.	Importance et facteurs de risque	80
2.3.3.	Physiopathologie de la maladie de Parkinson	81
2.3.3.1.	Les biomarqueurs de la maladie de Parkinson.....	81

2.3.3.2.	La mort neuronale par ferroptose.....	82
2.3.3.3.	La neuroinflammation orchestrée par les cellules gliales	82
2.3.3.4.	Modification et implication de la MEC.....	84
2.3.4.	Diagnostic et traitements	86
3.	Les modèles cérébraux <i>in vitro</i> : caractéristiques et limites actuelles.....	89
3.1.	Les cellules cérébrales cultivées <i>in vitro</i>	89
3.1.1.	Cellules primaires humaines	89
3.1.2.	Cellules souches humaines	91
3.1.3.	Les lignées cellulaires immortalisées.....	93
3.1.3.1.	Exemple des SH-SY5Y, une lignée très utilisée en recherche et en industrie 94	
3.1.3.2.	Exemple des Luhmes, un modèle de choix pour étudier la maladie de Parkinson 96	
3.2.	Les conditions et supports de culture	99
3.2.1.	Les milieux de culture	99
3.2.2.	Supports de culture en 2 dimensions (2D)	100
3.2.3.	Supports de culture en 3 dimensions (3D)	101
3.2.3.1.	Les systèmes de culture en 3D sans matrice.....	101
3.2.3.2.	Les systèmes de culture en 3D avec matrice	104
3.2.3.3.	Systèmes en puces microfluidiques	106
3.2.3.4.	L'hydroscaffold™ BIOMIMESYS®	107
4.	Objectifs de thèse	109
	METHODOLOGIE EXPERIMENTALE.....	110
1.	La culture cellulaire en 3D dans l' <i>hydroscaffold</i> ™ BIOMIMESYS®	110

1.1.	L' <i>hydroscaffold</i> [™] BIOMIMESYS®	110
1.2.	Technique d'ensemencement dans BIOMIMESYS®	111
2.	Principe expérimental général	112
3.	L'analyse d'images.....	113
3.1.	Principe du module « <i>Live Dead</i> ».....	114
3.2.	Principe du module d'application « <i>Neurite outgrowth</i> »	114
3.3.	Principe du module « <i>Multi wavelength cell scoring</i> »	115
TRAVAUX DE THESE - PARTIE 1 : Impact du microenvironnement dans un modèle <i>in vitro</i> pathologique pour la recherche de molécules thérapeutiques contre la maladie de Parkinson117		
1.	Matériels et méthodes	117
1.1.	Culture et différenciation des cellules Luhmes.....	117
1.1.1.	Origine des cellules Luhmes.....	117
1.1.2.	Maintien des cellules	117
1.1.3.	Différenciation des cellules et ensemencement en plaques multipuits	117
1.2.	Culture des astrocytes primaires humains.....	119
1.3.	Co-culture	119
1.4.	Exposition des cellules aux inducteurs de la maladie de Parkinson (iMP)	120
1.5.	Criblage pour la recherche de molécules anti-ferroptotiques.....	122
1.6.	Immunomarquage.....	122
1.6.1.	Viabilité	122
1.6.2.	Fixation.....	123
1.6.3.	Perméabilisation	123
1.6.4.	Marquage.....	123
1.6.5.	Acquisition et analyse des images	125

1.7.	Test ELISA	126
2.	Résultats	127
2.1.	Criblage préliminaire pour le repositionnement de molécules contre la maladie de Parkinson 127	
2.2.	Impact du microenvironnement matriciel	129
2.2.1.	Développement de l'hydroscaffold™ BIOMIMESYS® Brain pour la culture en 3D de cellules cérébrales.....	129
2.2.2.	Sensibilité des cellules Luhmes aux iMP en 2D vs BIOMIMESYS®	133
2.2.3.	Impact de la matrice sur la disponibilité des molécules.....	134
2.2.4.	Maturité des cellules Luhmes dans BIOMIMESYS® Brain	136
2.2.4.1.	Analyse de la maturité neuronale et dopaminergique	136
2.2.4.2.	Optimisation de la composition du milieu de différenciation	138
2.2.4.3.	Effet d'un antiprolifératif.....	139
2.3.	Impact du microenvironnement cellulaire : co-culture de cellules neuronales et d'astrocytes	141
2.3.1.	En culture en 2D.....	141
2.3.1.1.	Mise au point de la co-culture en 2D	141
2.3.1.2.	Effet de la présence d'astrocytes sur la sensibilité des cellules Luhmes en 2D 142	
2.3.2.	Co-culture en 3D dans BIOMIMESYS®	143
2.3.2.1.	Mise au point de la co-culture en 3D	143
2.3.2.2.	Effet des astrocytes sur la viabilité et la différenciation des cellules Luhmes 145	
3.	Discussion intermédiaire	146

TRAVAUX DE THESE - PARTIE 2 : Impact du microenvironnement <i>in vitro</i> dans un modèle pour évaluer la neurotoxicité	152
1. Introduction	152
2. Article.....	155
DISCUSSION GENERALE : Bilan et perspectives scientifiques et industrielles	171
1. Rappel du contexte de l'étude	171
2. Importance du microenvironnement moléculaire en culture 2D et mise au point d'un modèle pour évaluer la neurotoxicité par criblage phénotypique à haut débit	172
3. Développement de l' <i>hydroscaffold</i> [™] BIOMIMESYS® <i>Brain</i> et étude de l'importance du microenvironnement matriciel sur les cellules Luhmes et les cellules SH-SY5Y.....	174
4. Importance du microenvironnement cellulaire et mise au point d'une co-culture	178
5. Perspectives scientifiques	180
6. Stratégie de HCS Pharma pour la recherche et le développement de nouveaux médicaments.....	183
7. Contextualisation du projet dans l'actualité scientifique : la diminution du recours à l'expérimentation animale	185
BIBLIOGRAPHIE	188

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les étapes de la recherche et du développement de nouveaux médicaments.	26
Figure 2 : Frise chronologique de la recherche et du développement de nouveaux médicaments.	27
Figure 3 : Plateforme robotisée de criblage à haut contenu.	31
Figure 4 : Exemple type d'une courbe de pharmacodynamie.	34
Figure 5 : Exemple type d'une courbe de pharmacocinétique et de ses paramètres principaux.	35
Figure 6 : Exemple type d'une courbe pharmacocinétique – pharmacodynamique.	40
Figure 7 : Taux de succès dans les différentes phases de développement des médicaments.	46
Figure 8 : Les raisons des échecs en phases cliniques I et II.	46
Figure 9 : Probabilité d'obtenir l'autorisation de mise sur le marché d'un candidat-médicament entrant en phase I.	47
Figure 10 : Systèmes impliqués dans les échecs pour raison de toxicité en phase clinique.	48
Figure 11 : Anatomie du système nerveux central humain adulte.	51
Figure 12 : Schéma d'un neurone.	52
Figure 13 : Schéma du fonctionnement de la transmission du signal au niveau d'une synapse.	54
Figure 14 : Récapitulatif des étapes de la différenciation et maturation neuronale et de l'expression des marqueurs protéiques associés.	60
Figure 15 : Morphologie des astrocytes dans des tissus cérébraux humains sains ou pathologiques.	64
Figure 16 : Structure et fonction de la barrière-hématoencéphalique.	66
Figure 17 : Module d'élasticité des tissus humains comparé aux supports de culture en plastique.	67
Figure 18. Schéma de l'organisation moléculaire des protéoglycanes dans la matrice extracellulaire.	68
Figure 19: Structure moléculaire de l'acide hyaluronique.	69
Figure 20 : Structure de la matrice extracellulaire cérébrale.	71
Figure 21 : Illustration de la mort des neurones dopaminergiques dans la substance noire pars compacta.	79

Figure 22 : Prévalence de la maladie de Parkinson en France en 2015 par âge et par sexe.	80
Figure 23 : Mécanismes inflammatoires dans la maladie de Parkinson.	83
Figure 24 : Photographie par microscopie à fluorescence d'astrocytes primaires humains en culture.	90
Figure 25 : Photographie de la lignée SH-SY5Y non différenciée.....	94
Figure 26 : Condition d'utilisation des cellules SH-SY5Y dans la recherche sur la maladie de Parkinson.....	96
Figure 27 : Photographie de la lignée cellulaire Luhmes.	97
Figure 28 : Mécanisme d'action de l'érastine, de RSL3 et du glutamate.....	99
Figure 29 : Technique de culture en 3 dimensions en gouttes suspendues.	101
Figure 30 : Culture de la lignée Luhmes en 3 dimensions sous agitation giratoire.	103
Figure 31 : Viabilité des cellules SH-SY5Y exposées au MPP+ et cultivées en 2 et 3 dimensions dans du Matrigel®.....	105
Figure 32 : Schéma récapitulatif des différents types de systèmes de culture en 3 dimensions.	107
Figure 33 : Structure de l'hydroscaffold™ BIOMIMESYS® en microscopie électronique à balayage comparée à la matrice extracellulaire.....	108
Figure 34 : Procédé de fabrication de l'hydroscaffold™ BIOMIMESYS®.....	110
Figure 35 : Méthode de culture dans BIOMIMESYS®.....	112
Figure 36 : Principe expérimental général.	113
Figure 37 : Segmentation des images avec le module d'application « Live Dead » de MetaXpress (Molecular Devices).....	114
Figure 38 : Segmentation des images avec le module d'application « Neurite Outgrowth » de MetaXpress (Molecular Devices).	115
Figure 39 : Segmentation des images avec le module d'application « Multi wavelenght cell scoring » de MetaXpress (Molecular Devices).....	116
Figure 40 : Schéma du protocole de culture et de différenciation des cellules Luhmes.	118
Figure 41 : Schéma du protocole de co-culture des cellules Luhmes et des astrocytes primaires humains en 2 dimensions et dans BIOMIMESYS® Brain.	119

Figure 42 : Schéma du protocole du test de rétention.	121
Figure 43 : Témoins négatifs et positifs du criblage de molécules anti-ferroptotiques.	127
Figure 44 : Courbes d'effet-doses des molécules potentiellement anti-ferroptotiques sélectionnées lors du criblage, en présence d'érastine et de RSL3.	129
Figure 45 : Optimisation de la densité de cellules Luhmes à l'ensemencement dans BIOMIMESYS® Brain.	130
Figure 46 : Impact de l'élasticité du support sur l'organisation des cellules Luhmes.	131
Figure 47 : Maintien des cellules Luhmes dans BIOMIMESYS® Brain.	132
Figure 48 : Sensibilité des cellules Luhmes cultivées en 2 dimensions et en 3 dimensions dans BIOMIMESYS® Brain.	134
Figure 49 : Influence de la matrice BIOMIMESYS® Brain sur l'effet de l'érastine sur les cellules Luhmes.	135
Figure 50 : Maturité neuronale et dopaminergique des cellules Luhmes en 2 dimensions et dans BIOMIMESYS® Brain.	137
Figure 51 : Optimisation des concentrations en facteurs de différenciation pour l'amélioration de la maturité neuronales des cellules Luhmes dans BIOMIMESYS® Brain.....	139
Figure 52 : Effet du taxol sur la viabilité et la maturité des cellules Luhmes dans BIOMIMESYS® Brain.	140
Figure 53 : Co-culture de cellules Luhmes et d'astrocytes primaires en 2 dimensions.....	141
Figure 54 : Effet de la présence des astrocytes sur la sensibilité des cellules Luhmes aux inducteurs de la maladie de Parkinson.	143
Figure 55 : Culture d'astrocytes primaires dans BIOMIMESYS® Brain.....	144
Figure 56 : Co-culture des cellules Luhmes et des astrocytes dans BIOMIMESYS® Brain.	144
Figure 57 : Impact des astrocytes sur la viabilité et la maturité des cellules Luhmes dans BIOMIMESYS® Brain.	145
Figure 58 : Viabilité des cellules SH-SY5Y dans BIOMIMESYS® Brain.....	154
Figure 59 : Résumé graphique de l'article « in vitro differentiation modifies the neurotoxic response of SH-SY5Y cells » (De Conto et al., 2021).	155

Figure 60 : Bilan et perspectives des éléments du microenvironnement étudiés et de leurs interactions.....182

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Proportion de chaque type de cellules gliales par rapport à la quantité totale de cellules gliales dans le cerveau humain.62

Tableau 2 : Densités et volumes d'ensemencement des cellules Lühmes en 2 dimensions et dans BIOMIMESYS® Brain.118

Tableau 3 : Densités et volume d'ensemencement des co-cultures des cellules Lühmes et des astrocytes en 2 dimensions et dans BIOMIMESYS® Brain.120

Tableau 4 : Liste des anticorps primaires utilisés pour les procédures d'immunomarquage, avec les dilutions utilisées, les fournisseurs et les références des produits.124

Tableau 5 : Liste des anticorps secondaires utilisés pour les procédures d'immunomarquage, avec les dilutions utilisées, les fournisseurs et les références des produits.124

Tableau 6 : Calcul des facteurs Z et Z' à partir du pourcentage de cellules vivantes dans les témoins négatifs et positifs du criblage de molécules anti-ferroptotiques (plaque 1).128

LISTE DES ABREVIATIONS

2D. 2 dimensions
3 R. Réduire, Raffiner, Remplacer
3D. 3 dimensions
6-OHDA. 6-hydroxydopamine
ADAMs. A-Disintegrin And Metalloproteinase
ADME. Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion
AH. Acide Hyaluronique
AMPA. α -Amino-3-hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid
AMPc. l'Adénosine Monophosphate cyclique
ANRT. Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie
ANSM. Agence Nationale de Sécurité du Médicament
ATCC. American Type Culture Collection
ATP. Adénosine Triphosphate
AUC. Area Under the Curve
BDNF. Brain-Derived Neurotrophic Factor
bFGF. basic Fibroblast Growth Factor
BHE. Barrière Hémato-Encéphalique
BIC. Brochure Investigateur Clinique
BIO. Biotechnology Innovation Organization
BMP. Bone Morphogenetic Proteins
BPC. Bonnes Pratiques Cliniques
CDK. Cyclin Dependent Kinase
CDNF. Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor
CL50. Concentrations Létales 50%
 C_{max} . Concentration maximale
CMR. Centre for Medicines Research
CNRS. Centre National de la Recherche Scientifique
CPP. Comité de Protection des Personnes
CS. Chondroïtine Sulfate
DAT. Dopamine Transporter
DDI. Drug/Drug Interaction
DEH. Dose Equivalente chez l'Homme
DL50. Dose Létales 50%
DMEM. Dulbecco's Modified Eagle Medium
DRD1. Dopamine Receptor D1
DRD2. Dopamine Receptor D2
DRD3. Dopamine Receptor D3
DSENO. Dose Sans Effet Nocif Observable
EC50. Dose Effective 50%
EMA. European Medicines Agency
EPA. Environmental Protection Agency
F12. Ham's F12

Fer-1. Ferrostatine-1
FGF. Fibroblast Growth Factor
GABA. Gamma-Aminobutyric Acid
GAG. Glycosaminoglycane
GDNF. Glial Cell Derived Neurotrophic Factor
GFAP. Glial Fibrillary Acidic Protein
GLAST. Glutamate-Aspartate Transporter
GPI. glycosylphosphatidylinositol
GSH. Glutathion
HAPLN. Hyaluronan and Proteoglycanbinding Link
HCS. High Content Screening
HS. Héparane Sulfate
HTS. High Throughput Screening
iBMX. 3-isobutyl-1-Methylxanthine
IC50. Dose Inhibitrice 50%
ICH. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
IFN. Interféron
IL. Interleukine
iMP. inducteurs de la Maladie de Parkinson
INSERM. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
iPSc. induced Pluripotent Stem cells
LOAEL. Lowest Observed Adverse Effect Level
MABEL. Minimal Anticipated Biological Effect Levels
MAC. Molécules d'Adhésion Cellulaire
MACN. Molécule d'Adhésion Cellulaire Neurale
MANF. Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor
MAP2. Microtubule Associated Protein 2
MEC. Matrice Extracellulaire
MEM. Milieu Essentiel Minimum
MMP. Matrix Métalloproteinase
MPP+. 1-méthyl-4-phénylpyridinium
MPTP. 1-Méthyl-4-Phényl-1,2,3,6-Tétrahydro Pyridine
MRSD. Maximum Recommended Starting Dose
NGF. Nerve Growth Factor
NNGH. N-isobutyl-N-[4-methoxyphenylsulfonyl]-glycylhydroxamic acid
NOAEL. Non Observed Adverse Effect Level
NOEL. No Observed Effect Level
NT. Neutrophine
PBPK. Physiologically-Based Pharmacokinetics
PD. Pharmacodynamie
PDGF. Platelet-Derived Growth Factor
PDL. Poly-D-lysine
PEG. Polyéthylène Glycol

PG. Protéoglycane
PGCS. Protéoglycane à Chondroïtines Sulfates
PGHS. Protéoglycane à Héparanes Sulfates
PK. Pharmacocinétique
PLL. Poly-L-Lysine
PLO. Poly-L-Ornithine
pRB. protéine du Rétinoblastome
R&D. Recherche et le Développement
ROS. Reactive Oxygen Species
RPN. Réseaux Périneuronaux
RSAQ. Relation Structure Activité Quantitative
Shh. facteur Sonic Hedgehog
SNC. Système Nerveux Central
SNpc. Substance Noire pars comptacta
SVF. Sérum de Veau Foetal
 $t_{1/2}$. temps de demi-vie
TGF. Transforming Growth Factor
TH. Tyrosine Hydroxylase
TIMP. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
 T_{max} . Temps maximal
TNF. Tumor Necrosis Factor
tPA. tissue Plasminogen Activator
TPA. 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13 acetate
UMR. Unité Mixte de Recherche
VEGF. Vascular Endothelial Growth Factor
vGLUT2. vesicular Glutamate Transporter 2
VMAT. Vesicular Monoamine Transporter
VTR. Valeurs Toxicologiques de Référence
ZSG. Zone Sous-Granulaire

RESUME

Environ 90% des candidats-médicaments échouent en phase clinique, pour des raisons d'efficacité ou de toxicité qui impliquent souvent le système nerveux central (SNC). Ce fort taux d'échec souligne un manque de pertinence des modèles expérimentaux utilisés en amont, dont les modèles *in vitro* de cellules humaines. En effet, ces derniers ne prennent pas en compte toute la complexité du SNC, où les neurones organisés en 3 dimensions (3D) interagissent avec leur microenvironnement composé de cellules, de facteurs solubles et des molécules de la matrice extracellulaire (MEC). Les objectifs de ce travail étaient *i)* d'étudier l'influence de ces trois composantes du microenvironnement sur les cellules neuronales dans des modèles cérébraux *in vitro* par imagerie cellulaire automatisée, et *ii)* de développer des modèles cérébraux *in vitro* plus pertinents pour évaluer les effets neurotoxiques ou thérapeutiques de molécules par criblage phénotypique, notamment dans le cadre de la maladie de Parkinson (MP).

Dans un premier temps, la technologie BIOMIMESYS® *Brain* a été développée. Cette matrice à base d'acide hyaluronique permet de mimer la MEC et de cultiver des cellules cérébrales en 3D dans des plaques 96 puits. La sensibilité des cellules Luhmes, une lignée de neurones dopaminergiques, aux inducteurs de la MP a été étudiée : les cellules ont montré une sensibilité plus faible dans BIOMIMESYS® *Brain* qu'en 2 dimensions (2D). Cette différence a pu être expliquée par deux phénomènes : une rétention partielle des molécules toxiques dans la matrice, et un phénotype de neurone dopaminergique moins mature qu'en 2D. L'importance du microenvironnement cellulaire a ensuite été étudiée au travers d'une co-culture de cellules Luhmes et d'astrocytes primaires humains en 2D. Cette co-culture a ensuite été transposée dans la matrice BIOMIMESYS®, formant ainsi un modèle complexe incluant à la fois le microenvironnement glial et le microenvironnement matriciel.

En parallèle, l'influence du microenvironnement moléculaire a été étudiée sur les cellules SH-SY5Y, une lignée cellulaire issue d'un neuroblastome, couramment utilisée pour évaluer la neurotoxicité de molécules. Dans cette étude, les 24 principaux milieux décrits dans la littérature pour différencier ces cellules en neurones ont été criblés. Les 3 conditions les plus différenciantes en matière de ralentissement de la prolifération cellulaire et de croissance des neurites ont été

sélectionnées : l'acide rétinoïque, la staurosporine, et l'Adénosine Monophosphate cyclique (AMPC) associée à du supplément B21. L'expression de marqueurs protéiques neuronaux et la sensibilité des cellules à des composés de toxicités connues ont été mesurées, en 2D et en 3D dans BIOMIMESYS® *Brain*. La maturité neuronale et la sensibilité aux composés neurotoxiques différaient selon le milieu, en étant les plus hautes en milieu B21+AMPC. La culture en 3D modifiait aussi la réponse des cellules, avec une sensibilité plus faible comparée aux cellules cultivées en 2D.

Cette thèse a mis en évidence que le microenvironnement des neurones, qui inclut la MEC, les cellules gliales et les facteurs solubles, modifie la réponse neuronale *in vitro* et devrait par conséquent être considéré avec attention dans la recherche académique comme industrielle, dès les étapes de criblage de nouveaux médicaments.

Mots clés : Microenvironnement, Matrice extracellulaire, Culture cellulaire en 3 dimensions, Neurotoxicité, Maladies neurodégénératives, Criblage phénotypique.

ABSTRACT

About 90% of drug candidates fail in clinical trials, for efficacy- and toxicity-related reasons, which often involve the Central Nervous System (CNS). This high failure rate highlights a lack of relevance in experimental models used upstream, including human *in vitro* models. Indeed, they do not take into account the complexity of the CNS, in which neurons are organized in 3 dimensions (3D) and interact with their microenvironment, composed of cells, soluble factors and extracellular matrix (ECM). The objectives of this PhD were *i)* to study the influence of these three microenvironment components on neuronal cells in cerebral *in vitro* models by automatized cellular imaging, and *ii)* to develop more relevant cerebral *in vitro* models for phenotypic screening, to assess neurotoxic or therapeutic effects, in the frame of Parkinson's Disease (PD).

First, the BIOMIMESYS® *Brain* technology has been developed. This acid hyaluronic based-matrix allows the simulation of the ECM and a 3D culture of cerebral cells in 96-well plates. The sensitivity of Luhmes cells, a dopaminergic neuronal cell line, to PD inducers has been studied: the cells displayed a lower sensitivity in BIOMIMESYS® *Brain* compared to cells cultured in 2 dimensions (2D). This difference was explained by two phenomena: a partial retention of toxic molecules in the matrix, and a lower neuronal maturity compared to cells cultured in 2D.

The importance of the cellular microenvironment has been studied through a co-culture of Luhmes cells and primary human astrocytes in 2D. This co-culture has then been transposed in BIOMIMESYS® matrix, to form a complex model including both the glial and the matricial microenvironments.

In parallel, the influence of the molecular microenvironment has been studied on the SH-SY5Y cells, a cell line derived from a neuroblastoma, commonly used for neurotoxicity assessment. In this study, the 24 major differentiation media described in the literature to differentiate these cells into neurons have been screened. The 3 most differentiating conditions in terms of proliferation slowdown and neurite elongation have been selected: retinoic acid, staurosporine, and cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) combined to B21 supplement. The neuronal protein marker expression and the cell sensitivity to compounds of known-toxicity have been measured, in 2D and in 3D in BIOMIMESYS® *Brain*. Both maturity and sensitivity of these neurons

varied according to the differentiation medium, and were higher in B21+cAMP. The 3D cell culture modified also the cell response, with a lower sensitivity of cells cultured in 2D.

This PhD highlighted that the microenvironment of neurons, including the ECM, the glial cells and the soluble factors, can modify the neuronal response *in vitro*, and should thus be considered carefully in academic research and as early as possible in the drug discovery industrial process.

Key-words: Microenvironment, Extracellular matrix, 3-dimensional cell culture, Neurotoxicity assessment, Neurodegenerative disease, Phenotypic screening.

INTRODUCTION : Contexte scientifique

1. La recherche et le développement de nouveaux médicaments

Le code de la Santé publique (article L.5111-1) définit un médicament comme « toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'Homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique». Le médicament va agir sur une cible thérapeutique, qui peut être définie comme une molécule (protéine, enzyme, récepteur, etc.) dont l'interaction spécifique avec le médicament va engendrer une réponse cellulaire.

La Recherche et le Développement (R&D) d'un nouveau médicament définit l'ensemble du processus de sélection et d'évaluation qui permet, suite à l'identification d'une cible thérapeutique, d'aboutir à la commercialisation d'un médicament. Ce processus comporte trois principales étapes. Tout d'abord, la phase de criblage permet de sélectionner des molécules d'intérêt contre la cible préalablement identifiée et validée. Ensuite, l'efficacité et l'innocuité de ces molécules vont être vérifiées sur des modèles cellulaires et animaux lors de la phase préclinique, puis sur des humains lors de la phase clinique. L'ensemble de ce processus dure en moyenne 12 ans, pour un coût pouvant aller de 0.8 à 2.3 milliards de dollars (Congressional Budget Office, 2021) (Figure 1).

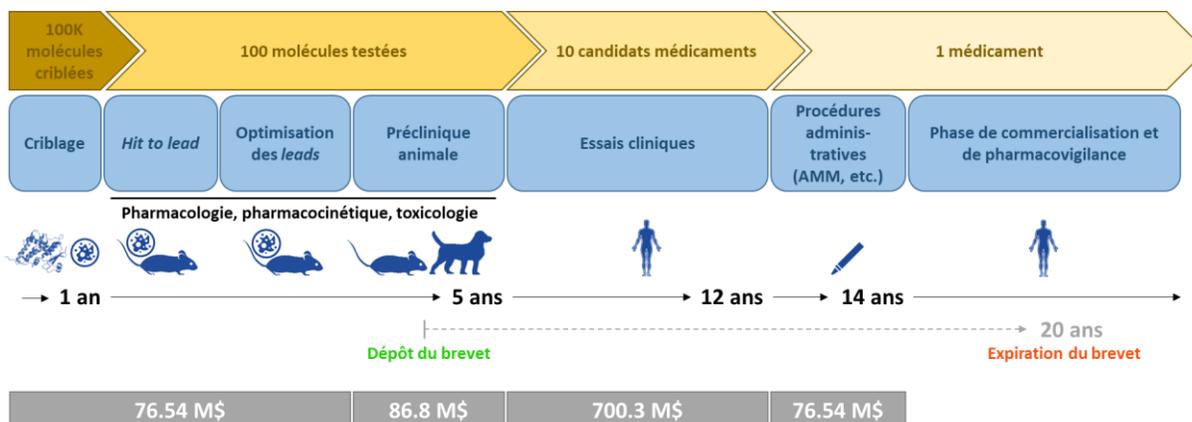


Figure 1 : Les étapes de la recherche et du développement de nouveaux médicaments.

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché ; Hit : Molécule d'intérêt ; Lead : Molécule d'intérêt optimisée pour obtenir à terme un candidat médicament. Coût par étape selon Mestre-Ferrandiz et al., 2012.

1.1. Les molécules thérapeutiques

A l'origine, les traitements thérapeutiques étaient principalement des infusions ou décoctions de plantes médicinales. Avec le développement de la chimie au XIX^{ème} siècle, les principes actifs ont pu être isolés (isolement de la morphine en 1803) puis synthétisés (synthèse de l'aspirine en 1853). Ainsi, les molécules thérapeutiques peuvent à présent être extraites ou dérivées de produits naturels (végétaux, animaux, microbes ou minéraux), ou obtenues par synthèse totale. Ces deux types de molécules sont aujourd'hui regroupés dans la catégorie des « petites molécules », en opposition aux biomédicaments, qui ont vu le jour dans les années 80 avec le développement de la biologie moléculaire, et qui ont une taille souvent supérieure à une dizaine de millier de daltons. Ces derniers désignent des produits dont la substance active est une substance biologique, comme les anticorps thérapeutiques par exemple (définition selon la Directive européenne 2001/83/CE modifiée par la Directive 2003/63/CE - Annexe I, Partie I, 3.2.1.1.b) (Figure 2).

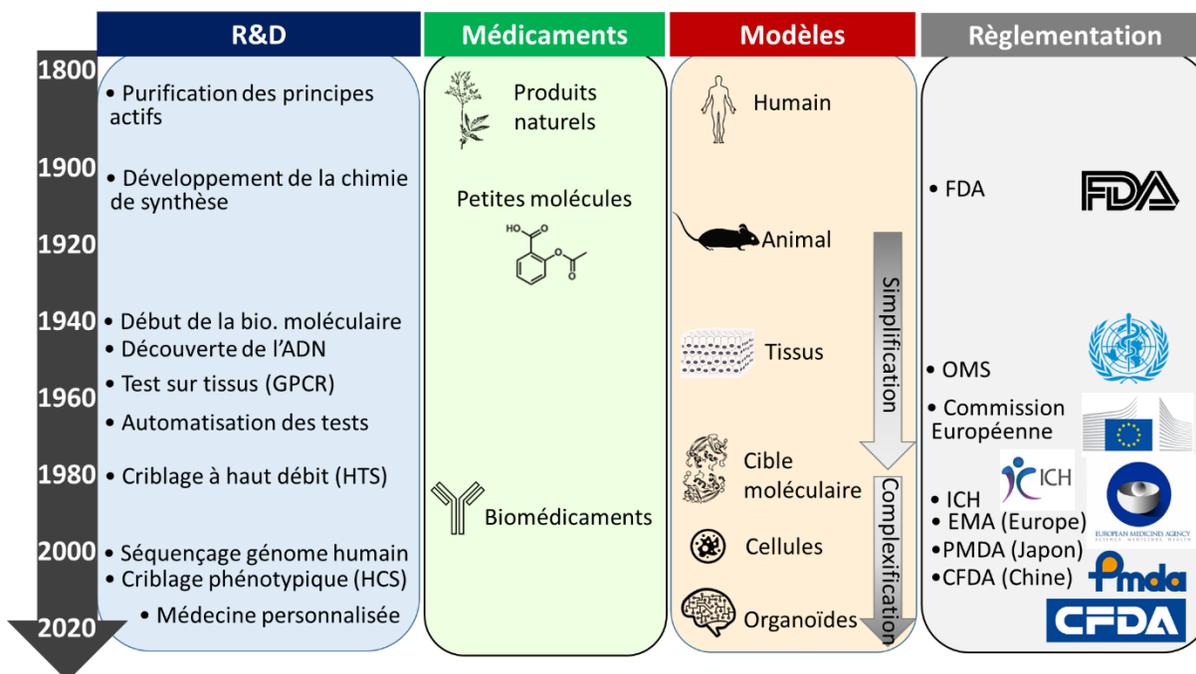


Figure 2 : Frise chronologique de la recherche et du développement de nouveaux médicaments.
 CFDA : China Food and Drug Administration ; EMA : European Medicines Agency ; FDA : Food Drug Administration ; GPCR: G Protein-Coupled Receptors ; HTS : High-Throughput Screening ; HCS: High Content Screening ; ICH : International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use ; OMS : Organisation Mondiale de la Santé ; PMDA : Pharmaceuticals and Medical Devices Agency ; R&D : Recherche et Développement.

Les chimiothèques, ou banques de molécules, regroupent de quelques centaines de milliers à quelques millions de petites molécules. Il peut s'agir de molécules nouvelles, synthétisées en nombre de manière automatisée dans le cas des industries pharmaceutiques. Les petites sociétés de biotechnologie et les unités de recherche académique utilisent également des molécules connues et déjà commercialisées, qui peuvent être criblées dans un objectif de repositionnement, c'est-à-dire dans le cadre d'une maladie différente de celle pour laquelle elles ont initialement été développées. C'est le cas de la banque commerciale Prestwick® par exemple, qui contient 1280 molécules thérapeutiques déjà mises sur le marché. Il existe également des chimiothèques dites orientées, qui permettent d'augmenter la chance de trouver des molécules actives, par exemple des molécules contenant des motifs structuraux identifiés comme des éléments de liaison à la protéine d'intérêt (Rognan and Bonnet, 2014).

1.2. La sélection de molécules d'intérêt

Dans un premier temps, des centaines de milliers ou millions de molécules vont être criblées. Trois méthodes de criblage peuvent être distinguées : le criblage *in silico*, le criblage à haut débit (HTS pour *High Throughput Screening*) basé sur la cible, et le criblage phénotypique à haut contenu (HCS pour *High Content Screening*).

1.2.1. Le criblage *in silico*

Aussi appelé criblage virtuel, le criblage *in silico* est une approche informatique visant à prédire les propriétés biologiques et physicochimiques d'une banque de molécules. Ces programmes se fondent sur les structures moléculaires et les données expérimentales existantes sur les activités biologiques de composés connus, principalement dans le but de prédire les interactions probables entre les molécules et une cible. Ils utilisent pour cela des chimiothèques de produits biologiquement actifs qui regroupent ces informations. Les industries pharmaceutiques commencent aussi à utiliser l'intelligence artificielle pour étudier des activités plus complexes (nouvelles cibles, mécanismes, répercussions biologiques, etc.) en analysant les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* présents dans l'ensemble de la littérature scientifique (données de génomique, protéomique, métabolomique, etc.). Plus rapide que les méthodes de criblage *in vitro*, le criblage *in silico* permet de tester théoriquement plusieurs millions de composés, mais ne permet pas actuellement une sélection très pertinente, en particulier pour de nouvelles molécules, cibles ou mécanismes, puisqu'il se base sur les données déjà obtenues expérimentalement.

1.2.2. Le criblage *in vitro* à haut débit

1.2.2.1. Le criblage à haut débit basé sur la cible (HTS)

Le criblage à haut débit ou HTS a vu le jour dans les années 80 suite au développement de l'automatisation des tests biologiques. Grâce à l'utilisation d'une plateforme robotique, il permet

de tester simultanément des centaines de milliers de molécules sur une cible moléculaire précise, comme une activité enzymatique ou une interaction protéine-récepteur par exemple, d'où le terme également de « criblage basé sur la cible ».

Cette technique repose sur l'utilisation d'essais biologiques miniaturisés, avec des échantillons cellulaires ou biochimiques disposés en plaques multipuits (96, 384, 1536, ou 3456 puits) sur lesquels va pouvoir être testé un grand nombre de molécules de manière rapide et automatisée. Cela est réalisé à l'aide d'une plateforme qui possède des bras robotiques pour la manutention des plaques, des systèmes de pipetages automatisés pour l'aspiration ou la distribution des solutions, des incubateurs à différentes températures, ainsi que des systèmes d'analyses automatisées qui permettent de quantifier le paramètre final étudié.

1.2.2.2. *Le criblage phénotypique à haut contenu (HCS)*

Le criblage phénotypique à haut contenu ou HCS, est également une méthode de criblage à haut débit réalisée sur une plateforme robotique, mais qui diffère du criblage HTS en n'étudiant l'effet des molécules non plus sur une cible moléculaire spécifique mais sur le phénotype cellulaire.

En effet, par opposition au HTS basé sur le postulat qu'une maladie est provoquée par un unique dysfonctionnement moléculaire (un gène muté, une protéine dysfonctionnelle), le HCS permet de prendre en compte la résultante des mécanismes cellulaires impliqués dans une maladie, ainsi que des mécanismes compensatoires, et est donc particulièrement intéressant dans le cadre des maladies complexes et multifactorielles, comme les maladies neurodégénératives par exemple. Il permet aussi de tenir compte de l'effet de la molécule sur la cellule dans son ensemble et non uniquement sur sa cible, comme par exemple l'effet cytotoxique.

Le criblage phénotypique repose sur l'utilisation de microscopes et d'analyse d'images automatisée pour la visualisation et la quantification des caractéristiques cellulaires, telles que la morphologie des cellules ou des organelles (noyaux, mitochondries, etc.), la taille, l'expression et

la localisation de protéines d'intérêt, ou encore le comportement cellulaire (migration, prolifération, etc.). Plusieurs de ces paramètres peuvent être étudiés simultanément.

Le criblage phénotypique à haut débit nécessite l'utilisation à grande échelle de cellules dont la viabilité doit être stable et reproductible. Il s'agit par conséquent majoritairement de lignées cellulaires immortalisées. Après amplification, les cellules sont réparties de manière automatisée dans des plaques multipuits. Ensuite, les cellules sont incubées en présence de molécules issues d'une banque. Des témoins sont réalisés sur chaque plaque, notamment des témoins en milieu seul et des témoins incubés en présence d'une molécule de référence si elle existe. Ils permettront de s'assurer dans un premier temps de la validité du modèle. Après l'incubation, les cellules vivantes peuvent être marquées pour observer leur état, leur morphologie et différents paramètres, comme par exemple la viabilité ou la prolifération cellulaires. Elles peuvent ensuite également être fixées, marquées à l'aide d'anticorps ou de sondes fluorescentes pour détecter l'expression et la localisation de protéines d'intérêt. Elles vont ensuite être observées par microscopie à fluorescence, et analysées quantitativement de manière automatisée par des logiciels d'analyse d'images. Les témoins permettront alors de quantifier les signaux et de normaliser les résultats afin de s'affranchir de la variabilité inter-plaque. L'automatisation permet à la fois une meilleure reproductibilité, ainsi qu'une meilleure objectivité dans l'analyse des résultats (Figure 3).

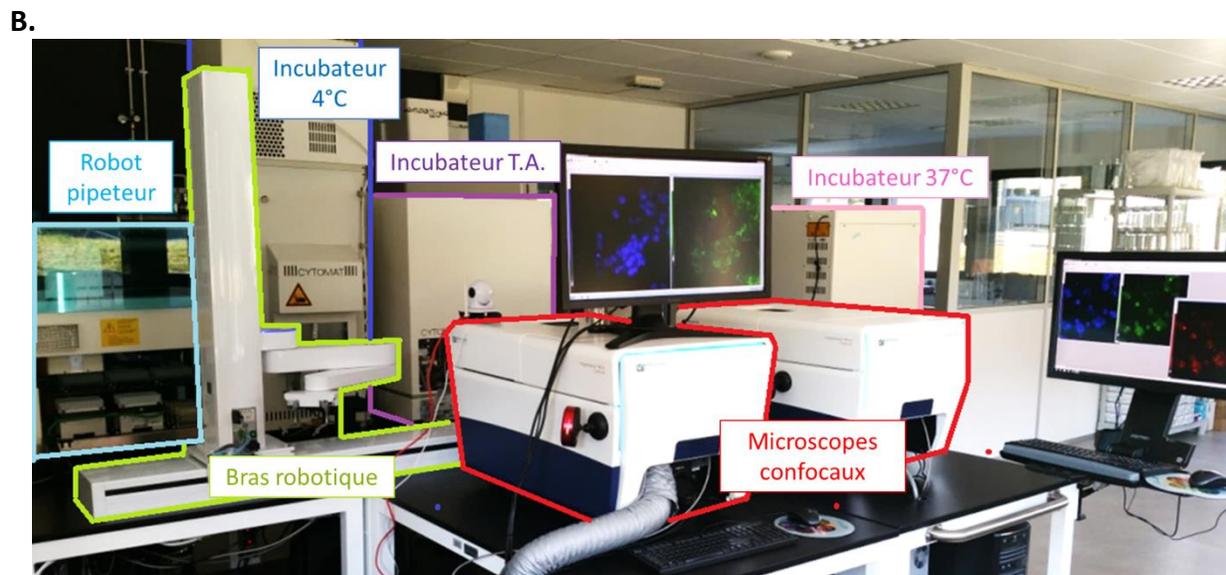
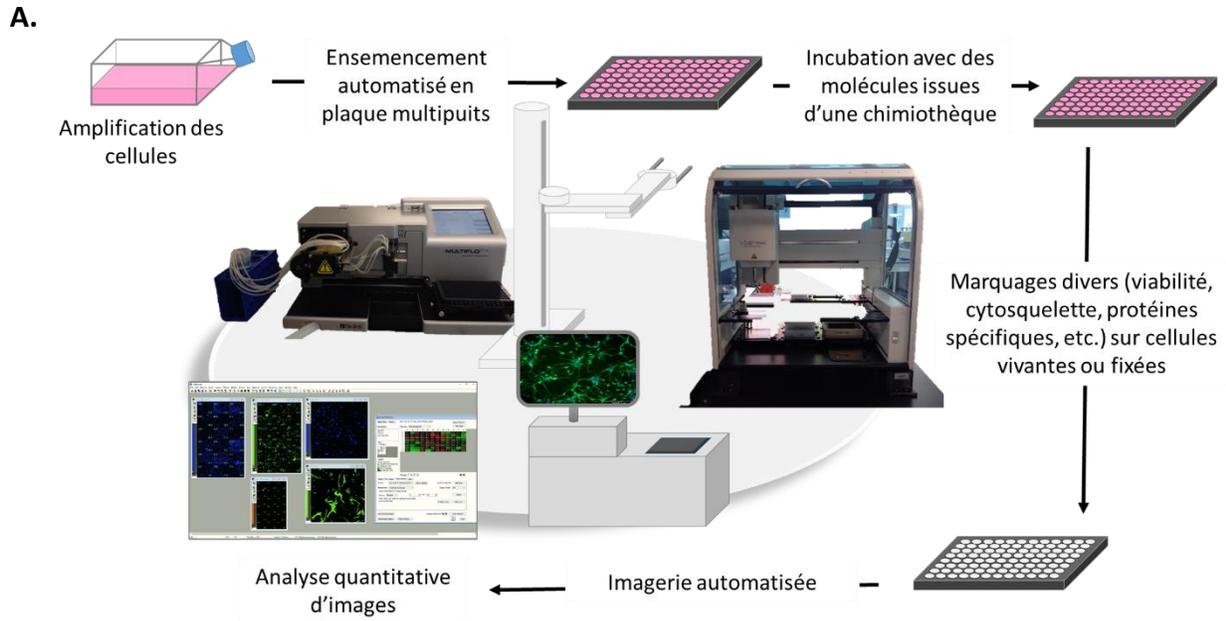


Figure 3 : Plateforme robotisée de criblage à haut contenu.

A. Schéma des différentes étapes. **B.** Photographie d'une plateforme (HCS Pharma). T.A. : Température Ambiante. (HCS Pharma, Loos, France).

1.2.2.3. *Contrôle qualité*

Le facteur Z est la mesure statistique la plus couramment utilisée dans le criblage haut débit pour vérifier la qualité du modèle. Il est estimé à partir des moyennes (μ) et des déviations standards (σ) des témoins positifs (p) et négatifs (n). Par exemple, dans le cadre de la recherche d'une molécule protectrice contre la dégénérescence neuronale, les témoins négatifs seront les cellules incubées en présence de l'inducteur de dégénérescence neuronale uniquement, et les contrôles positifs seront les cellules sans inducteur (calcul du facteur Z) ou incubées en présence de l'inducteur et d'une molécule neuroprotectrice de référence (calcul du facteur Z'). Les facteurs Z et Z' doivent être compris entre 0,5 et 1 pour que le modèle soit considéré comme pertinent et que le criblage soit interprétable. Plus il est proche de 1, plus le modèle est fiable.

La formule de calcul est la suivante :

$$Z = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

1.2.2.1. *Identification et confirmation des molécules d'intérêt (criblages primaires et secondaires)*

Dans un premier temps, l'ensemble des molécules de la chimiothèque va être testé à une ou quelques concentrations, sans réplicas ; c'est le criblage primaire. Les molécules identifiées comme biologiquement actives sont appelées les « touches » ou *hits*.

Ensuite, un criblage secondaire va être réalisé afin de confirmer les *hits* et de caractériser leur effet. Pour cela, les *hits* vont être évalués à nouveau dans les mêmes conditions que le criblage primaire afin de vérifier la reproductibilité de l'effet, et en gamme de concentrations afin de préciser l'efficacité de la molécule. Cela va notamment permettre de déterminer la Dose Inhibitrice 50% (IC50) ou la Dose Effective 50% (EC50), c'est-à-dire la dose pour laquelle le composé induit 50% de son effet (inhibiteur ou activateur).

1.3. L'évaluation préclinique pharmacologique, pharmacocinétique et toxicologique

1.3.1. Objectifs et définitions des paramètres étudiés

L'évaluation préclinique des molécules sélectionnées lors du criblage se fait au travers de trois grandes catégories de tests : les tests pharmacologiques, les tests pharmacocinétiques (PK) et les tests toxicologiques.

Ces tests sont soumis à des directives réglementaires pour le développement de médicaments qui sont décrites dans les lignes directrices de la *Food and Drug Administration* (FDA) pour les Etats-Unis ou de l'Agence Européenne des Médicaments (EMA pour *European Medicines Agency*) pour l'Europe. De plus, les tests de toxicité *in vivo* sont soumis au respect des Bonnes Pratiques de Laboratoire (Arrêté du 20 janvier 1986). En 1990, dans un effort d'harmonisation des directives réglementaires pour le développement de médicaments dans l'Union Européenne, au Japon et aux Etats-Unis, a été créé le conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain (ICH pour *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*). Sa mission est d'harmoniser les données et les règlements permettant d'assurer la sûreté, la qualité et l'efficacité des médicaments développés par les différents pays membres. Tous les résultats obtenus, y compris ceux du criblage, permettront la rédaction de la Brochure Investigateur Clinique (BIC) pour la demande d'autorisation de tests sur l'Homme.

1.3.1.1. Les tests pharmacologiques

La pharmacologie primaire vise à vérifier l'efficacité de la molécule contre la maladie indiquée, le mécanisme d'action, les récepteurs cibles et son activité selon les espèces (ICH *Multidisciplinary Guidelines M3*, <https://www.ich.org>). C'est la première preuve de concept, qui peut être réalisée *in vitro* ou *in vivo*. La pharmacodynamie (PD) est une mesure de l'effet en fonction de la dose administrée (Figure 4).

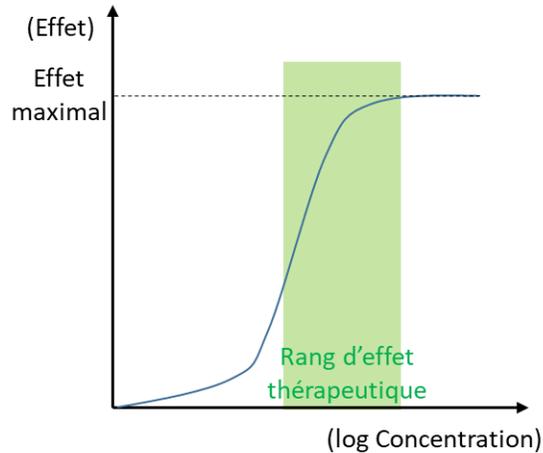


Figure 4 : Exemple type d'une courbe de pharmacodynamie.

La pharmacologie secondaire vise quant à elle à vérifier la sélectivité de la molécule afin d'identifier en amont des tests cliniques tout risque potentiel chez l'Homme (ICH *Multidisciplinary Guidelines* M3, <https://www.ich.org>). Tout un panel de récepteurs cellulaires va être étudié *in vitro* pour vérifier si la molécule d'intérêt interagit avec d'autres cibles que celle souhaitée (canaux ioniques, récepteurs à cytokines, récepteurs à des facteurs de croissance, etc.). Des tests *in vivo* et *in silico* peuvent également être réalisés.

Enfin, la pharmacologie de sécurité a pour objectif de vérifier les effets *in vitro* et *in vivo* de la molécule aux doses pharmacologiques sur les fonctions vitales principales : le système cardiovasculaire, le Système Nerveux Central (SNC), et le système respiratoire (et d'autres systèmes si nécessaire) (ICH *Safety Guidelines* S7A/B, <https://www.ich.org>).

1.3.1.2. Les tests pharmacocinétiques

La pharmacocinétique vise à décrire le devenir de la molécule dans l'organisme (ICH M3, <https://www.ich.org>). Elle peut être séparée en trois parties, l'Absorption, la Distribution, le Métabolisme et l'Excrétion (ADME) :

Absorption. L'absorption est le passage de la molécule entre son site d'administration et la circulation générale. Les principaux paramètres pour la caractériser sont la concentration maximale dans l'organisme pour une dose donnée (C_{max}) et l'air sous la courbe (AUC pour *Area Under the Curve*), qui permettent de décrire l'amplitude de l'effet ; le temps pour atteindre la C_{max} (T_{max}), qui représente le délai d'atteinte de l'effet pharmacologique ; le temps de demi-vie de la molécule dans l'organisme ($t_{1/2}$), c'est-à-dire le temps nécessaire pour que la concentration plasmatique maximale diminue de moitié, qui renseigne sur la durée de l'effet pharmacologique (Figure 5). La biodisponibilité est une mesure de l'absorption tenant compte de la fraction de la dose administrée atteignant la circulation générale, et la vitesse à laquelle elle l'atteint (ratio de l'AUC par rapport à une référence). Elle est influencée par la voie d'administration, les caractéristiques physico-chimiques de la molécule, sa taille, la forme galénique, ainsi que par les caractéristiques de l'individu (pH gastrique, alimentation, etc.). En cas d'administration *per os* (par voie orale), le premier passage hépatique, qui a lieu avant le passage dans la circulation générale, peut fortement impacter la biodisponibilité du médicament ; il s'agit donc d'une étape systématiquement étudiée.

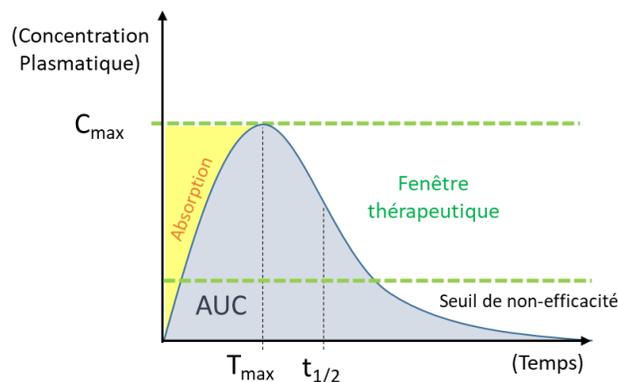


Figure 5 : Exemple type d'une courbe de pharmacocinétique et de ses paramètres principaux.
 AUC : Area Under the Curve ; C_{max} : Concentration maximale ; T_{max} : Température maximale.

Distribution. La distribution désigne la répartition de la molécule dans les différents tissus de l'organisme. Elle est influencée par la fixation de la molécule aux protéines plasmatiques et tissulaires et sa capacité à franchir les barrières biologiques. Elle dépend donc des caractéristiques physico-chimiques du médicament et des caractéristiques structurelles et biochimiques de

l'organe-cible (débit sanguin, structure des capillaires, transporteurs et récepteurs présents sur les cellules de l'organe, etc.). Cette étape vise à vérifier que la molécule atteint bien l'organe-cible, mais également de vérifier s'il y a des phénomènes de rétention ou d'accumulation tissulaire.

Métabolisme. L'étude du métabolisme vise à analyser les transformations enzymatiques du médicament en différents métabolites actifs ou inactifs dans l'organisme. Bien que de nombreux tissus puissent réaliser ces transformations (rein, intestin, etc.), le principal site du métabolisme des médicaments est le foie, notamment *via* les enzymes du métabolisme des xénobiotiques, dont font partie les cytochromes P450. Ce métabolisme des xénobiotiques permet de rendre la molécule plus hydrophile afin d'en faciliter son élimination par le système excréteur.

Excrétion. La principale voie d'élimination d'une molécule et/ou de ses métabolites est rénale (élimination par les urines). Le foie peut également participer à l'élimination d'un médicament *via* la bile excrétée dans l'intestin ; cependant, dans l'intestin, le médicament peut être réabsorbé (cycle entéro-hépatique). La clairance représente la capacité de l'organisme à éliminer une molécule (volume de plasma totalement épuré par unité de temps) ; elle tient compte à la fois de de l'excrétion de la molécule et sa transformation en métabolites. Le temps de demi-vie dans l'organisme est aussi un paramètre couramment utilisé. L'état d'équilibre désigne la situation dans laquelle l'apport global d'un médicament est relativement en équilibre dynamique avec son élimination (administration chronique).

1.3.1.3. *Tests toxicologiques*

Les tests toxicologiques sont réalisés sur cellules et sur animaux. Ils ont pour objectifs de déterminer les organes touchés, les doses toxiques, et la réversibilité des effets. Selon le cadre des prérequis défini par l'ICH, l'analyse toxicologique doit évaluer à la fois la toxicité aiguë et chronique, la toxicité sur les fonctions de reproduction, ainsi que les effets mutagènes, génotoxiques et cancérogènes, et enfin le risque sur l'environnement (ICH *Safety Guidelines* S1 à 12, <https://www.ich.org>).

Tous ces tests (pharmacologiques, ADME et toxicologiques) sont répartis au cours de trois étapes : l'optimisation des *hits*, l'optimisation des *leads*, et le développement préclinique animal.

1.3.2. Optimisation des hits (Hit to Lead)

L'activité pharmacologique des *hits* sélectionnés et validés va être évaluée sur des modèles plus complexes que lors du criblage (modèles cellulaires, tests fonctionnels, etc.).

En parallèle des tests d'activité pharmacologique, les molécules sont testées pour leurs propriétés ADME. Pour les tests précoces d'absorption, les molécules vont être testées *in vitro* sur un modèle cellulaire d'endothélium intestinal (lignée Caco-2), afin de vérifier leur capacité à passer la barrière intestinale, et, en cas de molécules à visée cérébrale, sur un modèle *in vitro* de Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) afin de vérifier leur capacité à passer du sang vers le cerveau. Les tests de métabolisme font quant à eux référence à l'étude des modifications enzymatiques de la molécule dans l'organisme. Les premiers tests vont être réalisés sur des microsomes (fraction de réticulum endoplasmique contenant de nombreuses enzymes dont des cytochromes P450) issus d'hépatocytes primaires humains et murins (de la même espèce que celle qui sera ensuite utilisée pour les études *in vivo*).

Les interactions médicamenteuses (DDI pour *Drug/Drug Interaction*) vont également être étudiées : la molécule d'intérêt va être incubée sur des microsomes en présence de substrats des cytochrome P450 incubés individuellement ou en cocktail, et les métabolites de ces substrats vont être analysés afin de regarder si la molécule a impacté le métabolisme. La modification de l'expression des enzymes du métabolisme par les molécules d'intérêt peut aussi être analysée (EMA, *Guideline on the investigation of drug interactions*, <https://www.ema.europa.eu>).

Des premiers tests de PK sur la souris vont aussi être menés, afin d'obtenir des premières données sur les propriétés ADME *in vivo* de la molécule. La PK *per os* va permettre de déterminer les paramètres $t_{1/2}$, C_{max} , T_{max} , et AUC.

Enfin, la pertinence des *hits* en tant que potentiel candidat-médicament va être vérifiée, par exemple en étudiant la faisabilité de la synthèse à l'échelle industrielle d'un point de vue technique et économique, ainsi que la brevetabilité de la molécule.

La relation entre la structure moléculaire et les données biologiques *in vitro* est étudiée (RSAQ pour « Relation Structure Activité Quantitative »). Les structures moléculaires sont alors optimisées chimiquement, pour améliorer leur activité pharmacologique (affinité avec la cible par exemple), et leurs propriétés ADME. Les *hits* ainsi validés et optimisés deviennent alors des « têtes de série » ou *leads*.

En parallèle de cette étape est développé le modèle pharmacologique *in vivo* « petite espèce » ; il s'agit majoritairement de modèles murins (souris ou rat), choisis en fonction de la maladie étudiée et des données bibliographiques existantes.

1.3.3. Optimisation des leads

L'efficacité des *leads* est ensuite évaluée sur des modèles plus avancés, avec la réalisation de courbes effet-dose et la détermination de l'EC50 sur modèles *in vitro* complexes comme des co-cultures et des modèles en 3 dimensions (3D), ainsi que sur un modèle animal en dose aiguë.

Des tests métaboliques plus poussés sont réalisés, avec incubation des molécules sur des cytochromes P450 recombinant seuls, et sur des hépatocytes d'espèces variées (humains, souris, rats, chiens, singes) suivie de l'identification et de la semi-quantification des métabolites obtenus. Ces tests permettent de choisir la seconde espèce (chien ou singe) qui sera utilisée en phase préclinique, afin de couvrir, avec l'espèce de rongeur choisie précédemment, tous les métabolites obtenus avec les cellules humaines.

Des tests de DDI sont de nouveau réalisés, cette fois-ci sur des hépatocytes primaires humains et sur des lignées exprimant les transporteurs d'intérêt, en présence ou non d'inhibiteur d'enzymes du métabolisme (le salicylamide). L'objectif est de déterminer si la molécule est un substrat, un inducteur ou un inhibiteur des cytochromes P450, des enzymes du métabolisme ou de certains transporteurs. Le potentiel d'inhibition irréversible est aussi identifié.

Les effets mutagènes et génotoxiques sont obligatoirement étudiés à cette étape, avant tout test chez l'Homme. Ces tests ont pour objectif de d'évaluer l'impact des molécules sur le matériel génétique : risque de cancer pour la génération actuelle ou risque génétique pour la génération future. Généralement, un test de mutation génique est réalisé *in vitro* sur des bactéries *Salmonella typhimurium* (test d'Ames), ainsi qu'un test d'aberration chromosomique *in vitro* sur des cellules de mammifères, et *in vivo* sur des cellules hématopoïétiques de rat ou de souris (ICH, *Safety Guidelines S2*, <https://www.ich.org>).

Des tests de distribution tissulaire sont réalisés *in vivo* par injection intraveineuse. Les résultats obtenus sont comparés avec les résultats *per os* pour mesurer le passage intestinal et le premier passage hépatique. Les propriétés de liaison aux protéines du sang humain sont étudiées *in vitro* : un juste équilibre entre la fraction libre et adsorbée est nécessaire, afin de permettre à la fois le transport par liaison et la biodisponibilité par libération.

Les *leads* optimisés sont ensuite appelés candidats précliniques. La synthèse des candidats précliniques va, si nécessaire, être revue pour permettre la mise en place de procédés permettant la synthèse de grandes quantités (appelé *scale-up*). Les métabolites majoritaires de chaque candidat seront aussi synthétisés pour permettre l'analyse de leur efficacité ou toxicité potentielle.

1.3.4. Développement préclinique animal

Les candidats précliniques sélectionnés vont alors être testés sur *a minima* deux modèles animaux choisis précédemment (petit animal et gros animal) en dose unique ou chronique, afin de vérifier leur efficacité, leurs propriétés ADME et leur innocuité. Pour ce faire, la quantification de biomarqueurs, du candidat préclinique et de ses métabolites, est réalisée sur des prélèvements sanguins des animaux selon une cinétique préétablie. D'autres études plus poussées peuvent être réalisées en fonction de la maladie ou du candidat préclinique.

L'analyse Pharmacocinétique – Pharmacodynamique (PK-PD, soit l'intensité de l'effet en fonction du temps pour une dose injectée) est réalisée sur la base des données quantitatives de

la molécule et des biomarqueurs. Elle va permettre de décrire l'évolution temporelle de l'intensité de l'effet en réponse à l'administration d'une dose pour les différentes espèces, et d'anticiper ainsi les effets du dosage sur une période donnée (Figure 6).

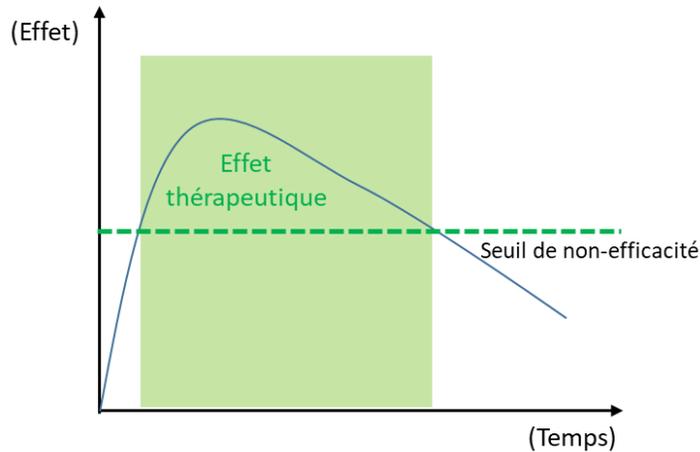


Figure 6 : Exemple type d'une courbe pharmacocinétique – pharmacodynamique.

Un modèle physiologique basé sur la pharmacocinétique (*Physiologically-Based Pharmacokinetics*, PBPK) est ensuite établi. C'est un modèle mathématique basé sur les données précliniques et les paramètres physiologiques humains connus (débit de perfusion des organes, etc.) qui a pour objectif de simuler et de prédire les taux circulants pour une dose déterminée chez l'Homme. Il va permettre d'extrapoler les résultats des tests PK-PD obtenus chez l'animal à l'Homme, et ainsi de déterminer les doses qui seront administrées lors des essais cliniques. La DDI peut être approfondie *in vivo* à ce stade. Suite à cela est établie la liste des médicaments concomitants interdits.

En parallèle, des tests de toxicité aiguë et chronique sont réalisés, ainsi que des tests de toxicité sur les fonctions de reproduction, et des tests sur les effets cancérogènes.

Toxicités aiguë et chronique. La toxicité aiguë désigne la toxicité observée à court terme après une exposition unique, contrairement à la toxicité chronique qui désigne la toxicité du produit en doses répétées à long terme. L'analyse doit être réalisée chez au moins deux espèces de mammifères, incluant de préférence le même nombre de mâles et de femelles. Il est recommandé

de tester au moins trois doses. Pour les tests de toxicité aiguë, deux voies d'administration doivent être utilisées, incluant celle qui sera utilisée chez l'Homme. En chronique, une seule voie peut être testée mais doit être la même que celles qui seront utilisées chez l'Homme, tout comme la formulation. Différents paramètres *in vivo* seront suivis, comme le poids, le comportement, etc. puis un examen *post mortem* de tous les tissus sera réalisé (ICH *Safety Guidelines* S4, <https://www.ich.org>).

Toxicité sur les fonctions de reproduction (fertilité et gestation). Pour évaluer la toxicité sur la fertilité et le développement embryonnaire, 3 doses sont testées sur une espèce de rongeur, administrées plusieurs semaines avant l'accouplement. De même, trois doses sont testées sur deux espèces différentes (rongeur et non rongeur) entre l'accouplement et la fin de l'organogénèse, afin d'évaluer la toxicité sur le développement embryo-fœtal. Enfin, trois doses sont testées sur une espèce de rongeur de la fin de l'organogénèse jusqu'au sevrage des petits, afin d'étudier la toxicité sur le développement prénatal, la mise bas, le comportement maternel, l'allaitement et le développement postnatal (ICH *Safety Guidelines* S5, <https://www.ich.org>).

Cancérogénèse. Ces expérimentations ont pour objectif de détecter un effet cancérigène de la molécule. Ils peuvent être menés en parallèle des premiers essais chez l'Homme, sauf en cas de tests mutagènes positifs (réalisés en phase d'optimisation des *leads*). Trois doses de produit sont testées chez deux espèces de rongeurs, en voie d'administration identique que chez l'Homme, sur minimum 2 ans (ICH *Safety Guidelines* S1A – S1C, <https://www.ich.org>).

L'analyse toxicologique permet de déterminer les Valeurs Toxicologiques de Référence (VTR), qui sont des indices qui établissent la relation entre une dose d'exposition à une substance et la survenue d'un effet nocif, parmi elles :

- **La Dose Sans Effet Nocif Observable** (DSENO, ou NOAEL pour *Non Observed Adverse Effect Level*), qui représente la dose maximale n'induisant pas d'augmentation significatif des effets indésirables ;
- **La Dose Sans Effet** (NOEL pour *No Observed Effect Level*), qu'il soit toxique ou pharmacologique ;

- **La Dose la plus faible induisant un effet indésirable** (LOAEL pour *Lowest Observed Adverse Effect Level*).

La Dose Létale 50% (DL50), c'est-à-dire la dose tuant la moitié des animaux peut également être calculée mais n'est plus obligatoire depuis 1991.

Tout composé étant toxique à une dose suffisamment forte, l'index thérapeutique est défini comme les ratios de la dose toxique sur la dose thérapeutique, afin de considérer l'effet risque/bénéfice.

Pour le calcul de la première dose administrable à l'Homme, la NOAEL est divisée par un facteur de correction de la surface corporelle, ce qui permet d'obtenir la **Dose Equivalente chez l'Homme** (DEH), c'est-à-dire la dose chez l'Homme qui produit un effet équivalent à l'effet obtenu avec une dose plus faible chez l'animal. Ensuite, la DEH est divisée par un facteur de sécurité (supérieur à 10), afin d'obtenir la **dose de départ maximale recommandée** (MRSD pour *Maximum Recommended Starting Dose*). Enfin, la MRSD est comparée avec la dose pharmacologiquement active (ICH *Guideline on the investigation of drug interactions M3-R2*, <https://www.ich.org>).

$$\begin{aligned}
 \text{Dose de départ} &= \frac{\text{NOAEL}}{\text{Fact. de correction de la surface corporelle} \times \text{fact. de sécurité}} \\
 &= \frac{\text{DEH}}{\text{Fact. de sécurité}}
 \end{aligned}$$

La dose minimale associée à un effet biologique (MABEL pour *Minimal Anticipated Biological Effect Levels*), qu'il soit toxique ou pharmacologique, est une approche alternative utilisée pour les molécules induisant des effets indésirables liés au mécanisme d'action et indépendants de la dose depuis 2007. Elle est calculée par combinaison de toutes les données précliniques obtenues *in vitro* sur cellules humaines et *in vivo* sur animaux (EMA, *Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with investigational medicinal products*, 2007, <https://www.ema.europa.eu>).

Les questionnements bioéthiques relatifs au bien-être animal et notamment la règle des 3R (Remplacer les animaux par des méthodes alternatives si elles existent, Réduire le nombre d'animaux utilisés, Raffiner les méthodes d'expérimentation pour limiter la douleur), élaborée en 1959, incitent à limiter le nombre d'animaux utilisés, notamment *via* l'utilisation de modèles *in vitro*. Cependant, les tests *in vivo* restent actuellement obligatoires avant tout test chez l'humain.

1.4. Les tests cliniques

Environ 10% des molécules testées en préclinique continueront en phase clinique. Les essais cliniques sont régulés au niveau national, notamment par la loi n°2004-804 relative à la politique de santé publique. Ils doivent être réalisés dans le respect des Bonnes Pratiques Cliniques (BPC) établies par la directive 2005/28/CE. En France, la mise en place d'un essai clinique nécessite l'autorisation de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM), par le biais de l'envoi de la BIC aux autorités compétentes, et un avis favorable d'un Comité de Protection des Personnes (CPP). Un essai clinique est composé de 3 phases réalisées avant l'AMM selon la FDA.

1.4.1. Phase I : Innocuité et pharmacocinétique chez l'Homme

La phase I a pour objectif de vérifier l'innocuité du candidat médicament chez l'Homme, et d'étudier sa cinétique dans l'organisme humain. Des doses croissantes sont administrées à un petit groupe de volontaires sains (entre 20 et 100). Ces tests sont réalisés sous surveillance étroite : les patients sont souvent hébergés en centre spécialisé pendant quelques jours, et de nombreux examens sont réalisés (cardiaques, respiratoires, sanguins, etc.). Cette phase dure plusieurs mois.

1.4.2. Phase II : Efficacité et tolérance

La phase II a pour objectif de vérifier l'efficacité de la molécule et sa tolérance chez le malade. Pour cela, le candidat médicament est administré à un petit nombre de volontaires malades

hospitalisés. Il s'agit de la preuve de concept chez l'humain. Dans un premier temps, la dose optimale va être déterminée. Il s'agit de la dose minimale qui permet un effet thérapeutique tout en maintenant un niveau d'effets indésirables tolérable. Dans un second temps, le candidat médicament va être testé sur 100 à 300 malades, en fonction de la fréquence de la maladie. Cette phase dure entre plusieurs mois et deux ans.

1.4.3. Phase III : test à grande échelle

La phase III est un test à grande échelle : le candidat médicament va être testé sur quelques centaines, voire des milliers de patients en fonction de la fréquence de la maladie. Les essais sont le plus souvent des essais en double aveugle randomisés : les malades sont répartis en deux groupes, dont l'un est traité avec le candidat médicament, et l'autre avec le traitement de référence s'il est disponible, ou un placebo. Le médecin et le patient ignorent tous les deux dans quel groupe le malade se trouve. Pendant cette phase sont aussi vérifiées les précautions d'emploi et les interactions avec d'autres traitements. C'est aussi pendant cette étape que sont testées différentes formes galéniques. Cette phase dure de 1 à 4 ans.

1.4.4. Autorisation de mise sur le marché et Phase IV (pharmacovigilance)

Environ 10% des molécules franchiront avec succès les trois phases cliniques. Une demande d'AMM contenant les données recueillies lors des phases précliniques et cliniques pourra alors être déposée. La délivrance d'une AMM est fondée sur l'examen de la balance bénéfice/risque du produit, tenant compte de son efficacité contre la maladie ciblée, du profil des patients auquel il est destiné, de la posologie recommandée, des effets indésirables, de la qualité du produit fini et des procédés de fabrication.

En France, les AMM sont délivrées par l'ANSM, ou au niveau européen par l'EMA. Aux Etats-Unis, l'organisme responsable de la délivrance des AMM est la FDA. Bien qu'il existe quelques différences dans les données nécessaires à la délivrance des AMM en fonction des pays, la majorité des informations sont aujourd'hui harmonisées à l'international.

La pharmacovigilance (phase IV) dure tout le long de la commercialisation du médicament. Les deux premières années, les industries pharmaceutiques doivent rendre un rapport sur le suivi du médicament tous les six mois, puis tous les ans pendant les trois années suivantes, et enfin tous les cinq ans, tant que le médicament reste sur le marché.

1.5. Les échecs en phase clinique impliquant le Système Nerveux Central (SNC)

1.5.1. Les taux de succès dans les différentes phases de développement d'un médicament

L'industrie pharmaceutique fait face à une importante difficulté qui est le faible taux de réussite en phase clinique. En effet, selon les données du *Centre for Medicines Research* (CMR) recueillies entre 2013-2015, plus de 50% des candidats-médicaments échouent dès les premiers tests sur volontaires sains (phase I), avec 38.5% des échecs liés à un problème de toxicité (Morgan *et al.*, 2018) (Figure 7 et Figure 8). Cependant le plus fort taux d'échec a lieu en phase II lors des premiers tests sur des malades, avec plus de 80% d'échecs, dont 84% sont liés à un problème d'efficacité. Malgré cette importante sélection des molécules durant les deux premières phases cliniques, le taux d'échec dans les tests à grande échelle en phase III s'élève encore à 34%. Au total, plus de 90% des molécules échouent donc lors des essais sur l'Homme. De plus, le taux de succès n'a pas progressé au cours des 10 dernières années. Les données de la *Biotechnology Innovation Organization* (BIO) recueillies entre 2006 et 2015 montrent des résultats similaires (Figure 7).

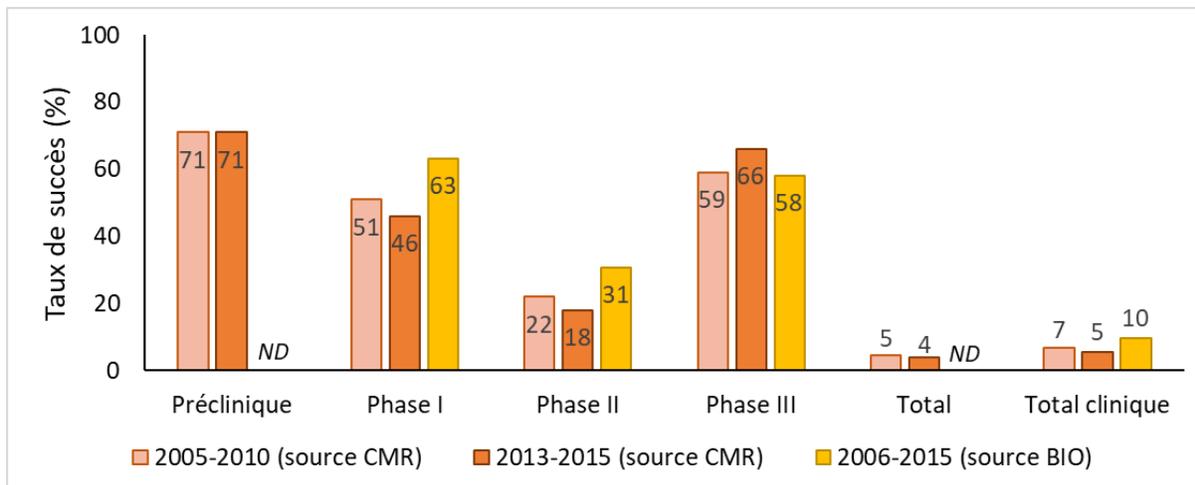


Figure 7 : Taux de succès dans les différentes phases de développement des médicaments.

BIO (Biotechnology Innovation Organization): Analyse basée sur 7 455 programmes de développement aux Etats-Unis entre 2005 et 2010, issus de 1 103 entreprises (Biotechnology Innovation organization et al., 2016); CMR (Centre for Medicines Research): données entre 2005 et 2010, et entre 2013 et 2015, issues du CMR International (CMR Industry Benchmark Data) (nombre de cohorte non précisé) (Morgan et al., 2018).

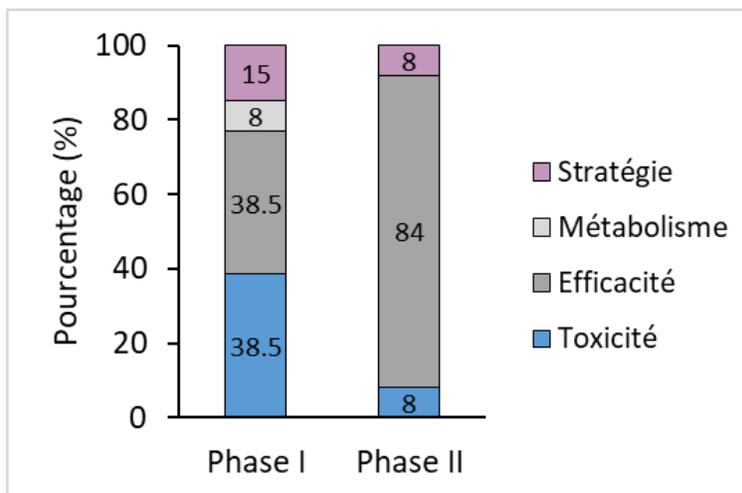


Figure 8 : Les raisons des échecs en phases cliniques I et II.

Les raisons des échecs ont été classifiées pour 13 candidats ayant échoués entre 2012 et 2016 chez AstraZeneca, pour chaque phase. Adapté de Morgan et al., 2018.

Ce fort taux d'échec a un grand impact économique pour l'industrie pharmaceutique, ainsi qu'un impact social majeur. Outre le manque d'efficacité engendrant une perte de temps dans la recherche de traitement, la toxicité des candidats-médicaments non détectée en phase préclinique représente un risque important, en particulier pour les volontaires sains en phase I.

1.5.2. Le SNC : une double difficulté pour les candidats-médicaments

1.5.2.1. Problème d'efficacité

La probabilité qu'un candidat médicament soit approuvé à l'issue des trois phases cliniques varie en fonction du domaine thérapeutique ; il est particulièrement faible pour les maladies du SNC. Bien que les chiffres varient selon les études, seuls 3 à 8% des médicaments à visée cérébrale entrant en phase clinique I seront approuvés en fin de phase III (Figure 9).

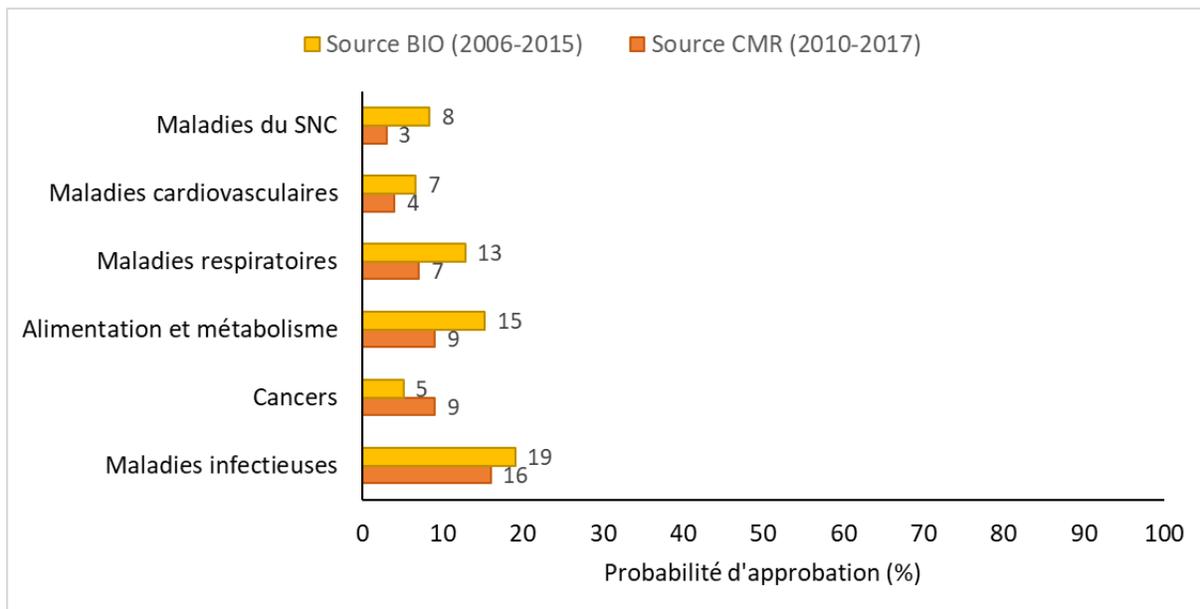


Figure 9 : Probabilité d'obtenir l'autorisation de mise sur le marché d'un candidat-médicament entrant en phase I.

BIO (Biotechnology Innovation Organization) : Analyse basée sur 7 455 programmes de développement aux Etats-Unis entre 2005 et 2010, issus de 1 103 entreprises (Biotechnology Innovation organization et al., 2016). CMR (Centre for Medicines Research) : données obtenues entre 2010 et 2017 du CMR International (CMR R&D Performance Metrics) basée sur une trentaine d'entreprises (Dowden and Munro, 2019).

1.5.2.2. Problème de toxicité

En plus du manque d'efficacité des traitements à visée cérébrale, le SNC est fortement impliqué dans les problèmes de toxicité détectés lors des essais cliniques. En effet, 34% des échecs pour raison de toxicité en phase clinique concernent le SNC, contre seulement 7% en phase préclinique (Figure 10).

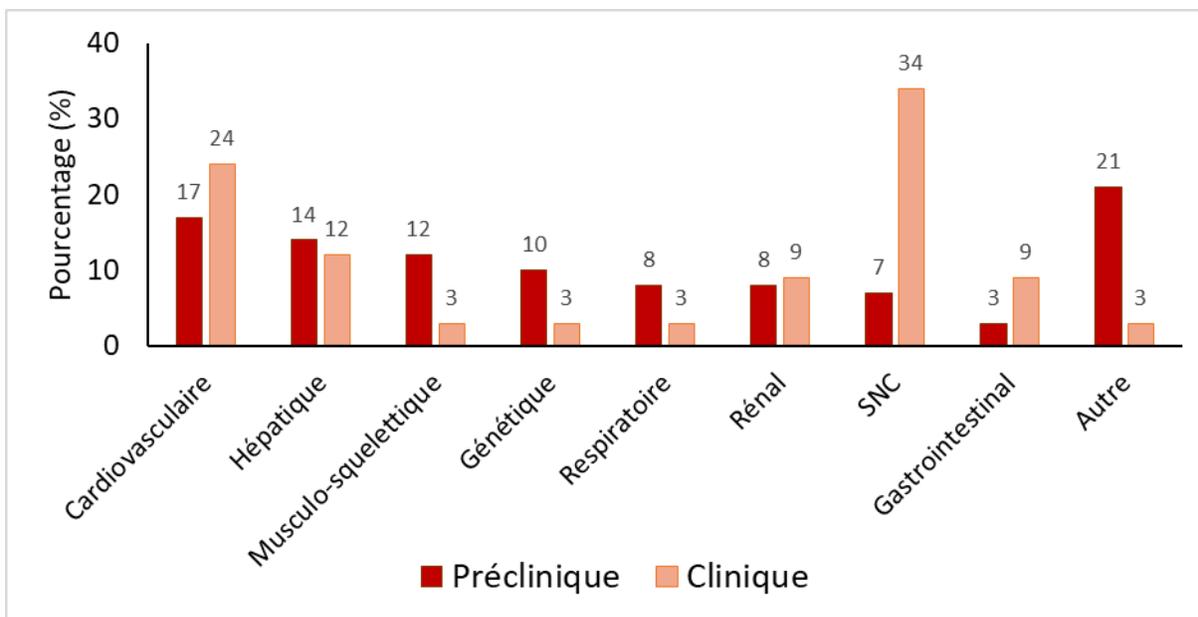


Figure 10 : Systèmes impliqués dans les échecs pour raison de toxicité en phase clinique.

SNC : Système Nerveux Central. Analyse basée sur 142 projets de Recherche et Développement chez AstraZeneca, entre 2005 et 2010. Adapté de Cook et al., 2014.

1.5.3. Hypothèse sur ce fort taux d'échec

Ces données soulignent un manque de pertinence des modèles précliniques utilisés pour sélectionner les candidats-médicaments. En effet, les modèles précliniques, à la fois *in vivo* et *in vitro*, présentent des limites. Tout d'abord, les différences inter-espèces entre l'Homme et les animaux peuvent constituer un biais important. Par exemple, le Thalidomide était un médicament commercialisé en Allemagne et Grande-Bretagne durant les années 1950-1960 comme hypnotique et antiémétique chez la femme enceinte. En 1960, il a été découvert que ce médicament était tératogène : plus de 10 000 enfants sont nés avec des malformations sévères (Vargesson, 2015). Il s'est avéré que le rat, sur lequel il avait été testé en phase préclinique, était peu sensible, contrairement à la majorité des autres mammifères.

Les différences inter-espèces existent aussi au niveau cérébral. Par exemple, il a été montré que la variation d'un seul acide aminé entre deux récepteurs homologues chez l'Homme et le rongeur entraînait une grande variation dans son affinité pour de nombreux médicaments (Oksenberg et al., 1992). De même, l'oxyde nitrique synthase-2 (NOS-2) est une enzyme dont

l'expression est régulée aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel de manière différente entre l'humain et la souris. Il en résulte des niveaux d'oxyde nitrique différents, ce qui influence le stress oxydant et les réactions inflammatoires, deux paramètres impliqués dans des maladies neurodégénératives (Hoos *et al.*, 2014).

Les modèles *in vitro*, en pouvant être réalisés avec des cellules humaines, permettent de contourner cette barrière inter-espèces. Cependant, les modèles *in vitro* actuels présentent eux aussi des limites très importantes. Ils sont souvent très simplifiés, en étant majoritairement composés d'un seul type cellulaire cultivé en 2 dimensions (2D). Ils ne prennent pas en compte la complexité de l'organisme humain, fait de tissus et d'organes reliés les uns aux autres, et constitués eux-mêmes de nombreux types cellulaires organisés en 3D et interagissant entre eux et avec leur microenvironnement.

2. Le SNC : un système complexe mettant en jeu cellules et matrice extracellulaire en conditions physiologiques et pathologiques

2.1. Organisation et fonction des cellules du SNC

2.1.1. Anatomie générale du SNC

Le SNC est un système complexe composé de différentes structures. Le terme SNC regroupe à la fois l'encéphale et la moelle épinière. L'encéphale est lui-même constitué du cerveau, du cervelet et du tronc cérébral (mésencéphale, pont de Varole et bulbe rachidien) (Figure 11.A.) Dans le cerveau humain, on observe une partie corticale très développée, ainsi que des zones profondes. Cette partie corticale contient la matière grise formée par les corps cellulaires des neurones, des dendrites et des synapses, en opposition à la substance blanche qui contient principalement des axones et la myéline. Les neurones participant à une même fonction sont regroupés en structures anatomiquement distinctes, permettant de diviser le cortex en aires fonctionnelles (Figure 11.B.). On distingue ainsi trois grandes catégories de zones fonctionnelles : les aires motrices, sensorielles et associatives.

Les différentes aires peuvent être regroupées en quatre lobes désignant des emplacements anatomiques spécifiques et des fonctions sensorielles et motrices : le lobe frontal, le lobe pariétal, le lobe occipital, et le lobe temporal (Figure 11.C.). Dans le lobe frontal, l'aire préfrontale est le centre de la pensée complexe et de la mémoire, et l'aire motrice est le lieu de la coordination des mouvements et de la parole. Le lobe pariétal est quant à lui impliqué dans la conscience du corps et de l'espace (traitement du toucher, de la pression et de la température, et de la douleur). Le lobe occipital est impliqué dans le traitement et de l'interprétation des informations visuelles. Enfin, le lobe temporal comprend l'aire auditive, l'aire de Wernicke (langage) et l'hippocampe, qui est impliqué dans la mémoire et les émotions (<https://institutducerveau-icm.org>).

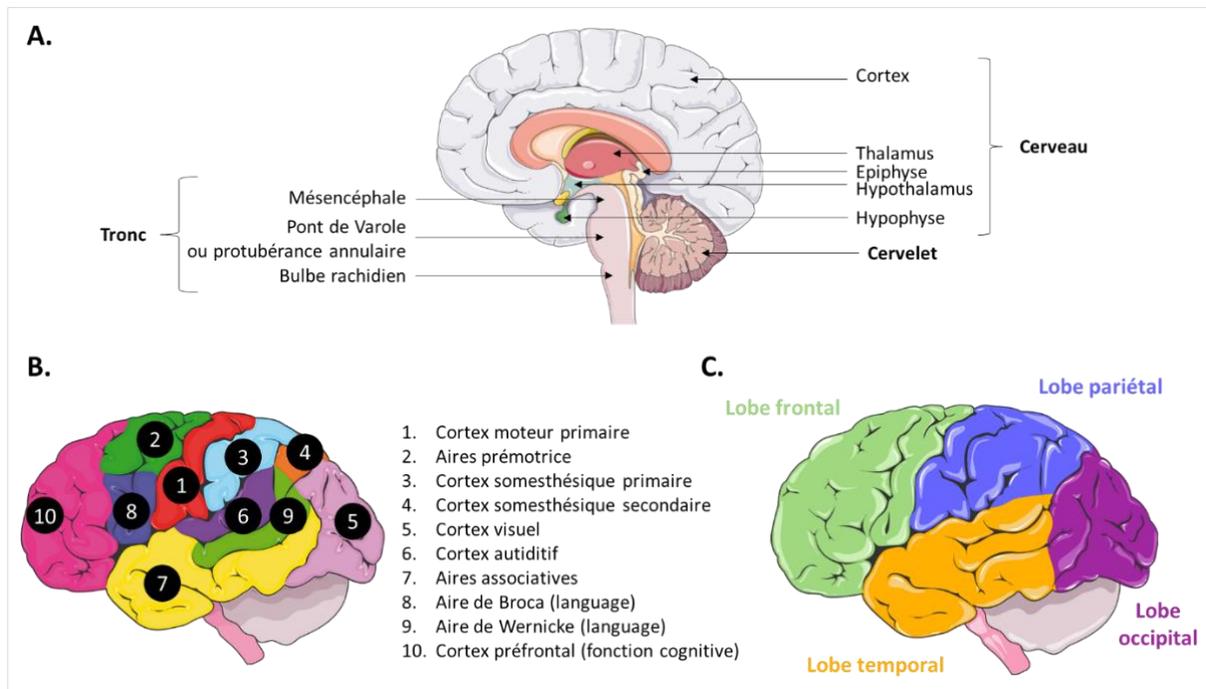


Figure 11 : Anatomie du système nerveux central humain adulte.

A. Subdivision du système nerveux central. **B.** Aires corticales fonctionnelles. **C.** Les lobes corticaux. Adapté de Canu et al., 2016 et Servier Medical Art.

2.1.2. Les neurones

2.1.2.1. Anatomie des neurones

Il est estimé que le cerveau humain contient environ 100 milliards de neurones, dont 200 types différents qui varient en morphologie et en fonction (von Bartheld *et al.*, 2016). Tous sont composés d'un corps cellulaire, le soma, qui contient le noyau et dont les prolongements forment l'axone et les dendrites (tous deux regroupés sous le terme général de « neurites ») (Figure 12).

Les dendrites sont des structures ramifiées qui permettent de recevoir les signaux provenant d'autres cellules, dans le but de les intégrer pour fournir une réponse. Elles présentent elles aussi des prolongements membranaires riches en actine, les épines dendritiques, qui augmentent leur surface réceptrice. Les épines dendritiques peuvent changer de morphologie en réponse à un stimulus pour potentialiser un signal et sont un aspect majeur de la neuroplasticité.

L'axone est un long prolongement du cytosquelette fait de neurofilament et de microtubules. Il conduit les signaux électriques du corps cellulaire à la synapse. L'axone peut être recouvert d'une gaine de myéline formée par les oligodendrocytes dans le SNC. Cette structure permet d'augmenter la vitesse de propagation de l'influx nerveux par conduction saltatoire (saut de l'influx nerveux de nœud de Ranvier en nœud de Ranvier). La terminaison de l'axone est très ramifiée ; on parle d'arborisation terminale. Cela permet à un neurone de contacter plusieurs autres neurones avec la même information.

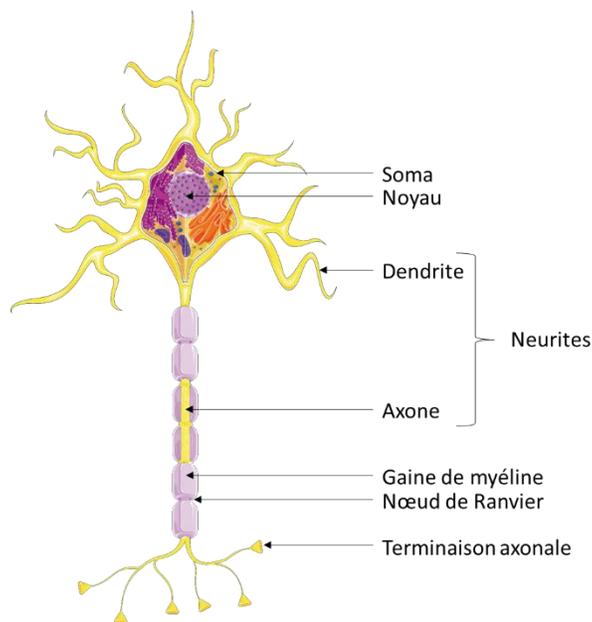


Figure 12 : Schéma d'un neurone.
Réalisé avec Servier Medical Art.

Les connexions entre les neurones se font au niveau des synapses. Ces dernières sont généralement constituées d'un axone issu de la cellule d'où provient le signal (membrane présynaptique), d'une dendrite recevant le signal (membrane postsynaptique) et d'une fente synaptique d'environ 20 à 30 nm (synapse axodendritique), mais il existe aussi d'autres types de synapses.

2.1.2.2. *Transmission du signal*

La communication entre les neurones au niveau des synapses se fait *via* des processus électrochimiques. Quand le neurone est au repos, des ions potassium (K^+) sont davantage concentrés à l'intérieur de la cellule, alors que des ions sodium (Na^+) et calcium (Ca^{2+}) sont plus concentrés à l'extérieur. La surface interne de la membrane cellulaire a une charge négative comparée à la surface externe. Le potentiel d'action est une brève inversion de quelques millièmes de seconde de ces conditions. Il est engendré par un influx de Na^+ dans la cellule qui va dépolariser la membrane jusqu'à un seuil critique. La membrane va ensuite se repolariser grâce à un efflux de K^+ . Progressivement, les concentrations d'ions sont rétablies et le potentiel membranaire de repos est restauré dans ce segment du neurone.

Au niveau présynaptique, la dépolarisation de la membrane entraîne un influx de Ca^{2+} *via* l'activation des canaux Ca^{2+} dépendant du voltage. L'augmentation de la concentration présynaptique de Ca^{2+} entraîne la libération des neurotransmetteurs contenus dans les vésicules synaptiques par exocytose. La quantité de neurotransmetteurs libérée dépend de la quantité de Ca^{2+} entrée dans la terminaison présynaptique, qui est elle-même liée à la fréquence de la stimulation de la membrane. Les neurotransmetteurs diffusent dans la fente synaptique et se lient à des récepteurs canaux sur la membrane postsynaptique. Il existe deux familles de récepteurs, dont l'activation peut entraîner soit l'ouverture soit la fermeture de canaux ioniques, selon le neurotransmetteur et le récepteur. Les récepteurs ionotropiques sont des canaux ioniques dépendants d'un ligand qui fixent directement le neurotransmetteur, ce qui entraîne leur ouverture ou fermeture. Les récepteurs métabotropiques sont des récepteurs couplés à la protéine G. La fixation du neurotransmetteur entraîne l'activation des protéines G dans la cellule, qui vont ouvrir ou fermer des canaux directement ou *via* un messenger secondaire. L'ouverture ou la fermeture des canaux modifie les flux ioniques, ce qui génère un potentiel postsynaptique, qui peut être soit excitateur, soit inhibiteur. Un potentiel postsynaptique excitateur entraîne la dépolarisation de la membrane et augmente ainsi la probabilité qu'un potentiel d'action soit généré. A l'inverse, un potentiel postsynaptique inhibiteur entraîne une hyperpolarisation de la membrane qui diminue la probabilité qu'un potentiel d'action soit généré. La plupart des neurones reçoivent des milliers de potentiels postsynaptiques, à la fois excitateurs et inhibiteurs,

qu'il va intégrer et additionner. Si la somme de tous les potentiels postsynaptiques résulte en une dépolarisation d'une amplitude suffisante, un potentiel d'action sera produit. Enfin, la réduction des niveaux de neurotransmetteurs *via* leur diffusion, leur récupération par le neurone présynaptique ou leur dégradation enzymatique, entraîne la fin du signal (Barha *et al.*, 2016) (Figure 13).

Il existe aussi des synapses purement électriques, où les deux cellules sont reliées par des jonctions communicantes, les jonctions GAP, qui permettent aux ions de passer d'une cellule à l'autre et ainsi de propager la dépolarisation.

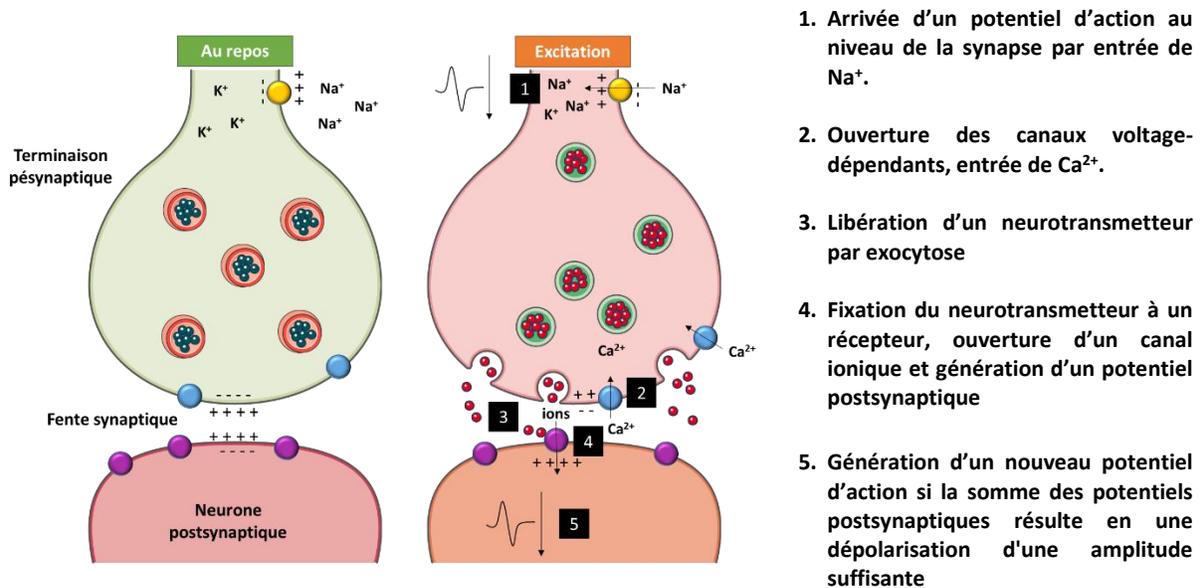


Figure 13 : Schéma du fonctionnement de la transmission du signal au niveau d'une synapse.
Réalisé avec Servier Medical Art.

2.1.2.3. Les neurotransmetteurs

Les neurotransmetteurs peuvent être définis comme des substances présentes dans les cellules présynaptiques et libérées en réponse à une dépolarisation présynaptique dépendante du Ca²⁺, et dont des récepteurs spécifiques sont présents sur les cellules postsynaptiques (Hall *et al.*, 2015). Ils ont été découverts en 1926 par Otto Loewi, qui a démontré l'implication de l'acétylcholine dans le ralentissement du rythme cardiaque. A ce jour, plus de 100 neurotransmetteurs ont été identifiés. Ils peuvent être classés en deux groupes : les

neuropeptides, qui sont de relativement grosses molécules d'environ 3 à 36 acides aminés, et les neurotransmetteurs à petites molécules (Barha *et al.*, 2016). Ces derniers regroupent l'acétylcholine, des acides aminés individuels comme le glutamate et l'acide gamma-aminobutyrique (*Gamma-Aminobutyric Acid*, GABA) par exemple, des purines, et des amines biogènes dont les catécholamines, la sérotonine et l'histamine. Quelques exemples de neurotransmetteurs sont détaillés ci-dessous.

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur le plus répandu dans le cerveau : il peut être libéré par plus de la moitié des synapses cérébrales. Il est synthétisé par les neurones à partir de la glutamine. Il possède de nombreux récepteurs ionotropiques, qui produisent tous des potentiels postsynaptiques excitateurs. Un fois libéré dans la fente synaptique, il est pris en charge par des transporteurs pour le ramener dans la cellule présynaptique ou dans les cellules gliales avoisinantes pour être converti de nouveau en glutamine. Un retrait rapide et efficace du glutamate est en effet nécessaire car des hauts niveaux de glutamate dans la fente synaptique induisent une excitation excessive et prolongée, pouvant provoquer une mort neuronale. Ce phénomène appelé excitotoxicité est retrouvé dans certaines maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson (Lau and Tymianski, 2010).

Le GABA est quant à lui le principal neurotransmetteur inhibiteur dans le SNC. Il est synthétisé dans les neurones à partir du glutamate par l'enzyme glutamate décarboxylase et par un dérivé de la vitamine B6. Il possède deux récepteurs ionotropiques, GABA_A et GABA_C, et un récepteur métabotrope, GABA_B.

L'Acétylcholine est présente au niveau de toutes les jonctions neuromusculaires, mais est également trouvée dans certaines zones cérébrales. Elle est impliquée dans la cognition et le contrôle de la motricité. Elle est synthétisée dans la terminaison présynaptique à partir de l'acétyl-coenzyme A et de la choline par l'enzyme choline acétyltransférase. Elle possède deux principaux récepteurs, le récepteur ionotrope nicotinique avec lequel elle va avoir un effet exciteur, et le récepteur métabotrope muscarinique, avec lequel elle aura un effet inhibiteur. Contrairement à beaucoup d'autres neurotransmetteurs à petite molécule, elle n'est pas récupérée par la cellule après sa libération, mais est inactivée par l'enzyme acétylcholinestérase

dans la fente synaptique. Un déficit en acétylcholine ou en ses récepteurs est lié aux déclin cognitifs retrouvés dans la maladie d'Alzheimer et aux symptômes non moteurs de la maladie de Parkinson (Rizzi and Tan, 2017; Shimohama *et al.*, 1986; Whitehouse *et al.*, 1982).

Les catécholamines, regroupant la dopamine, l'adrénaline et la noradrénaline, sont toutes dérivées de l'acide aminé tyrosine dans la terminaison présynaptique. La dopamine est généralement inhibitrice. Elle est notamment impliquée dans le contrôle volontaire des mouvements. De ce fait, la perte des neurones à dopamine entraîne les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson. La dopamine interagit avec plusieurs sous-types de récepteurs métabotropiques (D₁ à D₅). Elle est ensuite dégradée par l'enzyme catéchol-O-méthyltransférase dans la fente synaptique, et dans la cellule par la monoamine oxydase.

Les neurones peuvent être classifiés selon le neurotransmetteur libéré. On retrouve ainsi des neurones glutamatergiques, GABAergiques, cholinergiques, dopaminergiques, etc. Cependant, certains terminaux présynaptiques peuvent libérer plusieurs types de neurotransmetteurs. Par exemple, certains neurones dopaminergiques peuvent aussi libérer du glutamate comme neurotransmetteur secondaire (Kawano *et al.*, 2006; Trudeau, 2004).

2.1.2.4. *La différenciation neuronale*

- **Régulation de la neurogenèse**

La neurogenèse embryonnaire, qui permet d'obtenir une diversité de neurones spécialisés et organisés, résulte du contrôle de l'expression de certains gènes par des molécules appelées morphogènes. Parmi eux, on trouve l'acide rétinoïque, le *Fibroblast Growth Factor* (FGF), les *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP), les protéines Wnt, et le facteur Sonic Hedgehog (Shh). Ces molécules diffusent dans l'espace extracellulaire, créant un gradient de concentration des signaux dont dépendent la différenciation et la spécialisation neuronales. Ces morphogènes vont agir de manière combinée sur des facteurs de transcription et entraîner la différenciation neuronale.

- **Prolifération et différenciation des cellules embryonnaires**

Le système nerveux est formé à partir du feuillet embryonnaire externe, l'ectoderme. Brièvement, celui-ci va s'invaginer pour former un sillon entouré de deux crêtes neurales. Le sillon va se refermer pour donner le tube neural, qui deviendra le SNC, alors que les crêtes neurales formeront le système nerveux périphérique. La partie postérieure du tube neural deviendra la moelle épinière, alors que la partie antérieure va se développer pour former l'encéphale. La neurogenèse embryonnaire commence après la fermeture du tube neuronal, entre la 10^{ème} et 20^{ème} semaine de gestation chez l'Homme. Celui-ci est au départ formé par une monocouche de cellules souches, les cellules neuroépithéliales. Dans un premier temps, elles vont se multiplier pour former un tissu avec de nombreuses couches cellulaires ; la couche apicale, qui contient de nombreux corps cellulaires, est appelée la zone ventriculaire. Les cellules neuroépithéliales vont ensuite former des cellules gliales radiaires, qui vont progressivement les remplacer. Ces dernières présentent des caractéristiques épithéliales résiduelles (par exemple l'expression de la nestine), ainsi que des caractéristiques astrogliales, comme par exemple le transporteur de glutamate spécifique des astrocytes (GLAST pour *Glutamate-Aspartate Transporter*) ou la *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP). Ce sont des cellules souches neurales, elles sont capables de se diviser et ainsi de s'auto-renouveler et/ou de donner naissance à des neurones ou à des cellules gliales. La plupart des neurones du cerveau provient, directement ou indirectement, de la glie radiaire. Les cellules gliales radiaires vont en effet générer des neurones immatures (les neuroblastes), soit directement, soit, dans la majorité des cas, en formant des progéniteurs intermédiaires (qui peuvent aussi être issus directement des cellules neuroépithéliales) (Figure 14). Ces derniers vont former la zone subventriculaire et se diviser en neurones immatures. Les cellules gliales radiaires peuvent aussi former des astrocytes et des oligodendrocytes, mais ce phénomène apparaît plus tardivement. Une des voies essentielles de la régulation de la prolifération cellulaire dans la neurogenèse est la voie Notch, dont l'activation par des protéines Delta à la surface des cellules voisines favorise la prolifération en inhibant des gènes pro-neuronaux (Götz and Huttner, 2005).

- **Migration des neuroblastes**

Les neurones encore immatures vont quitter la zone subventriculaire et migrer dans leur zone définitive. Au départ, la migration se fait par la translocation somatique. Le neurone déploie une longue extension de son corps cellulaire, qui va se projeter au-delà de la zone ventriculaire et aller se fixer sur la surface extérieure du cerveau en développement (surface piale). Le noyau va ensuite se déplacer à l'intérieur du cytoplasme de cette élongation pour rejoindre sa destination finale. Au cours du développement, le cerveau devient plus volumineux et le mode de migration change. La glie radiaire va alors servir de support de migration pour les neuroblastes, d'où le terme de migration radiale. Comme les neurones dans la translocation somatique, les cellules gliales radiaires vont développer un allongement basal qui va s'attacher à la surface piale, mais leurs noyaux vont rester dans la zone ventriculaire. L'élongation va former un support permettant la migration des neurones (Delhay-Bouchaud, 2001; Stiles and Jernigan, 2010).

- **Maturation neuronale et synaptogenèse**

Une fois arrivés à leur emplacement définitif, les neuroblastes vont adhérer entre eux, avec les cellules gliales et la Matrice Extracellulaire (MEC). Cette étape est sous le contrôle de plusieurs Molécules d'Adhésion Cellulaire (MAC), dont la Molécule d'Adhésion Cellulaire Neurale (MACN) et la N-cadhérine pour l'adhésion intercellulaire, et les intégrines pour l'adhésion à la MEC. Les neuroblastes vont ensuite se différencier pour devenir des neurones matures. Un des éléments majeurs est la poussée de son axone en direction d'une cible précise. La poussée des neurites se fait grâce à une structure spécialisée appelée le cône de croissance. Il s'agit d'une structure formée d'une lame aplatie, le lamellipode, qui porte de fines extensions, les filipodes, capables de s'allonger et de se contracter grâce à un cytosquelette d'actine en remaniement continu, permettant ainsi l'exploration du milieu. A l'arrière du cône de croissance, la formation des microtubules à partir de la tubuline stabilise l'axone en croissance et permet le transport vésiculaire des éléments nécessaires à la formation de la nouvelle membrane. Le guidage de l'axone peut se faire par contact *via* des molécules de la MEC, des MAC ou des éphrines, ou par chimiotactisme *via* des facteurs solubles et des molécules associées à la MEC (nétrines, Slit, et sémaphorines). Lorsque le cône de croissance arrive à proximité de sa cible, une connexion

synaptique va se mettre en place. Le cône de croissance se connecte à la cellule cible au travers de protocadhérines et de cadhérines. Des vésicules synaptiques vont se former et s'accumuler au niveau pré-synaptique, et le nombre de canaux Ca^{2+} va augmenter. Cette maturation est contrôlée par des signaux moléculaires comparables à ceux de la croissance axonale (éphrine, MAC, cadhérines, etc.). La synapse va ensuite se stabiliser grâce à l'association des neurexines pré-synaptiques et aux neuroligines post-synaptiques. La cellule cible va sécréter des facteurs neurotrophiques : le *Nerve Growth Factor* (NGF), le *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), la Neutrophine-3 (NT-3) et les Neutrophines 4/5 (NT-4/5), qui vont contrôler la différenciation, la croissance et la survie de la synapse (Delhay-Bouchaud, 2001; Richard *et al.*, 2013).

Les neurones matures expriment certains marqueurs pan-neuronaux comme la protéine nucléaire NeuN, la *Microtubule Associated Protein 2* (MAP2) et la synaptophysine. En fonction de leur spécialisation, c'est-à-dire du neurotransmetteur produit, ils vont exprimer des protéines spécifiques, par exemple le transporteur vésiculaire de glutamate 2 (*vesicular Glutamate Transporter 2*, vGLUT2) pour les neurones glutamatergiques, ou la Tyrosine Hydroxylase (TH) pour les neurones dopaminergiques (Figure 14).

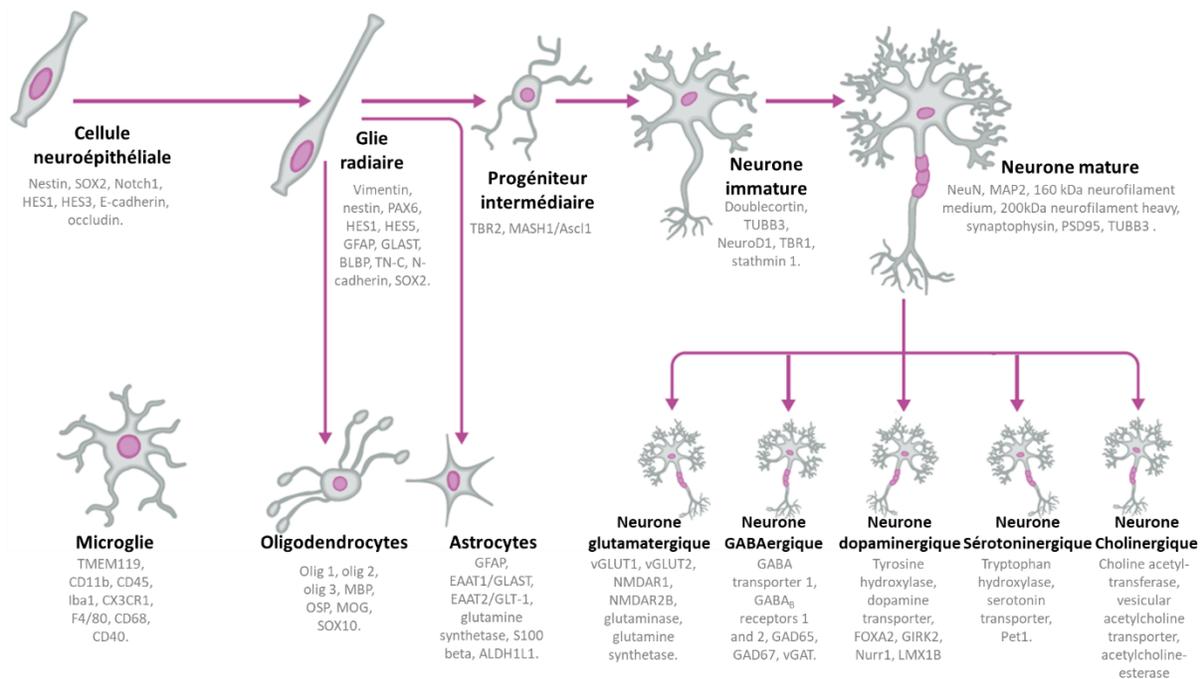


Figure 14 : Récapitulatif des étapes de la différenciation et maturation neuronale et de l'expression des marqueurs protéiques associés.

Adapté de <https://www.abcam.com>.

- **Neurogenèse adulte**

La neurogenèse perdure chez l'adulte de manière localisée en tant que mécanisme de la plasticité cérébrale, dans ce que l'on appelle les niches neurogéniques, comme la Zone Sous-Granulaire (ZSG) du gyrus denté de l'hippocampe chez l'humain. Les cellules souches neurales résidentes dans la niche neurogénique présentent des caractéristiques de la glie radiaire, avec l'expression de marqueurs de cellules gliales (e.g. GFAP) et de progéniteurs neuraux (e.g. Sox2, Nestin). Initialement quiescentes, elles vont s'activer et se diviser pour s'auto-renouveler et générer des progéniteurs transitoires. Ces derniers vont à leur tour se diviser puis se différencier en neuroblastes, puis en neurones immatures qui vont migrer de la ZSG jusqu'à la zone granulaire et se différencier en neurones matures, les neurones granulaires du gyrus denté (Jourdon, 2015).

La neurogenèse adulte est l'un des mécanismes de la plasticité cérébrale. La plasticité désigne la capacité d'une structure à se modifier en réponse à des stimuli extérieurs et de conserver cette modification. La plasticité du SNC est un mécanisme clef de l'apprentissage et de la mémoire. Elle

est permise par la modification et la réorganisation des synapses neuronales, mais peut aussi être favorisée par l'élimination ou l'apport de cellules neuronales dans des zones spécifiques. Au niveau de l'hippocampe, elle serait ainsi impliquée dans la séparation de deux événements présentant un contexte similaire, ainsi que dans la navigation et la mémoire spatiale, dans le conditionnement contextuel de la peur et dans la mémoire (Jourdon, 2015; Urbán and Guillemot, 2014). La neurogenèse adulte peut aussi être impliquée dans des mécanismes de réparation endogène du cerveau suite à une lésion, bien que cela reste limité.

2.1.3. *Les cellules gliales*

Le SNC est composé non seulement de neurones, mais également de cellules gliales, qui peuvent être séparées en trois principaux types : les astrocytes, les oligodendrocytes, et les cellules microgliales. Ces cellules jouent des rôles importants dans la physiologie du SNC mature ou en développement, ainsi que dans les pathologies cérébrales. Il a longtemps été estimé que le ratio cellules gliales : neurones était de 10 : 1. Pourtant, les études histologiques montraient un ratio d'environ 1:1, avec 40 à 130 milliards de cellules gliales estimées dans le cerveau humain (Blinkov and Glezer, 1968; Haug, 1986). Une nouvelle méthode de comptage, le fractionneur isotrope, a confirmé ce ratio inférieur à 1:1 en dénombant moins de 100 milliards de cellules gliales dans le cerveau humain (Andrade-Moraes *et al.*, 2013; Azevedo *et al.*, 2009). Le ratio entre cellules gliales et neurones peut cependant aussi varier en fonction de la zone cérébrale étudiée. De même, au sein des cellules gliales, les proportions d'astrocytes, de microglie et d'oligodendrocytes varient en fonction de la zone cérébrale et des études (Tableau 1) (von Bartheld *et al.*, 2016).

Tableau 1 : Proportion de chaque type de cellules gliales par rapport à la quantité totale de cellules gliales dans le cerveau humain.

Tableau adapté de von Bartheld et al. 2016, à partir d'études reportant des données primaires.

Oligodendrocytes	Astrocytes	Microglie	Région	Auteurs	Année
29%	61.5%	9.5%	Cortex visuel	Kryspin-Exner	1952
40%	54%	-	Caudatum	Kryspin-Exner	1952
57%	-	-	Pallidum	Kryspin-Exner	1952
52-74%	30-40%	6-8%	Thalamus	Kryspin-Exner	1952
77%	-	-	Nucleus ruber	Kryspin-Exner	1952
62%	-	-	Substantia nigra, pc	Kryspin-Exner	
51%	40%	9%	Cortex moteur, couche V	Brownxon	1956
45%	45%	10%	Matière grise	Pope	1958
<67%	>23%	10%	Matière blanche	Pope	1958
36.6%	46.5%	16.8%	Matière grise du cortex frontale	Pope	1959
69%	24%	6.9%	Matière blanche du cortex frontal	Pope	1959
75%	19%	6%	Matière grise du néocortex	Pelvig <i>et al.</i>	2003
74.6-75.6%	17.3-20.2%	5.2-6.5%	Matière grise du néocortex (hommes et femmes)	Pelvig <i>et al.</i>	2008
-	-	15-18%	Neocortex, (hommes)	Lyck <i>et al.</i>	2009

2.1.3.1. Les astrocytes

Les astrocytes ont une forme étoilée du fait de leurs nombreux prolongements émanant du corps cellulaire, qui leur permettent d'interagir avec les autres cellules (Figure 15.A.). Ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions cérébrales.

Ils sont notamment impliqués dans la modulation de la transmission du signal neuronal. En effet, ils possèdent des sites de fixation à haute affinité pour les neurotransmetteurs, des systèmes de pompes moléculaires et des enzymes intracellulaires qui leur permettent de participer au retrait des neurotransmetteurs après leur libération dans la synapse. De plus, les

astrocytes sont capables de sécréter eux-mêmes des neurotransmetteurs (appelés alors gliotransmetteurs) comme le glutamate par exemple. Ils possèdent en effet des récepteurs à neurotransmetteurs qui, une fois activés, entraînent un influx de Ca^{2+} et la libération de glutamate glial qui va moduler la transmission du signal. De plus, l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire peut se propager entre les astrocytes et ainsi moduler l'activité neuronale en différentes localisations (Halassa *et al.*, 2007; Jessen, 2004). Le rôle essentiel des astrocytes au niveau des synapses ont fait naître la notion de synapse « tripartite » qu'ils forment avec les membranes pré- et postsynaptiques neuronales. De plus, les astrocytes contribuent au maintien de l'homéostasie ionique en participant au retrait des ions K^+ libérés par les neurones durant la propagation du potentiel d'action grâce à des transporteurs et des canaux ioniques (Walz, 2000).

Les astrocytes participent aussi à l'homéostasie cérébrale et à la modulation de l'apport en nutriments et en énergie au travers de leur rôle au niveau de la BHE, et sécrètent de nombreuses molécules de la MEC cérébrale, notamment des lecticanes, et de la ténascine-C (Wiese *et al.*, 2012). Ils peuvent aussi sécréter des facteurs neurotrophiques pouvant favoriser entre autres la survie neuronale et la croissance des neurites, comme le GDNF, le BDNF, le NGF, le bFGF et FGF-2, le *Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor* (CDNF) et son homologue le *Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor* (MANF) (Miyazaki and Asanuma, 2020). Ils peuvent aussi protéger les neurones *via* des fonctions d'endocytose des débris cellulaires et autres facteurs neurotoxiques. Enfin, ils peuvent produire des molécules anti-oxydantes, comme le Glutathion (GSH), l'ascorbate et la vitamine E (Bélanger and Magistretti, 2009; Miyazaki and Asanuma, 2020).

De plus, les astrocytes participent aux mécanismes inflammatoires du SNC. Ils peuvent s'activer en réponse à des signaux pro-inflammatoires, comme l'Interleukine- 1β (IL- 1β) et le *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), et vont alors produire à leur tour des molécules de l'inflammation variées, notamment des cytokines, pouvant avoir des effets anti- mais également pro-inflammatoires (Bélanger and Magistretti, 2009; Boghdadi *et al.*, 2020). Ainsi, leur rôle dans la modulation de la neuroinflammation reste discuté. Les astrocytes activés sont caractérisés par l'augmentation des niveaux d'expression de la GFAP (Figure 15.B. et C.). Ce phénomène est appelé astrogliose (Wang *et al.*, 2015). Il est à noter qu'en culture *in vitro*, bien que les conditions

soient adaptées à leur survie, les astrocytes expriment un niveau relativement élevé de la GFAP, même sans induction de l'inflammation.

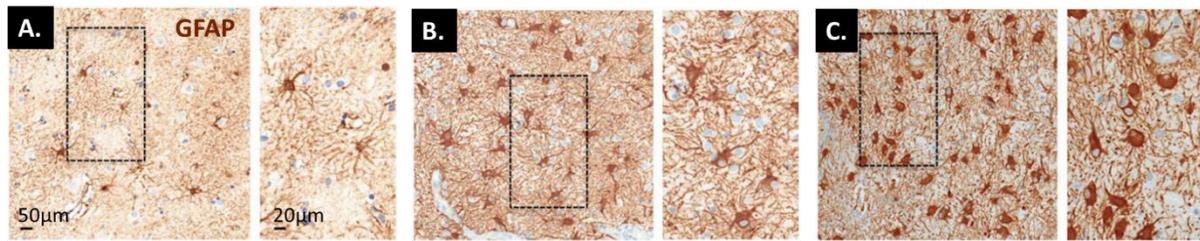


Figure 15 : Morphologie des astrocytes dans des tissus cérébraux humains sains ou pathologiques.

A. Tissu éloigné d'une lésion et considéré sain. **B.** Astroglie réactionnelle modérée. **C.** Astroglie réactionnelle diffuse sévère. Vue agrandie des zones encadrées à droite. Marquage immunohistochimique de la GFAP, contremarquée avec l'hématoxyline. GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein. Adapté de Sofroniew and Vinters, 2010.

2.1.3.2. Les cellules microgliales

Ce sont les principales cellules immunitaires résidentes du cerveau. Elles présentent au départ une morphologie ramifiée, mais, une fois activées par des signaux inflammatoires, prennent une morphologie amiboïde.

Avec les astrocytes, la microglie participe au système immunitaire cérébral qui permet de se défendre contre les lésions, en activant les processus neuroinflammatoires et en détectant la réponse immune périphérique. L'inflammation chronique est associée à des maladies comme les maladies auto-immunes, lésions traumatiques, maladie neurodégénératives et troubles psychiatriques comme la schizophrénie. En conditions physiologiques, les cellules microgliales sont maintenues en quiescence par une variété de molécules immunomodulatrices (CX3CL1, CD200, CD22, CD47, CD95) et par la MACN exprimée par les neurones et les cellules gliales.

Deux phénotypes majeurs d'activation des cellules microgliales sont décrits : le phénotype M1 pro-inflammatoire, et le phénotype M2 anti-inflammatoire. Le phénotype M1 est caractérisé par la production de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et l'Interféron-gamma (IFN- γ), ainsi que par des molécules cytotoxiques comme l'ion superoxyde, l'oxyde nitrique et les Espèces Réactives à l'Oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS) qui contribuent à

l'amplification de la réponse pro-inflammatoire. Le phénotype M2 joue un rôle anti-inflammatoire en produisant une variété de cytokines anti-inflammatoires, comme les IL-4, 10 et 13, et le *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) (Wang *et al.*, 2015).

2.1.3.3. *Oligodendrocytes*

Les oligodendrocytes synthétisent la gaine de myéline dans le SNC, et participent ainsi à l'augmentation de la vitesse de transmission du signal électrique le long de l'axone. Un seul oligodendrocyte peut myéliniser 30 à 40 axones (Jessen, 2004). La sclérose en plaques est une maladie auto-immune qui entraîne la perte des oligodendrocytes et la démyélinisation des neurones ; elle a pour conséquence des troubles de la sensibilité (fourmillement, sensation de froid, engourdissement, douleurs, etc.), une faiblesse musculaire, et parfois des troubles visuels.

2.1.4. *La barrière hémato-encéphalique*

La BHE se trouve au niveau des capillaires sanguins cérébraux, qui forment une interface de 12 à 18 m² entre le parenchyme cérébral et la circulation sanguine (Abbott *et al.*, 2010). Elle est formée par les cellules endothéliales, la lame basale, des péricytes et des pieds de prolongements astrocytaires (Figure 16.A. et B.). Les péricytes sont impliqués dans la mise en place de la BHE lors du développement et apportent un soutien structurel *via* la synthèse de la membrane basale (Krueger et Bechmann, 2010). Les astrocytes sont quant à eux impliqués dans le maintien des propriétés de barrière, et dans la régulation du flux sanguin, et donc dans la modulation de l'apport en nutriments et en énergie vers le cerveau. Les cellules endothéliales sont reliées entre elles par des jonctions serrées qui scellent le transport paracellulaire des molécules du sang vers le parenchyme cérébral. Elles sont également reliées par des jonctions adhérentes qui forment une ceinture continue qui maintient les cellules voisines attachées, permettant le maintien des jonctions serrées. Cette structure forme une barrière physique entre le sang et le cerveau, et oriente le passage des substances vers les systèmes de transport spécifique (Abbott *et al.*, 2006). Il existe ainsi 3 voies de passage à travers la BHE : la diffusion passive, le passage *via* des protéines

de transport (canaux ou perméases), et la transcytose (mécanisme de passage par endocytose) (Figure 16.C.). La BHE est aussi une barrière métabolique, en raison de la présence de mécanismes d'efflux des molécules vers le sang, les transporteurs *Adenosine triphosphate-Binding Cassette* comme la glycoprotéine P, ou encore les transporteurs de solutés.

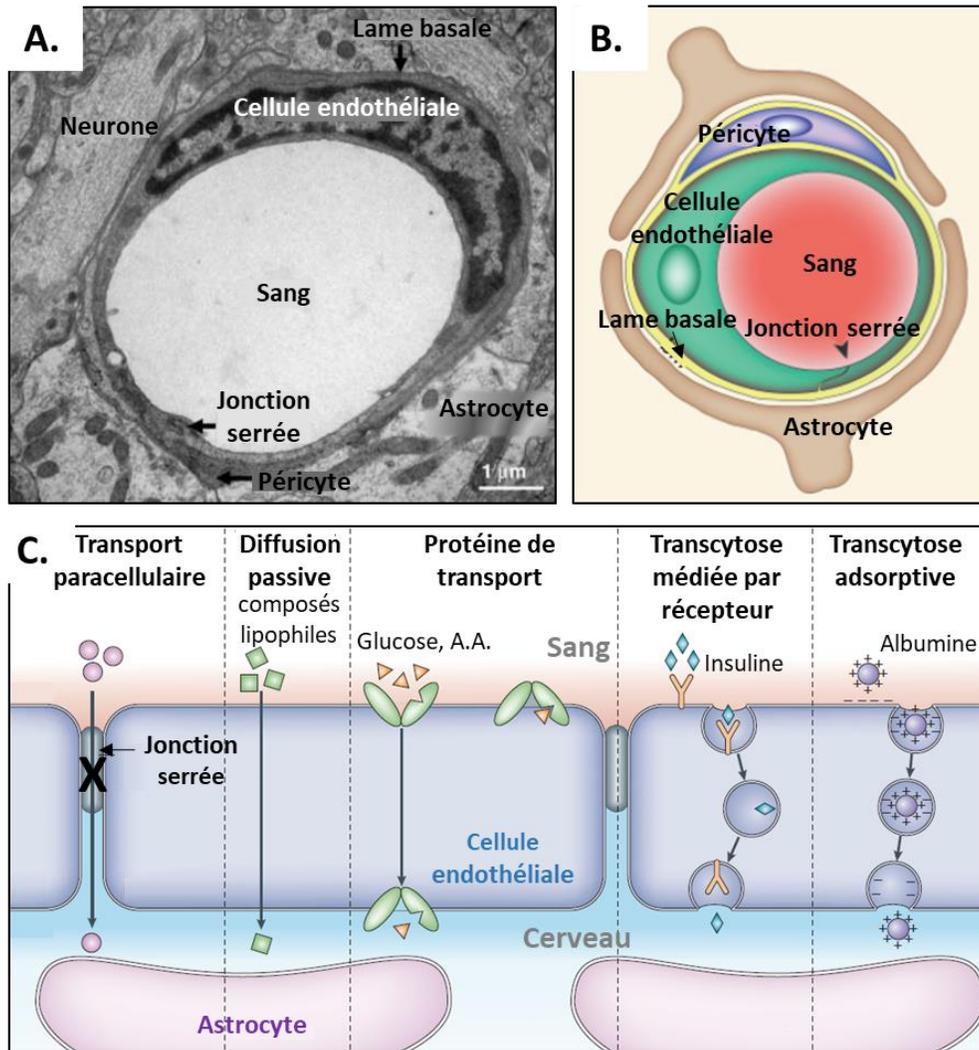


Figure 16 : Structure et fonction de la barrière-hématoencéphalique.

A. Coupe transversale d'un vaisseau sanguin cérébral au niveau de la BHE en microscopie électronique. **B.** Schéma de la coupe transversale. **C.** Les 5 voies de transports. A.A. : Acides Aminés. Adapté de Weiss et al., 2009 ; Saunders et al., 2016 ; Abbott, 2004, respectivement.

Cette structure permet de protéger le cerveau des fluctuations des éléments présents dans le sang (nutriments, hormones, métabolites, etc.) et maintient ainsi un environnement cérébral

stable nécessaire aux fonctions cérébrales (Bernacki *et al.* 2008 ; Hawkins et Davis, 2005). Elle régule le passage des substrats énergétiques et permet l'élimination des déchets métaboliques produit par le SNC. De plus, elle isole le cerveau des composants potentiellement toxiques circulant dans le sang, comme des protéines endogènes, des pathogènes ou les médicaments à visée périphérique. Cependant, cette sélectivité du passage des substances à travers la BHE couplée aux mécanismes d'efflux représente un véritable obstacle pour le passage des médicaments à visée cérébrale ; différentes stratégies peuvent être mises en place pour contourner ou franchir cette barrière.

2.2. La matrice extracellulaire cérébrale (MEC)

2.2.1. Composition et élasticité de la MEC cérébrale

La composition moléculaire et les propriétés physiques de la MEC varient en fonction des organes. Le cerveau, où la matrice représente 20% du volume total, est l'organe le plus souple du corps humain, avec un module d'élasticité de 0,1 kPa, en raison de sa composition spécifique (Figure 17) (Syková, 1997; Akhmanova et al., 2015; Barnes et al., 2017; Butcher et al., 2009; Sood et al., 2016).

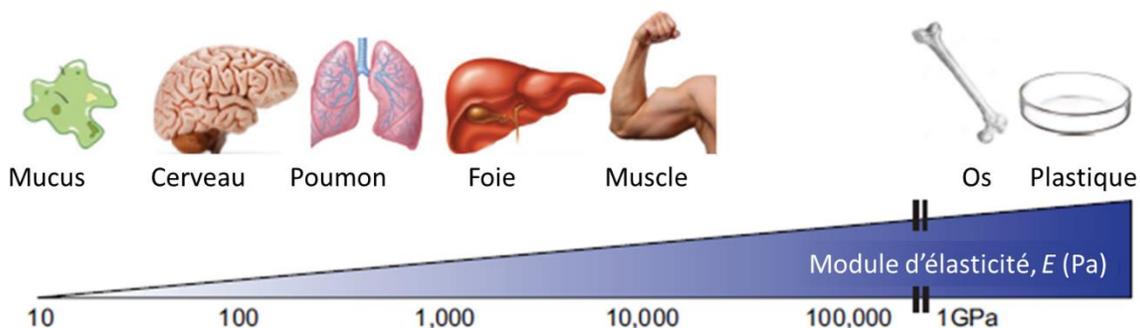


Figure 17 : Module d'élasticité des tissus humains comparé aux supports de culture en plastique.
Adapté de Barnes et al., 2017.

En effet, contrairement à la matrice des autres tissus du corps humain, celle du cerveau contient un faible niveau de protéines structurales telles que le collagène ou la fibronectine, et

de protéines basales telles que les laminines (Ruoslahti, 1996). Elle est principalement composée de Protéoglycane (PG), eux-mêmes formés par des Glycosaminoglycane sulfatés (GAG) reliés par liaison covalente à une protéine centrale (Figure 18). L'Acide Hyaluronique (AH), un GAG non sulfaté, est également abondant. Ainsi, le ratio GAG : Collagène dans la MEC cérébrale est seulement de 10 : 1.

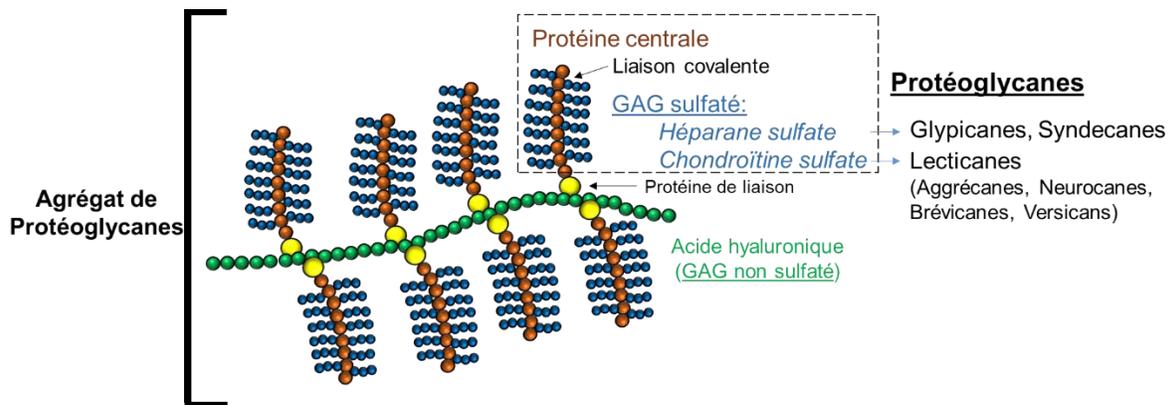


Figure 18. Schéma de l'organisation moléculaire des protéoglycane dans la matrice extracellulaire.

GAG : Glycosaminoglycane

La diversité des PG dépend de l'expression différentielle des gènes codant pour les protéines centrales, de l'épissage alternatif, du type et de la longueur des chaînes de GAG sulfatés. Les GAG sulfatés qui composent la majorité des PG du SNC sont les Chondroïtines Sulfates (CS) et les Héparanes Sulfates (HS), bien que d'autres, comme les dermatanes sulfates et les kératanes sulfates, soient également présents. Les CS et les HS sont deux polysaccharides hautement sulfatés, composés d'une répétition d'unités de disaccharides d'acide glucuronique et de N-acetylgalactosamine, et d'acide glucuronique et de N-acetylglucosamine, respectivement (Bandtlow and Zimmermann, 2000; Bonneh-Barkay and Wiley, 2009; Maeda et al., 2011). C'est le groupement sulfo qui confère aux chaînes GAG leurs charges et leurs propriétés de fixation (Miyata and Kitagawa, 2017).

Les lecticanes sont une famille de PG à Chondroïtines Sulfates (PGCS), dont font partie les aggrécane, les neurocane, les brévicanes, et les versicanes. Ils sont caractérisés par la présence de domaines lectine de type C dans leur protéine centrale, et d'un domaine de liaison à l'AH.

(Yamaguchi, 2000). Les neurocanes et les brevicanes semblent être exprimés spécifiquement dans le tissu cérébral. D'autres PG abondamment exprimés dans le SNC sont les glypicanes et les syndécanes, deux familles de PG à Héparanes Sulfates (PGHS) (Bonneh-Barkay and Wiley, 2009). Tous deux sont liés à la membrane cellulaire *via* un ancrage Glycosylphosphatidylinositol (GPI) pour les glypicanes, ou un domaine transmembranaire pour les syndécanes (Bandtlow and Zimmermann, 2000).

Contrairement aux GAG sulfatés, l'AH ne se lie pas par liaison covalente aux protéines centrales pour former des PG ; on le trouve soit en tant que polysaccharide libre à la surface des cellules, ou lié à des PG de la MEC par une protéine de liaison (Theocharis *et al.*, 2016). Il est composé de milliers de répétitions de N-acétylglucosamine et d'acide glucuronique, formant des polymères de 10^6 à 10^7 kDa (Figure 19) (Novak and Kaye, 2000).

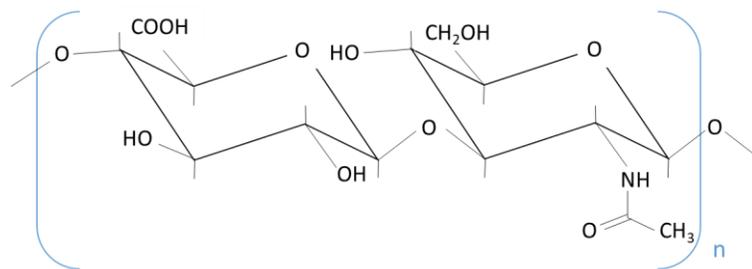


Figure 19: Structure moléculaire de l'acide hyaluronique.

La MEC cérébrale contient également de la ténascine-C et de la ténascine-R. Les ténascines sont des glycoprotéines qui présentent des sites de liaison aux PG, à la fibronectine, et aux autres molécules de ténascines. La ténascine-C est organisée sous forme d'hexamère et est trouvée dans de nombreux tissus, alors que la ténascine-R est organisée en trimère et est exprimée uniquement dans le SNC (Novak and Kaye, 2000).

Une autre protéine bien connue de la MEC cérébrale est la reeline. C'est une glycoprotéine sécrétée d'environ 400 kDa qui est présente dans de nombreux tissus durant le développement foetal, ainsi que dans les tissus adultes (Barros *et al.*, 2011; Novak and Kaye, 2000).

2.2.2. Structure de la MEC cérébrale

La MEC cérébrale peut être séparée en trois compartiments distincts selon l'organisation de ses composants : la lame basale, la matrice interstitielle et les Réseaux Périneuronaux (RPN) (Figure 20) (Lau *et al.*, 2013).

La lame basale forme une couche de 20 à 200 nm d'épaisseur autour des vaisseaux sanguins et de l'intégralité de la surface piale du SNC. Contrairement aux autres compartiments de la MEC cérébrale, la lame basale est principalement composée de collagènes, en particulier du collagène de type IV, et de laminine, reliés ensemble par du nidogène (une glycoprotéine également appelée entactine). La lame basale est également riche en PGHS, en particulier en perlécane et en agrines (Iozzo, 2005; Pozzi *et al.*, 2017).

La matrice interstitielle désigne les molécules de la MEC réparties dans le parenchyme. Il s'agit d'une matrice diffuse et hydratée principalement constituée de PG, d'AH, de ténascines et de protéines de liaison. Elle contient peu de protéines structurales (collagène et élastine) et peu de glycoprotéines d'adhésion (laminine et fibronectine).

Les RPN sont des réseaux réticulés condensés qui entourent les corps cellulaires et les parties proximales et médianes des dendrites dans de nombreux types neuronaux chez les mammifères, en particulier les interneurons inhibiteurs du cerveau. On les trouve aussi autour du segment axonal initial. Ils sont principalement composés de lecticanes, en particulier d'aggrécane (bien que les neurocane, brevican et versican soient également présents en proportions variables), d'AH, et de ténascine-R (Bosiacki *et al.*, 2019; Carulli *et al.*, 2006; Fawcett *et al.*, 2019; Wen *et al.*, 2018). L'AH et la ténascine-R sont deux ligands des lecticanes, ce qui entraîne la formation d'un complexe ternaire. La liaison PGCS-AH est stabilisée par les protéines *Hyaluronan and Proteoglycanbinding Link 1 et 4* (HAPLN1 et HAPLN4) (Carulli *et al.*, 2010). Deux autres formes de MEC condensées sont présentes dans les SNC : la MEC périnodale et les enveloppes axonales. Ces dernières sont principalement composées d'aggrécane et de brevican, et entourent les terminaisons présynaptiques inhibitrices de nombreux types neuronaux (Brückner *et al.*, 2008). La MEC périnodale entoure les nœuds de Ranvier et forme une barrière contre la diffusion des ions qui affectent la vitesse de conduction axonale. Leur structure est similaire à celles des RPN,

excepté qu'ils sont stabilisés par les protéines de liaison HAPLM2, et que les PGCS prédominants sont les brévicanes, les versicanes et les neurocanes, et non les agrécanes (Foscarin *et al.*, 2017).

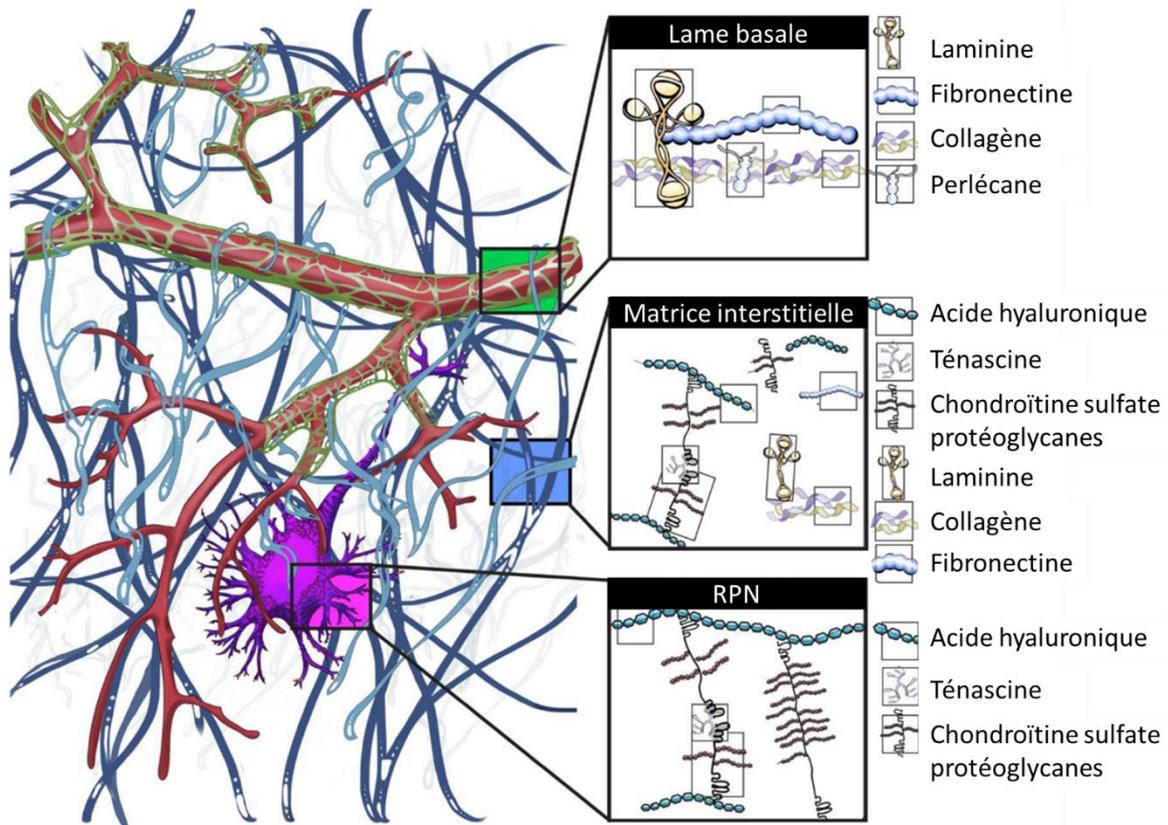


Figure 20 : Structure de la matrice extracellulaire cérébrale.
RPN : Réseau Périneuronal, adapté de Stephenson and Yong, 2018.

2.2.3. Interactions matrice-cellules

Les composants de la MEC interagissent non seulement ensemble, mais également avec les cellules. En plus des PGHS glypicanes et syndécans qui se lient constitutivement aux cellules *via* les ancrages GPI ou *via* un domaine transmembranaire, respectivement, d'autres PG peuvent aussi interagir avec les cellules au travers de récepteurs variés. Par exemple, les brévicanes ainsi que d'autres PG peuvent lier les cellules *via* le récepteur cellulaire α -Amino-3-hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid (AMPA) et les canaux potassium. De plus, les brévicanes, les versicanes et la ténascines-R peuvent interagir avec la membrane axonale *via* la neurofascine 186 ou les canaux sodium, et l'AH peut interagir avec le récepteur CD44 (Fawcett *et al.*, 2019).

D'autres importantes molécules d'adhésion sont les intégrines, des glycoprotéines transmembranaires qui agissent comme des récepteurs pour les PG, le collagène, les laminines et la fibronectine (Saleh, 2017; Wu and Reddy, 2012). Toutes ces interactions permettent l'adhésion cellulaire, l'internalisation des molécules de la MEC ou la transmission de signaux biochimiques qui déclenchent des réponses cellulaires (Novak and Kaye, 2000).

2.2.4. Synthèse et remodelage continu de la MEC

L'organisation de la MEC varie tout au long de la vie, du développement au vieillissement cérébral (Bandtlow and Zimmermann, 2000; Carulli *et al.*, 2006; Foscari *et al.*, 2017; Long and Huttner, 2019). En effet, la MEC est une structure dynamique continuellement remodelée par des mécanismes de dégradation et de synthèse de ses composants.

La MEC cérébrale est principalement synthétisée par les astrocytes et les oligodendrocytes, mais aussi par les neurones au niveau du stroma ou des terminaisons synaptiques. Les PG sont synthétisés et assemblés dans le réticulum endoplasmique rugueux et l'appareil de Golgi, puis sont exportés dans des vésicules de sécrétion dans l'espace extracellulaire.

L'AH est quant à lui synthétisé par les hyaluronane synthases transmembranaires. Trois hyaluronane synthases ont été identifiées chez les vertébrés : HAS1, HAS2 et HAS3 (Itano and Kimata, 2002). Ce sont des protéines transmembranaires qui assemblent l'AH dans le cytosol et simultanément le transportent à l'extérieur de la cellule. L'AH peut être soit libéré dans l'espace extracellulaire, ou rester lié à la surface cellulaire en se fixant à des récepteurs cellulaires ou en restant accroché aux hyaluronane synthases incorporées dans la membrane (Toole, 2004) (Miyata and Kitagawa, 2017). La synthèse d'AH est très importante pendant le développement, mais diminue dans la majorité des tissus adultes. Cependant, de nombreux tissus conservent la capacité de synthétiser l'AH, et en produisent de manière rapide et en quantité, en réponse à un stimulus physiologique (Ding *et al.*, 2019). De nombreux types cellulaires peuvent produire de l'AH, notamment les astrocytes dans le système nerveux central (Asher and Bignami, 1991; Bignami and Asher, 1992).

Deux systèmes majeurs sont impliqués dans la modification de la MEC cérébrale adulte : l'activateur tissulaire du plasminogène (*tissue Plasminogen Activator*, tPA), et les métalloprotéinases matricielles (*Matrix Metalloproteinase*, MMP). Ces deux types de protéases peuvent dégrader les composants de la MEC, comme les PG, les ténascines, la fibronectine et les laminines (Vaday and Lider, 2000).

Les MMP sont synthétisées par les neurones, les oligodendrocytes, la microglie et les cellules endothéliales, sous forme de proenzymes dont l'activation nécessite l'élimination d'un domaine peptidique (Lo *et al.*, 2002). Les MMP sont généralement localisées dans l'espace interstitiel, mais peuvent aussi se lier à la surface des cellules grâce à des molécules d'adhésion, ou grâce à des PG ou des intégrines de la surface membranaire, ou au travers de domaines transmembranaires. Elles sont exprimées simultanément avec les Inhibiteurs Tissulaires de Métalloprotéinases (TIMP pour « *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase* »), qui sont aussi produits par les neurones et les astrocytes dans le SNC adulte, et qui inactivent les MMP en se fixant dessus, évitant ainsi la dégradation excessive de la MEC (Rempe *et al.*, 2016).

L'activation des MMP peut se faire par le biais du tPA, au travers de l'activation du plasminogène en plasmine, liant ainsi les deux systèmes protéolytiques. Le tPA possède aussi des effets indépendants du plasminogène, dont la régulation positive de MMP-9. Il est synthétisé par toutes les cellules de l'unité neurovasculaire, notamment à un haut niveau dans les zones impliquées dans l'apprentissage et la mémoire (Bonneh-Barkay and Wiley, 2009; Lo *et al.*, 2002; Ortolano and Spuch, 2013). L'activité du tPA est régulée à différent niveau : au niveau de la transcription, de la traduction, de la sécrétion, et de l'inhibition. L'activité synaptique, au travers de la dépolarisation et de l'entrée de calcium dans la cellule, peut notamment impacter positivement la traduction et ainsi favoriser la synthèse de tPA (Gualandris *et al.*, 1996). L'inhibition du tPA est quant à elle contrôlée par des anti-protéases de la famille des serpinines, comme la protéase nextine 1, la neuroserpine et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (Bonneh-Barkay and Wiley, 2009).

L'AH peut quant à lui être dégradé par les enzymes hyaluronidases. Cinq hyaluronidases fonctionnelles sont connues chez l'humain : HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYAL5 (également

appelé SPAM1 ou PH-20) (Csoka *et al.*, 2001). Cependant, HYAL4 ne présente pas d'activité hyaluronidase et hydrolyse les CS (Kaneiwa *et al.*, 2010). Un pseudogène a également été identifié, HYAL6/HYALP1, mais l'enzyme produite n'est pas fonctionnelle. HYAL1, 2, 3 et 5 ont des séquences et des structures homologues. Elles catabolisent l'AH de haut poids moléculaire (> 500 kDa, vs 10-500 kDa pour l'AH de faible poids moléculaire) par des réactions similaires, bien que chacune ait différentes localisations subcellulaires et différentes conditions d'activité optimales. De plus, les fragments issus de la dégradation peuvent varier en taille (Wang *et al.*, 2017). HYAL1 est localisée dans les lysosomes, alors que HYAL2 est liée à la membrane plasmique par ancrage GPI et dégrade l'AH extracellulaire suite à son interaction avec le récepteur CD44 (Bourguignon *et al.*, 2004). Il est pensé que l'AH natif de haut poids moléculaire présent dans la MEC serait tout d'abord partiellement dégradé à l'extérieur de la cellule, puis que les plus petits brins d'AH pénétreraient dans les cellules par endocytose et seraient dégradés dans les lysosomes. Cependant, le rôle des hyaluronidases dans le cerveau adulte et leurs modifications au cours du vieillissement restent peu connus (Peters and Sherman, 2020). L'activité des hyaluronidases semble être régulée par la quantité d'AH de haut poids moléculaire et la production de fragments bioactifs (Peters and Sherman, 2020). L'équilibre entre la synthèse et la dégradation d'AH pourrait aussi être régulé au travers des PG : une augmentation d'AH modifierait son ratio avec les PG pouvant se lier à lui, et ainsi l'AH moins substitué serait une meilleure cible pour les hyaluronidases (Rauch, 2004).

Deux autres protéines présentent une activité catalytique pour l'AH, mais sont structurellement distinctes des autres hyaluronidases : la *Cell Migration Inducing and Hyaluronan Binding Protein* (CEMIP), aussi connue sous le nom de HYBRID ou KIAA1199, et TMEM2. CEMIP catalyse la dépolymérisation de l'AH extracellulaire par l'hydrolyse des liaisons entre les résidus N-acetyl-D-glucosamine et D-glucuronate (Yoshida *et al.*, 2013). Cependant, son rôle dans le SNC n'a pas été entièrement élucidé. Concernant TMEM2, il a été montré que cette protéine est impliquée dans la dégradation de l'AH extracellulaire, mais son rôle en tant que hyaluronidase reste débattu car une autre étude a montré que l'extinction de son gène entraîne une augmentation de la dégradation de l'AH (Yamamoto *et al.*, 2017; Yoshino *et al.*, 2018).

Le remodelage de la MEC est impliqué dans la migration cellulaire et la croissance des neurites, et est donc un phénomène fondamental du développement et de la plasticité cérébrale.

2.2.5. *Fonction de la MEC cérébrale*

Il a longtemps été considéré que la MEC jouait un rôle uniquement structurel. Cependant, les études récentes montrent que la MEC est une structure dynamique dans laquelle les composants interagissent entre eux, avec les cellules, et avec les molécules de l'environnement cellulaire, ce qui fait d'elle un acteur indispensable au fonctionnement cérébral. Elle est ainsi impliquée dans l'homéostasie tissulaire et dans la transmission des signaux biochimiques. De plus, elle est impliquée dans la prolifération et la différenciation des progéniteurs neuronaux, et dans la migration et la maturation des cellules neuronales. Elle est donc un élément clef dans le développement et dans la plasticité cérébrale.

2.2.5.1. *La régulation de l'homéostasie*

La matrice, au travers de ses propriétés physico-chimiques, va interagir avec les molécules du milieu extracellulaire, et influencer leur diffusion et leur biodisponibilité (Kihara *et al.*, 2013; Stylianopoulos *et al.*, 2010). La MEC, et plus précisément la lame basale, va également participer à l'homéostasie cérébrale au travers de son rôle dans la BHE.

2.2.5.2. *La modulation des facteurs de croissance*

La MEC peut lier les facteurs de croissance *via* les chaînes HS et CS, et ainsi moduler leur interaction avec les cellules. Par exemple, l'activité du FGF dépend des composants de la matrice : les cellules qui expriment des récepteurs à haute affinité pour le FGF mais ne présentent pas de HS de surface ne répondent pas à ce facteur (Yayon *et al.*, 1991). En effet, les PGHS stabilisent le FGF, le protègent de la protéolyse et jouent un rôle de corécepteur (Saksela and Rifkin, 1990; Vlodavsky *et al.*, 1996). De plus, la structure et les caractéristiques spécifiques des PGHS comme

la sulfonation ont un impact sur leur interaction avec le FGF et affectent son activité biologique (Bandtlow and Zimmermann, 2000). Les PGHS interagissent aussi avec d'autres familles de facteurs de croissance, comme le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) et le *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) et modulent leurs activités biologiques (Neufeld *et al.*, 1999; Raines and Ross, 1992).

Les PGCS peuvent aussi lier des facteurs de croissance et modifier leur activité. Par exemple, la protéine centrale des PGCS phosphacanés est un ligand de haute affinité du *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) et potentialise son activité mitogénique (Milev *et al.*, 1998). Les MMP peuvent aussi moduler l'activité de certains facteurs. C'est le cas des *A-Disintegrin And Metalloproteinases* (ADAMs), un sous-groupe des MMP, qui sont ancrées dans la membrane et présentent à la fois des fonctions de dégradation de cytokines, de récepteurs et de facteurs de croissance, et des fonctions d'adhésion cellulaire *via* les intégrines (Bridges and Bowditch, 2005).

2.2.5.3. *La prolifération et migration cellulaires*

De nombreux composants de la MEC comme les PG, les glycoprotéines et le collagène interviennent dans les processus de prolifération, différenciation et migration cellulaires. Par exemple, la ténascine-C joue un rôle important dans la neurogenèse embryonnaire et adulte en étant associée à une augmentation de la prolifération des précurseurs neuronaux. De plus, la migration des précurseurs neuronaux le long des cellules gliales radiaires est en partie permise par son expression par ces cellules (Garcion *et al.*, 2001; Tucić *et al.*, 2021). L'AH est impliqué dans la régulation de la neurogenèse adulte, en contrôlant la prolifération des cellules souches neurales et les premières étapes de la différenciation neuronale au travers de son interaction avec le récepteur CD44. Son accumulation dans la ZSG au cours du vieillissement pourrait contribuer à la réduction de la neurogenèse et ainsi au déclin cognitif (Su *et al.*, 2017, 2019).

2.2.5.4. *La croissance des neurites*

Les PG influencent également la croissance des neurites, au travers à la fois de leur protéine centrale et des GAG (Bandtlow and Zimmermann, 2000; Bonneh-Barkay and Wiley, 2009). De nombreux GAG sulfatés peuvent notamment interagir avec la sémaphorine 5A (SEMA5), une protéine transmembranaire impliquée dans la régulation de la croissance axonale et du développement neuronal. Le résultat de cette interaction dépend du type de GAG sulfaté : une interaction avec les CS limite la croissance axonale, alors que les HS la favorisent (Kantor *et al.* 2004).

2.2.5.5. *Impact sur l'activité neuronale et les connexions synaptiques*

Les molécules de la MEC régulent de nombreux aspects de la différenciation pré- et postsynaptique, de la maturation des synapses et de leur plasticité. Elles peuvent induire indirectement le regroupement de récepteurs postsynaptiques et modifier leur structure et leur fonction. De plus, les laminines et la ténascine-R peuvent interagir directement avec les canaux Ca^{2+} dépendants du voltage ou les récepteurs cellulaires AMPA et GABA_B, définissant ainsi l'organisation et la fonction de différents types de synapses (Dityatev and Schachner, 2006). Certains de ces mécanismes peuvent contribuer à l'induction de la potentiation à long terme, qui désigne le remodelage des connexions synaptiques conduisant à une augmentation de l'amplitude de la réponse postsynaptique après des stimulations présynaptiques excitatrices répétées ; ce serait ainsi un des mécanismes de l'apprentissage et la mémoire. De nombreux composants de la MEC ont été démontrés nécessaires à ce phénomène, dont les HS, les CS et la ténascine-C (Bukalo *et al.*, 2001; Dityatev and Schachner, 2006; Saghatelian *et al.*, 2001).

La MEC cérébrale peut aussi former une barrière physique qui influence la plasticité et la régénération neuronale (Bandtlow and Zimmermann, 2000). Les RPN, en particulier, forment une barrière contre les axones et les dendrites voisins (Miyata and Kitagawa, 2017; Yamaguchi, 2000). La composition des RPN varie selon leur localisation dans le cerveau, entraînant parfois un blocage complet de certaines synapses, ou modulant au contraire les connexions et contribuant

ainsi à une haute plasticité neuronale (Carulli *et al.*, 2004, 2006). Les modifications des RPN et la plasticité synaptique sont principalement permises par la protéolyse et la synthèse de ses composants (Yamada and Nelson, 2007). Parmi eux, la délétion des aggrecanes entraîne la détérioration des RPN, favorisant ainsi la plasticité neuronale et améliorant la mémoire (Rowlands *et al.*, 2018). L'équilibre MMP/TIMP qui permet la modulation de la matrice est aussi primordial dans la plasticité synaptique. Par exemple, la suppression de l'expression de TIMP-1 et TIMP-2 chez la souris entraîne des déficiences dans l'apprentissage et dans la mémoire (Chaillan *et al.*, 2006). L'activité des tPA dans les tissus neuronaux est aussi corrélée avec la croissance des neurites, la régénération et la migration, ce qui suggère que le tPA pourrait être impliqué dans la plasticité neuronale (Melchor and Strickland, 2005).

2.2.5.6. *La mécanotransduction*

La MEC est impliquée dans les fonctions cérébrales au travers des propriétés biochimiques de ses composants, mais également au travers de ses propriétés mécaniques. En effet, les cellules sont constamment soumises aux forces physiques de leur microenvironnement. Elles intègrent les signaux mécaniques, comme la rigidité et l'élasticité de la matrice, et les transforment en signaux biochimiques qui vont induire une réponse cellulaire. Ce processus appelé mécanotransduction est aussi impliqué dans la régulation du développement et de l'homéostasie cérébrale (Barnes *et al.*, 2017; Humphrey *et al.*, 2014).

Le cerveau est donc un organe complexe, dans lequel les neurones sont en perpétuelle interaction avec leur microenvironnement, composées de cellules gliales, de la MEC, et des molécules solubles. Ces éléments permettent le bon fonctionnement du SNC, mais sont également impliqués dans la mise en place des processus pathologiques, comme dans les maladies neurodégénératives, par exemple dans la maladie de Parkinson.

2.3. Exemple de la maladie de Parkinson : une mort neuronale influencée par son microenvironnement

2.3.1. Symptômes de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative chronique, décrite pour la première fois en 1817 par le docteur James Parkinson. Cette maladie résulte principalement de la mort des neurones dopaminergiques dans la Substance Noire *pars compacta* (SNpc) (Figure 21).

Dans un cerveau sain, la dopamine régule l'excitabilité des neurones striataux, impliqués dans le contrôle des mouvements volontaires et automatiques du corps. La dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson entraîne une baisse du taux de dopamine, et par conséquent une diminution de l'inhibition de l'activité des neurones striataux. Cela a pour conséquence l'apparition de symptômes moteurs, comme les tremblements au repos, une bradykinésie, une rigidité musculaire et des troubles de l'équilibre.

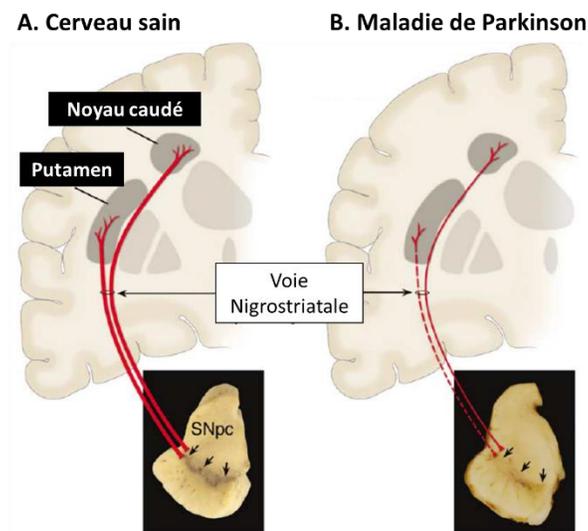


Figure 21 : Illustration de la mort des neurones dopaminergiques dans la substance noire pars compacta.

Les corps cellulaires des neurones dopaminergiques sont localisés dans la SNpc, et se projettent dans le noyau caudé et le putamen. Les neurones dopaminergiques produisent de la neuromélanine, ce qui donne la pigmentation visible sur le cerveau sain. SNpc : Substance Noire pars compacta. Adapté de Dauer and Przedborski, 2003.

Ces symptômes sont accompagnés de troubles non moteurs variables, comme la fatigue, la dépression, l’anxiété, des troubles du sommeil, des troubles de l’odorat, des troubles cognitifs, etc. Ces symptômes non moteurs sont liés à la perte d’autres types neuronaux, comme de neurones noradrénergiques, cholinergiques ou sérotoninergiques (Jellinger, 1999).

2.3.2. Importance et facteurs de risque

Il s’agit de la deuxième maladie neurodégénérative en France après la maladie d’Alzheimer, avec une prévalence de 2,5/1000 personnes, et une incidence de 0,39/1000 nouveaux cas par an. L’âge moyen du début des traitements est 75 ans, mais 17% des nouveaux malades sont âgés de moins de 65 ans. Les hommes sont atteints environ 1,5 fois plus souvent que les femmes (Figure 22) (Santé Publique France, 2018).

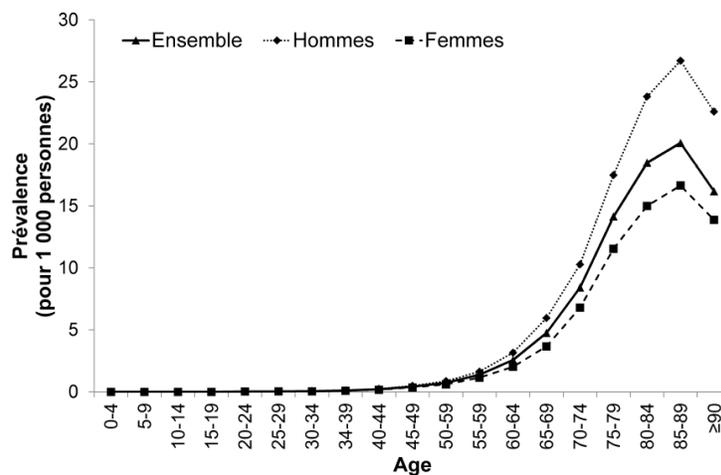


Figure 22 : Prévalence de la maladie de Parkinson en France en 2015 par âge et par sexe.
Données nationales et régionale 2010-2015 (Santé Publique France, 2018).

Le principal facteur de risque de la maladie de Parkinson est l’âge, mais il peut également y avoir des facteurs de risque d’origine pathologique, comme les microtraumatismes ou les atteintes cérébrovasculaires localisées, ainsi que des facteurs environnementaux. On observe notamment une incidence plus élevée chez les exploitants agricoles (Kab *et al.*, 2017) ; la maladie de Parkinson est en effet reconnue en tant que maladie professionnelle pour les agriculteurs

depuis 2013. Parmi les molécules neurotoxiques, nous pouvons citer la roténone, molécule naturellement produite par certaines plantes tropicales et entrant dans la composition de certains insecticides, interdite en France depuis 2011. Nous pouvons également citer le paraquat, un herbicide dont l'utilisation est interdite depuis 2007 dans les pays membres de l'Union Européenne. Dans les années 1980, plusieurs cas de syndromes parkinsoniens sont apparus parmi des toxicomanes ayant utilisé par voie intraveineuse du 1-Méthyl-4-Phényl-1,2,3,6-Tétrahydro Pyridine (MPTP). Le métabolite du MPTP, le 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP+) a une structure chimique proche de celle du paraquat.

Bien que la majorité des cas soient sporadiques, il existe aussi des facteurs de risque génétiques (moins de 10% des cas) (Klein and Westenberger, 2012). Les gènes les plus fréquemment impliqués dans la maladie de Parkinson sont *snca*, *parkin*, *dj-1*, *pink1*, et *lrkk2* (Maiti *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015). La déclaration de la forme sporadique de la maladie résulte probablement de l'association entre des facteurs de prédisposition génétique et des facteurs environnementaux.

2.3.3. Physiopathologie de la maladie de Parkinson

2.3.3.1. Les biomarqueurs de la maladie de Parkinson

Les mécanismes pathologiques de la maladie de Parkinson ne sont pas entièrement connus, bien que certaines caractéristiques typiques de la maladie aient tout de même été identifiées par imagerie ou analyse *post-mortem* de cerveaux de patients, ou encore par expérimentation sur des modèles animaux. Un des principaux marqueurs de la maladie de Parkinson est l'accumulation intracellulaire de corps de Lewy dans les neurones dopaminergiques de la SNpc. Ils contiennent principalement des agrégats d' α -synucléine, mais également d'autres protéines comme l'ubiquitine ou la PARKIN. Leur rôle dans la neurotoxicité ou dans la neuroprotection est incertain. En effet, les corps de Lewy ont longtemps été associés à la neurodégénérescence, mais la découverte de l' α -synucléine comme étant leur composant principal, ainsi que la présence de

protéines impliquées dans la dégradation comme l'ubiquitine ou la PARKIN ouvre l'hypothèse d'un rôle protecteur contre l'accumulation de toxiques dans la cellule.

2.3.3.2. *La mort neuronale par ferroptose*

Une forme de mort cellulaire dépendante du fer, la ferroptose, est impliquée dans la neurodégénérescence de la maladie de Parkinson (Do Van *et al.*, 2016). Cette voie de mort cellulaire est différente de l'apoptose, nécrose et autophagie (Dixon *et al.*, 2012). En effet, contrairement à l'apoptose, elle se déroule sans induction de la perméabilisation de la membrane externe des mitochondries. Le stress oxydant, qui apparaît précocement, joue en revanche un rôle essentiel. Une des caractéristiques de la maladie de Parkinson est l'accumulation de fer dans le système nerveux. Le fer est un agent réducteur puissant qui permet la production de radicaux hydroxyles et induit l'oxydation de la dopamine. Cela crée un environnement oxydant et augmente la perte de neurones dopaminergiques dans la SNpc.

2.3.3.3. *La neuroinflammation orchestrée par les cellules gliales*

Comme dans les autres maladies neurodégénératives, la neuroinflammation est présente dans la maladie de Parkinson. L'analyse *post-mortem* des cerveaux humains et les études expérimentales sur les animaux ont en effet montré une importante activation des cellules microgliales et des niveaux facteurs pro-inflammatoires élevés dont le TNF- α , l'IL-1 β et l'IFN- γ (Bartels *et al.*, 2010; Benner *et al.*, 2008; Gerhard *et al.*, 2006; McGeer *et al.*, 1988).

Au départ, l'activation des cellules microgliales pourrait avoir un rôle protecteur. Cependant, leur activation à long terme entraîne l'augmentation de facteurs pro-inflammatoires et de molécules toxiques comme les ROS, qui accélèrent la dégénérescence neuronale (Ferrari *et al.*, 2006; McCoy *et al.*, 2006). Les neurones dégénératifs libèrent des molécules comme l' α -synucléine qui activent la microglie et l'orientent vers le phénotype M1. Ceci amplifie donc la réponse inflammatoire et crée ainsi un cercle vicieux (Figure 23) (Saijo *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2005).

Les régions cérébrales des patients atteints de la maladie de Parkinson présentent aussi une astroglie (Yamada *et al.*, 1992). Il a été montré que l'activation astrocytaire était relativement plus lente que l'activation microgliale. La microglie pourrait initier la réponse inflammatoire, par exemple suite à l'agrégation d' α -synucléine. Les astrocytes seraient ensuite activés par les signaux pro-inflammatoires dont ceux issus des cellules microgliales, et les amplifieraient à leur tour (Saijo *et al.*, 2009). Il a également été montré *in vitro* et *in vivo* que les astrocytes pouvaient être aussi activés par l' α -synucléine. Les activations synergiques des astrocytes et de la microglie entraîneraient donc une neuroinflammation incontrôlée qui contribuerait à la mort des neurones dopaminergiques dans la SNpc (Figure 23).

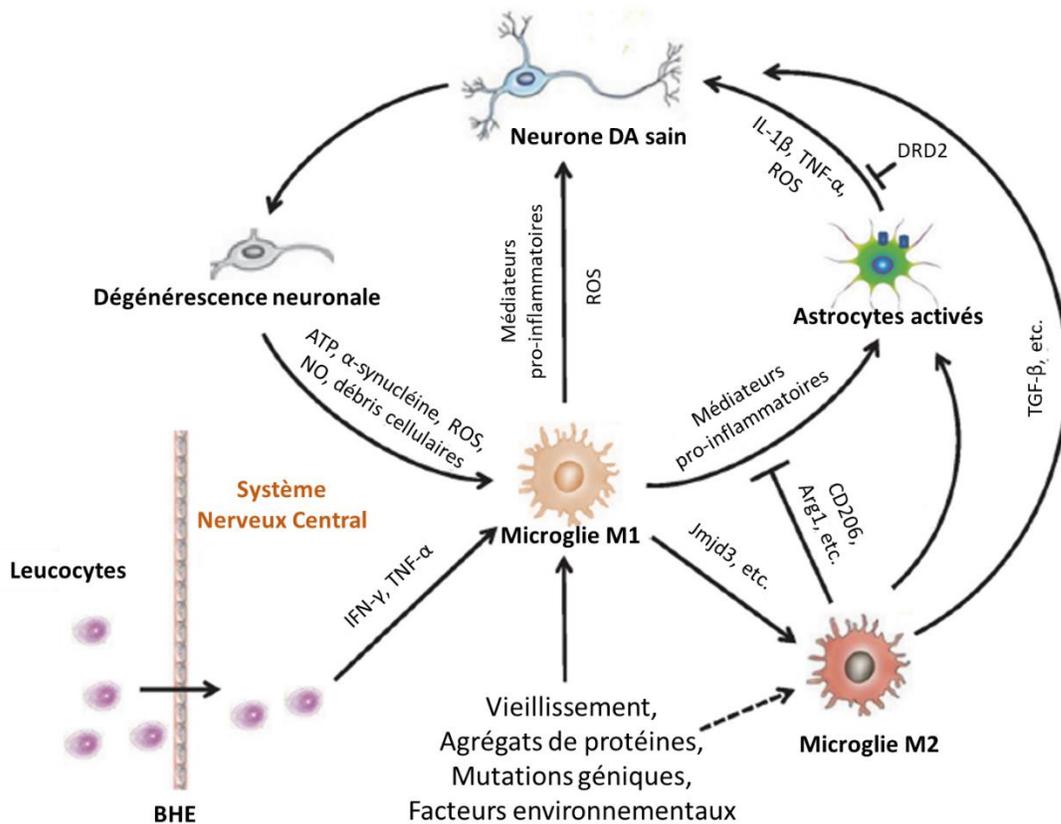


Figure 23 : Mécanismes inflammatoires dans la maladie de Parkinson.

ATP : Adénosine Triphosphate ; Arg1 : Arginase 1 ; BHE : Barrière Hémato-Encéphalique ; CD206 : Récepteur du Mannose ; DA : Dopamine ; DRD2 : Récepteur à la Dopamine D2 ; IFN- γ : Interféron- γ ; IL-1 β : Interleukine-1 β ; Jmjd3 : histone H3K27me3 demethylase ; NO : Oxyde Nitrique ; ROS : Reactive Oxygen Species ; TGF- β : Transforming Growth Factor- β ; TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α . Traduit de Wang *et al.*, 2015.

De plus, des altérations de la BHE ont été identifiées dans la maladie de Parkinson (Al-Bachari *et al.*, 2020; Lee and Pienaar, 2014). Cela peut résulter des infiltrations de cellules immunitaires périphériques comme les lymphocytes T, qui participent alors à une neuroinflammation exacerbée et à la pathogenèse de la maladie de Parkinson. La neuroinflammation dans la maladie de Parkinson pourrait aussi être initiée génétiquement, comme par exemple avec des mutations dans le gène LRRK2 qui régule l'activation microgliale (Wang *et al.*, 2015).

2.3.3.4. *Modification et implication de la MEC*

La MEC est impactée dans les maladies neurodégénératives en général (Bonneh-Barkay and Wiley, 2009). Certaines molécules de la MEC vont être anormalement surexprimées, alors que d'autres vont être au contraire dégradées, et certaines molécules vont aussi participer au processus neuroinflammatoire.

Tout d'abord, la composition générale de la matrice peut être modifiée. Une analyse glycomique et protéomique a montré que les cerveaux de patients atteints de la maladie de Parkinson étaient enrichis en composants de la MEC comme les collagènes, les lecticanes, la té nascine et les HAPLNs, en comparaison avec des patients sains du même âge (Raghunathan *et al.*, 2020). Il a été mis en évidence à l'inverse sur un modèle murin une dégradation de l'AH dans les cerveaux Parkinsoniens, ainsi qu'un élargissement de l'espace extracellulaire associé à une augmentation de la diffusion des molécules dans cet espace (Soria *et al.*, 2020). L'expression des récepteurs de molécules de la matrice peut aussi être modifiée : une augmentation de l'expression de CD44 a été observée dans la SNpc de patients et dans les astrocytes d'un modèle animal de la maladie de Parkinson (Neal *et al.*, 2018).

De plus, il a été montré que les PG peuvent être impliqués dans les agrégations anormales de protéines, qui sont souvent une des caractéristiques des maladies neurodégénératives. Cela a été particulièrement étudié dans la cadre de la maladie d'Alzheimer, notamment du fait de la présence de plaques amyloïdes extracellulaires. Dans la maladie de Parkinson, les agrégats d' α -synucléine sont intracellulaires, ce qui a davantage questionné l'implication de la MEC.

Cependant, des études ont montré la présence de PGHS et de PGCS dans les corps de Lewy dans les cerveaux de patients atteints de la maladie de Parkinson, suggérant que les PG peuvent être impliqués dans la formation d'inclusions pathogènes d' α -synucléine (DeWitt *et al.*, 1994; Perry *et al.*, 1992). Il a été montré *in vitro* que les PGHS présents à la surface cellulaire étaient impliqués dans l'internalisation et la propagation des agrégats d' α -synucléine (Holmes *et al.*, 2013). De plus, il a aussi été montré *in vitro* que les HS favorisent l'agrégation de l' α -synucléine, tout en s'incorporant à l'intérieur des fibrilles (Cohlberg *et al.*, 2002). De plus, les GAG sulfatés diminuent l'activité de la cathepsine D *in vitro*, une protéase impliquée dans la dégradation de l' α -synucléine (Lehri-Boufala *et al.*, 2015).

De plus, les composants de la MEC peuvent moduler la neuroinflammation. Par exemple, la ténascine-C peut activer les cellules gliales et ainsi participer à la neuroinflammation. Les PGCS ont aussi un rôle pro-inflammatoire dans les maladies cérébrales en général. Ils peuvent en effet interagir avec les récepteurs des cellules de l'inflammation, comme par exemple le récepteur CD44 des cellules microgliales, entraînant leur activation. Les PGCS hautement sulfatés ont aussi une forte affinité avec des chimiokines, des cytokines et autres molécules pro-inflammatoires. Ils peuvent aussi favoriser la production de MMP, les activer ou augmenter leur activité, ou encore interférer avec leurs inhibiteurs TIMPs (Stephenson and Yong, 2018). Les MMP vont entraîner à la fois une dégradation de la MEC, et également participer au processus neuroinflammatoire. En effet, la dégradation des PGCS par les MMP vont générer des fragments bioactifs qui amplifient l'inflammation (Stephenson and Yong, 2018). De plus, la dégradation de la matrice contribue à la migration des monocytes et des astrocytes (Bonneh-Barkay and Wiley, 2009).

Le rôle de MMP-3 a été particulièrement étudié dans la maladie de Parkinson (Kim and Hwang, 2011). Sa surexpression a été mise en évidence dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson, ainsi que dans des cerveaux de patients (Choi *et al.*, 2011; Sung *et al.*, 2005). De plus, il a été montré sur des modèles animaux et cellulaires de la maladie de Parkinson que la dégénérescence neuronale était moindre lorsque le gène codant pour MMP-3 était inactivé (Kim *et al.*, 2007). MMP-3 est impliquée dans le processus neuroinflammatoire à différents niveaux. MMP-3 peut être activé au niveau intracellulaire par l' α -synucléine, ce qui va déclencher la mort neuronale et la libération extracellulaire de MMP-3 activée. Elle va alors entraîner l'activation des

cellules microgliales, qui en réponse vont produire des cytokines et des molécules oxydantes. Ces molécules vont à leur tour favoriser l'expression de MMP-3, créant donc un cercle vicieux pro-inflammatoire. De plus, la surexpression de MMP-3 va entraîner une dégradation de la lame basale, ce qui va altérer la BHE et favoriser l'infiltration de cellules immunitaires sanguines qui vont participer à la neuroinflammation. MMP-3 peut aussi amplifier l'inflammation en activant par clivage les IL-1 β . MMP-3 (ainsi que MMP-1, 2, 8 et 9) peut altérer par clivage les fonctions de DJ1, qui est une protéine présentant des à la fois propriétés antioxydantes et également anti-agrégantes envers l' α -synucléine. De plus, il a été montré *in vitro* que MMP-3 (ainsi que MMP-1 et 9) peut cliver l' α -synucléine, générant une forme tronquée capable de s'agréger en fibrilles neurotoxiques. A l'inverse, MMP-2 aurait plutôt un rôle neuroprotecteur en dégradant l' α -synucléine (Oh *et al.*, 2017). Les analyses de cerveaux humains *post mortem* ont mis en évidence un niveau diminué de ces MMP-2 dans la SNpc de patients atteints de la maladie de Parkinson (Lorenzl *et al.*, 2002).

La dégradation de l'AH observée dans le modèle murin par Soria *et al.* 2020 serait quant à elle réalisée par phagocytose microgliale. Cette dégradation génère des fragments qui activent davantage la microglie. Curieusement, ils ont également mis en évidence que la dégradation de l'AH aurait plutôt un rôle neuroprotecteur dans leur modèle, en entraînant un effet pro-inflammatoire bénéfique qui limite la propagation des agrégats d' α -synucléine et la mort neuronale. Ces résultats soulignent la complexité des mécanismes impliqués dans les maladies neurodégénératives, qui ont des effets à la fois protecteurs et délétères.

2.3.4. Diagnostic et traitements

Le diagnostic est uniquement clinique ; seule une étude histologique *post-mortem* permet de confirmer la maladie. Les traitements actuels traitent les symptômes mais ne stoppent pas la dégénérescence neuronale. Le traitement le plus efficace est la L-DOPA (Levodopa), utilisée depuis les années 1960. Il existe d'autres précurseurs de la dopamine (L-3,4 dihydroxyphenilalanina) et des agonistes de la dopamine (amantadine, apomorphine, bromocriptine, cabergoline, lisuride, pergolide, pramidexole, ropinirole, rotigonine), des inhibiteurs de la monoamine oxydase

(selegiline, rasagiline), et des inhibiteurs de la catechol-O-methyltransferase (entacapone, tolcapone). Tous ces traitements présentent des effets secondaires importants, notamment des troubles du comportement. De plus, l'administration chronique peut entraîner une diminution de l'efficacité du traitement et donc la réapparition intermittente des symptômes (Pahwa and Lyons, 2009).

Cependant, la dégénérescence des neurones commence plusieurs années avant l'apparition des symptômes moteurs. Ceux-ci se déclenchent lorsque 50 à 80% des neurones dopaminergiques sont détruits et que le cerveau n'est plus en mesure de compenser cette perte (DeMaagd and Philip, 2015). Il est donc nécessaire de mettre en place des méthodes de diagnostic précoce et de développer des traitements neuroprotecteurs afin de stopper au plus tôt la neurodégénérescence.

Il existe différentes pistes thérapeutiques plus ou moins exploitées afin de cibler les mécanismes physiopathologiques de la maladie et de stopper la mort neuronale, dont certaines ciblant le microenvironnement cérébral (Elkouzi *et al.*, 2019).

Tout d'abord, les chélateurs de fer pourraient permettre de limiter l'accumulation de fer dans la SNcp, et limiter ainsi la mort neuronale par ferroptose et ralentir la progression de la maladie. Des études précliniques ont montré que les chélateurs de fer pouvaient passer la BHE et enlever l'excès de fer (Dexter *et al.*, 2011). Ces résultats ont incité le lancement d'un essai clinique pilote en double aveugle, randomisé et contrôlé par un placebo, sur le chélateur du fer Dfériprone (Martin-Bastida *et al.*, 2017). Cette étude a montré à court terme l'innocuité de la Dfériprone et la diminution du fer dans des régions cérébrales spécifiques. A présent, une étude clinique sur la Dfériprone (FAIRPARKII) est en phase II (Moreau *et al.*, 2019).

Ensuite, en raison de l'important rôle de la neuroinflammation dans l'accélération de la dégénérescence neuronale, de nombreuses molécules anti-inflammatoires ont été étudiées. Parmi elles, les anti-inflammatoires non stéroïdiens ont montré une diminution du risque de développer la maladie de Parkinson sur une étude de 293 personnes, mais la méta-analyse n'a pas confirmé ce lien (Wahner *et al.*, 2007; Samii *et al.*, 2009; Gagne and Power, 2010). AZD3241, un inhibiteur de myéloperoxidase (une enzyme exprimée par la microglie connue pour jouer un

rôle dans l'inflammation et la dégénérescence) a montré un effet neuroprotecteur sur des études précliniques, et une bonne tolérance en phases cliniques I et II, avec une modulation de l'environnement cellulaire oxydant (Jucaite *et al.*, 2015). Un autre exemple est la Sargramostim, un médicament anticancéreux approuvé par la FDA, qui a été testé comme anti-inflammatoire contre la maladie de Parkinson. Les essais cliniques ont montré une bonne tolérance, et une amélioration de l'activité des cellules T régulatrices (une sous-population de cellules T qui suppriment la réponse immunitaire), avec un score *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS, permettant de mesurer la progression de la maladie) qui n'était pas aggravé au cours du temps (Gendelman *et al.*, 2017).

Les modulateurs des MMP sont aussi une piste très étudiée dans de nombreuses maladies, et pourraient être d'intérêt dans la maladie de Parkinson, notamment les inhibiteurs de MMP-3. En effet, l'inhibition de MMP-3 *in vitro* sur cellules primaires de rats par du *N-isobutyl-N-[4-methoxyphenylsulfonyl]-glycylhydroxamic acid* (NNGH) a montré une amélioration de la survie neuronale au travers d'une diminution de la libération de TNF- α par les cellules microgliales (Choi *et al.*, 2008). Des inhibiteurs de MMP ont déjà été testés en clinique dans le cadre de maladies autres que la maladie de Parkinson. Cependant, les inhibiteurs de MMP de type petites molécules ont échoué en phase clinique en raison de leur manque de sélectivité dans le ciblage du domaine catalytique des protéases, entraînant des effets secondaires qui nécessitaient l'utilisation de doses trop faibles pour être efficaces (Vandenbroucke and Libert, 2014). En effet, la plupart était des chélateurs de zinc et donc non spécifiques à un type de MMP. Les TIMPs ou les anticorps thérapeutiques pourraient permettre une meilleure spécificité (Raeeszadeh-Sarmazdeh *et al.*, 2020).

3. Les modèles cérébraux *in vitro* : caractéristiques et limites actuelles

De nombreux modèles *in vitro* ont été développés pour étudier le SNC. Au départ, les modèles ont été le plus possible simplifiés, en étudiant uniquement un seul type cellulaire isolé, dans l'objectif d'étudier des mécanismes cellulaires précis. Depuis quelques années, des modèles plus complexes se sont développés, afin de mieux prendre en compte la complexité du tissu cérébral.

3.1. Les cellules cérébrales cultivées *in vitro*

Différents types de cellules peuvent être cultivées *in vitro*. On peut distinguer trois catégories en fonction de leur origine et de leurs caractéristiques : les cellules primaires adultes, les cellules souches, et les lignées cellulaires. Toutes peuvent être d'origine animale ou humaine.

Les cellules animales présentent un avantage vis-à-vis de leur accès, en comparaison des cellules humaines. Elles peuvent être utilisées pour étudier plus précisément un mécanisme moléculaire observé dans le modèle animal lors d'études fondamentales, et faire des corrélations entre les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* sur la même espèce. Cependant, les différences inter-espèces limitent l'extrapolation des résultats vers l'Homme (Hodge *et al.*, 2019; Leist and Hartung, 2013). Les cellules humaines sont donc un outil précieux dans les tests précliniques, puisqu'elles permettent de tenir compte des spécificités inter-espèces en amont des tests cliniques.

3.1.1. Cellules primaires humaines

Les cellules primaires sont des cellules directement prélevées sur un organisme. Pour les cellules cérébrales humaines, l'accès constitue donc une limite majeure, puisqu'elles nécessitent un prélèvement cérébral. Elles peuvent être prélevées sur des cerveaux adultes par dissection *post-mortem*, ou lors d'une chirurgie cérébrale, mais qui par conséquent est réalisée à l'occasion de situations pathologiques, ce qui peut avoir des conséquences sur le phénotype des cellules. La mise en culture de neurones primaires issus de cerveaux adultes est particulièrement délicate. Les cellules cérébrales primaires peuvent aussi être prélevées sur des fœtus issus d'interruptions volontaires de grossesses (Jana *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 2014). Il existe différentes méthodes pour

trier les cellules et ne conserver que les cellules d'intérêt, comme l'utilisation de milieux de culture spécifiques ou des appareils de cytométrie en flux. Cependant, les cultures de cellules primaires contiennent souvent une part plus ou moins importante d'autres types cellulaires que les cellules souhaitées.

Par exemple, l'isolement d'astrocytes primaires humains a été décrit par De Groot *et al.*, en 1995. Brièvement, les tissus cérébraux humains sont disséqués en petits fragments et digérés avec de la trypsine. La suspension cellulaire est ensuite rincée et incubée à 37°C dans un milieu spécifique pour permettre l'adhésion des macrophages et de la microglie. Au bout de 2h, les cellules non-adhérentes (les astrocytes) sont récupérées et cultivées dans un milieu de culture spécifique en flasques de culture recouverte de Poly-L-Lysine (PLL) qui permet leur adhésion. Les astrocytes primaires humains peuvent alors être cryoconservés et commercialisés (Figure 24).

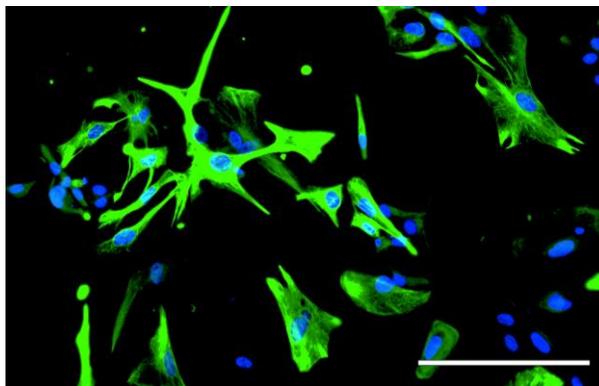


Figure 24 : Photographie par microscopie à fluorescence d'astrocytes primaires humains en culture.

En bleu les noyaux marqués au Hoechst et en vert la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein). Barre d'échelle = 200 μ m (HCS Pharma).

Malgré la difficulté d'accès, les cellules primaires présentent l'avantage de ne pas être transformées. Bien que souvent prélevées sur des fœtus, elles se sont différenciées en amont de la mise en culture, et présentent en général de bonnes caractéristiques de cellules matures, avec par exemple l'expression de MAP2 pour les cellules neuronales. Cependant, leur maturité limite leur capacité de prolifération. De plus, elles peuvent perdre leur phénotype mature au cours de leurs divisions cellulaires, qui doivent donc rester limitées.

Chaque lot de cellules primaires provient d'un individu différent, ce qui peut être source de variabilité dans les résultats. De plus, les cellules primaires sont en général fragiles, et leur coût est élevé en raison de la difficulté d'accès, de leur faible capacité de prolifération et de la technicité liée à leur obtention. Par conséquent, leur utilisation à l'échelle industrielle, par exemple pour les criblages à haut débit, est limitée. Elles sont d'avantage utilisées à petite échelle, pour les tests pharmacologiques *in vitro* comme pour étudier un mécanisme d'action par exemple.

3.1.2. Cellules souches humaines

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées capables de s'auto-renouveler et de se différencier en un ou plusieurs types cellulaires. Elles offrent donc des avantages en matière d'amplification et de possibilité de différenciation en un large panel de cellules différentes. Elles peuvent être classées en trois groupes en fonction de leur origine : les cellules souches embryonnaires, les cellules souches somatiques ou adultes, et les cellules Souches Pluripotentes induites (iPSc pour *induced Pluripotent Stem cells*).

Les cellules souches embryonnaires humaines ont été cultivées *in vitro* pour la première fois en 1998, soit 17 ans après la première culture de cellules embryonnaires de souris (Evans and Kaufman, 1981; Thomson *et al.*, 1998). Elles sont issues des embryons surnuméraires de la fécondation *in vitro* après abandon de tout projet parental, consentement par les individus et approbation du CPP. Elles sont pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier en un large panel de types cellulaires. Ces cellules soulèvent toutefois des questionnements éthiques puisqu'elles sont prélevées sur des embryons humains. Elles peuvent aussi être collectées dans le cordon ombilical.

Il existe aussi des cellules souches non-embryonnaires, aussi appelées cellules souches adultes ou somatiques. On les trouve dans les tissus adultes. Elles sont multipotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier en un nombre restreint de types cellulaires, souvent spécifiques à leur localisation. Parmi elles, on trouve les cellules souches neuronales présentes dans les niches

neurogéniques, qui peuvent être différenciées en cellules neuronales et gliales, mais leur accès est compliqué.

Les iPSc sont issues de la « reprogrammation » de cellules adultes par la surexpression de gènes de pluripotence. Cette technique a été publiée pour la première fois en 2006 par Takahishi et Yamanaka, avec la reprogrammation de fibroblastes de souris, puis de fibroblastes humains l'année suivante, en cellules souches pluripotentes grâce à la transduction rétrovirale de 4 facteurs de transcription Oct3/4, Sox2, c-Myc et Klf4 (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007). Ces travaux ont été récompensés par le Prix Nobel de médecine en 2012. Depuis, de nombreuses études ont proposé des méthodes alternatives pour améliorer l'efficacité et la qualité de la reprogrammation. Cette technique offre de nombreux avantages, notamment la facilité de l'accès aux cellules puisqu'elles peuvent être issues de n'importe quel tissu ou fluide accessibles avant d'être reprogrammées puis différenciées vers le type cellulaire voulu. De plus, les iPSc peuvent être dérivées de patients, ce qui permet de développer des modèles cellulaires ayant un patrimoine génétique d'intérêt pour une maladie étudiée. Leur coût reste cependant élevé, et leur utilisation à des fins commerciales nécessite une licence d'exploitation du brevet.

Quelle que soit leur origine, les cellules souches doivent ensuite être différenciées pour devenir des cellules cérébrales matures. Cependant, cette étape de différenciation est complexe et technique, car elle nécessite la bonne combinaison de facteurs (nature, concentration et temps d'incubation). Brièvement, les cellules souches pluripotentes embryonnaires ou induites doivent tout d'abord être différenciées en cellules souches neurales ; la méthode la plus couramment utilisée est la méthode de l'inhibition double de la voie Smad (Chambers *et al.*, 2009). Ensuite, elles vont devoir être différenciées en progéniteurs neuraux spécifiques de la région visée, par combinaison de morphogènes comme l'acide rétinoïque, les BMP, les protéines Wnt, et le facteur Shh (Chang *et al.*, 2020; Kriks *et al.*, 2011; Tao and Zhang, 2016). Par exemple, des neurones dopaminergiques ont pu être obtenus à partir de cellules souches embryonnaires humaines et d'iPSc, par différenciation intermédiaire en précurseurs du plancher du mésencéphale, par activation des voies Shh et Wnt (Kriks *et al.*, 2011; Tofoli *et al.*, 2019).

Le potentiel de différenciation des cellules souches permet aussi de former des « organoïdes ». Le terme organoïde désigne un groupe de cellules évoluant dans un environnement tridimensionnel *in vitro* défini, pour former des amas cellulaires qui s'auto-organisent et se différencient en cellules fonctionnelles, reproduisant la structure et les fonctions d'un organe *in vivo* (Corrò *et al.*, 2020). Ainsi, en 2013, des chercheurs ont développé un organoïde cérébral qui contient les différentes régions du cerveau à partir de cellules souches embryonnaires humaines (Lancaster *et al.*, 2013).

Tout comme les cellules primaires, les cellules souches, qu'elles soient embryonnaires, adultes ou induites, proviennent de donneurs différents ce qui est source de variabilité.

3.1.3. Les lignées cellulaires immortalisées

Les lignées cellulaires immortalisées sont des cellules dont la population est relativement homogène et qui présentent un fort taux de prolifération lié à une modification du contrôle du cycle cellulaire. Leur utilisation pour la recherche médicale se fait depuis 1951, année où la première lignée cellulaire, les HeLa, a été prélevée, sans son consentement, sur les métastases d'un cancer du col de l'utérus d'une patiente afro-américaine nommée Henrietta Lacks. Il en existe aujourd'hui un très grand nombre, avec par exemple plus de 1600 lignées cellulaires commercialisées par l'*American Type Culture Collection* (ATCC), dont 33 sont des lignées de cellules cérébrales humaines.

L'immortalisation de ces cellules peut survenir naturellement dans le cas des cellules cancéreuses. Les cellules peuvent également être transformées par différentes approches de génie génétique, notamment par l'altération du contrôle du cycle cellulaire, par exemple en inactivant des gènes suppresseurs de tumeur comme *p53* ou le gène de la protéine du Rétinoblastome (*pRB*). Ces dernières inhibent les *Cyclin Dependent Kinase* (CDK) qui stimulent le cycle cellulaire en activant la synthèse de protéines de phase S. La surexpression d'oncogènes peut aussi permettre l'immortalisation, comme les gènes codant pour des facteurs de croissance ou leurs récepteurs, des transducteurs ou des facteurs transcriptionnels nucléaires. Enfin, l'immortalisation peut être obtenue en surexprimant le gène de la télomérase ou de la

téломérase reverse transcriptase (sous-unité catalytique de la téломérase). Cela permet l'élongation des téломères en ajoutant des répétitions (TTAGGG), qui augmentent la stabilité chromosomique et limitent la sénescence cellulaire.

Les lignées cellulaires sont relativement peu coûteuses, et peuvent être amplifiées à grande échelle. Elles sont donc particulièrement adaptées au criblage à haut débit. Cependant, elles possèdent souvent des anomalies génétiques et métaboliques (Gordon *et al.*, 2014). Elles peuvent notamment présenter des caractéristiques cancéreuses et peu matures, qui peuvent modifier leur sensibilité et leur réponse. Une étape de différenciation peut parfois permettre d'améliorer leur maturité et la pertinence du modèle.

3.1.3.1. Exemple des SH-SY5Y, une lignée très utilisée en recherche et en industrie

La lignée cellulaire SH-SY5Y est un sous-clone de la lignée parentale SK-N-SH issue de cellules de neuroblastome métastasées, isolées à partir d'une biopsie de moelle osseuse chez un enfant de 4 ans (Figure 25). Elle a été déposée à l'ATCC® en 1970 par June L. Biedler. La lignée parentale SK-N-SH présente deux phénotypes cellulaires distincts : le phénotype neuroblastique (type « N ») et le phénotype épithélial (type « S »). Bien qu'étant issue d'un clone neuroblastique, la lignée SH-SY5Y conserve une petite proportion de cellules de type « S » (Encinas *et al.*, 2000). De plus, les cellules en culture forment deux populations : des cellules adhérentes et des cellules en suspension.

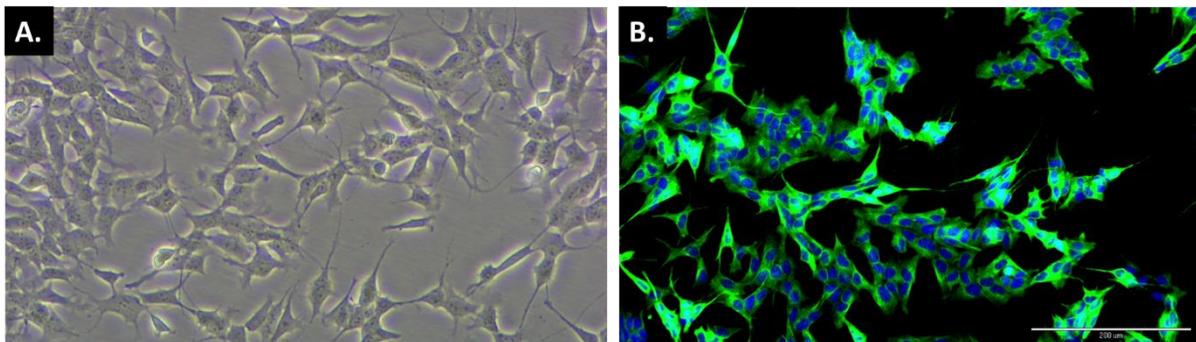


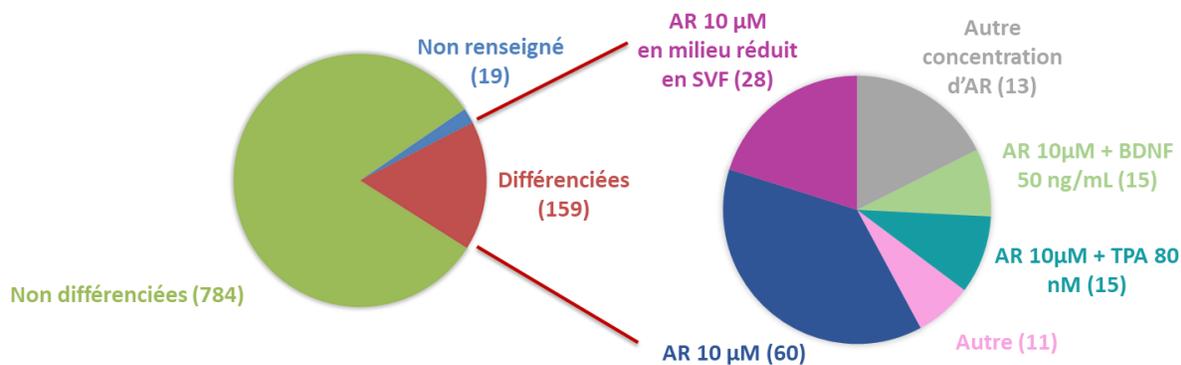
Figure 25 : Photographie de la lignée SH-SY5Y non différenciée.

A. Microscopie à contraste de phase, objectif x10. **B.** Microscopie à fluorescence. En plus les noyaux et en vert TUBB3, barre d'échelle = 200 µm (HCS Pharma).

Les cellules SH-SY5Y présentent plusieurs avantages. Tout d'abord, étant dérivées de cellules humaines, elles expriment des protéines humaines. Leur population est relativement homogène, ce qui permet une bonne reproductibilité des résultats. De plus, avant différenciation, elles présentent une bonne capacité de prolifération, dans des conditions de culture relativement simples et peu coûteuses en comparaison à des neurones primaires, ce qui les rend utilisables à grande échelle (Kovalevich and Langford, 2013; Tieu et al., 1999). Ces caractéristiques en font un outil de choix pour la recherche *in vitro* en neurobiologie. Ainsi, ces cellules sont couramment utilisées dans l'industrie et dans la recherche publique, notamment pour les tests d'évaluation de neurotoxicité et pour étudier la maladie de Parkinson. Au cours des 20 dernières années, plus de 2500 publications sur PubMed incluaient les termes « SH-SY5Y » et « toxicity », et plus de 1800 incluaient « SH-SY5Y » et « Parkinson ».

Etant issues d'un neuroblastome, les SH-SY5Y expriment des marqueurs neuronaux, mais une étape de différenciation doit être réalisée afin d'améliorer leur maturité neuronale. Avant différenciation, les SH-SY5Y expriment des marqueurs de neurones immatures, comme la nestine. Les cellules SH-SY5Y différenciées expriment des marqueurs de neurones matures dont la β -3-tubuline (TUBB3), MAP2, la synaptophysine, et NeuN. Elles expriment aussi des marqueurs de neurones dopaminergiques dont la TH, le transporteur de la dopamine (*Dopamine Transporter*, DAT), et les récepteurs de la Dopamine D2 et D3 (*Dopamine Receptor D2*, DRD2 et *Dopamine Receptor D3*, DRD3) qu'elles soient différenciées ou non, d'où leur intérêt pour étudier la maladie de Parkinson (Kovalevich and Langford, 2013).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour les différencier (Kovalevich and Langford, 2013). La méthode la plus courante est l'acide rétinoïque (Påhlman *et al.*, 1984) (Cheung *et al.*, 2009). Elles peuvent également être différenciées par des esters de phorbol tel que le 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13 acetate (TPA) (Påhlman *et al.*, 1981), par l'Adénosine Monophosphate cyclique (AMPC) (Kume et al., 2008), ou encore par la staurosporine (Jalava *et al.*, 1992). Il a également été montré que cultiver les SH-SY5Y en milieu neurobasal supplémenté en B27 améliorerait la différenciation (Sayas et al., 1999). La méthode de différenciation varie donc selon les études, y compris au sein d'étude sur une même thématique, comme la recherche sur la maladie de Parkinson (Figure 26).



Adapté de Xicoy *et al.* 2017

Figure 26 : Condition d'utilisation des cellules SH-SY5Y dans la recherche sur la maladie de Parkinson.

AR : Acide Rétinoïque ; BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor ; SVF : Sérum de Veau Fœtal. TPA : 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13 acetate. Adapté de Xicoy *et al.*, 2017.

Pourtant, la méthode de différenciation peut influencer le phénotype du modèle final, notamment l'expression de marqueurs neuronaux ou la réponse des cellules à de nombreux *stimuli* (Xie *et al.*, 2010). Il a par exemple été montré que les cellules différenciées à la staurosporine étaient plus sensibles à certains toxiques, comme la cisplatine ou la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (Tieu *et al.*, 1999).

3.1.3.2. Exemple des Luhmes, un modèle de choix pour étudier la maladie de Parkinson

La lignée cellulaire Luhmes est issue d'un mésencéphale humain féminin de 8 semaines (Figure 27). Il s'agit de précurseurs neuronaux immortalisés par l'insertion de l'oncogène v-myc, placés sous le contrôle d'un promoteur de tétracycline (système Tet-off) (Lotharius *et al.*, 2002). L'exposition des cellules à la tétracycline, complétée par de l'AMPc et du *Glial Cell Derived Neurotrophic Factor* (GDNF), entraîne l'arrêt de la prolifération et la différenciation irréversible des cellules. Elles forment alors une population homogène de neurones matures (expression de TUBB3 et NeuN) et présentent des caractéristiques dopaminergiques, dont l'expression du Transporteur de Monoamine Vésiculaire (*Vesicular Monoamine Transporter*, VMAT), DAT, les récepteurs à la dopamine D1 (*Dopamine Receptor D1*, DRD1) et DRD2, et la TH. L'expression de

ces marqueurs augmente au cours de la différenciation, et atteint son maximum en moins de 6 jours. Ces cellules deviennent aussi électriquement actives, grâce à des canaux au sodium et au potassium fonctionnels (Scholz *et al.*, 2011).

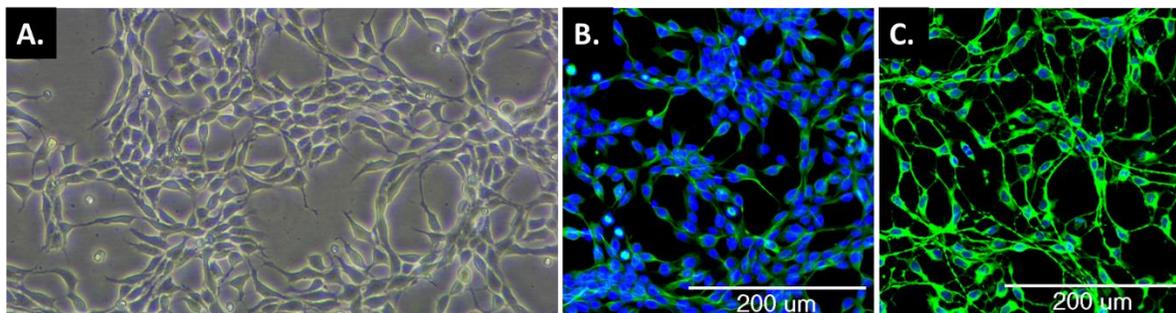


Figure 27 : Photographie de la lignée cellulaire Luhmes.

A. Luhmes non différenciées, microscope à contraste de phase, objectif x10. **B.** Luhmes non différenciées, microscopie à fluorescence, en bleu les noyaux et en vert TUBB3, barre d'échelle = 200 µm. **C.** Luhmes différenciées, en bleu les noyaux et en vert TUBB3, barre d'échelle = 200 µm (HCS Pharma).

Les caractéristiques dopaminergiques des cellules Luhmes en font un modèle d'intérêt pour étudier la maladie de Parkinson, puisque celle-ci est principalement caractérisée par la dégénérescence des neurones dopaminergiques. De plus, d'autres avantages en font un modèle de choix dans ce contexte (Slanzi *et al.*, 2020). Tout d'abord, leur immortalité a été induite ; par conséquent, une fois différenciées, les Luhmes ne présentent pas de caractéristiques cancéreuses liées à leur origine qui pourraient influencer leur réponse, contrairement aux SH-SY5Y par exemple. De plus, il a déjà été montré qu'elles pouvaient être co-cultivées avec des astrocytes, et aussi cultivées dans des systèmes de culture 3D, ce qui permet de réaliser des modèles complexes (Efremova *et al.*, 2017; Smirnova *et al.*, 2016). Enfin, elles sont particulièrement sensibles aux composés neurotoxiques (Tong *et al.*, 2017).

Pour modéliser les mécanismes pathologiques *in vitro*, les cellules vont être exposées à des inducteurs pharmacologiques de la Maladie de Parkinson (iMP), comme le MPP+, la 6-OHDA, la roténone et le paraquat, qui induisent la mort neuronale par des dysfonctionnements mitochondriaux et le stress oxydant. Plus précisément, le MPP+ est métabolisé au niveau cérébral à partir du MPTP. Il pénètre ensuite dans les cellules *via* le DAT car sa structure est similaire avec celle de la dopamine. Il va alors inhiber le complexe I dans la chaîne de respiration mitochondriale,

ce qui va résulter en une diminution rapide en adénosine triphosphate (ATP) suivie de la mort neuronale. Le paraquat a une structure similaire au MMP+. Cependant, son mécanisme d'action n'est pas le même : il altère le cycle redox du GSH et de la thioedoxine dans la mitochondrie, empêchant alors la protection contre le stress oxydant. La 6-OHDA a elle aussi une structure similaire à la dopamine et à la norépinephrine, ce qui lui permet de se lier aux transporteurs membranaires des catécholamines. Une fois dans la cellule, elle s'oxyde rapidement et produit des ROS qui conduisent au dysfonctionnement mitochondrial et à la mort neuronale. Il est à noter que la 6-OHDA ne passe pas naturellement la BHE. Enfin, la roténone est un iMP reconnu chez l'Homme. Elle induit donc la mort des neurones dopaminergiques, mais de manière non spécifique : d'autres neurones comme les neurones sérotoninergiques, noradrénergiques et cholinergiques sont affectés (Chia *et al.*, 2020; Slanzi *et al.*, 2020).

L'érastine peut aussi être utilisée pour étudier la mort neuronale dans la maladie de Parkinson car elle induit la ferroptose dans les cellules Lühmes. Pour cela, elle inhibe indirectement l'absorption de la cystine par l'antiporteur cystine/glutamate (système X_c⁻), qui est nécessaire à la synthèse du GSH. Ce dernier est quant à lui nécessaire à l'activité de l'enzyme Glutathion peroxydase GPx4, qui est un élément clef dans la protection des membranes contre la peroxydation lipidique. L'érastine provoque ainsi un stress oxydant cytosolique et surtout lipidique. Le stress oxydant mitochondrial ne semble en revanche pas touché. L'effet de l'érastine peut être inhibé par un chélateur de Fer, la Ferrostatine-1 (Fer-1). L'enzyme GPx4 peut également directement ciblée pour induire la ferroptose, comme par exemple avec la molécule RSL3 qui bloque son activité (Figure 28) (Dixon *et al.*, 2012; Lachiaier *et al.*, 2014; Do Van *et al.*, 2016).

Enfin, le glutamate peut aussi être utilisé comme iMP. En tant que neurotransmetteur excitateur, son exposition chronique entraîne une excitotoxicité engendrant la mort neuronale (Lewerenz and Maher, 2015). Il peut aussi induire la ferroptose en bloquant directement le Système X_c⁻ (Figure 28) (Lachiaier *et al.*, 2014).

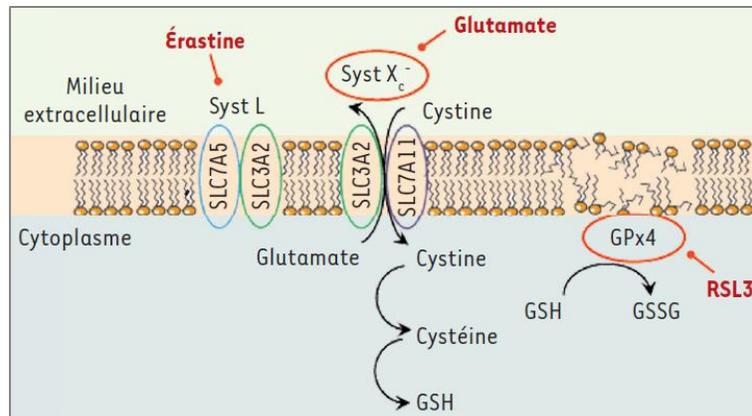


Figure 28 : Mécanisme d'action de l'érastine, de RSL3 et du glutamate.

L'érastine se fixe sur la sous-unité SLC7A5, ce qui va indirectement bloquer le système X_c^- . Syst : Système.
Adapté de Lachaier et al., 2014.

Il existe également des modèles cellulaires génétiquement modifiés pour reproduire certaines caractéristiques de la maladie de Parkinson, mais les formes purement génétiques de la maladie sont rares, d'où l'intérêt d'un modèle pathologique chimiquement induit.

3.2. Les conditions et supports de culture

3.2.1. Les milieux de culture

Les cellules eucaryotes sont classiquement cultivées en conditions stériles, à 37°C en présence de 5% de CO₂ et de 90 à 95% d'humidité, dans un milieu de culture adéquat. Ce milieu de culture contient les éléments nécessaires à la survie des cellules, à leur prolifération ou leur différenciation. Chaque type cellulaire a des besoins particuliers, et il existe donc un large panel de milieux qui diffèrent dans leur composition et dans les proportions des différents éléments. De manière générale, les milieux basiques contiennent des sucres, des sels inorganiques, et des acides aminés. Ils peuvent aussi contenir du rouge de phénol qui donne une indication sur le pH du milieu (qui doit être compris entre 7.2 et 7.4), et d'autres éléments comme par exemple de l'HEPES pour tamponner le milieu. Les milieux de culture peuvent contenir des antimycotiques ou des antibiotiques comme de la pénicilline et streptomycine par exemple, qui limitent le risque

de contamination. Cependant, toutes les cellules ne supportent pas la présence d'antibiotiques, comme généralement les cellules issues d'iPSc ou certaines cellulaires primaires.

Le Sérum de Veau Fœtal (SVF) est couramment utilisé pour enrichir les milieux de culture. Il permet d'apporter divers éléments comme des nutriments, sels minéraux, oligo-éléments, facteurs d'attachement, hormones et facteurs de croissance. Cependant, il s'agit d'un produit d'origine biologique : sa composition n'est pas entièrement déterminée et varie d'un lot à l'autre, ce qui peut entraîner une variabilité dans les réponses cellulaires. De plus, il est d'origine animale et n'est donc pas adapté aux cultures dites « *animal-free* ». Il existe aujourd'hui des milieux spécifiques permettant de s'affranchir du SVF, avec des suppléments comme le B27 ou le N2.

Des facteurs de croissance peuvent aussi être ajoutés dans les milieux en réponse à des besoins cellulaires spécifiques, ou encore pour permettre la prolifération ou la différenciation cellulaire, comme le bFGF dans le milieu de prolifération des cellules LHMES, ou le GDNF dans leur milieu de différenciation.

3.2.2. Supports de culture en 2 dimensions (2D)

Classiquement, les cellules adhérentes comme les neurones sont cultivées *in vitro* sur des surfaces planes en polystyrène (module d'élasticité > 1GPa) traitées physiquement pour exposer des charges négatives et ainsi favoriser l'adhésion cellulaire. Les cellules sont généralement amplifiées en flasque de culture, puis réparties dans des plaques multipuits pour l'incubation avec des molécules d'intérêt. Les supports plastiques peuvent être recouverts de molécules pour améliorer l'adhésion cellulaire. C'est souvent le cas pour les cellules cérébrales, qui sont particulièrement sensibles. Ce recouvrement peut être réalisé avec des polymères cationiques qui permettent d'améliorer l'adhésion ainsi que la croissance des neurites, comme la Poly-L-Ornithine (PLO), la Poly-D-lysine (PDL) et la PLL. Les supports sont aussi parfois recouverts de molécules de la matrice extracellulaire, comme le collagène ou la fibronectine.

3.2.3. Supports de culture en 3 dimensions (3D)

La culture des cellules en 2D est éloignée des conditions physiologiques, puisque dans l'organisme les cellules s'organisent en 3D dans la MEC. Les interactions entre les cellules, ainsi que les interactions entre les cellules et leur microenvironnement, peuvent donc être fortement modifiées, ce qui entraîne un biais important. Face à cette problématique, de nombreuses technologies de culture en 3D se sont développées. On peut ainsi distinguer deux catégories de technologies pour la culture en 3D : les systèmes sans matrice et les systèmes avec matrice.

3.2.3.1. Les systèmes de culture en 3D sans matrice

Les systèmes de culture en 3D sans matrice, ou indépendants de l'ancrage, favorisent l'auto-agrégation des cellules en sphéroïdes. Parmi les systèmes existants, la culture en « gouttes suspendues » (*hanging drop*) est une technique qui peut être réalisée au moyen de plaques présentant un fond ouvert qui permet la formation d'une goutte de milieu, dans laquelle les cellules vont s'agréger (Figure 29). Cette technique peut aussi être réalisée en disposant des gouttes de suspension cellulaire au fond d'un puit ou d'une boîte de Pétri ensuite retournés. Les gouttes sont maintenues par tension de surface.

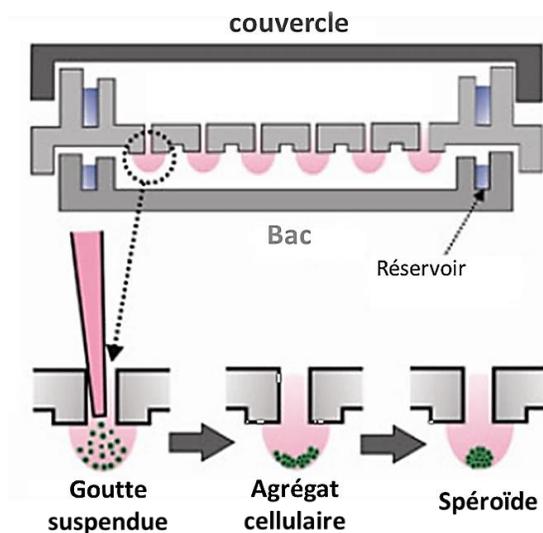


Figure 29 : Technique de culture en 3 dimensions en gouttes suspendues.
Adapté de (Asghar et al., 2013)

Une autre méthode sans matrice très utilisée pour la culture en 3D sont les systèmes anti-adhésion (*low binding* ou *ultra low attachment*) qui empêchent l'adhésion des cellules au support, favorisant ainsi leur agrégation entre elles sous forme de sphéroïdes. Le fond des puits est arrondi ou conique, et traité avec un polymère qui inhibe les interactions hydrophobes ou ioniques des cellules avec le support, comme par exemple du poly-2-hydroxyethyl méthacrylate ou de l'agarose.

Les cellules peuvent aussi s'organiser en sphéroïdes grâce à des systèmes en suspension sous agitation, qui empêchent la sédimentation des cellules. Par exemple, Smirnova *et al.* ont utilisé cette méthode pour cultiver les cellules Luhmes en 3D, dans des plaques 6 puits sous agitation. Ils ont ainsi obtenu des sphéroïdes pouvant être maintenus 21 jours en culture, contre environ 1 semaine pour les mêmes cellules cultivées en 2D. Cependant, la différenciation des Luhmes en 3D a nécessité un ajustement du protocole, notamment avec l'ajout de taxol (un anti-prolifératif) pour stopper la prolifération et améliorer la maturité neuronale des Luhmes (Figure 30) (Smirnova *et al.*, 2016). Cette étude illustre ainsi un phénomène courant en culture 3D : la nécessité d'adapter les protocoles de différenciation. Cela peut être fait comme dans cette étude par l'ajout de nouveaux composés, ou par ajustement des concentrations et/ou les temps d'incubation des facteurs de différenciation. De plus, les méthodes d'analyse doivent aussi parfois être adaptées. Par exemple, le comptage des cellules regroupées en sphéroïdes est délicat ; la mesure du diamètre des sphéroïdes pour mesurer la prolifération cellulaire peut être utilisée (Smirnova *et al.*, 2016).

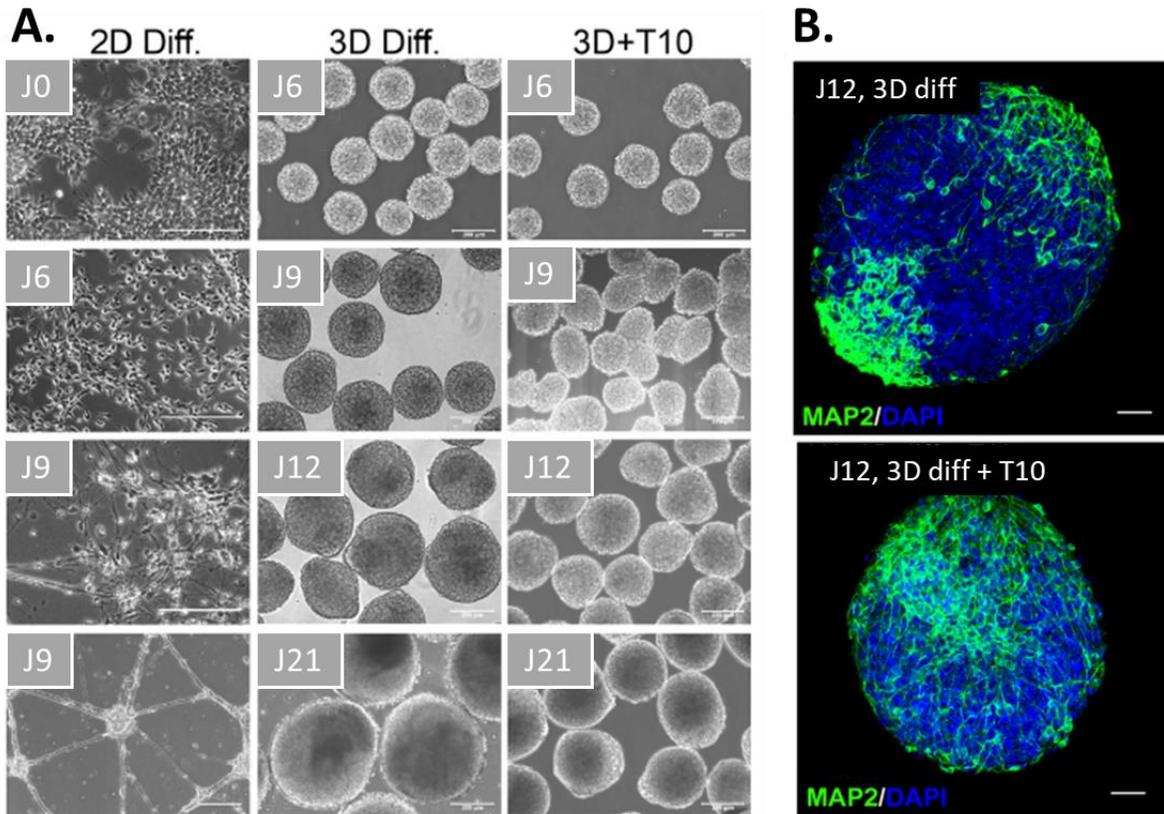


Figure 30 : Culture de la lignée Luhmes en 3 dimensions sous agitation giratoire.

A. Viabilité et prolifération des Luhmes en 2D et 3D, avec et sans taxol. Barre d'échelle = 200 μ m. **B.** Expression du marqueur de maturité neuronale MAP2 chez les Luhmes différenciées en 3D, avec et sans taxol. 2D : 2 Dimensions ; 2D diff : Luhmes différenciées cultivées en 2D ; 3D : 3 Dimensions ; 3D diff : Luhmes différenciées dans le même milieu qu'en 2D mais cultivées en 3D ; 3D+T10 : Luhmes différenciées et cultivées en 3D en présence de taxol 10 nM ; J : Jour ; MAP2 : Microtubule Associated Protein 2. Barre d'échelle = 50 μ m. Adapté de Smirnova *et al.*, 2016.

La méthode de culture en suspension sous agitation peut également être réalisée à l'échelle industrielle grâce à des bioréacteurs qui permettent de contrôler les paramètres de culture (King and Miller, 2007; Kumar and Starly, 2015).

Il existe également des systèmes fonctionnant par lévitation magnétique. Les cellules sont préalablement chargées avec des nanoparticules magnétiques. Un champ magnétique est ensuite appliqué, ce qui permet aux cellules de se regrouper en sphéroïdes. Cette méthode a par exemple été utilisée sur des cellules de glioblastome, qui ont montré une expression protéique proche de celle trouvée *in vivo* sur des xenogreffes (Souza *et al.*, 2010).

Ces systèmes sans matrice permettent une organisation en sphéroïdes, avec des interactions cellules-cellules. Ils n'incluent cependant pas le microenvironnement matriciel, bien que les cellules en sphéroïdes puissent sécréter elles-mêmes leur propre matrice.

3.2.3.2. *Les systèmes de culture en 3D avec matrice*

Il est possible d'inclure la matrice dans les modèles *in vitro* en utilisant des organes décellularisés. Ces derniers présentent l'avantage d'apporter une MEC complète. Cependant, l'accès à ces matrices est limité, en particulier pour la MEC humaine. Un autre inconvénient de ces produits d'origine biologique est le manque de reproductibilité et la technicité associée. Face à ces limites, un grand nombre de matrices pour la culture cellulaire en 3D a été développé.

On trouve tout d'abord les matrices solides et inertes (*solid scaffold*) qui constituent un support rigide permettant aux cellules de s'accrocher et de s'organiser ainsi en 3D. Il existe un large panel de matériaux pouvant être utilisés, comme le polystyrène, le métal, la céramique, le verre, etc. Ces matrices rigides ne sont pas physiologiques et ne miment pas le microenvironnement cellulaire : elles permettent uniquement une organisation structurelle.

Il existe également des matrices sous forme d'hydrogels, qui sont des réseaux formés par des polymères capables de piéger des quantités importantes d'eau. Les cellules vont être cultivées soit en surface par phénomène d'adhésion, soit en volume ; on parle alors d'encapsulation. Il existe une grande diversité d'hydrogels, en terme de composition et de propriétés mécaniques. Ils peuvent être directement d'origine biologique (animale comme le collagène ou végétale comme l'alginate) ou synthétisés à partir de composés naturels (comme l'AH) ou non-naturels (comme le Polyéthylène Glycol – PEG). Ils peuvent aussi être hybrides par le mélange de différents types d'hydrogels, afin d'obtenir des nouvelles propriétés physiques et biologiques. Les hydrogels de source naturelle sont dits « biocompatibles ». Ils présentent des propriétés d'adhésion et interagissent avec les cellules, ce qui par conséquent modifie leur métabolisme et leur comportement comme la viabilité, la prolifération et la différenciation, et également leur phénotype. Les hydrogels à base de collagène de type I sont les plus utilisés, en raison de la facilité

de préparation, du faible coût et des possibilités de modulation de leur propriété structurale (taille des pores, densité, rigidité, etc.) (Langhans, 2018).

Un autre hydrogel couramment utilisé, notamment pour la culture neuronale, est le Matrigel®. Il s'agit d'un extrait d'un sarcome murin d'Engelbreth-Holm-Swarm), une tumeur riche en protéines de matrice extracellulaire. Il est riche en laminines, collagène IV, entactine et PGHS, mais sa composition précise varie entre les lots en raison de son origine biologique. Il présente la propriété de se polymériser à température ambiante. Cependant, il contient aussi des facteurs de croissance naturellement présents dans ce type de tumeur. La lignée cellulaire SH-SY5Y a notamment été cultivée dans du Matrigel® (en monocouche et en 3D), et comparée avec des cellules SH-SY5Y cultivées en 2D (Ko *et al.*, 2020). Leur viabilité après exposition au MPP+ a été évaluée dans ces trois conditions, montrant une sensibilité diminuée en 3D (Figure 31). Cette différence de sensibilité entre les cellules cultivées en 2D et celles cultivées en 3D est un phénomène fréquemment retrouvé (Edmondson *et al.*, 2014).

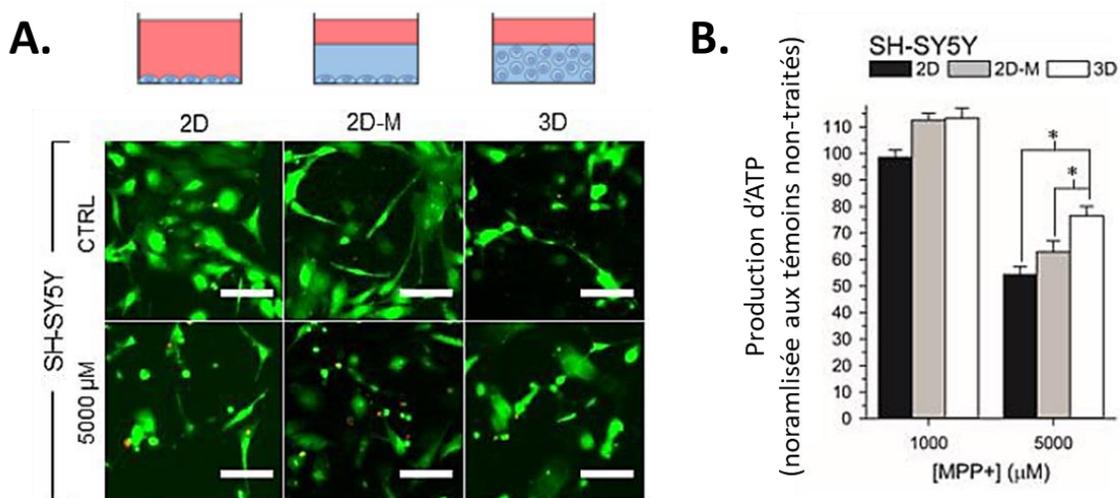


Figure 31 : Viabilité des cellules SH-SY5Y exposées au MPP+ et cultivées en 2 et 3 dimensions dans du Matrigel®.

A. Immunomarquages. En vert les cellules vivantes (Calcein-AM) et en rouge les cellules mortes (iodure de propidium). Barre d'échelle = 100 μm. **B. Viabilité quantifiée par marquage au Cell-Titer Glo 2.0** (production d'ATP). Barre d'erreur = SD, n = 3. SH-SY5Y différenciées à l'acide rétinolique et BDNF. 2D : 2 Dimensions ; 2D-M : cellules cultivées en monocouche dans du Matrigel® ; 3D : 3 Dimensions, cellules cultivées à l'intérieur du Matrigel®. Adapté de Ko *et al.*, 2020

L'utilisation d'une matrice permet aussi de moduler les propriétés physiques du support, ce qui présente un intérêt puisque la rigidité et l'élasticité de la MEC régulent les réponses cellulaires au travers de la mécanotransduction. Le tissu cérébral est particulièrement souple, avec un module d'élasticité de 0.1 kPa, ce qui est très éloigné des supports en 2D en polystyrène ($E > 1\text{GPa}$) ; il semble donc particulièrement important de tenir en compte de ce paramètre dans les modèles cérébraux (Akhmanova *et al.*, 2015).

3.2.3.3. *Systèmes en puces microfluidiques*

Afin de modéliser les flux présents dans l'organisme qui ne sont pas pris en compte dans les modèles statiques décrits précédemment, des systèmes microfluidiques ont été développés. Les systèmes microfluidiques, ou puces microfluidiques, sont conçus pour cultiver des cellules sous perfusion, ce qui permet de renouveler continuellement l'oxygène et les nutriments, tout en éliminant les déchets. Ils permettent aussi une exposition continue de certaines molécules comme des médicaments ou des facteurs de croissance. Ils peuvent aussi permettre d'exercer des forces physiques retrouvées *in vivo* (compression, cisaillement, etc.). De plus, ils permettent de réaliser des échanges entre différents compartiments qui peuvent contenir par exemple des modèles cellulaires de différents organes (foie, cerveau, etc.), modélisant ainsi *in vitro* un organisme plus ou moins complet. Au niveau cérébral, ils peuvent par exemple permettre de modéliser la BHE pour étudier les échanges en système fluide et modéliser les forces de cisaillement provoquées par le flux sanguin le long des cellules endothéliales (Oddo *et al.*, 2019). Il peuvent aussi permettre d'étudier l'axe intestin-cerveau (Boeri *et al.*, 2019).

Les différents systèmes de culture 3D peuvent être associés entre eux pour former des systèmes de cultures hybrides combinant les avantages des deux systèmes. Par exemple, des hydrogels peuvent être inclus dans des systèmes microfluidiques, ou des sphéroïdes obtenus en plaques anti-adhésion peuvent être incorporés dans des matrices. Le schéma ci-dessous récapitule les différents types de systèmes de culture en 3D (Figure 32) (Langhans, 2018).

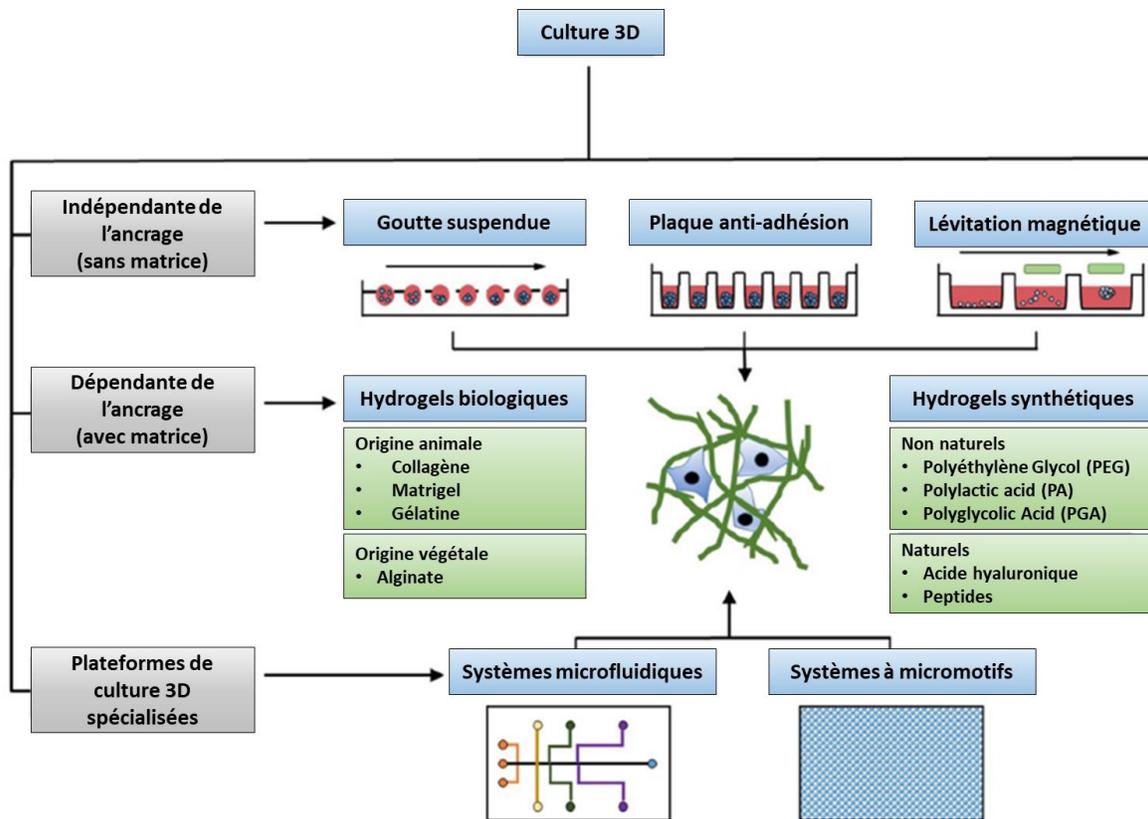


Figure 32 : Schéma récapitulatif des différents types de systèmes de culture en 3 dimensions.
Adapté de Langhans, 2018.

3.2.3.4. L'hydroscaffold™ BIOMIMESYS®

BIOMIMESYS® est une matrice à base d'AH, sur laquelle peut être greffée différents composants de la matrice extracellulaire, comme le collagène, de la fibronectine, etc. Cette matrice présente à la fois les propriétés d'un hydrogel et d'une matrice solide, d'où sa désignation en tant que *hydroscaffold™* (Figure 33). Sa composition ainsi que sa rigidité peuvent ainsi être modifiées en fonction de l'organe ou de la maladie étudiée. Etant synthétisée chimiquement, sa composition est entièrement définie. De plus, elle peut être produite en plaques multipuits et est adaptée à l'imagerie à fluorescence, ce qui en fait un outil d'intérêt pour le HCS.

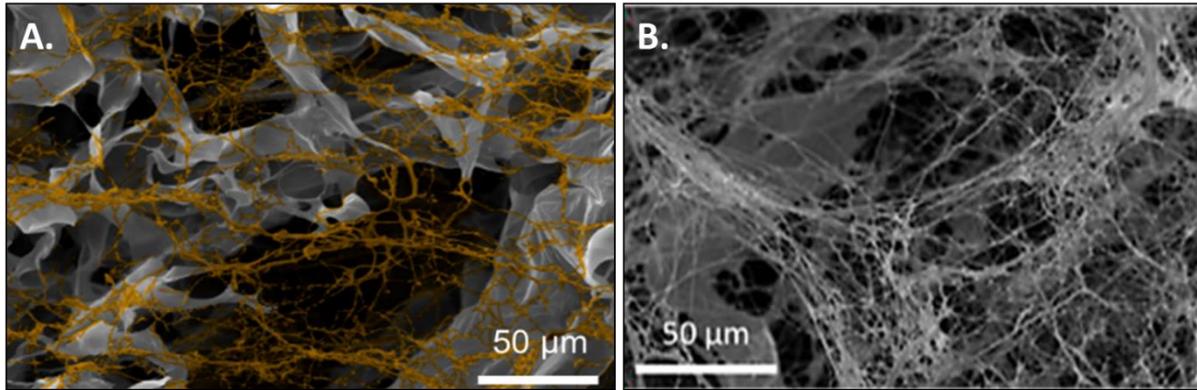


Figure 33 : Structure de l'hydroscaffold™ BIOMIMESYS® en microscopie électronique à balayage comparée à la matrice extracellulaire.

A. Matrice BIOMIMESYS® Adipose tissue, avec en jaune les fibres de collagène. **B.** Matrice extracellulaire de tissu adipeux décellularisé (Wang et al., 2013).

4. Objectifs de thèse

Malgré les avancées scientifiques et les améliorations des processus de R&D dans l'industrie pharmaceutique, le SNC reste trop fréquemment impliqué dans les échecs des candidats-médicaments en phase clinique, que ce soit pour des raisons de toxicité ou pour un manque d'efficacité contre la maladie ciblée. En effet, le cerveau est un organe complexe, où les neurones organisés en 3D interagissent avec leur microenvironnement. Ce dernier peut être défini comme l'environnement local qui entoure la cellule et qui contient différents éléments pouvant directement ou indirectement influencer son comportement. Dans ce contexte, de plus en plus de modèles *in vitro* complexes visant à mieux reproduire la complexité du SNC se développent, comme les modèles cellulaires en 3D dans des systèmes matriciels, posant la problématique suivante : quelle est l'influence du microenvironnement sur la réponse des neurones *in vitro* ?

Nous avons ici considéré 3 aspects du microenvironnement : la composante cellulaire désignant les cellules entourant le neurone, comme les cellules gliales, la composante moléculaire regroupant les molécules et facteurs solubles présents dans le milieu, et la composante matricielle désignant la MEC. Dans le cadre de cette thèse CIFRE, et fruit d'une collaboration public-privé entre l'unité U1172 « Troubles cognitifs dégénératifs et vasculaires » de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) et HCS Pharma, les objectifs de ce travail étaient *i)* d'étudier l'influence de ces trois composantes du microenvironnement sur des cellules neuronales dans des modèles cérébraux *in vitro* par imagerie cellulaire automatisée, et *ii)* de développer des modèles cérébraux *in vitro* miniaturisés et plus pertinents pour le criblage phénotypique, notamment en 3D dans la matrice BIOMIMESYS®, pour évaluer les effets neurotoxiques ou thérapeutiques de molécules, en particulier dans le cadre de la maladie de Parkinson.

METHODOLOGIE EXPERIMENTALE

1. La culture cellulaire en 3D dans l'*hydrosccaffold*TM BIOMIMESYS[®]

1.1. L'*hydrosccaffold*TM BIOMIMESYS[®]

BIOMIMESYS[®] est la technologie développée et produite par HCS Pharma. Brièvement, un groupement peptidique ARG-GLY-ASP-SER (appelé « RGDS ») est greffé sur l'AH. Ensuite, cet AH modifié est réticulé en présence de collagène par un agent de réticulant, de préférence de l'acide adipique dihydrazide (ADH), permettant d'obtenir un hydrogel. Le produit est ensuite purifié puis coulé dans le support de culture, où il est lyophilisé. Le produit final est transformé en *hydrosccaffold*TM prêt à l'utilisation, selon la procédure brevetée par HCS Pharma (brevet WO2016166479A1) (Figure 34). Le produit est ensuite stérilisé et stocké dans un emballage sous vide à 4°C.

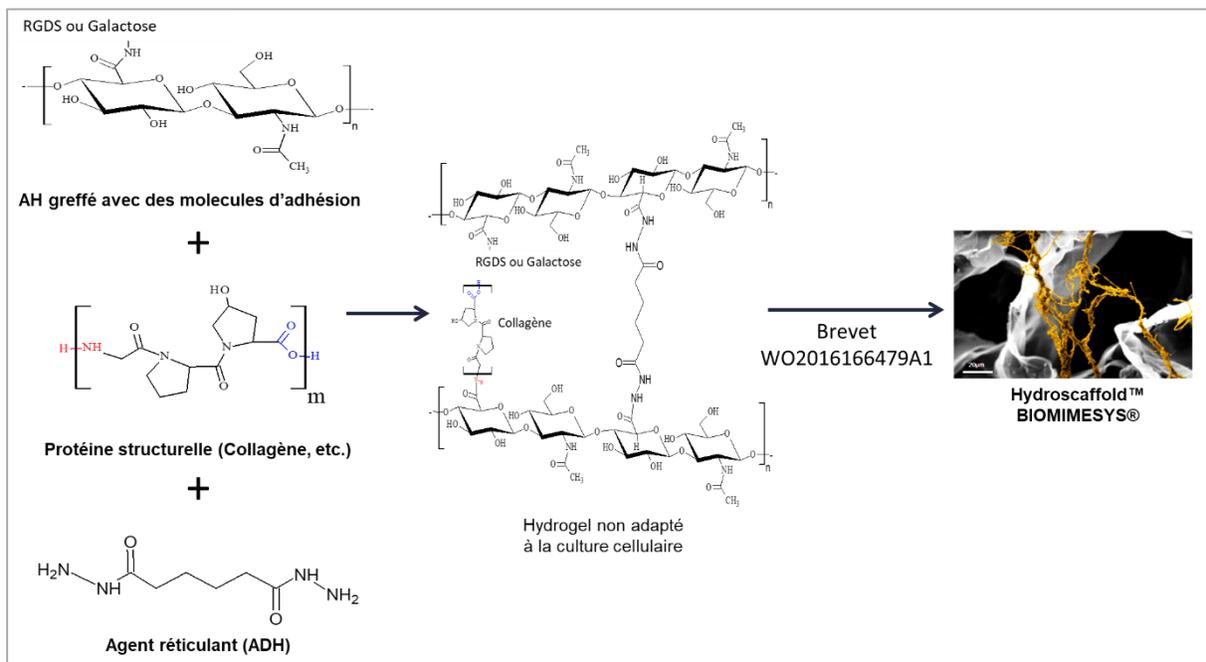


Figure 34 : Procédé de fabrication de l'*hydrosccaffold*TM BIOMIMESYS[®].
(HCS Pharma)

1.2. Technique d'ensemencement dans BIOMIMESYS®

BIOMIMESYS® se présente donc sous forme lyophilisée en plaques 96 puits noires à fonds transparents (adaptées à la microscopie à fluorescence). La technique d'ensemencement consiste à concentrer l'ensemble des cellules souhaitées par puits dans une goutte de milieu (20 à 30 μ l). La goutte est ensuite déposée sur la matrice lyophilisée, et pénètre à l'intérieur, permettant l'hydratation et le gonflement de la matrice, tout en piégeant les cellules à l'intérieur (Figure 35.A.). Du milieu de culture est ensuite ajouté par-dessus, pour compléter le puits. Par la suite, le milieu de culture doit être renouvelé totalement ou partiellement, tous les 2 ou 3 jours en fonction du type cellulaire et de la prolifération. Il est à noter que dans un puits, la place disponible pour les cellules en 3D est considérablement supérieure à la place disponible en 2D (surface du fond du puits). Par conséquent, la densité d'ensemencement utilisée doit être plus importante, au moins 3 fois supérieure dans BIOMIMESYS® qu'en 2D, la densité précise variant en fonction du type cellulaire. BIOMIMESYS® peut aussi être produit dans des plaques 384 puits ; dans ce format, les cellules peuvent être ensemencées directement dans le volume final, soit 50 μ l.

Les matrices BIOMIMESYS® peuvent aussi être récupérées à l'aide d'une pince, et transférées dans un autre support de culture (Figure 35.B.). Par exemple, pour des analyses à différents temps de culture, certaines matrices pouvaient être prélevées pour être analysées, pendant que les autres matrices restaient en conditions de culture.

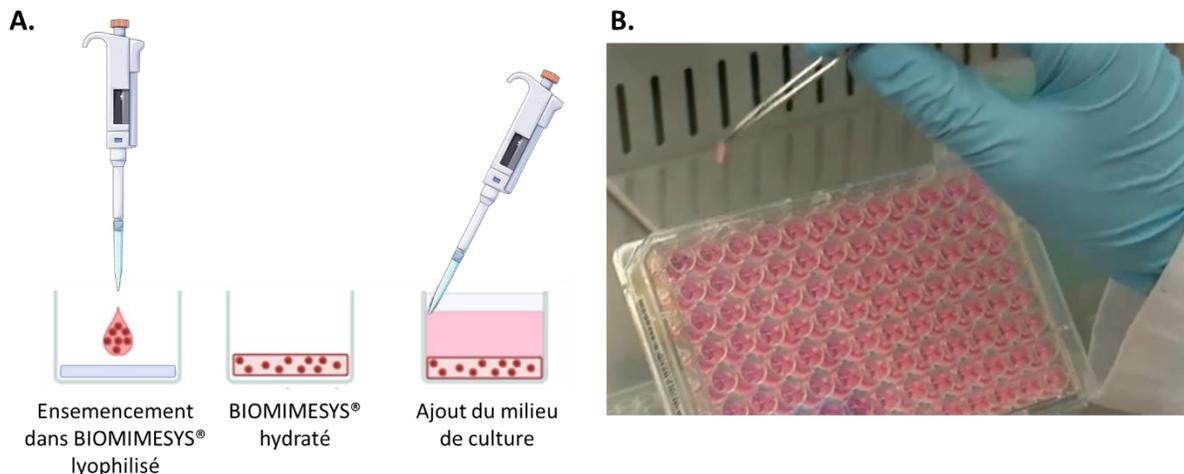


Figure 35 : Méthode de culture dans BIOMIMESYS®.

A. Ensemencement des cellules dans BIOMIMESYS®. **B.** Extraction d'une matrice BIOMIMESYS® à l'aide d'une pince (HCS Pharma).

La matrice BIOMIMESYS® est translucide, adaptée à la microscopie. Il est également possible d'extraire les cellules ou de les lyser pour les analyser par d'autres méthodes comme *les western blots*, les tests ELISA, ou la cytométrie en flux.

2. Principe expérimental général

Tout d'abord, les cellules étaient amplifiées en flasques de culture. Ensuite, elles étaient ensemencées en plaques multipuits, 96 ou 384 puits, en 2D ou dans BIOMIMESYS®, manuellement ou à l'aide d'un robot MultiFlo-FX (BioTek, Winooski, VT, USA). Après 3 jours, le milieu était changé. Elles pouvaient être maintenues en culture pour les tests de viabilité au cours du temps par exemple. Elles pouvaient également être exposées à des molécules pour évaluer leur réponse ; l'incubation était alors réalisée à l'aide d'un robot pipetteur Cybio-FeliX (CyRISBio, Saint Genis Laval, France). A la fin de l'expérience, les cellules pouvaient être marquées pour observer différents paramètres, comme la viabilité (avant fixation) ou l'expression de protéines d'intérêt par technique d'immunomarquage (après fixation). Ces étapes de fixation et de marquage pouvaient être réalisées manuellement ou à l'aide du robot pipetteur Cybio-FeliX. Les

cellules étaient ensuite observées par microscopie à fluorescence automatisée, et les résultats étaient analysés par analyse d'images quantitative automatisée (Figure 36).

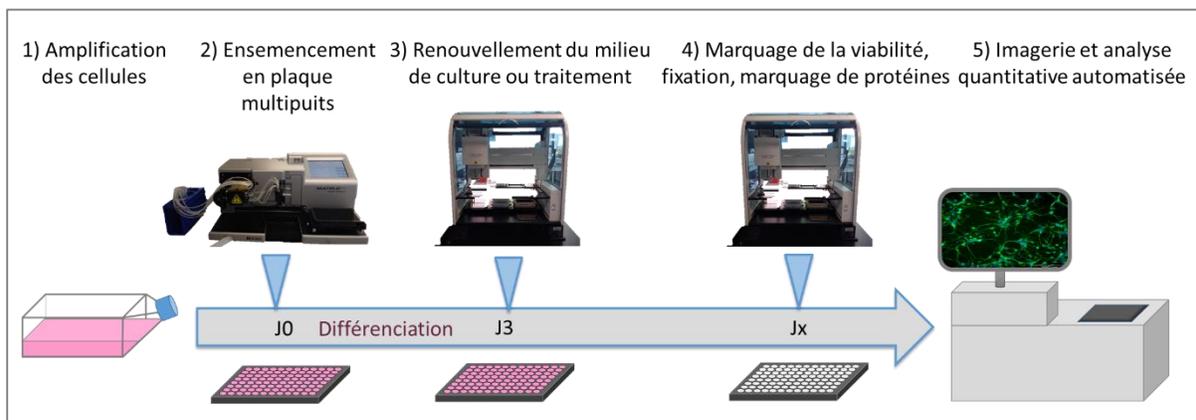


Figure 36 : Principe expérimental général.

J : Jour (HCS Pharma).

3. L'analyse d'images

L'acquisition des images a été réalisée avec un microscope automatisé à fluorescence « *ImageXpress Micro Confocal system* » (Molecular Devices, San José, Californie, États-Unis), avec au minimum 4 sites d'acquisition par puits, par méthode d'imagerie à champ large (*widefield*) pour l'acquisition des images en 2D et par imagerie confocale avec un sténopé de 60 μm pour l'acquisition des images des cultures en 3D, avec un regroupement de pixels par 2. Cinq filtres ont été utilisés : DAPI (excitation 377/ 50 nm, émission 447/60 nm), FITC (excitation 475/34 nm, émission 536/40 nm), Cy5 (excitation 631/28 nm, émission 692/40 nm), Cy3 (excitation 531/40 nm, émission 593/40 nm) et Texas Red (excitation 560/32 nm, émission 624/40 nm). Les images ont ensuite été analysées quantitativement avec le logiciel MetaXpress à l'aide de modules d'application. Les principaux modules d'applications utilisés étaient le module « *Live Dead* » pour le comptage des cellules vivantes et mortes, « *Neurite outgrowth* » pour l'analyse des neurites, et « *Multi wavelength cell scoring* » pour l'analyse de l'expression des marqueurs protéiques. Leurs principes respectifs sont détaillés ci-dessous.

3.1. Principe du module « *Live Dead* »

Dans un premier temps, le module d'application détecte l'ensemble des noyaux marqués au Hoechst, définis par une taille minimale et une taille maximale de la zone de marquage (en général 5 et 20 μm , respectivement) et une intensité en DAPI significativement supérieure au bruit de fond. Ensuite, les cellules mortes marquées à l'aide d'un marqueur de mortalité nucléaire (iodure de propidium ou DRAQ7) sont détectées parmi l'ensemble des noyaux précédemment identifiés, de nouveau définis par la taille de la zone de marquage et un seuil d'intensité de fluorescence (Figure 37).

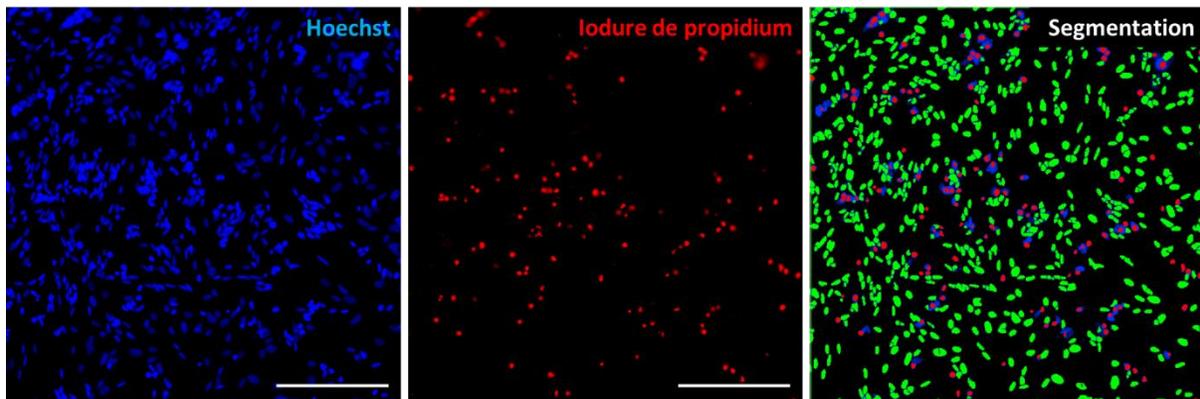


Figure 37 : Segmentation des images avec le module d'application « *Live Dead* » de MetaXpress (Molecular Devices).

Cellules SH-SY5Y différenciées à l'acide rétinoïque. Imagerie à fluorescence : les noyaux ont été marqués au Hoechst (en bleu – DAPI) et les cellules mortes à l'iodure de propidium (en rouge – Texas Red). Segmentation des images en cellules vivantes (en vert) et mortes (en rouge) Barre d'échelle = 200 μm .

3.2. Principe du module d'application « *Neurite outgrowth* »

Le module d'application détecte tout d'abord les corps cellulaires marqués pour TUBB3, en recherchant les formes arrondies présentant une intensité de fluorescence supérieure au bruit de fond. Ensuite, les noyaux sont recherchés grâce au marquage Hoechst à l'intérieur des corps cellulaires précédemment détectés (intensité de fluorescence DAPI supérieure au bruit de fond) : la détection d'un noyau à l'intérieur d'un corps cellulaire définit alors une cellule. Ensuite, les élongations, marquées comme les corps cellulaires pour TUBB3, sont détectées par la recherche de formes allongées d'intensité de fluorescence supérieure au bruit de fond (Figure 38).

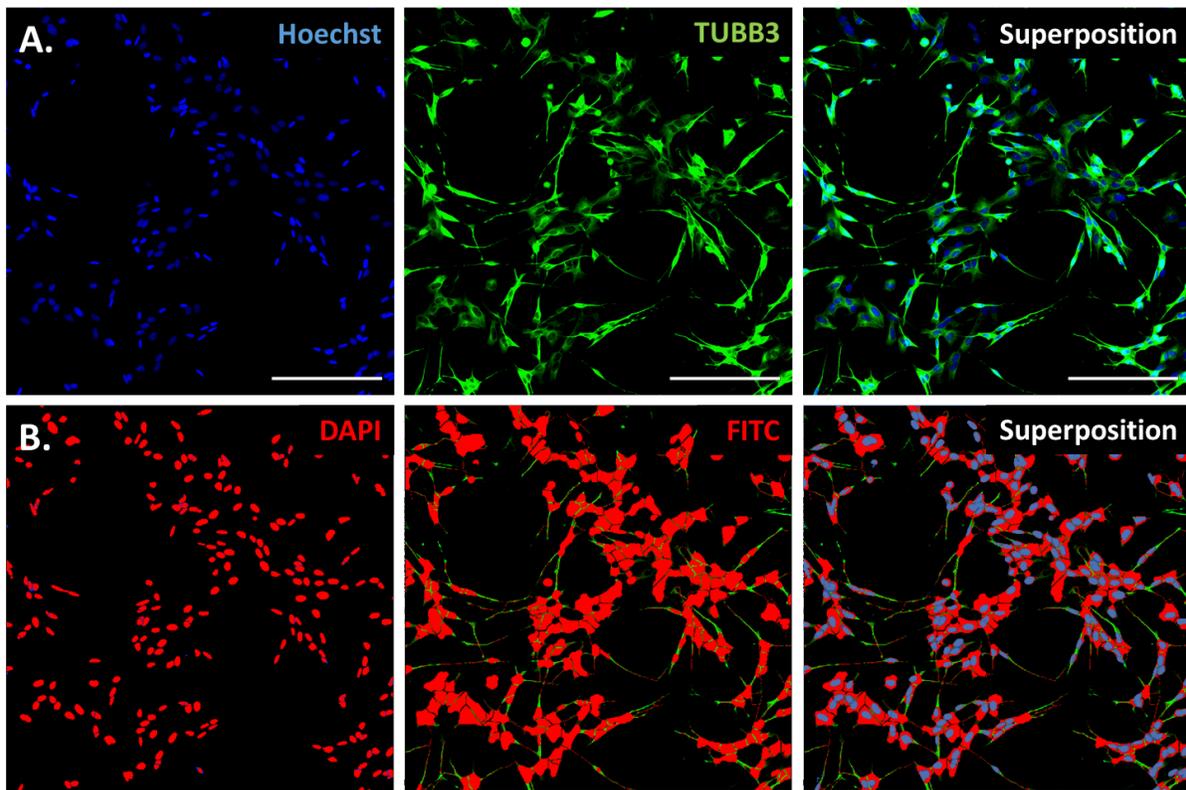


Figure 38 : Segmentation des images avec le module d'application « Neurite Outgrowth » de MetaXpress (Molecular Devices).

A. Imagerie à fluorescence. Cellules SH-SY5Y différenciées à l'acide rétinoïque. Les noyaux ont été marqués au Hoechst (en bleu – DAPI) et les corps cellulaires et les neurites ont été marqués pour TUBB3 (en vert – FITC). Barre d'échelle = 200 μm . **B.** Segmentation en noyaux selon l'intensité DAPI (en rouge et en bleu dans la superposition) et en corps cellulaires et neurites selon l'intensité FITC (en rouge).

3.3. Principe du module « Multi wavelength cell scoring »

Tout d'abord, le module d'application détecte les noyaux cellulaires (intensité de fluorescence en DAPI supérieure au bruit de fond, de taille comprise en 5 et 20 μm), permettant de déterminer le nombre de cellules. Ensuite, jusqu'à 7 longueurs d'ondes peuvent être analysées. La localisation du marquage peut être choisie (nucléaire et/ou cytoplasmique), ainsi que la taille (minimale et maximale) et le seuil de positivité par rapport au bruit de fond (Figure 39).

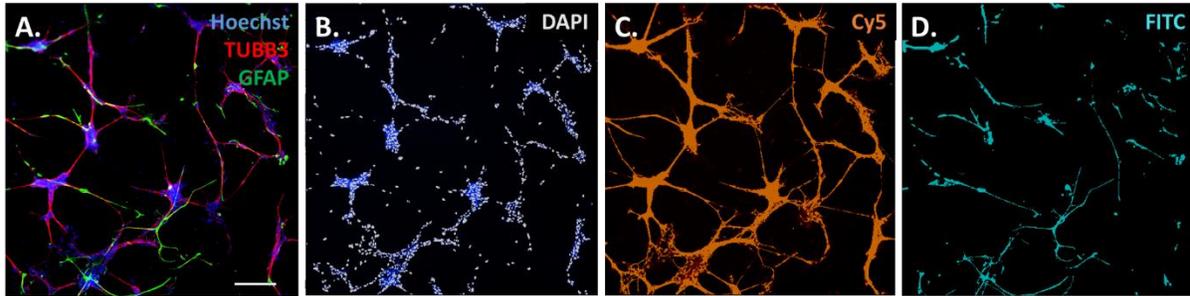


Figure 39 : Segmentation des images avec le module d'application « Multi wavelenght cell scoring » de MetaXpress (Molecular Devices).

A. Imagerie à fluorescence d'une co-culture de cellules neuronales exprimant TUBB3 (en rouge – Cy5) et d'astrocytes exprimant la GFAP (en vert – FITC), avec les noyaux marqués au Hoechst (en bleu – DAPI). Barre d'échelle = 200 μ m. **B.** Segmentation de l'image en noyaux selon l'intensité DAPI. **C.** Segmentation de l'image en cellules exprimant TUBB3 (en orange) selon l'intensité Cy5. **D.** Segmentation de l'image en cellules exprimant la GFAP (en cyan) selon l'intensité FITC. GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein.

TRAVAUX DE THESE - PARTIE 1 : Impact du microenvironnement dans un modèle *in vitro* pathologique pour la recherche de molécules thérapeutiques contre la maladie de Parkinson

1. Matériels et méthodes

1.1. Culture et différenciation des cellules Luhmes

1.1.1. Origine des cellules Luhmes

Les cellules Luhmes ont été offertes à l'INSERM U1172 « Troubles cognitifs dégénératifs et vasculaires », par l'équipe du Pr. Marcel Leist, du laboratoire « Toxicologie *in vitro* et biomédecine » qui a caractérisé la lignée, de l'université de Constance (Allemagne).

1.1.2. Maintien des cellules

Les cellules Luhmes étaient maintenues en culture à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂, en flasques Nunk™ EasYFlasks™ (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, États-Unis, ref. 10364131) préalablement recouvertes de 4 µg/cm² de PLO (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis, ref. P3655) et 0,1 µg/cm² de fibronectine (Sigma Aldrich, ref. F1141), en milieu de prolifération : Advanced *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)/Ham's F12 (F12) (Fisher Scientific, ref. 11540446), 100 UI/mL pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (Eurobio, Courtaboeuf, France, ref. CABPES01 0U), 2 mM de L-Glutamine (Eurobio, ref. CSTGLU00 0U), 1% (v/v) de N2 100X (Fisher Scientific, ref. 15410294), 40 ng/mL de bFGF (R&D systems, Minneapolis, Minnesota, États-Unis, ref. 4114-TC-01M).

1.1.3. Différenciation des cellules et ensemencement en plaques multipuits

Pour la différenciation, les cellules Luhmes étaient passées à une densité de 2.10⁶ cellules/flasque en milieu de prolifération 4 jours avant ensemencement (J-4). Deux jours plus tard, le milieu était retiré et remplacé par du milieu de différenciation : Advanced DMEM/F12, 100UI/mL pénicilline et 100µg/mL de streptomycine, 2mM de L-Glutamine, 1% (v/v) de N2 100X,

1mM de d'AMPC (Sigma Aldrich, ref. D0627) et 2ng/mL de GDNF (R&D systems, ref. 212-GD-010) (étape de prédifférenciation, J-2 avant ensemencement) (Figure 40).

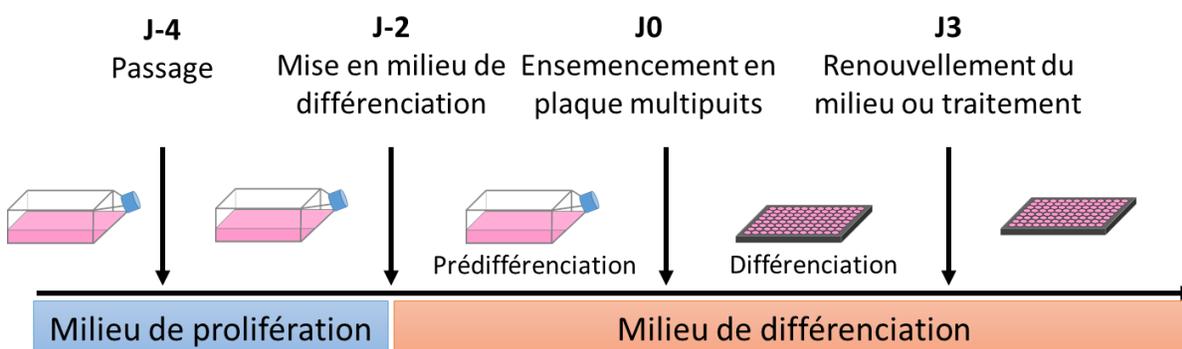


Figure 40 : Schéma du protocole de culture et de différenciation des cellules Luhmes.
J : Jour.

Les cellules Luhmes ainsi prédifférenciées étaient ensuite ensemencées (J0) en plaques multipuits 2D préalablement recouvertes de 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PLO et 0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de fibronectine ou en plaques BIOMIMESYS[®], en milieu de différenciation, selon les conditions détaillées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Densités et volumes d'ensemencement des cellules Luhmes en 2 dimensions et dans BIOMIMESYS[®] Brain.

Greiner Bio-one, Kremsmünster Autriche. HCS Pharma, Loos, France.

Plaques	Densité cellules/puits	Volume d'ensemencement (μl)
96 puits (2D) (Greiner Bio-one, ref. 655090)	40 000	200
384 puits (2D) (Greiner Bio-one, ref. 781091)	6 000	50
96 puits (BIOMIMESYS [®] Brain) (HCS Pharma, BIO_BRA_96_96_black)	100 à 200 000	20 à 30 (puis ajout qsp 200 μl de milieu)
384 puits (BIOMIMESYS [®] Brain) (non commercialisée)	30 000	50

1.2. Culture des astrocytes primaires humains

Les astrocytes primaires humains provenaient de ScienCell (Cliniscience, Nanterre - France, ref. 1800-SC). Ils ont été maintenus en flasques T75 préalablement recouvertes de 2 µg/cm² de PLL, dans leur milieu complet : *Astrocyte Medium* (AM) (Cliniscience, ref. 1801-SC) contenant 2% (v/v) de SVF (Cliniscience, Ref. No. 0010), 1% (v/v) de supplément de croissance astrocytaire (Cliniscience, Ref. 1852) et 1% (v/v) de pénicilline/streptomycine (Cliniscience, Ref. 0503). Ils ont été ensemencés en plaques multipuits après 4 passages maximum, dans leur milieu complet à la densité de 1 500 cellules/puits en plaques 96 puits (2D) préalablement recouvertes de 2 µg/cm² de PLL. Dans BIOMIMESYS® *Brain*, ils ont été ensemencés dans une gamme de densité comprise entre 2 500 et 80 000 cellules par puits, dans 30 µl de milieu complet (puis ajout qsp 200 µl de milieu complet).

1.3. Co-culture

La co-culture de cellules Luhmes et d'astrocytes a été réalisée en 2 temps, dans des plaques 96 puits 2D recouvertes de 6 µg/cm² de PLO et 0,1 µg/cm² de fibronectine, ou dans des plaques 96 puits BIOMIMESYS® *Brain*. Les astrocytes ont été ensemencés en premier, dans leur milieu spécifique. Deux jours après, le milieu a été entièrement retiré et les cellules Luhmes ont été ensemencées par-dessus les astrocytes, en milieu de différenciation des cellules Luhmes (J0) (Figure 41). Les densités et volumes d'ensemencement sont détaillés dans le Tableau 3.

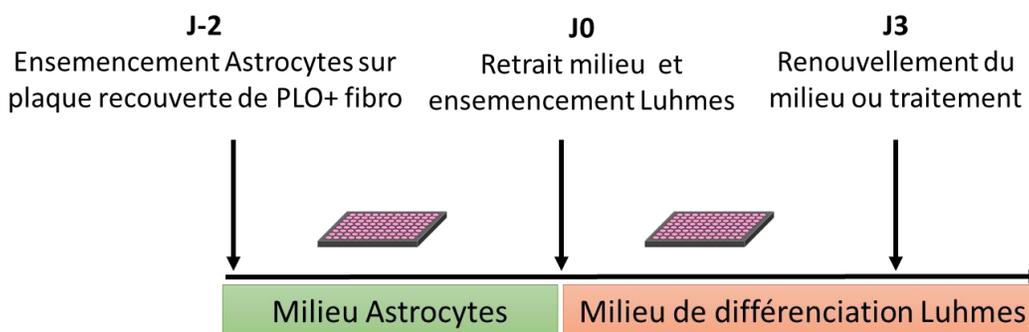


Figure 41 : Schéma du protocole de co-culture des cellules Luhmes et des astrocytes primaires humains en 2 dimensions et dans BIOMIMESYS® Brain.

Fibro : Fibronectine ; *PLO* : Poly-L-Ornithine.

Tableau 3 : Densités et volume d'ensemencement des co-cultures des cellules Luhmes et des astrocytes en 2 dimensions et dans BIOMIMESYS® Brain.

	ASTROCYTES PRIMAIRES HUMAINS		CELLULES LUHMES	
	Densité (cell/puits)	Volume d'ensemencement (µl)	Densité (cell/puits)	Volume d'ensemencement (µl)
Plaque 96 puits (2D)	1 500	200	20 000	200
Plaque 96 puits Biomimesys® Brain	20 000	25 (puis ajout 175 µl de milieu)	200 000	15 (puis ajout 185 µl de milieu après 15 minutes)

Les conditions témoins correspondaient à des astrocytes en monoculture mis en milieu de différenciation Luhmes après 2 jours, et à des cellules Luhmes en monoculture ensemencées après 2 jours d'incubation de milieu astrocyte complet (sans astrocytes) dans les puits.

1.4. Exposition des cellules aux inducteurs de la maladie de Parkinson (iMP)

Dans l'ensemble des tests réalisés, les cellules ont été exposées aux iMP 3 jours après leur ensemencement en plaques multipuits, en milieu de différenciation. La roténone (TCL, ref. R0090), la 6-OHDA (Sigma Aldrich, ref. H4381), l'érastine (Sigma Aldrich, ref. E7781), le MPP+ (Sigma Aldrich, ref. D048), le glutamate monosodique (Sigma Aldrich, ref. 49621), et paraquat dichlorure (Sigma Aldrich, ref. 36541) sous forme de poudre ont été solubilisés dans du DMSO à des concentrations 200 fois supérieures aux concentrations finales. Ils ont ensuite été dilués 100 fois dans du milieu de différenciation. La moitié du milieu de culture des cellules a été retirée et remplacée par les solutions d'iMP, entraînant leur dilution au demi, soit la concentration finale souhaitée, ainsi qu'une concentration en DMSO de 0,005% (v/v). Les puits témoins sans iMP étaient incubés dans du milieu de différenciation contenant 0,005% (v/v) de DMSO.

- **Test de sensibilité en 2D vs BIOMIMESYS® Brain**

Les cellules ont été ensemencées en plaques 384 puits 2D et BIOMIMESYS® Brain, puis incubées avec la roténone, la 6-OHDA, le MPP+, le glutamate, et le paraquat aux concentrations

finales de 100 ; 30 ; 10 ; 3 ; 1, 0,3 ; 0,1 ; 0,03 ; 0,01 ; 0,003 μM , et avec l'érastine, aux concentrations finales de 10 ; 3 ; 1, 0,3 ; 0,1 ; 0,03 ; 0,01 ; 0,003 ; 0,001 ; 0,0003 μM , pendant 24h.

- **Test de rétention**

Dans les conditions « exposition directe », les cellules ont étéensemencées en plaques 96 puits 2D et BIOMIMESYS® *Brain*. Elles ont ensuite été exposées à l'érastine aux concentrations finales 25 ; 7,5 ; 2,5 ; 0,75 ; 0,25 ; 0,075 ; 0,025 ; 0,0075 ; 0,0025 ; 0,00075 μM pendant 48h. Dans la plaque « 2D avec pré-incubation des molécules », les cellules ont étéensemencées en plaques 96 puits 2D. La gamme d'érastine a été incubée pendant 1h dans une plaque BIOMIMESYS® *Brain*, puis récupérée et appliquée sur les cellules de la plaque 2D pendant 48h (Figure 42).

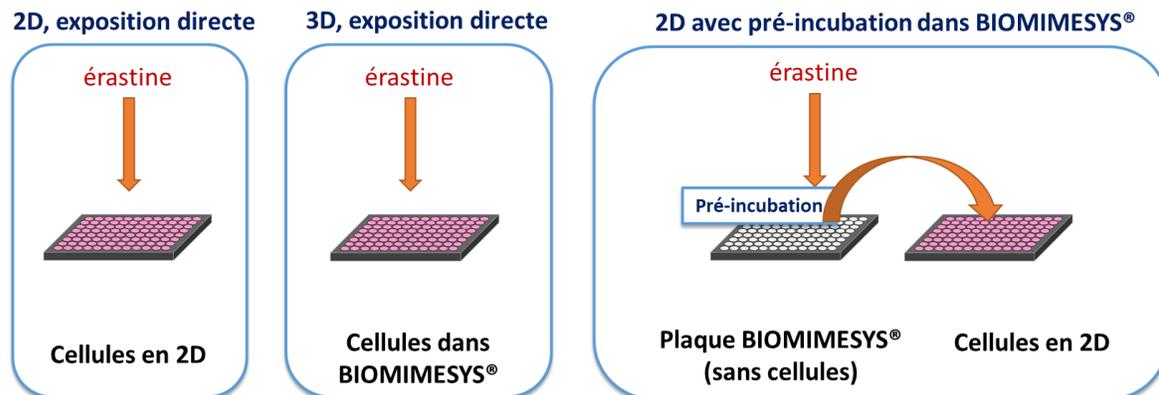


Figure 42 : Schéma du protocole du test de rétention.

2D : 2 Dimensions ; 3D : 3 Dimensions.

- **Test sur la co-culture de cellules Luhmes et d'astrocytes vs monoculture**

Les cellules en co-culture ou en monoculture ont étéensemencées en plaques 96 puits 2D comme décrit précédemment. Elles sont ensuite été exposées à la roténone, la 6-OHDA, le MPP+, le glutamate, et le paraquat aux concentrations finales de 100 ; 30 ; 10 ; 3 ; 1, 0,3 ; 0,1 ; 0,03 ; 0,01 ; 0,003 μM , et avec l'érastine, aux concentrations finales de 25 ; 7,5 ; 2,5 ; 0,75 ; 0,25 ; 0,075 ; 0,025 ; 0,0075 ; 0,0025 ; 0,00075 μM pendant 48h, en milieu de différenciation des cellules Luhmes.

1.5. Criblage pour la recherche de molécules anti-ferroptotiques

Le criblage a été réalisé en plaques 384 puits 2D. Les LHMes différenciées ont été ensemencées à la densité de 6 000 cellules par puits, en milieu de différenciation. Après 3 jours, elles ont été exposées aux molécules de la chimiothèque Prestwick® à 1 µM en présence de 1.25 µM d'érastine, pendant 24h. Les témoins négatifs étaient les cellules exposées à l'érastine. Les témoins positifs étaient les cellules en milieu seul et les cellules en milieu contenant de l'érastine et de la Fer-1 (chélateur de fer) à 5 µM. La viabilité a été analysée par marquage à l'iodure de propidium.

1.6. Immunomarquage

En 2D, les étapes de marquage ont été réalisées au robot Cybio-Felix avec une vitesse d'aspiration de 1 µl/seconde, par traitement partiel, c'est-à-dire que seule la moitié du volume était retirée du puit et était remplacée par la solution de marquage concentrée 2 fois. Cela permettait d'éviter le décollement des cellules. Dans BIOMIMESYS® *Brain* 96 puits, le milieu était retiré et la solution de marquage était ajoutée à la concentration finale directement, manuellement. Les marquages en plaques 384 (2D et BIOMIMESYS®) ont tous été réalisés au robot Cybio-Felix avec traitement partiel.

1.6.1. Viabilité

La mortalité cellulaire a été analysée par marquage des cellules avec 1 µg/mL d'iodure de propidium (Sigma Aldrich, ref. P4170) pendant 5 minutes ou 1,2 µM de DRAQ7 (Ozyme, ref. BLE424001) pendant 15 minutes, en milieu de base chaud (Advanced DMEM/F12 ou milieu astrocytes sans ajout de suppléments), en présence de 10 µg/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen™ H3570, Fisher Scientific, ref. 11534886). Les cellules ont ensuite été rincées dans du milieu de base chaud.

1.6.2. Fixation

Les cellules ont été fixées à la paraformaldéhyde (Fisher Scientific cat. 10260219) à 2% en 2D et 4% en 3D, pendant 15 minutes, puis rincées en *Phosphate Buffered Saline* (PBS) (Eurobio, ref. CS1PBS01).

1.6.3. Perméabilisation

Les cellules ont été perméabilisées avec 0,5% (v/v) de Tween-20, en présence de 1% de *Bovine Serum Albumin* (BSA) (Dominique Dutscher, Bernolsheim, France, ref. 871004) dans du PBS, pendant 30 minutes. Elles ont ensuite été rincées en PBS contenant 1% (w/v) de BSA.

1.6.4. Marquage

Les cellules ont été marquées par immunomarquage indirecte. Elles ont été incubées avec les anticorps primaires dilués dans du PBS contenant 1% (w/v) de BSA, pendant 1h30 à température ambiante ou sur la nuit à 4°C. Ensuite, les cellules ont été rincées avec du PBS contenant 1% (w/v) de BSA, puis incubées avec les anticorps secondaires, avec 10 µg/mL de Hoechst (sauf si étape du marquage de la viabilité préalablement réalisée), dans du PBS contenant 1% (w/v) de BSA pendant 1h à température ambiante à l'abri de la lumière. Les différents anticorps et les dilutions de travail sont détaillés dans le Tableau 4 et le Tableau 5.

Tableau 4 : Liste des anticorps primaires utilisés pour les procédures d'immunomarquage, avec les dilutions utilisées, les fournisseurs et les références des produits.

	Cible	Type	Espèce hôte	Dilution	Fournisseur	Référence
Anticorps primaires	TUBB3	Polyclonal IgG	Lapin	1:5 000 (2D) 1:2500 (3D)	Abcam	Ab18207
	NeuN D3S3I	Monoclonal IgG	Lapin	1:500	Cell signaling	12943S
	TH	Polyclonal IgG	Lapin	1:100	Sigma Aldrich	AB152
	GFAP	Polyclonal IgG	Mouton	1: 200	R&D systems	AF2594
	GFAP	Monoclonal IgG	Lapin	1: 400 (2D) 1: 200 (3D)	Biolegend	644702

Tableau 5 : Liste des anticorps secondaires utilisés pour les procédures d'immunomarquage, avec les dilutions utilisées, les fournisseurs et les références des produits.

	Couplage	Type	Espèce hôte	Dilution	Fournisseur	Référence
Anticorps secondaires	Alexa Fluor 488	IgG	Chèvre Anti-lapin	1:2000	Cell signaling	4412S
	Alexa Fluor 488	IgG	Chèvre Anti-souris	1:2000	Cell signaling	4408S
	Alexa Fluor 488	IgG	Âne Anti-mouton	1:2000	Abcam	ab150177
	Alexa Fluor 647	IgG	Chèvre Anti-lapin	1:2000	Cell signaling	4414S
	Alexa Fluor 647	IgG	Chèvre Anti-souris	1:2000	Cell signaling	4410S
	Alexa Fluor 555	IgG	Chèvre Anti-lapin	1:2000	Cell signaling	4413S
	Alexa Fluor 555	IgG	Chèvre Anti-souris	1:2000	Cell signaling	4409S

1.6.5. Acquisition et analyse des images

Les images ont été acquises avec le microscope automatisé à fluorescence ImageXpress Micro Confocal system (Molecular Devices). Elles ont ensuite été analysées avec le logiciel MetaXpress version 6.63.55 version, avec les modules d'application appropriés. Les graphiques ont été réalisés avec les logiciels Microsoft Excel 2016 version 16.0.4266.1001, et GraphPad Prism version 8.4.1 (676).

La viabilité des cellules a été mesurée par l'analyse du nombre de cellules totales et du nombre de cellules mortes. Pour l'analyse de la viabilité en 2D, le nombre de cellules vivantes par site d'acquisition a été normalisé par le nombre de cellules vivantes par site d'acquisition dans les puits témoins sans iMP. Pour l'analyse de la viabilité en 3D, le pourcentage de cellules vivantes par site d'acquisition a été normalisé au pourcentage de cellules vivantes par site d'acquisition dans les puits témoins sans iMP. Ce choix dans la méthode d'analyse était justifié par le fait qu'en 2D, les cellules mortes peuvent se décoller. Par conséquent, il était nécessaire de mesurer le nombre de cellules vivantes par site d'acquisition, et non le pourcentage de cellules vivantes, qui pouvait alors être biaisé. A l'inverse, en 3D, les cellules mortes restent piégées dans la matrice, évitant donc ce biais. En revanche, l'organisation en amas entraînait davantage de variabilité dans le nombre de cellules par site d'acquisition ; la mesure du pourcentage de cellules vivantes par site d'acquisition était donc plus pertinente.

La longueur totale des neurites par cellule a été mesurée comme la somme de toutes les longueurs des neurites par site d'acquisition, divisée par le nombre de cellules.

L'expression des marqueurs neuronaux a été analysée par la mesure de l'intensité intégrée par cellule, soit la somme des intensités des pixels sur la zone marquée (intensité significativement supérieure au bruit de fond), divisée par le nombre total de cellules. Ce paramètre permettait de prendre en compte l'expression totale, à la fois l'intensité et la quantité du signal. Le pourcentage de cellules positives pouvait également être analysé, soit le nombre de cellules exprimant significativement le marqueur par site d'acquisition (intensité significativement supérieure au bruit de fond) divisée par le nombre total de cellules par site d'acquisition.

1.7. Test ELISA

Les tests ELISA ont été réalisés avec les kits pour dosage de TUBB3 (Abcam, ref. ab235644) et de la TH (Antibodies on-line.fr, ref. ABIN2540154).

2. Résultats

2.1. Criblage préliminaire pour le repositionnement de molécules contre la maladie de Parkinson

Un criblage préliminaire a été réalisé dans l'objectif d'identifier des molécules neuroprotectrices contre la maladie de Parkinson, en collaboration avec le Pr. David Devos, neurologue au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Lille. Un modèle de ferroptose a été mis au point avec des cellules LHMES différenciées exposées à l'éraستine en plaque 384 puits. La banque Prestwick® de 1 280 molécules a été criblée.

Le paramètre mesuré était le pourcentage de cellules vivantes, suite à leur marquage à l'iodure de propidium. Les témoins négatifs étaient les cellules exposées à l'éraستine. Les témoins positifs étaient les cellules en milieu seul (calcul du facteur Z) et les cellules en milieu contenant de l'éraستine et un chélateur de fer, la Fer-1 (calcul du facteur Z') (Figure 43).

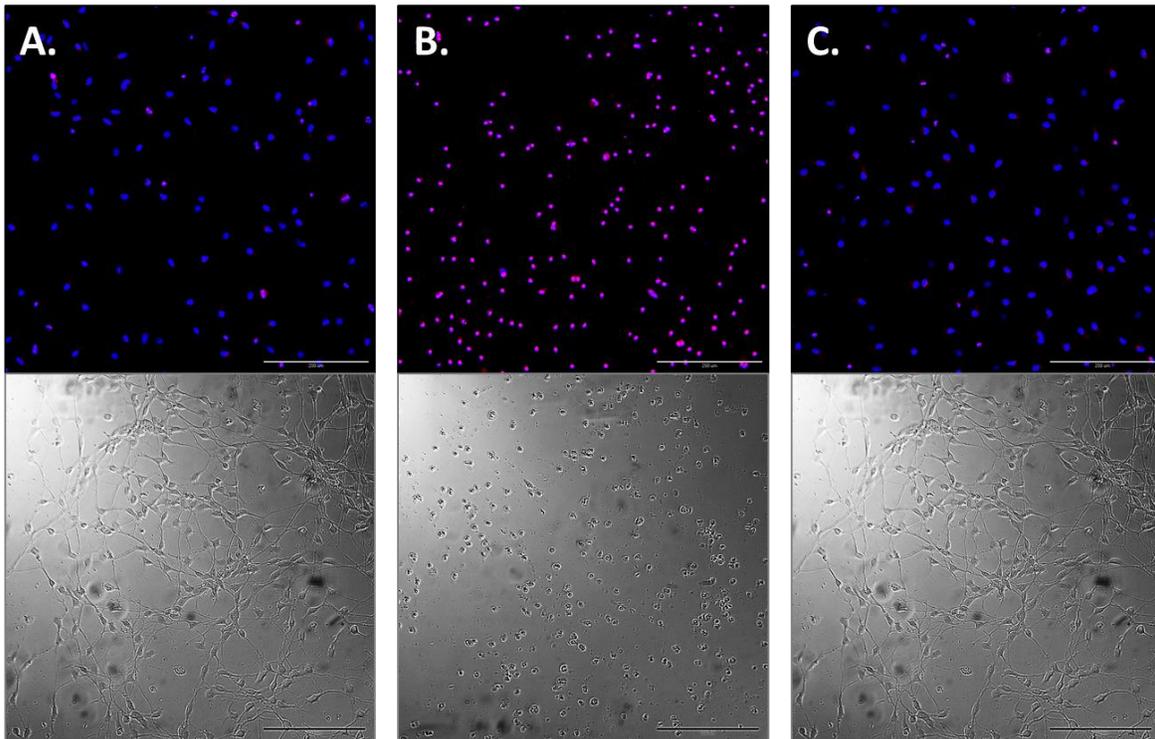


Figure 43 : Témoins négatifs et positifs du criblage de molécules anti-ferroptotiques.

A. Témoin milieu. **B.** Témoin éraستine. **C.** Témoin éraستine et ferrostatine-1. Ligne 1 : microscopie à fluorescence automatisée, avec en bleu les noyaux (Hoechst) et en rouge les cellules mortes marquées à l'iodure de propidium. Ligne 2 : microscopie par contraste de phase. Echelle = 200 μm .

Les facteurs Z et Z' ont été vérifiés pour chaque plaque d'essai (soit 4 plaques 384). Pour la plaque 1, la facteur Z₁ était de 0,77 et le facteur Z'₁ de 0,74 (Tableau 6). Les résultats des 4 autres plaques étaient similaires, avec Z₂ = 0,76 et Z'₂ = 0,77 pour la plaque 2, Z₃ = 0,83 et Z'₃ = 0,85 et Z₄ = 0,83 et Z'₄ = 0,84.

Tableau 6 : Calcul des facteurs Z et Z' à partir du pourcentage de cellules vivantes dans les témoins négatifs et positifs du criblage de molécules anti-ferroptotiques (plaque 1).

SD : Standard Deviation ; Cv : Coefficient de variations.

Plaque 1	% cellules vivantes				
	Moyenne	SD	Cv	Z	Z'
Témoin positif (milieu+DMSO)	88	3	4%		
Témoin négatif (érasatine)	5	3	59%	0,77	
Témoin positif (érasatine + Fer -1)	86	4	5%		0,74

Sur 1 280 molécules testées, 60 ont montré un effet neuroprotecteur, avec une viabilité cellulaire supérieure à 75% lors du criblage primaire (n=1, C=1 µM). Le Pr. David Devos a sélectionné parmi elles 4 molécules ayant une pertinence clinique (distribution cérébrale, tolérance, compatibilité avec la maladie de Parkinson).

Un criblage secondaire a ensuite été réalisé, avec des gammes de concentrations à partir de 30 µM pour confirmer ou infirmer l'effet anti-ferroptotique des molécules sélectionnées. Pour ces tests, la ferroptose a été de nouveau induite par l'érasatine, mais également par un autre inducteur, le RSL3 à 20nM, afin de comparer les effets de ces molécules.

L'effet anti-ferroptotique a été confirmé pour deux des quatre molécules sélectionnées (molécules 2 et 3). Pour les deux autres molécules, aucune amélioration de la viabilité n'a été observée. La molécule 2 montrait un effet neuroprotecteur vis-à-vis de l'érasatine et du RSL3, avec un effet plus prononcé contre l'érasatine, et un effet toxique au-dessus de 3 µM. La molécule 3 en revanche montrait un effet protecteur uniquement contre l'érasatine, avec un effet toxique au-dessus de 1 µM (Figure 44).

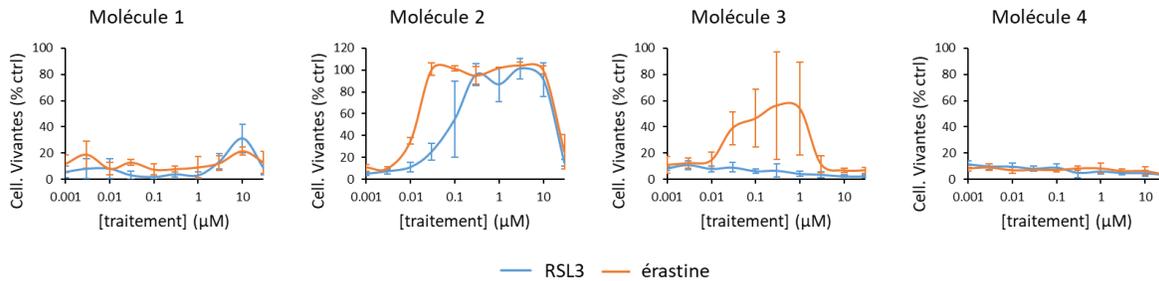


Figure 44 : Courbes d'effet-doses des molécules potentiellement anti-ferroptotiques sélectionnées lors du criblage, en présence d'érastine et de RSL3.

Exposition pendant 24h. Mesure de la viabilité par analyse d'images quantitative automatisée (marquage des noyaux au Hoechst, marquage des cellules mortes à l'iodure de propidium). Pourcentage de cellules vivantes par site d'acquisition normalisé par rapport au pourcentage de cellules vivantes par site d'acquisition dans les puits témoins sans inducteur de ferroptose. Cell. : Cellules ; Ctrl : Contrôle. Barre d'erreur = déviation standard.

Suite à ce criblage, des tests ont été réalisés pour complexifier le modèle, en incluant des paramètres présents dans le SNC *in vivo* : le microenvironnement matriciel et le microenvironnement glial.

2.2. Impact du microenvironnement matriciel

2.2.1. Développement de l'hydroscaffold™ BIOMIMESYS® Brain pour la culture en 3D de cellules cérébrales

Dans l'objectif de développer une matrice adaptée à la culture de cellules cérébrales en 3D, différentes versions de l'hydroscaffold™ BIOMIMESYS® en plaques 96 puits ont été évaluées. Plusieurs compositions chimiques ont été testées, incluant différentes concentrations d'AH, différents types de collagènes, différents polymères cationiques et molécules d'adhésion. Les matrices ont été testées dans un premier temps pour la culture des cellules Luhmes. Les critères de sélection étaient *i)* le maintien des cellules dans la matrice, et *ii)* l'organisation des cellules en réseau neuronal avec formation de neurites. Pour chaque version, plusieurs densités cellulaires et volumes d'ensemencement ont été testés, afin de déterminer les conditions de culture optimales.

Une composition de BIOMIMESYS® *Brain* a ainsi été validée, composée d'AH, de RGDS, de collagène IV, et d'un polymère cationique. Une densité cellulaire comprise entre 100 000 et 200 000 cellules Luhmes/puits était adaptée. Au-delà, une importante mortalité cellulaire et une diminution de l'expression de TUBB3 étaient observées (Figure 45). Un volume d'ensemencement compris entre 20 et 30 μ l permettait à la fois une hydratation complète de l'*hydroscaffold*™, ainsi qu'une perte limitée de la suspension cellulaire à l'extérieur de la matrice. Cela permettait donc une bonne pénétration et une dispersion homogène des cellules à l'intérieur de l'*hydroscaffold*™.

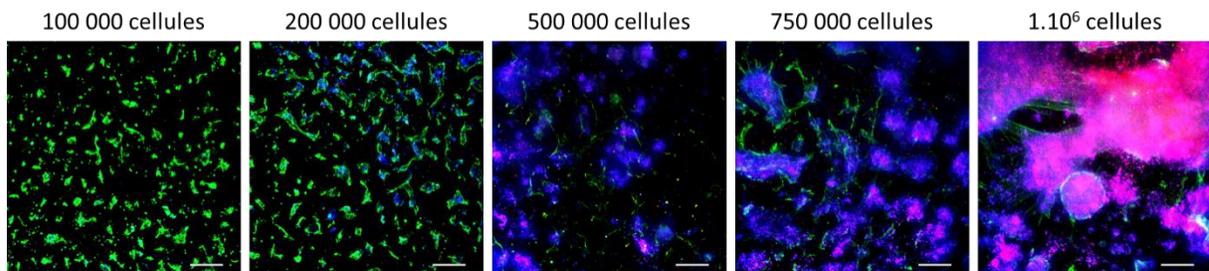


Figure 45 : Optimisation de la densité de cellules Luhmes à l'ensemencement dans BIOMIMESYS® Brain.

Cellules Luhmes différenciées cultivées dans BIOMIMESYS® Brain 0.1 kPa pendant 5 jours, en milieu de différenciation. Ensemencement dans 25 μ l. Microscopie à fluorescence automatisée à 5 jours. En bleu les noyaux (Hoechst), en rouge les cellules mortes marquées à l'iodure de propidium, et en vert TUBB3. Barre d'échelle = 200 μ m.

Deux modules élastiques de la matrice BIOMIMESYS® *Brain* ont été testés : 0.1 et 1kPa. Une différence dans l'organisation des cellules Luhmes a été observée en fonction du module d'élasticité. Dans la matrice de module d'élasticité 0.1 kPa, les cellules s'organisaient en grappes et formaient des neurites. Dans la matrice avec un module d'élasticité supérieur (1kPa), les cellules s'organisaient en sphéroïdes compacts, sans neurites extra-sphéroïdaux (Figure 46). La version BIOMIMESYS® *Brain* 0.1 kPa a été retenue pour la suite des expérimentations.

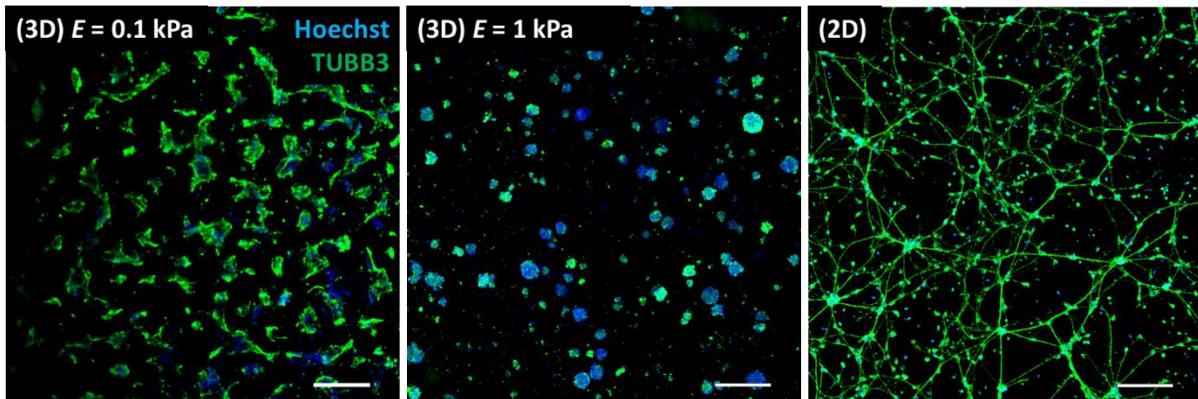


Figure 46 : Impact de l'élasticité du support sur l'organisation des cellules Lohmes.

Ensemencement 200 000 cellules/puits dans 25 μ l dans les hydroscaffolds™ BIOMIMESYS® Brain de modules élastiques 0.1 kPa et 1kPa; Ensemencement 40 000 cellules/puits en 2D). Microscopie à fluorescence automatisée à 5 jours. En bleu les noyaux (Hoechst) et en vert TUBB3. 2D : 2 Dimensions ; 3D : 3 Dimensions dans BIOMIMESYS® ; E : Elastique module. Barre d'échelle = 200 μ m.

Les cellules Lohmes ont pu être maintenues pendant une semaine dans BIOMIMESYS® Brain, indépendamment de la densité cellulaire utilisée (100 000 ou 200 000 cellules/puits). En effet, le marquage au DRAQ7 montrait une mortalité localisée uniquement dans les cellules isolées à J5. Le nombre de cellules marquées augmentait au cours du temps mais concernait toujours principalement les cellules isolées à J7. A J12, de nombreuses cellules mortes étaient marquées, y compris dans les amas cellulaires (Figure 47.A.). De plus, au-delà de 7 jours de culture, une perte des neurites a été observée, avec une diminution de l'intensité de TUBB3 (Figure 47.B.). En 2D, la répartition des cellules Lohmes était homogène à J5. A J7, les cellules commençaient à se regrouper. A J12, elles formaient de gros amas, entraînant des zones dépourvues de cellule, avec un marquage de TUBB3 bien plus faible qu'à J5 et J7. Le temps de maintien des cellules Lohmes dans BIOMIMESYS® Brain était ainsi équivalent au temps de maintien en culture 2D (Figure 47.C.).

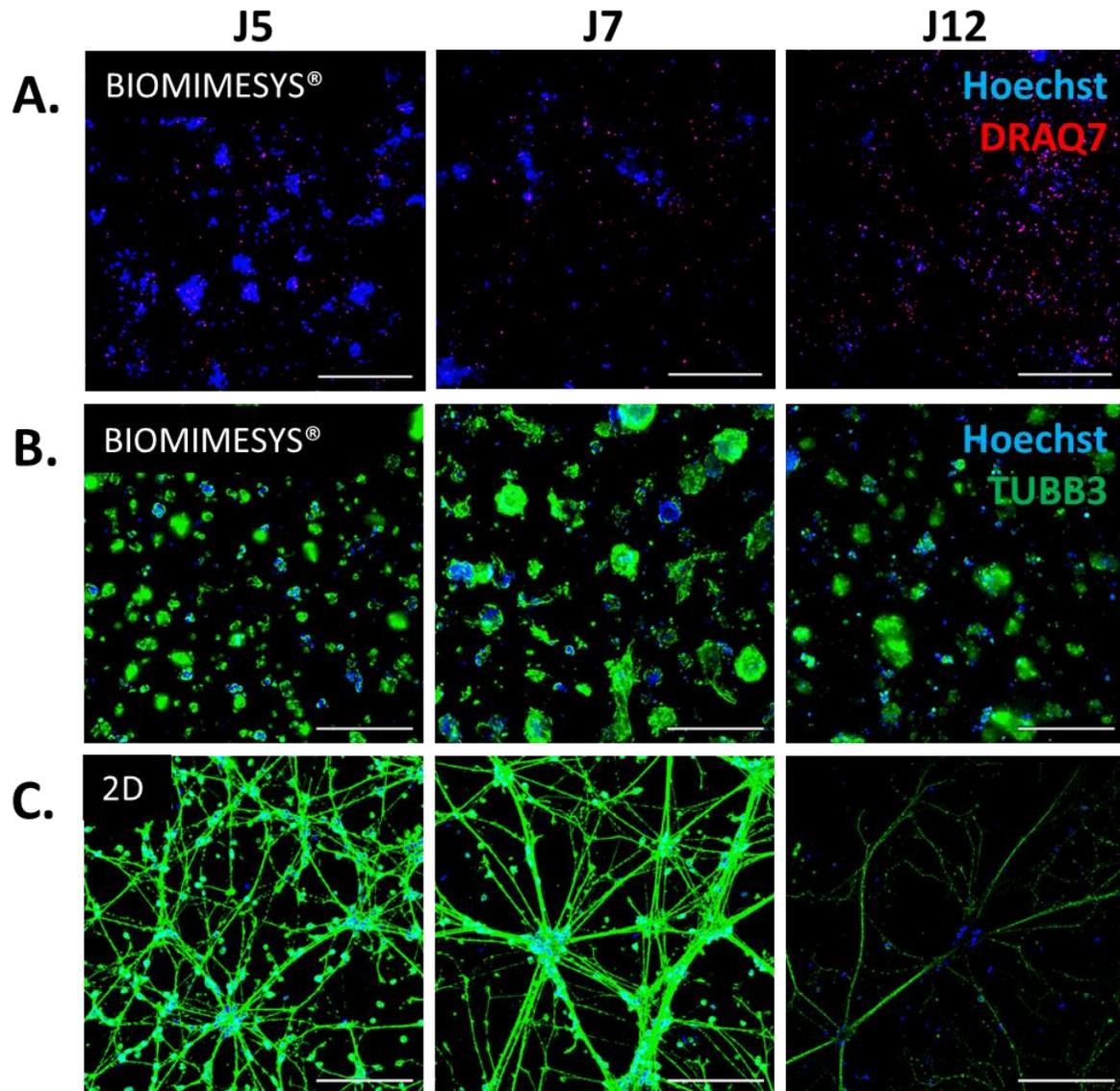


Figure 47 : Maintien des cellules Luhmes dans BIOMIMESYS® Brain.

A. Viabilité des cellules Luhmes dans BIOMIMESYS® Brain. Ensemencement 150 000 cellules/puits. Les noyaux ont été marqués au Hoechst (en bleu) et les cellules mortes ont été marquées au DRAQ7 (en rouge). **B.** Maintien du réseau neuronal dans BIOMIMESYS® Brain. Ensemencement 100 000 cellules/puits dans 20 μ l. Les cellules ont été marquées pour les noyaux (en bleu) et pour TUBB3 (en vert). **C.** Maintien des cellules Luhmes en culture en 2D. Les cellules ont été marquées pour les noyaux (en bleu) et pour TUBB3 (en vert). Microscopie à fluorescence après 5, 7 et 12 jours. 2D : 2 Dimensions. Barre d'échelle = 200 μ m.

Des essais ont également été réalisés en plaque BIOMIMESYS® Brain 384 puits. A l'intérieur, les cellules Luhmes étaient viables et formaient des neurites. C'est dans ce format qu'a été réalisé

le test suivant pour évaluer l'effet de l'exposition des cellules Luhmes aux iMP dans BIOMIMESYS® *Brain*.

2.2.2. Sensibilité des cellules Luhmes aux iMP en 2D vs BIOMIMESYS®

La sensibilité des cellules Luhmes aux iMP dans BIOMIMESYS® *Brain* a été comparée avec la sensibilité des cellules Luhmes cultivées en 2D. Six iMP ont été testés : la roténone, la 6-OHDA, l'érastine, le MPP+, le glutamate et le paraquat. Les 6 composés ont montré un effet toxique sur les cellules Luhmes, en 2D comme en 3D. Cependant, les cellules Luhmes étaient plus sensibles en 2D que dans BIOMIMESYS®, pour tous les composés testés, comme le montre les décalages dans les Concentrations Létales 50% (CL50), soit la concentration tuant 50% des cellules. Par exemple, l'exposition à la 6-OHDA entraînait une mortalité dépendante de la dose, avec une CL50 de 9.6 µM en 2D et 50.1 µM en 3D. La différence de sensibilité était particulièrement importante pour l'exposition à l'érastine, avec une CL50 de 0.1 µM en 2D ; dans BIOMIMESYS® *Brain*, la CL50 était trop élevée pour être déterminée dans ces conditions expérimentales (Figure 48).

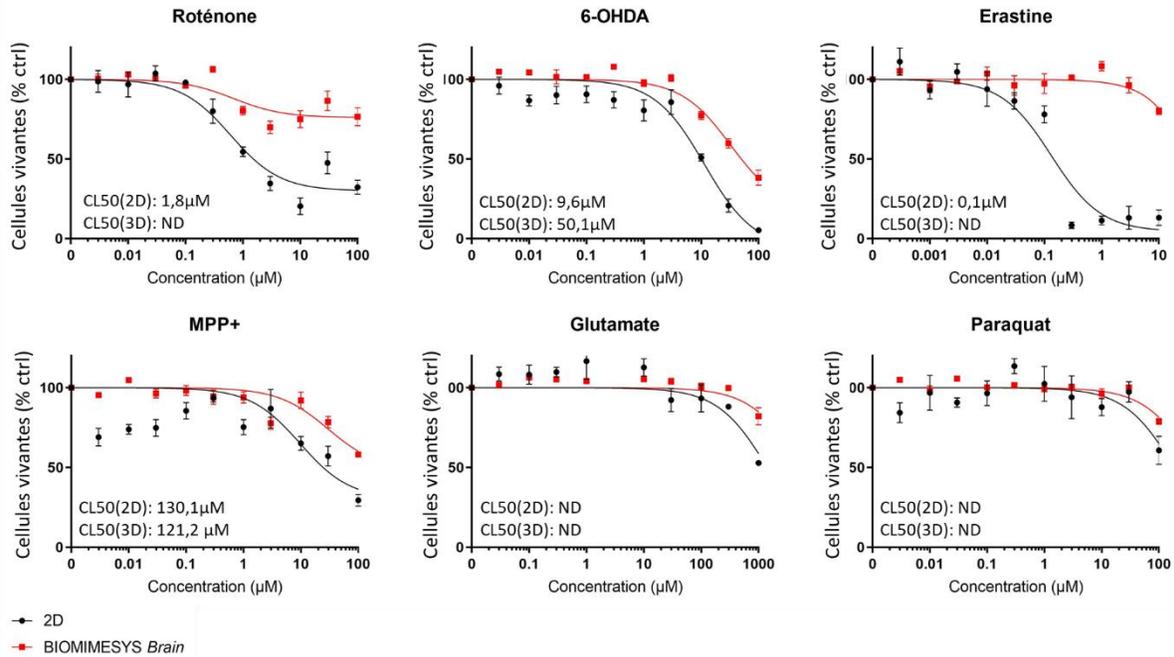


Figure 48 : Sensibilité des cellules Luhmes cultivées en 2 dimensions et en 3 dimensions dans BIOMIMESYS® Brain.

Viabilité des cellules Luhmes après 24h d'exposition à la Roténone, la 6-OHDA, l'érastine, le MPP+, le glutamate, et le paraquat) dans BIOMIMESYS® Brain format 384 puits. Mesure de la viabilité par analyse d'images quantitative automatisée (marquage des noyaux au Hoechst, marquage des cellules mortes à l'iodure de propidium). En 2D, le nombre de cellules vivantes par site d'acquisition a été normalisé par rapport au nombre de cellules vivantes par site d'acquisition dans les puits témoins sans iMP. En 3D, le pourcentage de cellules vivantes par site d'acquisition sur la projection 2D a été normalisé par rapport au pourcentage de cellules vivantes par site d'acquisition dans les puits témoins sans iMP, sur la projection 2D. 2D : 2 Dimensions ; CL50 : Concentration Létale 50% ; Ctrl : Contrôle ; ND : Non Déterminée ; iMP : Inducteurs de la Maladie de Parkinson ; 6-OHDA : 6-Hydroxydopamine. n=4. Les barres d'erreur représentent les SEM.

Cette différence de sensibilité observée entre les cellules cultivées en 2D et celles cultivées dans BIOMIMESYS® Brain peut être expliquée par un effet de la matrice sur la disponibilité des iMP ou sur l'expression de protéines impliquées dans la réponse neuronale.

2.2.3. Impact de la matrice sur la disponibilité des molécules

Suite à la différence de sensibilité observée entre les cellules Luhmes cultivées en 2D et celles cultivées en 3D dans BIOMIMESYS® Brain, l'hypothèse de l'impact de la matrice sur la diffusion et

la disponibilité des iMP a été posée, en particulier pour l'érastine qui a présenté la différence la plus importante entre les conditions 2D et 3D. Un test visant à étudier la rétention des molécules dans la matrice a donc été réalisé. Pour cela, l'érastine a été pré-incubée dans la matrice BIOMIMESYS® Brain en l'absence de cellules. Ensuite, le milieu a été récupéré et appliqué sur des cellules Luhmes cultivées en 2D. Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus avec les cellules Luhmes exposées directement à l'érastine (sans pré-incubation), en 2D et dans BIOMIMESYS® Brain.

Les résultats montraient une mortalité plus importante chez les cellules Luhmes cultivées en 2D et exposées directement à l'érastine (CL50 = 0,06 µM), que celles en 2D exposées à l'érastine ayant été pré-incubées dans la matrice BIOMIMESYS® Brain (CL50 = 0,21 µM) (Figure 49). Cela montrait que la matrice avait retenu une fraction de l'érastine. Cependant, la toxicité restait bien plus importante que sur les cellules Luhmes cultivées dans BIOMIMESYS® Brain et exposées directement à l'érastine (CL50 non déterminable dans ces conditions expérimentales) (Figure 49).

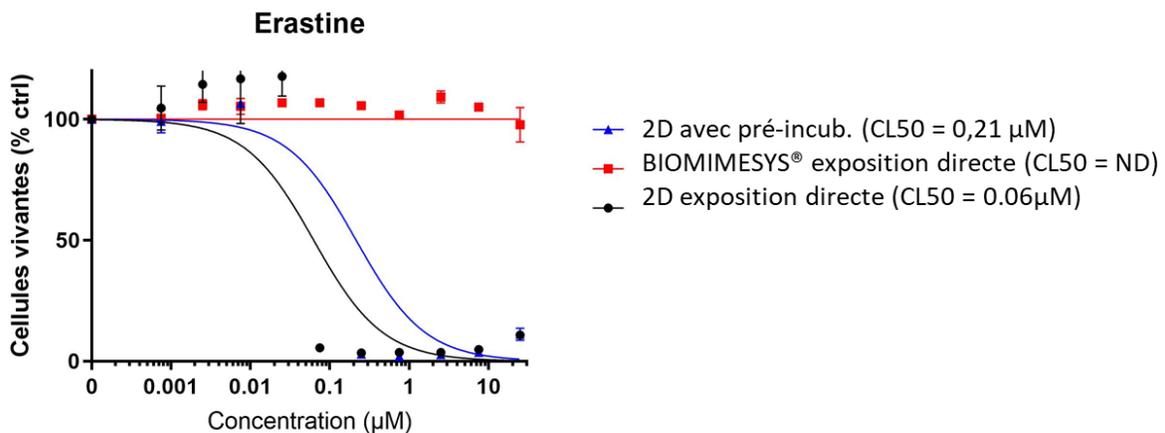


Figure 49 : Influence de la matrice BIOMIMESYS® Brain sur l'effet de l'érastine sur les cellules Luhmes.

Viabilité des cellules Luhmes après 48h d'exposition à l'érastine. Mesure de la viabilité par analyse d'images quantitative automatisée (marquage des noyaux au Hoechst, marquage des cellules mortes au DRAQ7). En 2D, le nombre de cellules vivantes par site d'acquisition a été normalisé par rapport au nombre de cellules vivantes par site d'acquisition dans les puits témoins sans érastine. En 3D, le pourcentage de cellules vivantes par site d'acquisition a été normalisé par rapport au pourcentage de cellules vivantes par site d'acquisition dans les puits témoins sans érastine (analyse de la projection 2D). 2D : 2 Dimensions ; CL50 : Concentration Létale 50% ; Ctrl : Contrôle ; ND : Non Déterminée. n=2. Les barres d'erreur représentent les SEM.

La matrice a donc un impact sur la diffusion des molécules, mais qui n'explique pas toute la différence de sensibilité entre les cellules Lühmes cultivées en 2D et celles cultivées dans BIOMIMESYS® *Brain*.

2.2.4. *Maturité des cellules Lühmes dans BIOMIMESYS® Brain*

2.2.4.1. *Analyse de la maturité neuronale et dopaminergique*

La rétention des molécules dans la matrice n'expliquant pas entièrement la différence de sensibilité observée entre les cellules Lühmes cultivées en 2D et celles cultivées dans BIOMIMESYS® *Brain*, la question de la maturité neuronale et plus particulièrement de la maturité dopaminergique des cellules Lühmes en 3D s'est posée. Les expressions de NeuN et de la TH ont donc été analysées. La comparaison de l'intensité des marquages des marqueurs neuronaux entre une culture 2D et une culture 3D est délicate, du fait des différences dans les techniques d'imagerie. Par conséquent, les pourcentages de cellules positives à la TH ont préférentiellement été comparés, en ajustant le seuil d'intensité des cellules non différenciées en 3D à celui des cellules non différenciées en 2D.

En 2D, les cellules Lühmes différenciées ont été analysées à J3, jour auquel les marqueurs atteignaient déjà leur maximum (soit 5 jours après la mise en milieu de différenciation, du fait de la prédifférenciation de 2 jours en flasques). Cependant, dans BIOMIMESYS® *Brain*, elles ne présentaient pas encore d'augmentation dans l'expression des marqueurs de différenciation à J3, et ont donc été analysées à J5 (soit 7 jours après la mise en milieu de différenciation).

NeuN n'était pas détectable dans les cellules Lühmes non différenciées, que ce soit en 2D ou en 3D. En revanche, les immunomarquages montrent une localisation nucléaire de la protéine dans les cellules différenciées, en 2D et en 3D (Figure 50. A.). La quantification a montré que 80% des cellules Lühmes différenciées cultivées en 2D exprimaient NeuN, contre 22% dans BIOMIMESYS® *Brain*, selon le seuil fixé (Figure 50.B.).

Concernant la TH, elle était détectable dans les corps cellulaires des cellules Lühmes non différenciées et différenciées, ainsi que dans les neurites des cellules Lühmes différenciées (Figure

50.C.). Environ 20% des cellules non différenciées exprimaient cette protéine en 2D et en 3D dans BIOMIMESYS® Brain. Après différenciation en 2D, 85% des cellules Luhmes exprimaient la TH, contre seulement 46% dans BIOMIMESYS® Brain (Figure 50.D.).

Un test ELISA a été réalisé et a confirmé une expression plus faible de la TH dans les cellules Luhmes différenciées cultivées dans BIOMIMESYS® Brain par rapport à celles différenciées cultivées en 2D (Figure 50. E.).

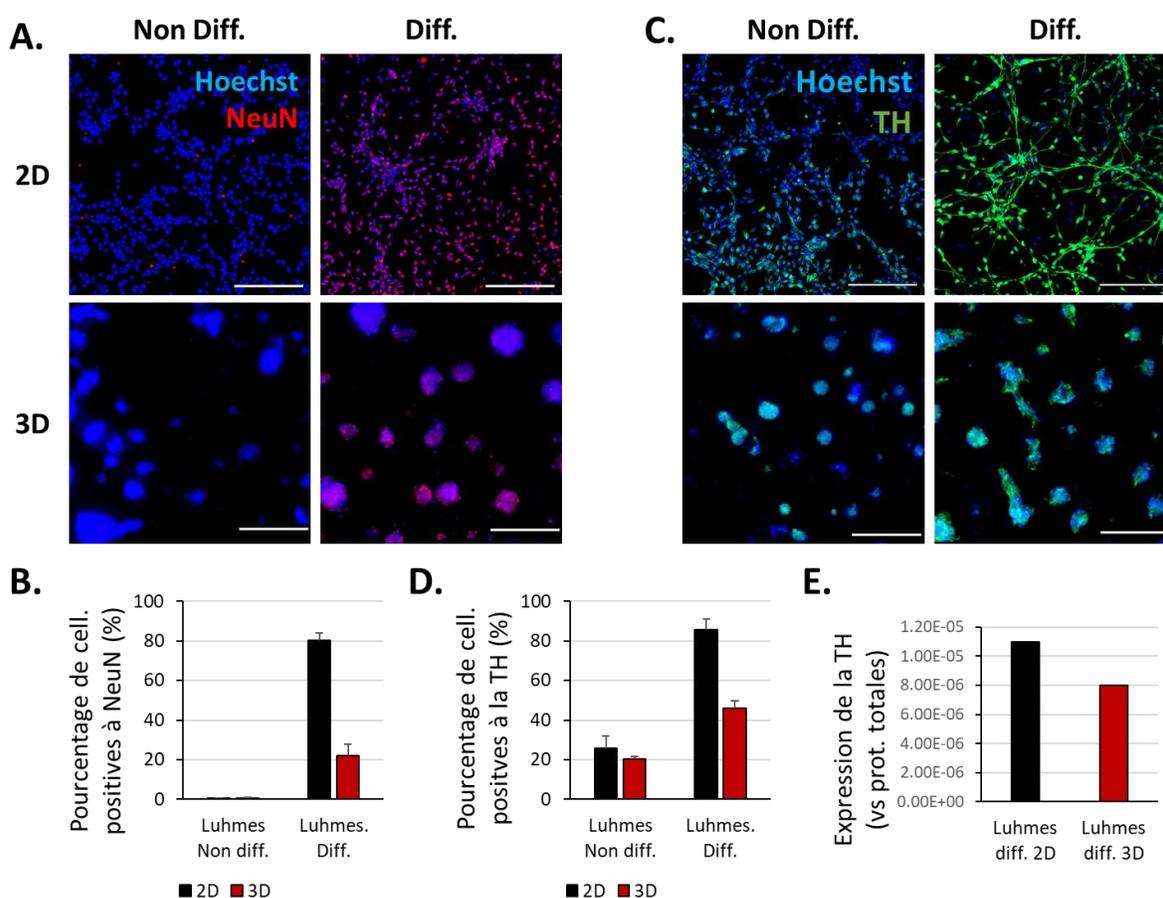


Figure 50 : Maturation neuronale et dopaminergique des cellules Luhmes en 2 dimensions et dans BIOMIMESYS® Brain.

A. Localisation cellulaire de NeuN. Les cellules ont été marquées pour les noyaux au Hoechst (en bleu) et pour NeuN (en rouge). **B.** Analyse quantitative de l'immunomarquage de NeuN. $n=4$. **C.** Localisation cellulaire de la TH. Les cellules ont été marquées pour les noyaux au Hoechst (en bleu) et pour la TH (en vert). **D.** Analyse quantitative de l'immunomarquage de la TH. $n=4$. **E.** Quantification de l'expression de la TH par test ELISA. La quantité de TH dosée a été normalisée par la quantité de protéines totales. $n=1$. Sur les images, les barres d'échelle représentent $200\ \mu\text{m}$. Sur les graphes, les barres d'erreur représentent les SEM. 2D : 2 Dimensions ; 3D : 3 Dimensions dans BIOMIMESYS® Brain ; Cell. : Cellules ; Diff. : Différenciées ; Prot. : Protéine ; TH : Tyrosine Hydroxylase.

2.2.4.2. *Optimisation de la composition du milieu de différenciation*

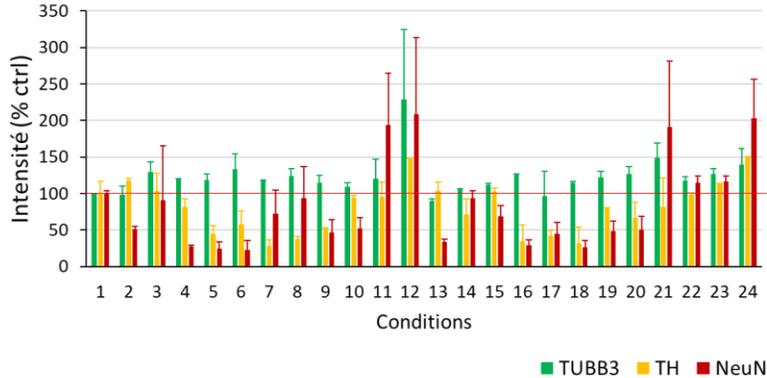
Les cellules Luhmes étant moins matures dans BIOMIMESYS® *Brain qu'en* 2D en utilisant la même méthode de différenciation, un test d'optimisation de la composition du milieu de différenciation a été réalisé. Pour cela, plusieurs concentrations des 4 facteurs présents dans le milieu utilisé pour la différenciation en 2D des cellules Luhmes ont été testées dans BIOMIMESYS® *Brain*, selon 23 combinaisons différentes (Figure 51.A.). Les expressions de TUBB3, TH et NeuN ont été analysées dans ces différentes conditions par l'analyse de l'intensité de l'immunomarquage.

Tout d'abord, les 23 milieux ont été criblés (n=2), en comparaison avec le milieu de différenciation initial (condition 1). Parmi ces conditions, les conditions 12 (concentrations de N2 et d'AMPc multipliées par 2) et 24 (concentrations d'AMPc, de tétracycline, et de GDNF multipliées par 1,5) ont montré une augmentation particulièrement importante de l'intensité du marquage des 3 protéines d'intérêt (Figure 51.B.). Ces conditions ont été de nouveau testées pour validation en augmentant le nombre de répétitions (n=4). Aucune augmentation de l'expression de la TH et de NeuN n'a été confirmée, ces conditions n'ont donc pas été validées pour l'amélioration de la maturité des cellules Luhmes cultivées dans BIOMIMESYS® *Brain* (Figure 51.C.).

A.

Milieu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
N2	1X	1,5X	2X	3X	2X	2X	2X	1X	1X	1X	1X	2X	2X	2X	1X	1X	1X	1X	1X	2X	2X	2X	1X	1X
AMPC	1X	1,5X	2X	3X	2X	3X	1X	2X	1X	1X	1X	2X	1X	1X	2X	2X	1X	1X	3X	2X	2X	1X	3X	1,5X
tétra	1X	1,5X	2X	3X	3X	3X	1X	1X	2X	1X	3X	1X	2X	1X	2X	1X	2X	3X	3X	2X	1X	2X	3X	1,5X
GDNF	1X	1,5X	2X	3X	2X	3X	1X	1X	1X	2X	1X	1X	1X	2X	1X	2X	2X	3X	1X	1X	2X	2X	3X	1,5X

B.



C.

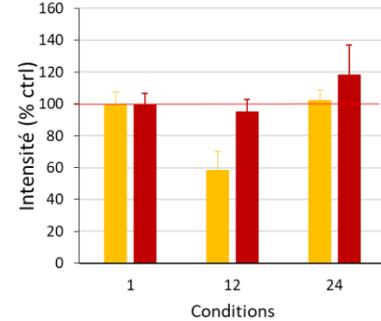


Figure 51 : Optimisation des concentrations en facteurs de différenciation pour l'amélioration de la maturité neuronales des cellules Luhmes dans BIOMIMESYS® Brain.

A. Tableau récapitulatif des conditions testées. B. Analyse quantitative des intensités des immunomarquages pour TUBB3, NeuN et TH dans les 23 conditions criblées. $n=2$. C. Analyse quantitative des intensités des immunomarquages pour NeuN et TH dans les deux conditions sélectionnées lors du criblage. $n=4$. Les intensités ont été normalisées par rapport aux intensités des cellules Luhmes dans le milieu de différenciation non modifié (condition 1). Les barres d'erreur représentent les SEM. AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique ; Ctrl : Contrôle ; GDNF : Glial Cell Derived Neurotrophic Factor ; tétra : tétracycline. TH : Tyrosine Hydroxylase.

2.2.4.3. Effet d'un antiprolifératif

L'ajustement des concentrations des facteurs présents dans le milieu de différenciation des cellules Luhmes initial n'ayant pas suffi à améliorer la maturité des cellules Luhmes, un antiprolifératif, le taxol, a été testé. Il a été ajouté dans le milieu après 3 jours de culture, à la concentration de 10nM. Deux conditions ont été testées, avec et sans prédifférenciation des cellules Luhmes en flasque pendant 2 jours avant ensemencement en plaque, selon le protocole initial et selon le protocole utilisé par Smirnova *et al.* (Smirnova *et al.*, 2016).

L'analyse de la viabilité montre une faible mortalité dans les 3 conditions à J5, avec une mortalité concernant principalement les cellules isolées. A J7, une augmentation de la mortalité était observée en présence de taxol, y compris pour les cellules non isolées, avec moins de 50% de cellules vivantes, contre 73% dans le témoin sans taxol. A J10, la mortalité était très importante dans toutes les conditions testées, avec une augmentation du nombre de cellules isolées (Figure 52.A et C.).

L'intensité du marquage de la TH n'était pas significativement augmentée en présence de taxol par rapport au milieu de différenciation sans taxol, ni à J5 ni à J7 ($p\text{-value}_{\text{Ctrl.J7/Non prédiff.J7}} = 0.259$) (Figure 52.B. et C.).

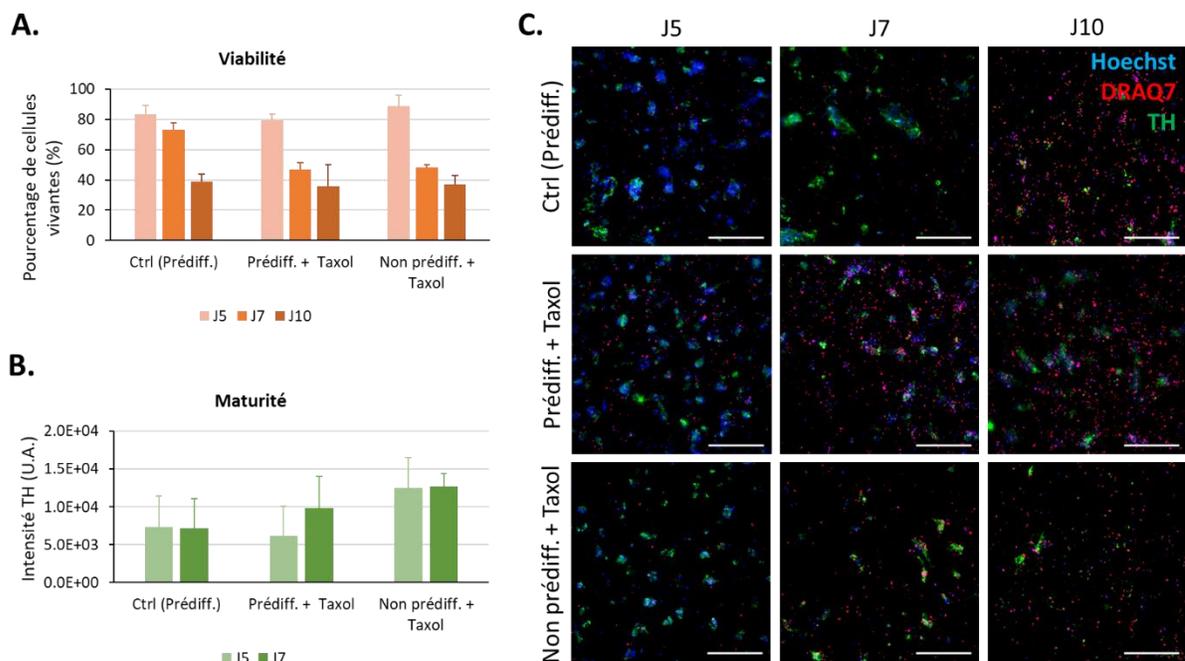


Figure 52 : Effet du taxol sur la viabilité et la maturité des cellules Luhmes dans BIOMIMESYS® Brain.

A. Analyse quantitative de l'intensité du marqueur de mortalité DRAQ7. **B.** Analyse quantitative de l'intensité de l'immunomarquage de la TH. Les barres d'erreur représentent les SEM. **C.** Visualisation des cellules mortes (marquées au DRAQ7, en rouge) par rapport aux cellules totales (marquées au Hoechst, en bleu), et localisation cellulaire de la TH (en vert). Barre d'échelle=200 μm . Ctrl : Contrôle. J : Jour. Prédif. : Prédifférenciation. TH : Tyrosine Hydroxylase. U.A. : Unité Arbitraire.

2.3. Impact du microenvironnement cellulaire : co-culture de cellules neuronales et d'astrocytes

2.3.1. En culture en 2D

2.3.1.1. Mise au point de la co-culture en 2D

La neuroinflammation impliquant les cellules gliales étant un des mécanismes majeurs dans les maladies neurodégénératives, les cellules Luhmes ont été co-cultivées avec des astrocytes primaires humains, dans l'objectif d'évaluer l'effet des astrocytes sur la réponse neuronale.

La co-culture a tout d'abord été mise au point en 2D. Elle a été réalisée en deux temps d'ensemencement, c'est-à-dire avec un ensemencement des astrocytes dans un premier temps, suivi d'un ensemencement des cellules Luhmes 2 jours après. L'imagerie à fluorescence a montré que les cellules Luhmes avaient majoritairement adhéré au niveau des astrocytes (Figure 53).

Des astrocytes témoins ont été cultivés en monoculture, dans leur milieu spécifique ou dans le milieu de différenciation des cellules Luhmes (mis en milieu spécifique des cellules Luhmes 2 jours après ensemencement). La culture d'astrocytes primaires présentait une part importante de cellules non astrocytaires (n'exprimant pas la GFAP). Curieusement, le nombre de ces cellules non-astrocytaires était visuellement bien moins important lorsque les cellules étaient cultivées après J2 en milieu spécifique des cellules Luhmes (Figure 53).

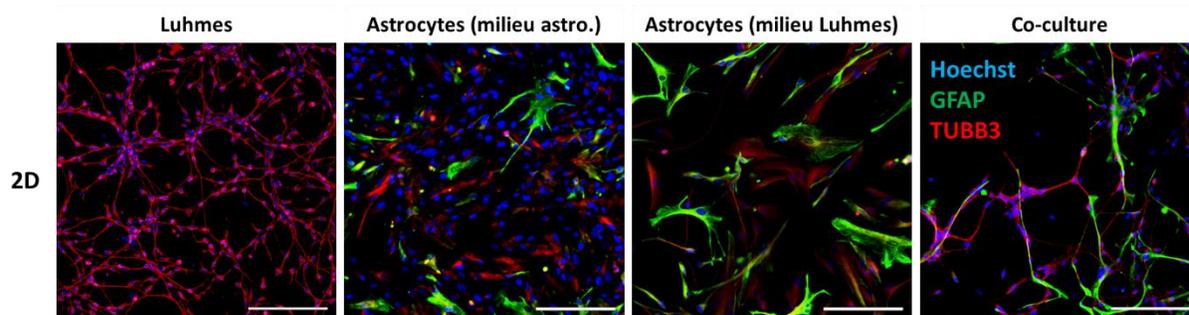


Figure 53 : Co-culture de cellules Luhmes et d'astrocytes primaires en 2 dimensions.

Les cellules ont été fixées après 3 jours de co-culture. Elles ont été marquées pour les noyaux au Hoechst (en bleu), pour TUBB3 en tant que marqueur neuronal (en rouge) et pour la GFAP en tant que marqueur astrocytaire (en vert). 2D : 2 Dimensions ; GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein. Barre d'échelle=200 μ m.

Le milieu spécifique pour la culture des astrocytes (sans cellules) a aussi été incubé dans les puits préalablement recouverts avec de la PLO et à la fibronectine. Deux jours après, le milieu a été retiré et les cellules Luhmes ont étéensemencées de manière similaire au protocole de coculture. Les cellules Luhmes ainsi cultivées n'ont pas adhéré au support de culture, contrairement aux cellules Luhmes cultivées en présence d'astrocytes, ou en monoculture avec ensemencement immédiatement après le recouvrement du support avec de la PLO et de la fibronectine, montrant un effet des astrocytes sur l'adhésion cellulaire.

2.3.1.2. *Effet de la présence d'astrocytes sur la sensibilité des cellules Luhmes en 2D*

Tout d'abord, la réponse des astrocytes seuls aux iMP a été étudiée en monoculture, en analysant la viabilité des cellules exprimant la GFAP, afin de ne pas comptabiliser les cellules non-astrocytaires. La roténone et l'érastine n'ont pas montré d'effet toxique sur les astrocytes. Un effet toxique de la 6-OHDA a pu être observé à la plus forte concentration uniquement (100 μM) (Figure 54.A.). Ces cellules étaient donc peu sensibles aux IMP, contrairement aux cellules Luhmes.

En coculture, les cellules Luhmes et les astrocytes étant superposés, l'attribution d'un noyau mort à une cellule Luhmes ou à un astrocyte était délicate. La sensibilité des cellules Luhmes aux iMP a donc été estimée par l'analyse de la longueur de neurites, dont la diminution est un marqueur de toxicité neuronale. L'exposition à la roténone a entraîné une diminution de la longueur des neurites de manière similaire entre les cellules Luhmes cultivées seules et celles cultivées avec les astrocytes ($\text{CL}_{50}=0.01 \mu\text{M}$ pour les cellules Luhmes seules ou en coculture avec les astrocytes). En revanche, la 6-OHDA et l'érastine ont entraîné une diminution de la longueur totale des neurites moins prononcée chez les cellules Luhmes cultivées avec les astrocytes que chez les cellules Luhmes en monoculture ($\text{CL}_{50_{6\text{-OHDA}}(\text{Luhmes})}=12,6 \mu\text{M}$; $\text{CL}_{50_{6\text{-OHDA}}(\text{co-culture})}=62,6 \mu\text{M}$; $\text{CL}_{50_{\text{érasatine}}(\text{Luhmes})}=0,01$; $\text{CL}_{50_{\text{érasatine}}(\text{co-culture})}=5,0 \mu\text{M}$) (Figure 54.B.).

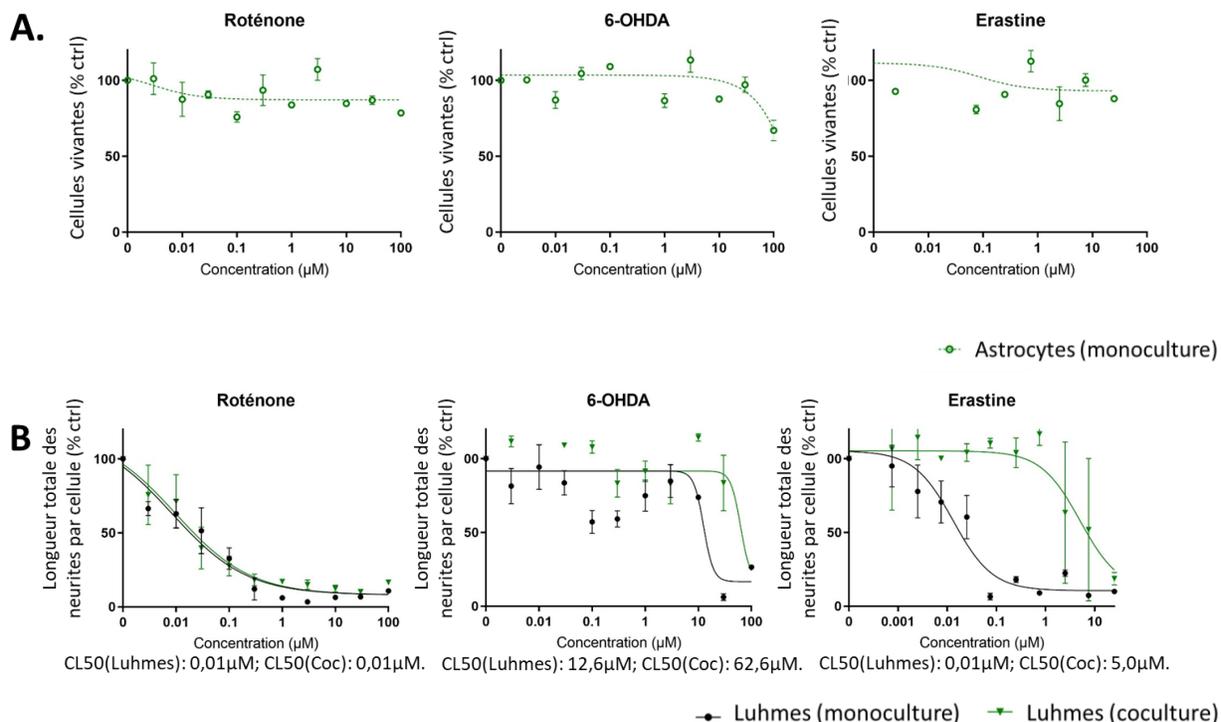


Figure 54 : Effet de la présence des astrocytes sur la sensibilité des cellules Luhmes aux inducteurs de la maladie de Parkinson.

A. Viabilité des astrocytes après 48h d'exposition à la rotenone, la 6-OHDA et l'érastine, en monoculture. Le nombre de cellules vivantes et exprimant la GFAP par site d'acquisition a été normalisé par rapport au nombre de cellules vivantes et exprimant la GFAP par site d'acquisition dans les témoins sans iMP. **B.** Longueur des neurites des cellules Luhmes cultivées en monoculture ou en co-culture avec des astrocytes primaires humains. Visualisation des neurites par marquage de TUBB3. La longueur totale des neurites par cellule a été normalisée par rapport à la longueur totale des neurites des cellules Luhmes dans les puits témoins sans iMP. CL50 : Concentration Létale 50%. Coc : Co-culture. Ctrl : Contrôle. 6-OHDA : 6-Hydroxydopamine. iMP : inducteurs de la Maladie de Parkinson. Les barres d'erreur représentent les SEM.

2.3.2. Co-culture en 3D dans BIOMIMESYS®

2.3.2.1. Mise au point de la co-culture en 3D

La co-culture des cellules Luhmes et des astrocytes a ensuite été mise au point dans l'*hydroscaffold*[™] BIOMIMESYS® Brain. Tout d'abord, la culture des astrocytes primaires humains seuls a été testée dans la matrice. Les astrocytes exprimaient la GFAP et formaient des amas peu denses. Ils ont pu être maintenus en culture 21 jours, à des densités comprises entre 20 000 et 80 000 cellules par puits (Figure 55).

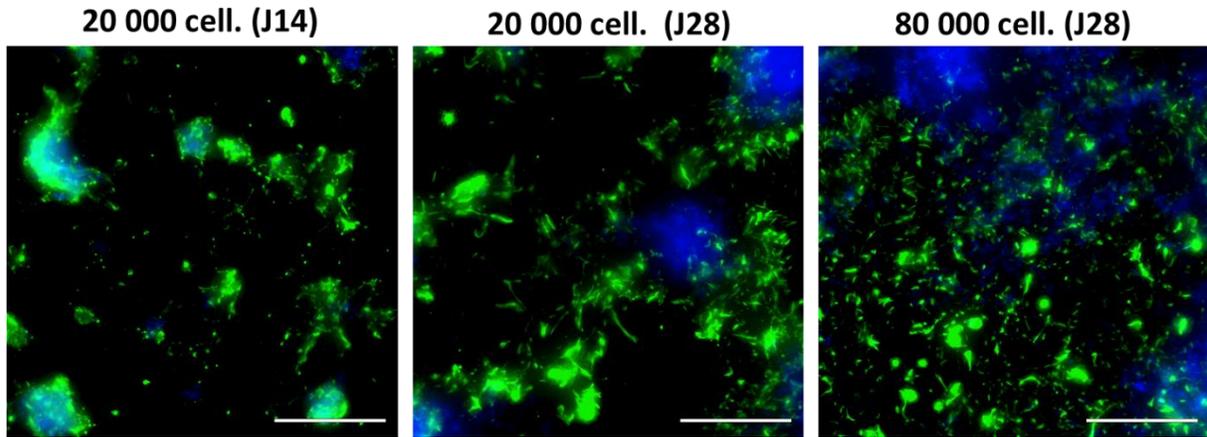


Figure 55 : Culture d'astrocytes primaires dans BIOMIMESYS® Brain.

Ensemencement 20 000 cellules et 80 000 cellules par puits, dans 30 μ l. Fixation après 14 et 28 jours de culture. Microscopie à fluorescence automatisée. En bleu les noyaux (Hoechst) et en vert la GFAP. Cell. : Cellules ; GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein. Barre d'échelle = 200 μ m.

La co-culture de cellules Lühmes et d'astrocytes primaires humains a ensuite été mise au point dans BIOMIMESYS® Brain. L'ensemencement des Lühmes dans un faible volume (15 μ l) a permis aux cellules de pénétrer dans l'*hydroscaffold*[™] pourtant préalablement hydraté par la culture d'astrocytes. Les cellules Lühmes et les astrocytes se sont regroupés ensemble en sphéroïdes (Figure 56).

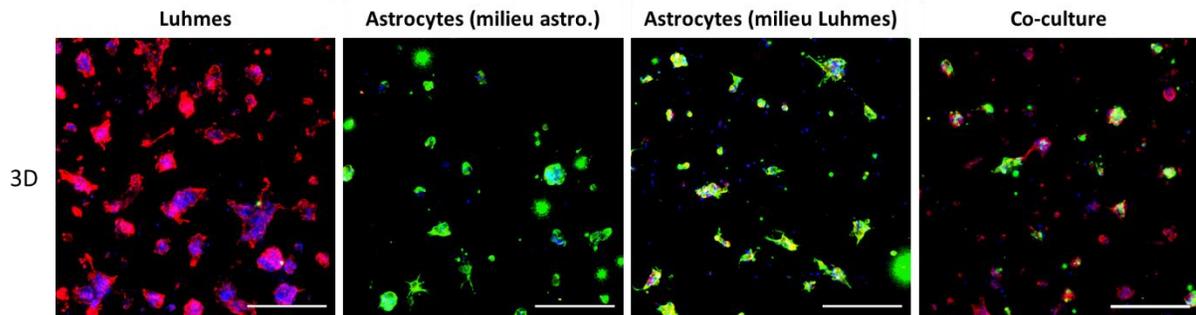


Figure 56 : Co-culture des cellules Lühmes et des astrocytes dans BIOMIMESYS® Brain.

Les cellules ont été fixées et immunomarquées après 3 jours de co-culture. Elles ont été marquées pour les noyaux au Hoechst (en bleu), pour TUBB3 en tant que marqueur neuronal (en rouge) et pour la GFAP en tant que marqueur astrocytaire (en vert). Astro. : Astrocytes ; GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein. Barre d'échelle=200 μ m.

2.3.2.2. Effet des astrocytes sur la viabilité et la différenciation des cellules Luhmes

Les astrocytes pouvant sécréter des molécules de la MEC et libérer des facteurs trophiques impactant les neurones, l'effet des astrocytes sur la viabilité et l'expression de la TH par les cellules Luhmes dans BIOMIMESYS® Brain a été analysée.

Cependant, aucun allongement de la viabilité n'a été observée, avec un maintien des cellules Luhmes en vie dans BIOMIMESYS® Brain pendant 7 jours, en présence comme en absence d'astrocytes (Figure 57.A.). De même, aucune augmentation de l'expression de la TH n'a été observée (Figure 57.B. et C.).

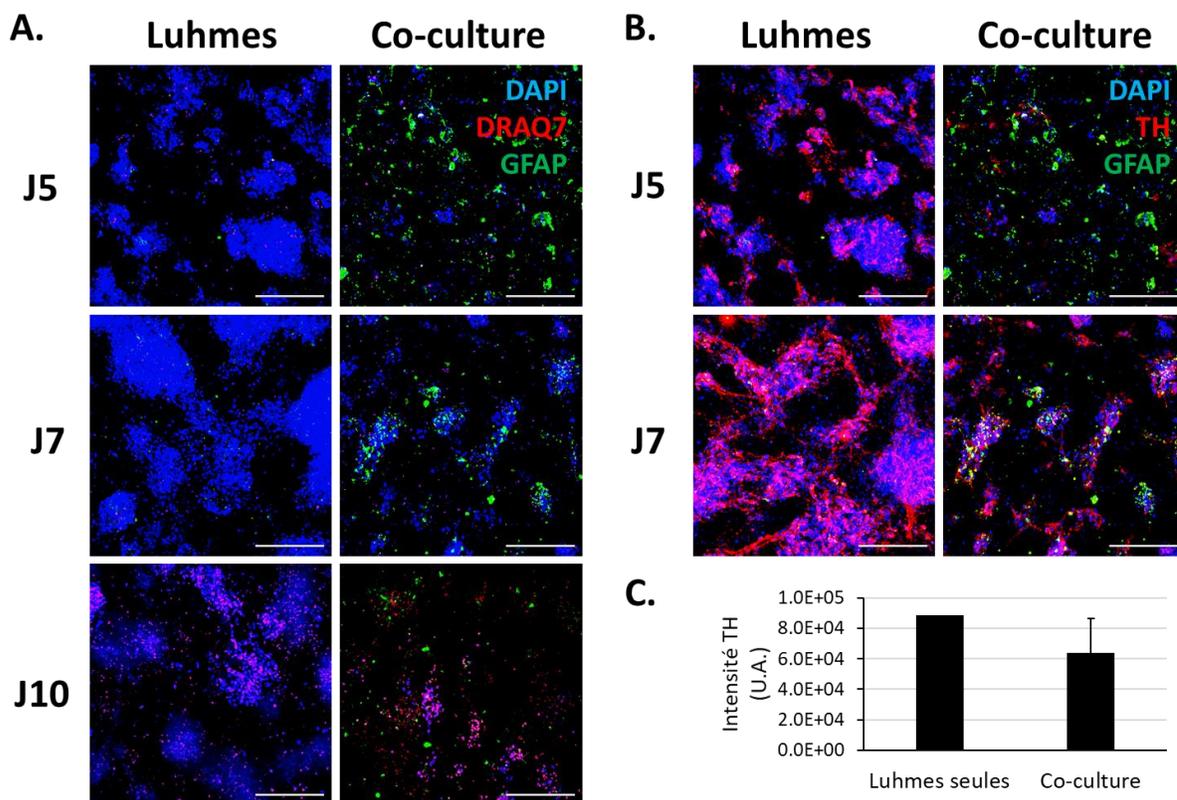


Figure 57 : Impact des astrocytes sur la viabilité et la maturité des cellules Luhmes dans BIOMIMESYS® Brain.

A. Viabilité des cellules. Les cellules ont été marquées pour les noyaux au Hoechst (en bleu) et pour la GFAP comme marqueur astrocytaire (en vert), et les cellules mortes ont été marquées au DRAQ7 (en rouge). **B.** Maturité des cellules Luhmes. Les cellules ont été marquées pour les noyaux au Hoechst (en bleu), pour la GFAP comme marqueur astrocytaire (en vert), et pour la TH (en rouge). Barre d'échelle=200 μ m. **C.** Quantification de l'expression de la TH (intensité de l'immunomarquage) à J7. $n=1$ pour les cellules Luhmes en monoculture, $n=3$ pour la co-culture. GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein ; J : Jour ; TH=Tyrosine Hydroxylase ; U.A. : Unité Arbitraire.

3. Discussion intermédiaire

Faisant suite au criblage phénotypique qui avait été réalisé sur une lignée neuronale cultivée en 2D pour identifier des molécules protectrices contre la maladie de Parkinson, ces travaux avaient pour objectif d'améliorer la pertinence physiologique du modèle en incluant des éléments présents dans le SNC *in vivo* et connus pour leur implication dans le fonctionnement neuronal : la matrice extracellulaire et les cellules gliales. Ces travaux ont ainsi permis d'étudier des effets du microenvironnement matriciel et cellulaire dans un modèle cérébral *in vitro* de la maladie de Parkinson.

Tout d'abord, ce travail a permis de développer une matrice pour la culture en 3D des cellules cérébrales, adaptée aux lignées cellulaires comme les cellules Luhmes, et aux cellules primaires comme les astrocytes humains. Cette matrice est synthétisée avec des composants de la MEC (AH, RGDS, collagène IV) et est compatible avec le développement de modèles *in vitro* sans composés d'origine animale. De plus, elle est exploitable à l'échelle industrielle. L'élasticité de la matrice BIOMIMESYS® est modulable, et a été fixée à 0,1 kPa pour BIOMIMESYS® *Brain*, soit le module d'élasticité de la MEC cérébrale humaine (Barnes et al., 2017; Butcher et al., 2009). Cela permettait une organisation des cellules Luhmes en amas cellulaires, présentant des neurites, et non en sphéroïdes compacts comme dans beaucoup de systèmes de culture en 3D. Les cellules Luhmes pouvaient être ainsi maintenues en culture pendant une semaine. La matrice BIOMIMESYS® *Brain* a été développée en plaques 96 puits, format actuellement commercialisé par HCS Pharma. Dans l'objectif de développer un modèle utilisable pour le criblage à haut débit, la matrice BIOMIMESYS® *Brain* a aussi été produite dans des plaques au format 384 puits. Cependant, la viscosité du gel augmente les erreurs de pipetages, ce qui peut fortement impacter les petits volumes comme ceux utilisés en plaques 384 puits. Des hétérogénéités de matrice entre les puits étaient en effet observées, en particulier lors du remplissage des plaques de manière automatisée. Des ajustements dans les concentrations d'AH et dans les volumes utilisés ont permis de réduire cette hétérogénéité, mais la production à l'échelle industrielle des plaques BIOMIMESYS® *Brain* en format 384 puits est toujours en cours de développement à ce jour.

L'*hydroscaffold*[™] BIOMIMESYS[®] *Brain* ainsi développé a ensuite pu être utilisé pour évaluer l'impact de la matrice sur la réponse des cellules LHMes aux IMP. Une sensibilité moins importante a été observée chez les cellules cultivées dans BIOMIMESYS[®] *Brain* par rapport à celles cultivées en 2D, comme cela est fréquemment décrit pour les modèles 3D dans la littérature, y compris pour les modèles en 3D cérébraux (Kapałczyńska *et al.*, 2018; Langhans, 2018; Ko *et al.*, 2020). La première hypothèse pour expliquer ce phénomène était que la matrice interagissait avec les molécules, ici les IMP, modifiant ainsi leur biodisponibilité, comme dans les organes *in vivo* (Kihara *et al.*, 2013; Stylianopoulos *et al.*, 2010). Un test permettant d'estimer la rétention des molécules dans la matrice a été donc réalisé, en particulier sur l'érastine qui avait montré la plus importante différence de mortalité entre les cellules LHMes cultivées en 2D et celles cultivées dans BIOMIMESYS[®] *Brain*. Les résultats ont montré qu'une fraction de l'érastine était effectivement retenue dans la matrice, mais n'expliquait pas la totalité de la différence observée.

Cela a conduit à une deuxième hypothèse, qui était que l'expression protéique, et plus précisément la maturité neuronale, différait entre les cellules LHMes cultivées en 2D et celles cultivées dans BIOMIMESYS[®] *Brain*. La maturité des cellules LHMes a donc été vérifiée, avec l'analyse de l'expression de NeuN et de la TH. Les résultats ont montré une maturité inférieure chez les cellules LHMes cultivées dans BIOMIMESYS[®] *Brain* en comparaison avec celles cultivées en 2D. Plusieurs phénomènes peuvent expliquer ce fait. Tout d'abord, la matrice impactant la diffusion des molécules toxiques, il est également possible qu'elle impacte la diffusion des facteurs de différenciation utilisés. De plus, le nombre de cellulesensemencées dans un puits en 3D est environ 4 fois supérieur au nombre de cellulesensemencées en 2D du fait de l'espace tridimensionnel qui augmente la surface de culture pour les cellules, ce qui peut modifier la réponse cellulaire. Enfin, la diffusion des facteurs et leur disponibilité pour les cellules peuvent aussi être impactées par l'organisation des cellules en amas, avec un accès aux facteurs variable entre les cellules situées au centre des amas cellulaires et celles situées plus en surface, ce qui est également valable pour les molécules toxiques.

Cette différenciation neuronale moins importante en 3D qu'en 2D avait également été décrite par Smirnova *et al.* en 2016. Les auteurs avaient constaté une prolifération chez les LHMes cultivées en 3D en suivant le même protocole de différenciation qu'en 2D. Pour limiter ce

phénomène, ils avaient ajouté au milieu de différenciation un antiprolifératif, le taxol. Cela avait permis de ralentir la prolifération cellulaire, avec une moindre augmentation du diamètre des sphéroïdes, et une diminution de l'expression du marqueur de prolifération Ki67, et du marqueur de précurseurs neuronaux nestine. En parallèle, une augmentation de l'expression des marqueurs de maturité neuronale avait été observée, dont celle la TH, de manière légèrement supérieure à la 2D. Cependant, le taxol pourrait interférer avec les molécules lors de tests d'évaluation de composés. Pour cette raison, en première intention, des tests d'optimisation de la concentration des facteurs déjà présents dans le milieu de différenciation des cellules Luhmes ont été réalisés dans BIOMIMESYS® *Brain*, pour éviter si possible le recours à du taxol. Cependant, aucune amélioration de la maturité n'a pu être obtenue par l'ajustement de la concentration des facteurs. L'effet du taxol a donc été testé sur les cellules Luhmes cultivées dans BIOMIMESYS® *Brain*, mais cela n'a pas non plus permis d'améliorer ni la maturité ni la viabilité des cellules Luhmes.

En effet, le paramètre viabilité a aussi été étudié. Le temps de maintien des cellules Luhmes dans BIOMIMESYS® *Brain* était équivalent à celui en culture 2D, soit une semaine. Ce temps de culture était bien inférieur au temps de culture obtenu par Smirnova *et al.* qui était de 1 mois. Un maintien en culture à long terme serait en effet intéressant sur deux aspects. Tout d'abord, les maladies neurodégénératives évoluant sur des dizaines d'années chez l'humain, une culture *in vitro* sur long terme qui permettrait de développer un modèle chronique serait plus pertinent. Deuxièmement, l'augmentation de la viabilité à long terme pourrait aussi permettre l'amélioration de la maturité des cellules Luhmes par une exposition plus longue aux facteurs de différenciation.

Dans l'objectif de développer un modèle cérébral plus complet, une co-culture de cellules Luhmes et d'astrocytes primaires a été mise au point, en 2D dans un premier temps. En effet, les astrocytes participent au fonctionnement du SNC en conditions physiologiques et également pathologiques, avec des effets pouvant être neuroprotecteurs ou au contraire neurotoxiques (Bélanger and Magistretti, 2009; Boghdadi *et al.*, 2020). Dans la maladie de Parkinson, des propriétés astrocytaires neurotoxiques ont été décrites, notamment au travers de la neuroinflammation, qui est une caractéristique importante des maladies neurodégénératives et qui participe à l'amplification de la mort neuronale (Wang *et al.*, 2015). Cependant, dans notre

modèle en 2D, la mort des neurones dopaminergiques en présence des iMP n'a pas été amplifiée en présence des astrocytes ; au contraire, les astrocytes ont montré un effet protecteur contre la 6-OHDA et l'érastine.

Les astrocytes peuvent sécréter un large panel de molécules et ont des rôles multiples, dont des effets neuroprotecteurs, qui peuvent expliquer ce résultat. *In vivo*, les effets neuroprotecteurs des astrocytes peuvent être liés à la sécrétion de molécules anti-inflammatoires ou à la suppression des mécanismes pro-inflammatoires (Boghdadi *et al.*, 2020). Cependant, le modèle utilisé ici ne contient pas les autres acteurs de la neuroinflammation, comme les cellules microgliales. Il est donc plus probable que l'effet neuroprotecteur observé pour la 6-OHDA et l'érastine soit lié à d'autres propriétés des astrocytes. Tout d'abord, ils peuvent exercer des fonctions d'endocytose sur les débris cellulaires et les facteurs neurotoxiques (Boghdadi *et al.*, 2020). Ils peuvent aussi libérer des facteurs neurotrophiques pouvant favoriser la survie neuronale et la croissance des neurites, comme le GDNF, le BDNF, le NGF, le bFGF et FGF-2, le CDNF et le MANF (Miyazaki and Asanuma, 2020). Enfin, les astrocytes peuvent avoir un effet neuroprotecteur au travers de la production de molécules anti-oxydantes, comme par exemple en synthétisant du GSH ou en augmentant sa production par les neurones (Bélanger and Magistretti, 2009; Miyazaki and Asanuma, 2020). Cette explication est particulièrement plausible car les mécanismes de la mort neuronale dans la maladie de Parkinson, notamment lors d'une induction par la 6-OHDA ou par l'érastine, mettent en jeu un important stress oxydant. Une analyse du stress oxydant dans notre modèle permettrait de vérifier cette hypothèse. Aucun effet des astrocytes n'a en revanche été observé en présence de roténone, montrant que l'effet des astrocytes dépend de la molécule toxique à laquelle sont exposés les neurones. En raison de la diversité des fonctions astrocytaires, il n'est pas surprenant que l'effet des astrocytes sur la réponse neuronale dépende de la molécule testée.

Les astrocytes peuvent également sécréter des molécules d'adhésion, comme la fibronectine et les laminines, ce qui peut aussi impacter la réponse neuronale (Hillen *et al.*, 2018; Wiese *et al.*, 2012). Cette sécrétion a été observée dans cette étude. En effet, l'adhésion des cellules LHMES nécessite un recouvrement du support avec de la PLO et de la fibronectine. L'ajout d'un milieu sans cellules pendant quelques jours avant l'ensemencement des LHMES sur le support

préalablement recouvert par de la PLO et à la fibronectine inhibait l'adhésion des LHMes. Ce phénomène était probablement dû à la dissolution des molécules adsorbées sur le support. En revanche, en présence d'astrocytes, l'adhésion des LHMes était maintenue, mettant en évidence un phénomène de sécrétion de molécules d'adhésion par les astrocytes.

Cette observation souligne un lien entre le microenvironnement matriciel et cellulaire, qui ne sont pas indépendants. En effet, bien qu'étudiées ici de manière indépendantes dans l'objectif d'étudier leurs effets respectifs, les composantes matricielle et cellulaire peuvent également interagir ensemble, avec la sécrétion de molécules de la MEC par les astrocytes et la rétention des molécules sécrétées par les astrocytes dans la MEC.

Ainsi, dans un second temps, la co-culture de cellules LHMes et d'astrocytes a été transposée dans BIOMIMESYS® *Brain*, dans l'objectif de développer un modèle cérébral incluant à la fois le microenvironnement matriciel et le microenvironnement glial. La co-culture devait être réalisée en deux temps, car la culture des astrocytes dans le milieu de culture des cellules LHMes nécessite qu'ils aient préalablement été ensemencés dans leur milieu spécifique et aient adhéré au support de culture. L'un des défis techniques pour transposer cette co-culture en 3D était donc de réussir à faire pénétrer les cellules LHMes dans l'*hydroscaffold*™ BIOMIMESYS® *Brain* déjà hydraté par la culture d'astrocytes, malgré le fait que l'ensemencement des cellules dans l'*hydroscaffold*™ déshydraté soit préférable pour piéger les cellules à l'intérieur. Le retrait maximal du milieu astrocytaire suivi d'un ensemencement des cellules LHMes dans un faible volume a cependant permis aux cellules LHMes de pénétrer dans l'*hydroscaffold*™ et de former avec succès une co-culture avec les astrocytes. Les astrocytes pouvant sécréter de nombreux facteurs solubles ainsi que des molécules d'adhésion, il a été vérifié s'ils permettaient d'améliorer la maturité ou la viabilité des cellules LHMes. Cependant, aucune amélioration n'a été observée.

Ce modèle *in vitro* incluant les composantes astrocytaire et matricielle du microenvironnement des neurones dopaminergiques ouvre des perspectives prometteuses en tant que modèle *in vitro* pour la recherche de molécules thérapeutiques contre la maladie de Parkinson. Cependant, avant de pouvoir l'utiliser pour le criblage phénotypique, la maturité des LHMes doit être améliorée, et si possible la viabilité sur le long terme afin de pouvoir réaliser des

tests chroniques. L'optimisation de la composition du milieu de culture et la présence d'astrocytes n'ayant pas permis d'améliorer ces paramètres, la perspective d'amélioration est la modification de la composition de la matrice. Pour cela, d'avantage de composants de la MEC *in vivo* pourraient être ajoutés, notamment de la fibronectine et des PG comme les PGHS ou les PGCS puisque ces molécules sont impliquées dans l'adhésion et la maturation neuronale *in vivo*.

Pour conclure, cette étude a permis de mettre en avant des effets du microenvironnement sur la réponse neuronale aux iMP *in vitro*, impliquant divers mécanismes comme la rétention de molécules toxiques et la modification du niveau d'expression de protéines neuronales par la matrice, et la sécrétion par les astrocytes de molécules d'adhésion et de d'autres molécules qu'il serait intéressant de caractériser.

TRAVAUX DE THESE - PARTIE 2 : Impact du microenvironnement *in vitro* dans un modèle pour évaluer la neurotoxicité

1. Introduction

La lignée SH-SY5Y est une lignée très utilisée en recherche académique comme industrielle, notamment pour évaluer l'effet neurotoxique de molécules. Issues d'un neuroblastome, plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour améliorer leurs caractéristiques neuronales. Cependant, l'impact de l'environnement de différenciation sur le phénotype neuronal et la sensibilité des cellules SH-SY5Y est peu documenté.

Dans cette étude, nous avons comparé simultanément les principaux facteurs cités dans la littérature pour la différenciation des cellules SH-SY5Y : l'acide rétinoïque, la staurosporine, le TPA, l'AMPc, et le 3-isobutyl-1-Méthylxanthine (iBMX).

Ces facteurs ont été testés seuls ou combinés entre eux, à une ou plusieurs concentrations, dans un milieu couramment utilisé (50% de Milieu Essentiel Minimum – MEM, et 50% de milieu F12, v/v) contenant 10% ou 1% (v/v) de SVF. Dans l'objectif d'améliorer la reproductibilité des tests et également de limiter l'utilisation de produits d'origine animale dans les modèles *in vitro*, nous avons également testé ces facteurs dans un milieu neurobasal ne contenant pas de SVF (milieu MACS® Neuro supplémenté avec du B21, un dérivé du B27 pour la culture de cellules neuronales). Au total, cela représentait 24 conditions de différenciation, qui ont été analysées après 3 et 5 jours de culture. Leur efficacité sur la différenciation neuronale a été évaluée en matière de ralentissement de la prolifération cellulaire et d'allongement des neurites. L'intégralité des analyses de cette étude a été réalisée par imagerie automatisée à fluorescence.

Suite à ce criblage, les 3 conditions les plus efficaces après 5 jours de différenciation ont été sélectionnées afin d'approfondir l'étude de leur effet sur le phénotype et la sensibilité des cellules SH-SY5Y : l'acide rétinoïque à 10 μ M en milieu MEM/F12 10% SVF, la staurosporine à 25 nM en milieu MEM/F12 1% SVF, et l'AMPc 1 mM en milieu MACS® Neuro 2% B21.

Tout d'abord, la maturation neuronale des cellules a été caractérisée par l'analyse cinétique de prolifération cellulaire, de l'allongement des neurites et de l'expression de 3 marqueurs pan-

neuronaux : TUBB3, synaptophysine et NeuN. Ensuite, la spécificité neuronale a été étudiée par l'analyse de l'expression de 2 marqueurs de spécificité neuronale : vGLUT2, un marqueur de neurones glutamatergiques, et TH, un marqueur de neurones dopaminergiques. De manière générale, les cellules différenciées en milieu B21+AMPC ont montré le phénotype neuronal le plus mature, celles en staurosporine une maturité intermédiaire, et celles en acide rétinoïque une maturité neuronale plus faible. Les cellules SH-SY5Y présentaient un phénotype dopaminergique caractérisé par une expression diffuse de la TH, bien que vGLUT2 soit également présent.

Leur sensibilité et leur pertinence en tant que modèle pour évaluer la toxicité de molécules sur la SNC ont été évaluées à l'aide de molécules de toxicité connue : deux composés non toxiques (amoxicilline et acide L-ascorbique), deux composés toxiques mais non neurotoxiques (acétaminophène et troglitazone), et quatre composés neurotoxiques (6-OHDA, cisplatine, colchicine, et tamoxifène). Dans les 3 milieux de différenciation, les catégories de molécules étaient majoritairement respectées, c'est-à-dire qu'il n'y avait pas d'effet toxique sous exposition avec les molécules non neurotoxiques, et une mortalité cellulaire en présence des molécules neurotoxiques. En cohérence avec les résultats sur leur phénotype neuronal, les cellules différenciées en B21+AMPC, qui exprimaient le phénotype neuronal le plus mature, ont montré dans la majorité des cas la plus forte sensibilité aux composés neurotoxiques, alors que les cellules différenciées en acide rétinoïque, les moins matures, étaient les moins sensibles.

Dans le contexte actuel du fort développement de systèmes de culture cellulaire en 3D, ainsi qu'en raison de l'effet connu de la MEC sur la différenciation neuronale, nous avons cultivé les cellules SH-SY5Y dans l'*hydroscaffold*[™] BIOMIMESYS[®] *Brain*, précédemment développé pour la culture de cellules LHMES. Dans cette matrice, les cellules SH-SY5Y se sont organisées en sphéroïdes viables pendant au moins 10 jours (Figure 58).

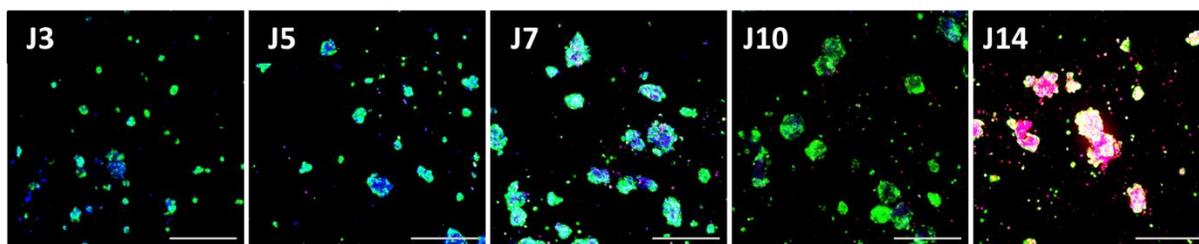


Figure 58 : Viabilité des cellules SH-SY5Y dans BIOMIMESYS® Brain.

Ensemencement 30 000 cellules/puits dans 25 µl par hydroscaffold. Microscopie à fluorescence. En bleu les noyaux (Hoechst), en rouge les cellules mortes marquées au DRAQ7, et en vert TUBB3. J : Jour

La différenciation des cellules SH-SY5Y dans cet environnement 3D a été étudiée, au travers de l'analyse de la prolifération cellulaire, de l'expression des marqueurs pan-neuronaux et spécifiques, dans les mêmes conditions que ce qui avait été fait en 2D. De nouveau, le milieu B21+AMPC a entraîné la plus haute différenciation neuronale. L'acide rétinoïque cependant n'a pas montré d'effet différenciant en comparaison au milieu de prolifération. Dans les 3 conditions de différenciation, les cellules ont été exposées à une sélection de molécules de toxicité connue. De manière générale, les catégories de molécules étaient de nouveau respectées, mais les cellules étaient majoritairement plus sensibles lorsqu'elles étaient différenciées par la staurosporine, et non par le duo B21+AMPC comme en 2D. Les effets toxiques observés étaient également moins prononcés qu'en 2D.

Ces résultats ont montré que le phénotype neuronal et la réponse aux composés neurotoxiques variaient en fonction du milieu de différenciation utilisé. La culture en 3D dans la matrice BIOMIMESYS® *Brain* modifiait également la réponse des cellules. Une des principales hypothèses était que la matrice modifiait la biodisponibilité des molécules, que ce soit les composés toxiques ou les facteurs de différenciation. En effet, la différenciation neuronale semblait plus faible en 3D, comme montré par l'analyse des marqueurs de neurones matures, en particulier la non-augmentation des marqueurs en milieu contenant de l'acide rétinoïque, et la non-détection de NeuN dans les trois milieux. Les résultats de cette étude soulignaient l'importance de tenir compte avec précaution de l'environnement extracellulaire *in vitro*, instauré à la fois par les molécules libres, et celles de la matrice. Cette étude a fait l'objet d'un article publié

dans le journal à comité de lecture *Toxicology in vitro* en Aout 2021 (Figure 59) (De Conto *et al.*, 2021).

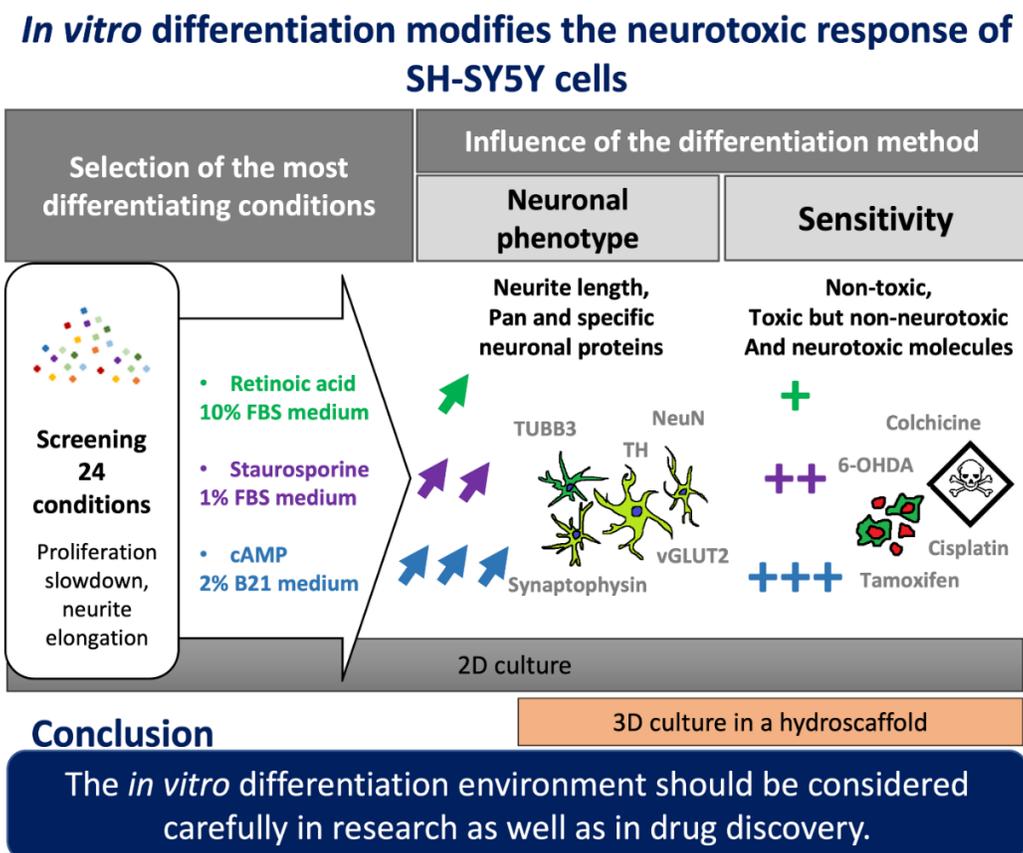


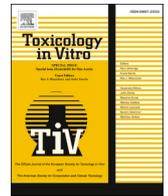
Figure 59 : Résumé graphique de l'article « in vitro differentiation modifies the neurotoxic response of SH-SY5Y cells » (De Conto *et al.*, 2021).

2D : 2 Dimensions ; 3D : 3 Dimensions ; 6-OHDA : 6-Hydroxydopamine ; TH : Tyrosine Hydroxylase ; vGLUT2 : vesicular Glutamate Transporter 2

Un test supplémentaire a été réalisé post-publication pour vérifier l'hypothèse de la différenciation plus faible en 2D que dans BIOMIMESYS®, en quantifiant l'expression de TUBB3 par test ELISA. Les résultats confirmaient l'hypothèse de la moins bonne différenciation, avec une expression de TUBB3 plus faible dans les cellules SH-SY5Y cultivées dans BIOMIMESYS® *Brain* comparées aux cellules SH-SY5Y cultivées en 2D.

L'article publié, qui détaille et discute tous les résultats résumés précédemment, est présenté ci-dessous.

2. Article



In vitro differentiation modifies the neurotoxic response of SH-SY5Y cells

Véronique De Conto^{a,b,*}, Vaihere Cheung^a, Grégory Maubon^a, Zied Souguir^a,
Nathalie Maubon^a, Elodie Vandenhautte^a, Vincent Bérézowski^{b,c}

^a HCS Pharma, Biocentre Fleming, Bât.A, 59120 Loos, France

^b Univ. Lille, Inserm U1172, CHU Lille, Lille Neuroscience & Cognition Research Center, F-59000 Lille, France

^c UArtois, F-62300 Lens, France

ARTICLE INFO

Keywords:

SH-SY5Y cell line
In vitro differentiation
Phenotypic analysis
Neurotoxicity assessment

ABSTRACT

The SH-SY5Y cell line is commonly used for the assessment of neurotoxicity in drug discovery. These neuroblastoma-derived cells can be differentiated into neurons using many methods. The present study has compared 24 of these differentiation methods on SH-SY5Y cells. After morphologic selection of the three most differentiating media (retinoic acid in 10% fetal bovine serum (FBS), staurosporine in 1% FBS medium, and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in B21-supplemented neurobasal medium), cells were analyzed for pan-neuronal and specific neuronal protein expression by fluorescent automated imaging. The response of SH-SY5Y to a set of compounds of known toxicity was examined in these culture conditions performed in 2D, and also in a 3D hyaluronic acid-based hydrosccaffold™ which mimics the extracellular matrix. The extent of neuronal markers expression and the sensitivity to neurotoxic compounds varied according to the differentiation medium. The cAMP B21-supplemented neurobasal medium led to the higher neuronal differentiation, and the higher sensitivity to neurotoxic compounds. The culture in 3D modified the neurotoxic response, through a lower sensitivity of cells compared to the 2D culture. The *in vitro* differentiation environment influences the neurotoxic response of SH-SY5Y cells and thus should be considered carefully in research as well as in drug discovery.

1. Introduction

The pharmaceutical industry faces a low success rate in drug discovery. Indeed, 90% of clinical trials fail because of efficiency and safety issues. The Central Nervous System (CNS) is particularly involved in this outcome, since 34% of safety failures occur in CNS clinical trials, but only 7% in preclinical trials (Cook et al., 2014). This points to the relevance of preclinical models for the assessment of neurotoxicity as used upstream in the process, to select molecules of interest. Nevertheless, lots of *in vitro* models exist to evaluate drug candidates. Although considered more physiologic, primary cell cultures cannot be upscaled to an industrial level, in particular for screening steps, because of limited access to biopsies, and reproducibility problems. Consequently, the pharmaceutical industry uses immortalized cell lines for the early assessment of neurotoxicity. Nevertheless, cell lines encounter differentiation problems possibly explaining their lack of relevance. Among them, the SH-SY5Y cell line is commonly used both in research and in the pharmaceutical industry for the assessment of neurotoxicity, with more than 1500 publications including both “SH-SY5Y” and

“neurotoxicity” terms listed on Pubmed in the last 20 years. Indeed, this cell line offers several advantages, including its human origin, its relatively homogenous population which promotes a good reproducibility, and its high proliferation rate, which makes it a suitable cell line for large-scale culture (Tieu et al., 1999). Since derived from a neuroblastoma, SH-SY5Y cells can be differentiated into neurons from several methods, ranging from the widely used Retinoic Acid (RA), to 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13 acetate (TPA), N⁶,2'-O-Dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (cAMP), staurosporine, and B27 (Kovalevich and Langford, 2013; Xicoy et al., 2017). This large panel of differentiation inducers might represent different extracellular environments leading to different cell responses to the same stimulus (Tieu et al., 1999).

To provide a comparative insight into the influence of the differentiation environment on the neurotoxic response of SH-SY5Y cells, we cultured these cells in media containing commonly used differentiation factors at several concentrations: RA, staurosporine, TPA combined or not with RA, cAMP, 3-isobutyl-1-methylxanthine (iBMX). All of them were tested in MEM/F12 medium supplemented with 0%, 1% and 10%

* Corresponding author at: HCS Pharma, Biocentre Fleming, Bât. A, 59120 Loos, France.

E-mail address: veronique.deconto@hcs-pharma.com (V. De Conto).

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105235>

Received 8 June 2021; Received in revised form 27 July 2021; Accepted 18 August 2021

Available online 20 August 2021

0887-2333/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Fetal Bovine Serum (FBS), and in FBS-free neurobasal 2% B21 (a B27-derived supplement) medium, for a total of 24 different culture conditions. After morphologic selection of the three most differentiating media, cells were analyzed for pan-neuronal and specific neuronal protein expression by fluorescent automated imaging, which allowed phenotypic analysis and marker intensity quantification.

Responses of SH-SY5Y to a set of compounds known as non-toxic, toxic but non-neurotoxic, or neurotoxic (Wilson et al., 2014) were examined in these culture conditions performed in 2D, but also in a 3D hyaluronic-based hydrosc scaffold™ which mimics the Extracellular Matrix (ECM).

2. Materials and methods

2.1. Cells and media

The SH-SY5Y cells came from *European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)*. Two culture media were used: **1) MEM/F12 medium**: 50% Minimum Essential Medium (Eurobio cat. CM1MEM10 01)/50% Ham F12 medium (Eurobio cat. L0136–500) (v/v), 100 UI/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Eurobio cat. CABPES01 0 U), 2 mM L-glutamine (Eurobio, cat. CSTGLU00 0 U), 1% (v/v) Non-Essential Amino Acids (Eurobio, cat. CSTAAN00 0 U), supplemented with 1 or 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS) (Eurobio/Biowest n°S13439S1810, cat. S1810–500); **2) Neurobasal 2% B21 medium**: MACS Neuro (Miltenyi Biotec cat. 130–093-570), 2% MACS® NeuroBrew®-21 (B21) (Miltenyi Biotec cat. 130-093-566) 100UI/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Eurobio cat. CABPES01 0U), 2 mM L-glutamine (Eurobio cat. CSTGLU00 0U).

2.2. Screening of differentiation media

The SH-SY5Y cells were expanded in a T75 flask containing MEM/F12 10% FBS medium. Cells were then plated in 96-well-plates (Greiner cat. 655986) directly in the differentiation medium, at a density of 7500 cells/well. Five differentiation factors were tested: 0.1, 1 and 10 µM retinoic acid (TCI, cat. R0064-1G) prepared at 2 mM in Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich, cat. 276855), 25 nM staurosporine (Sigma Aldrich, cat. 37095), 16 nM 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13 acetate (TPA, Sigma Aldrich cat. P18139) with or without 0.1 µM retinoic acid, 0.1 and 1 mM N⁶,2'-O-Dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (cAMP, Sigma Aldrich, cat. D0627), and 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (iBMX, Sigma Aldrich, cat. I5879). All of them were tested in MEM/F12 medium supplemented with 0%, 1% and 10% (v/v) FBS, and in neurobasal 2% B21 medium.

2.3. Cell culture and differentiation

Before differentiation in RA or staurosporine, SH-SY5Y were expanded in a T75 flask (Corning cat. 353136) in MEM/F12 10% FBS (Fig. 1A and B). Before B21 + cAMP differentiation, cells were expanded in neurobasal 2% B21 medium, to avoid a complete media modification between expansion and differentiation steps, and also because it is interesting to culture cells in a chemically defined media, and thus without FBS, to enhance the reproducibility of tests (Fig. 1A and C). After two weeks, cells were plated directly in differentiation media: MEM/F12 10% FBS 10 µM RA, MEM/F12 1% FBS 25 nM staurosporine, or neurobasal 2% B21 1 mM cAMP. It should be noted that even if neurobasal 2% B21 medium is adapted for cell expansion in flask, it induced a slight neuronal pre-differentiation. Consequently, proliferation control was in MEM/F12 10% FBS medium. In the 2D cell culture, cells were plated in 96-well plates (Greiner ref. 655986) coated with 10 µg/cm² with Poly-D-Lysine (PDL) (Sigma Aldrich cat. P7280), at a density of 5000 or 7500 cells/well. In the 3D cell culture, cells were plated in 96-wells BIOMIMESYS® Brain plates (HCS Pharma, BIO-BRA_96_96_black) at a density of 30,000 cells/well.

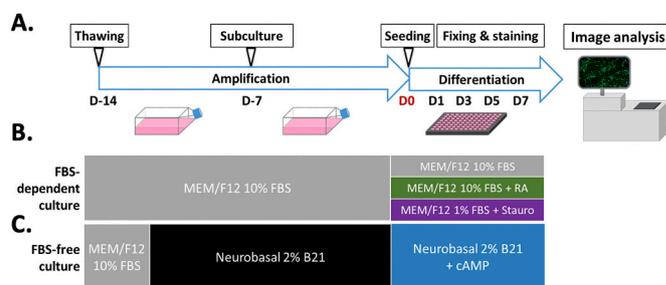


Fig. 1. Protocol of SH-SY5Y expansion and differentiation. A. Main steps from cell thawing to image analysis. B. Culture conditions for non-differentiated cells, and for cells differentiated with RA or staurosporine in FBS-supplemented MEM/F12. C. Culture conditions for cells differentiated with cAMP in FBS-free neurobasal 2% B21 medium. D: Day, followed by the number of days before (–) or after seeding. RA: Retinoic acid; Stauro: Staurosporine; FBS: Fetal Bovine Serum; MEM/F12: Minimum Essential Medium/Ham F12 medium; cAMP: cyclic Adenosine monophosphate.

2.4. Immunostaining

To characterize the differentiated SH-SY5Y cells, pan- and specific neuronal marker proteins were immunostained. For that, the cells were fixed with 2% paraformaldehyde (Fisher Scientific cat. 10260219) for 15 min. and then permeabilized with 0.5% (v/v) Tween-20 (Sigma Aldrich cat. P2287) in Phosphate Buffered Saline (PBS) (Eurobio cat. CS1PBS01) with 1% (w/v) Bovine Serum Albumin (BSA) (Dominique Dutscher cat. 871004) during 30 min. Primary antibodies were added for 1 h at room temperature or overnight at 4 °C, in PBS with 1% (w/v) BSA. Then secondary antibodies were added during 1.5 h at room temperature with Hoechst 33342 (Invitrogen™ H3570, Fisher Scientific cat. 11534886) for nuclei visualization, in PBS with 1% (w/v) BSA (Table 1).

2.5. Neurotoxicity assays

In 2D, neurotoxicity assessments were performed in 384-well plates (Greiner, cat. 781091) previously coated with 10 µg/cm² PDL. Cells were seeded at 2500 cells/well in the indicated differentiation media. In 3D, neurotoxicity assessments were performed in 96-wells BIOMIMESYS® Brain plates, seeded at 30,000 cells/well. In the 2D neurotoxicity assessment, cells were incubated with compounds at the 30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01, 0.003 and 0.001 µM final concentrations. In 3D, cells were incubated with compounds at 100, 30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01 and 0.003 µM final concentrations. The powdered compounds (Table 2) were solubilized in DMSO, at 200 times the final concentrations, to reach a final dilution of 0.005% DMSO. Control cells were incubated in a medium containing 0.005% DMSO as a vehicle condition. Three days after seeding, cells were incubated with compounds solubilized in MEM/F12 10% FBS (for RA-differentiated cells), MEM/F12 1% FBS (for staurosporine-differentiated cells), or neurobasal 2% B21 medium (for B21 + cAMP-differentiated cells). After 2 days of incubation, dead cells were stained with 1 µg/mL propidium iodide (Sigma Aldrich, cat. P4170) for 5 min in 2D, or with 1.2 µM DRAQ7 (Biolegend® cat. 424,001) for 30 min in 3D, in co-incubation with 10 µg/mL Hoechst 33342 in basic medium (MEM/F12 or neurobasal).

2.6. Image acquisition and analysis

The images were acquired by the ImageXpress Micro Confocal system automated microscope (Molecular Devices), with 4 acquisition sites per well, using widefield imaging method for 2D analysis, and confocal 60 µm pinhole imaging method for 3D analysis. Then images were post-treated with MetaXpress software (6.63.55 version) using the appropriate application module. Four filters were used, DAPI (excitation 377/

Table 1

List of primary antibodies used for immunocytochemistry procedures, respective dilution, provider and catalogue number.

	Antibody	Type	Host Species	Dilution	Provider	Cat.
Primary antibody	TUBB3	Polyclonal IgG	Rabbit	1:5000 (2D) 1:1000 (3D)	Abcam	Ab18207
	Synaptophysin	Monoclonal IgG	Rabbit	1:500 (2D) 1:250 (3D)	Abcam	ab32127
	NeuN D3S3I	Monoclonal IgG	Rabbit	1:500 (2D) 1:250 (3D)	Cell signaling	12943S
	TH	Polyclonal IgG	Rabbit	1:100	Sigma Aldrich	AB152
	vGLUT2	Monoclonal IgG	Mouse	1:100	Millipore	MAB5504
Secondary antibody	Alexa Fluor 488	IgG	Goat anti-rabbit	1:2,00	Cell signaling	4412S
	Alexa Fluor 488	IgG	Goat anti-mouse	1:2000	Cell signaling	4408S

Table 2

List of the compounds used for neurotoxicity assessment, CAS number, provider and catalogue number.

Compounds	CAS	Provider	Cat.
Acetaminophen	103-90-2	Sigma Aldrich	A7085-100G
Amoxicillin	61,336-70-7	TCI	A2099-5G
L-Ascorbic acid	50-81-7	TCI	A0537
Cisplatin	15,663-27-1	TCI	D3371-100MG
Colchicine	64-86-8	Sigma Aldrich	C9754-100MG
6-OHDA	28,094-15-7	Sigma Aldrich	H4381-100MG
Tamoxifen	10,540-29-1	TCI	T2510-1G
Troglitazone	97,322-87-7	Sigma Aldrich	T2573-5MG

50 nm, emission 447/60 nm), FITC (excitation 475/34 nm, emission 536/40 nm), Cy5 (excitation 631/28 nm, emission 692/40 nm and Texas Red (excitation 560/32 nm, emission 624/40 nm), with a binning of 2. The number of cells per well was calculated from the counted nuclei per acquisition site after Hoechst staining. Neurites were detected from the results of the TUBB3 staining. Neurite length was measured as the sum of all neurite lengths found in the acquisition sites divided by the number of cells, using the MetaXpress application module "Neurite Outgrowth". Briefly, the application module first detected cell bodies (FITC fluorescence above local background with round shape), then considered it as a cell if it detected a nucleus inside (DAPI fluorescence above local background). Then it analyzed elongations from the detected cells (FITC fluorescence above local background with elongated shape). Neurites were considered as such when the length was above 5 μm . For neuronal marker analysis, the stain integrated intensity of differentiated cells was normalized to the stain integrated intensity of proliferating cells for the same marker. In 3D, the stain average of the maximal 2D projection was determined by the integrated intensity divided by the surface of spheroids projection to avoid the bias induced by spheroid size variation according to the medium, and normalized to the average intensity of non-differentiated SH-SY5Y. For the 2D neurotoxicity assessment, the number of live cells incubated in the compounds was normalized to the number of live cells in vehicle controls. In 3D, the percentage of live cells in the well was normalized to the percentage of live cells in the vehicle controls. The concentration for which 50% of cells were dead has been calculated (Lethal Concentration 50% - LC50).

2.7. Statistical analysis

Values were presented in mean \pm Standard Error of the Mean (SEM). Error bar in the graphs corresponded to SEM. The statistical analyses were achieved with the R software version 3.6.1 (R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>), and R Studio environment version 1.3.1093). The normality of the

samples was verified by Shapiro test, and the heteroscedasticity by the Fisher test. The equality of the means was analyzed by Student test for parametric samples with equal variances, by Welch test for parametric samples with different variances, or by the Wilcoxon test for non-parametric samples. * p -value <0.05 ; ** p -value >0.005 ; *** p -value <0.0005 .

3. Results

3.1. Selection of differentiation media

We selected the differentiation media based on 2 requirements: cell proliferation slowdown and neurite elongation, compared to proliferation media (MEM/F12 10% FBS without any factor; $30,000 \pm 1200$ cell/well and neurite length 9.6 ± 0.3 $\mu\text{m}/\text{cell}$ at day 5). Even the differentiation effects were already visible at day 3 (data not shown), results were more pronounced at day 5 (Fig. 2). In MEM/F12 0% FBS media, cells did not survive. In MEM/F12 10% FBS medium, the number of cells per well was significantly lower, only in the presence of RA (all concentrations) and iBMX, (Fig. 2A). However, the neurite length was significantly increased only with 10 μM RA (Fig. 2B). The decrease in FBS concentration (MEM/F12 1% FBS) led to a significant decline in cell proliferation for all tested factors (Fig. 2A). The outgrowth of neurites was significantly higher with all factors in this medium, except in 0.1 and 1 μM RA (Fig. 2B). The neurobasal 2% B21 medium without additional factor led to a significant decrease in the number of cells, and a significant increase in the neurite length (Fig. 2A and B). The use of staurosporine, RA and iBMX induced an additional decrease in the cell proliferation compared to neurobasal 2% B21 alone (Fig. 2A, black asterisks), but no neurite elongation (Fig. 2B). With TPA (combined or not with RA), and with cAMP, the number of cells per well was equal to the one in neurobasal 2% B21 alone, and thus lower than the one in proliferation media. Only cAMP was associated to a supplementary increase in the neurite length (Fig. 2B, black asterisks). Following these results, we chose the most efficient conditions in each medium: RA 10 μM in MEM/F12 10% FBS medium ($14,000 \pm 940$ cells/well and neurite length = 21.1 ± 0.4 $\mu\text{m}/\text{cell}$) (called "RA medium"), staurosporine in MEM/F12 1% FBS ($18,000 \pm 2200$ cells/well and neurite length = 22.3 ± 0.4 $\mu\text{m}/\text{cell}$) (called "staurosporine medium"), and cAMP 1 mM in neurobasal 2% B21 medium ($18,000 \pm 2900$ cells/well, and neurite length = 36.6 ± 0.4 $\mu\text{m}/\text{cell}$) (called "B21 + cAMP medium"). In addition, fluorescent microscopy observations showed a difference in cell shape and cell organization according to these media. Cells in proliferation medium were more clustered, with short neurites. Cell cultured in RA and staurosporine media displayed elongated cell bodies, whereas cells cultured in B21 + cAMP medium displayed more rounded cell bodies. Neurite morphology varied too, with more branching in B21 + cAMP (Fig. 2C).

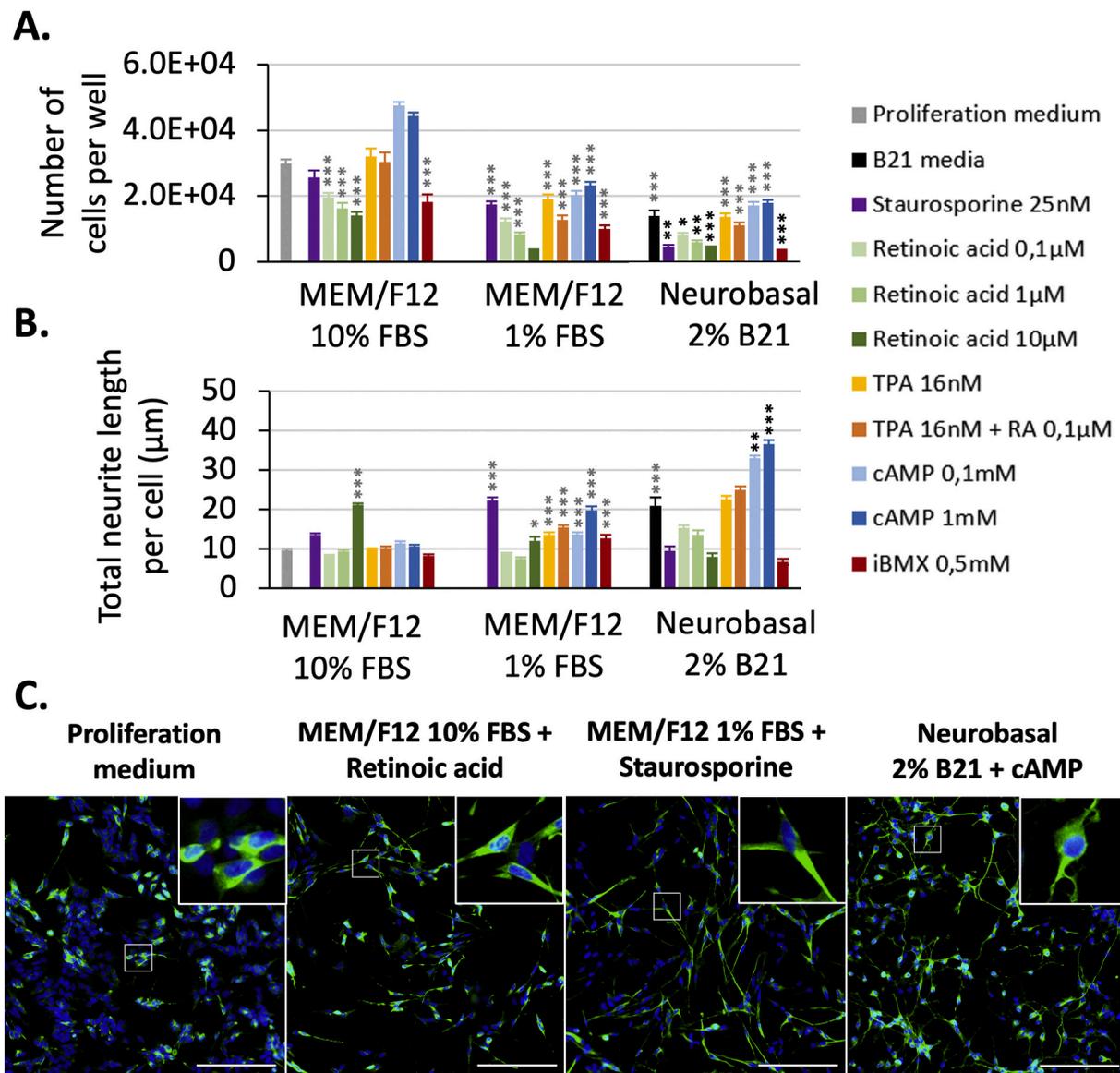


Fig. 2. Screening of 24 conditions for SH-SY5Y differentiation after 5 days. A. Cell proliferation. Cell nuclei count after Hoechst staining ($n = 8$). Grey asterisks: number of cells per well significantly lower in comparison to proliferation medium. B. Neurite length. Neurite length after TUBB3 immunostaining ($n = 8$). Grey asterisk: neurite length significantly higher in comparison to proliferation medium. Black asterisks: neurite length significantly higher in comparison to neurobasal 2% B21 medium. Mean values were significantly different according to Student test for parametric samples with equal variances, Welch test for parametric samples with different variances, or Wilcoxon test for non-parametric samples. * p -value < 0.05 ; ** p -value > 0.005 ; *** p -value < 0.0005 . Error bar represents the SEM. C. Morphology of SH-SY5Y cells in proliferation medium and in the three selected differentiation media. Nuclei were stained by Hoechst (blue) and TUBB3 was immunostained (green). Scale bar = 200 μm . The inset is a 4-fold magnified image of the outlined area. RA: Retinoic Acid; TPA: Tetradecanoylphorbol Acetate; cAMP: cyclic Adenosine Monophosphate; IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine; MEM/F12: Minimum Essential Medium/Ham F12 medium; FBS: Fetal Bovine Serum. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.2. Kinetic analysis of cell proliferation and neurite elongation

Cells in proliferation medium had a high proliferation rate, with a 25-fold increase in the number of cells, from 5000 cell/well at seeding to $123,000 \pm 5600$ cell/well after 7 days. Proliferation of cells was significantly slowed down in differentiation media. Among them, the highest cell number was found in staurosporine medium, with a 6-fold increase between seeding and day 7 (from 5000 to $29,600 \pm 1800$ cells/well). An intermediate cell proliferation was found in RA medium, with a 5-fold increase (from 5000 cells/well at the seeding time to $26,500 \pm 1500$ cells/well after 7 days). The lowest cell number was seen in B21 + cAMP medium, with a 4-fold increase (from 5000 to $22,200 \pm 2000$ cells/well) between seeding and day 7 (Fig. 3A and C). The neurite

length has been quantified because neurite elongation was a relevant morphological marker of neuronal differentiation in 2D, whereas the neurite number or branching nodes did not vary significantly among our experimental conditions (data not shown). The neurite length in proliferation medium decreased from 12.1 ± 0.5 $\mu\text{m}/\text{cell}$ at day 3, to 4.9 ± 0.1 $\mu\text{m}/\text{cell}$ at day 7 (Fig. 3B). On the contrary, neurite length in the three selected differentiation media was significantly enhanced (Fig. 3B and C). In RA and staurosporine media, neurite length reached 22.4 ± 1.0 μm at day 3 in RA, and 23.1 ± 0.4 μm at day 5 in staurosporine, and then remained constant until day 7. Cells in B21 + cAMP medium presented evident longer neurites for all times, with a maximum at day 5 (36.2 ± 2.7 μm).

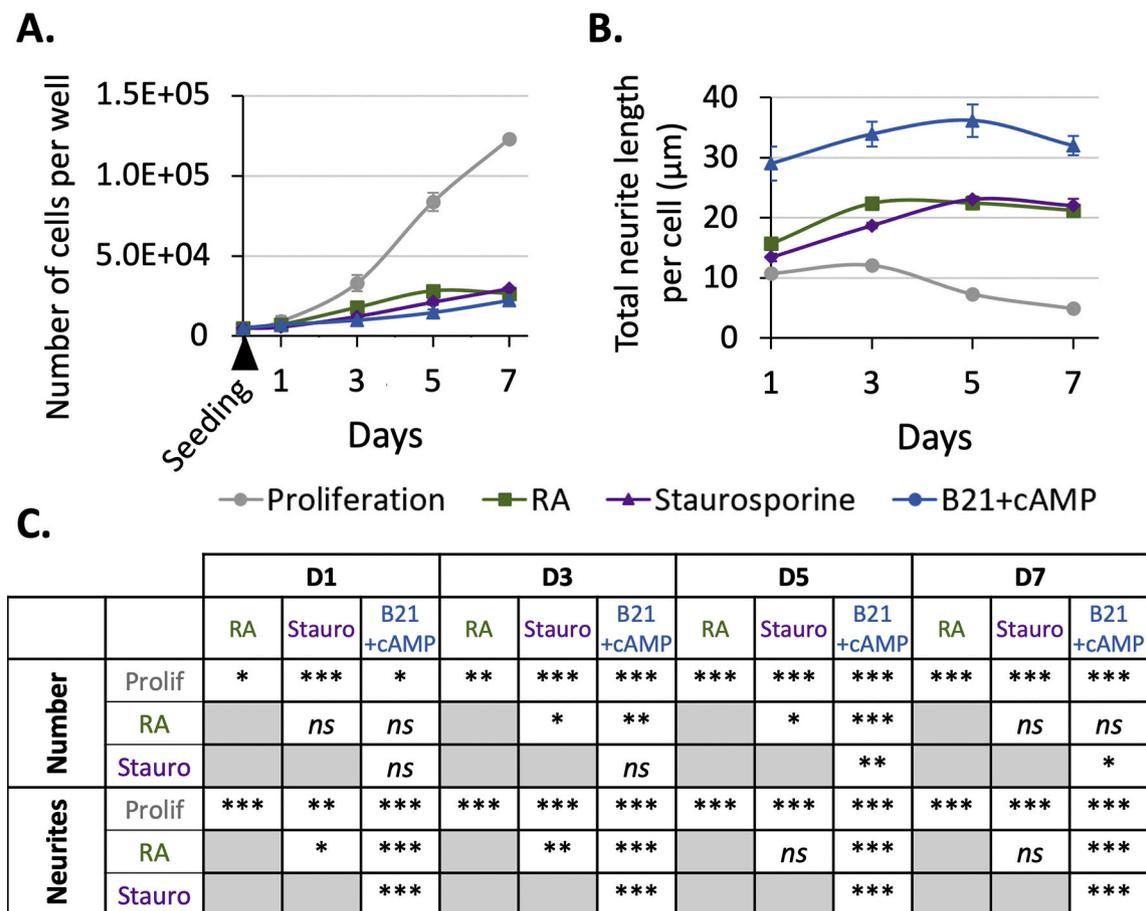


Fig. 3. Kinetic analysis of SH-SY5Y cell proliferation and neurite elongation. A. Cell proliferation. Cell nuclei count after Hoechst staining ($n = 12$). B. Neurite elongation. Neurite length after TUBB3 immunostaining ($n = 12$). Error bar represents the SEM. C. Statistical analysis. Mean values were significantly different according to Student test for parametric samples with equal variances, Welch test for parametric samples with different variances, or Wilcoxon test for non-parametric samples. * p -value < 0.05 ; ** p -value < 0.005 ; *** p -value < 0.0005 . RA: Retinoic Acid; cAMP: cyclic Adenosine Monophosphate; ns: not significant.

3.3. Kinetic analysis of pan-neuronal marker expression

The proteins TUBB3 and synaptophysin were highly expressed by SH-SY5Y cells in all media, including proliferation medium. The TUBB3 protein was widely expressed, both in cell bodies and in neurites, whereas synaptophysin was mostly expressed in neurites. On the contrary, NeuN was poorly expressed in non-differentiated cells, and localized only in the nucleus and perinuclear zone of differentiated cells (Fig. 4A). Overall, the stain intensities for the three marker proteins were significantly higher in differentiation media than in proliferation medium (ratio > 1) and rose over time. Moreover, intensities were higher in B21 + cAMP medium, and followed by the ones in the staurosporine medium, and the lower ones in the RA medium (Fig. 4B and C, and supplemental Figs. 1, 2 and 3). We chose day 5 as the time point for assessments in the next experiments, because the cells became too numerous in the wells at day 7, impacting the analysis of neurite length, cell viability and marker proteins.

3.4. Neuronal specificity

Tyrosine hydroxylase (TH) was widely expressed both in cell bodies and in neurites, in all media, including proliferation medium. On the contrary, vGLUT2 was weakly expressed in proliferation medium but appeared in differentiated media as puncted areas of cell bodies (Fig. 5A). Staining intensities were significantly higher in B21 + cAMP medium compared to that in proliferation medium (ratio = 3.4 ± 0.1 for TH and 58.9 ± 8.2 for vGLUT2), followed by the staurosporine medium

(ratio = 2.9 ± 0.1 for TH and 31.4 ± 8.0 for vGLUT2). In the RA medium, vGLUT2 expression was lower, but enhanced when compared to that in proliferation medium (ratio = 5.6 ± 2.6). There was no enhancement in TH expression (ratio < 1) (Fig. 5B and C). Differentiated SH-SY5Y cells expressed simultaneously dopaminergic (TH) and glutamatergic (vGLUT2) markers (Fig. 5D).

3.5. Neurotoxicity assessment

No toxicity was observed for non-neurotoxic compounds, in all the differentiation media, except for troglitazone in the staurosporine medium ($LC50_{\text{Troglitazone}} = 26 \mu\text{M}$). Troglitazone induced a slight mortality from $10 \mu\text{M}$ in B21 + cAMP, which stabilized at a lower bound value of 81% of viability (Fig. 6). Toxic effects were observed in all differentiation media for neurotoxic compounds. Cisplatin, 6-OHDA and colchicine induced a difference in $LC50$ depending on the medium. Cells were more sensitive in the B21 + cAMP medium ($LC50_{\text{cisplatin}} = 2 \mu\text{M}$; $LC50_{6\text{-OHDA}} = 5 \mu\text{M}$; $LC50_{\text{colchicine}} = 0.0008 \mu\text{M}$), followed by the staurosporine medium ($LC50_{\text{cisplatin}} = 18 \mu\text{M}$; $LC50_{6\text{-OHDA}} = 17 \mu\text{M}$; $LC50_{\text{colchicine}} = 0.008 \mu\text{M}$), and less sensitive in the RA medium ($LC50_{\text{cisplatin}} = 37 \mu\text{M}$; $LC50_{6\text{-OHDA}} = 36 \mu\text{M}$; $LC50_{\text{colchicine}} = 0.03 \mu\text{M}$). Moreover, in the staurosporine and RA media the last no-toxic-effect concentration was higher ($3 \mu\text{M}$ of cisplatin in RA and $1 \mu\text{M}$ in staurosporine, and $0.003 \mu\text{M}$ of colchicine for both RA and staurosporine) than in B21 + cAMP (toxic effect from the lowest tested concentration). Furthermore, in the presence of colchicine, the viability dropped down to 26% in B21 + cAMP medium, to 34% in the staurosporine medium, and to 39% in the RA

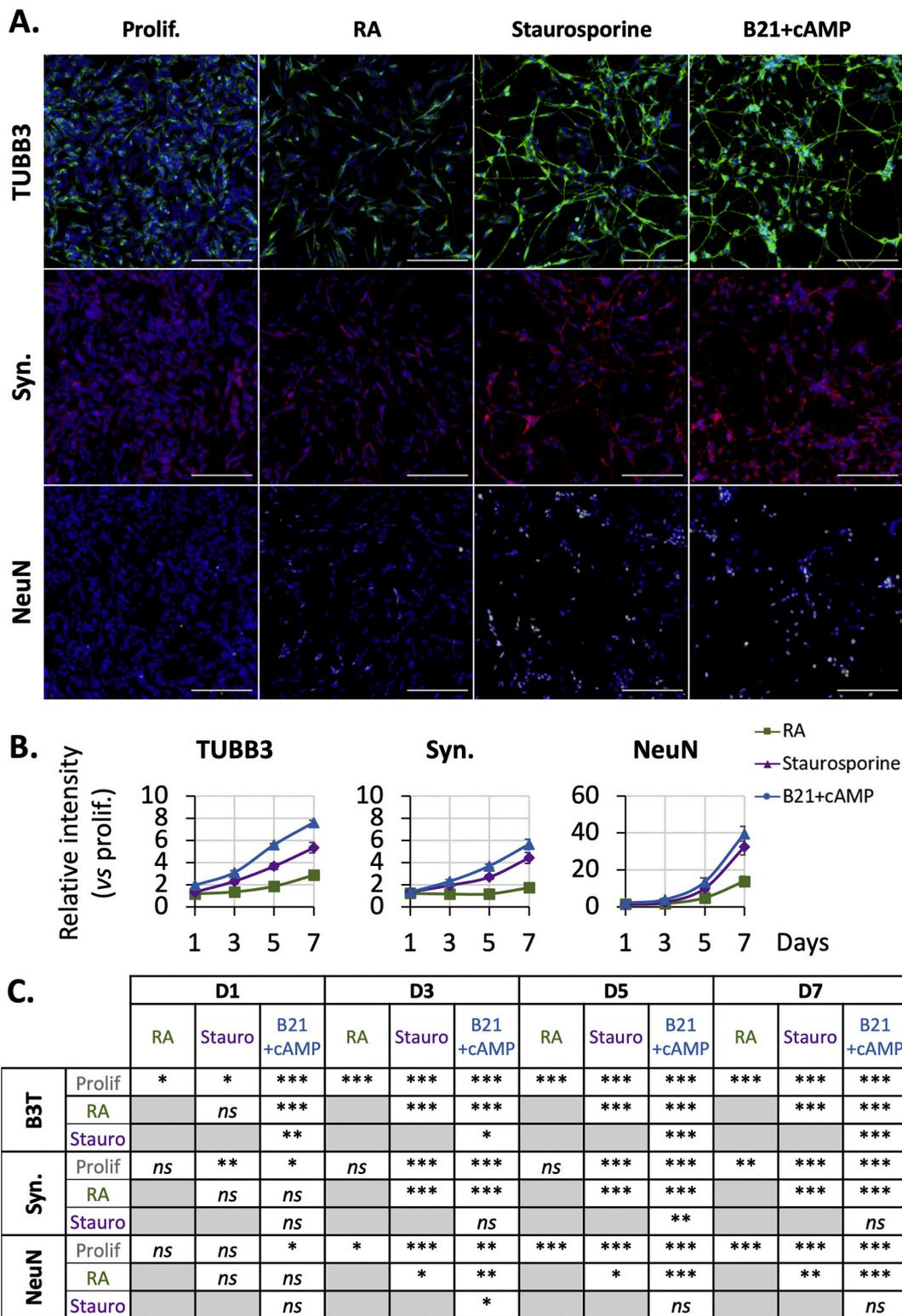


Fig. 4. Kinetic analysis of pan-neuronal marker expression in SH-SY5Y cells. **A.** Cellular localization of TUBB3, synaptophysin and NeuN at day 5. Cell were stained for nuclear DNA by Hoechst (in blue), for TUBB3 (in green), synaptophysin (in red), and NeuN (in yellow). Scale bar = 200 μ m. **B.** Quantitative analysis of immunostainings. The stain integrated intensity of differentiated cells was normalized to the stain integrated intensity of proliferating cells (n = 12). Error bar represents the SEM. **C.** Statistical analysis. Mean values were significantly different according to Student test for parametric samples with equal variances, Welch test for parametric samples with different variances, or Wilcoxon test for non-parametric samples. **p*-value <0.05; ***p*-value <0.005; ****p*-value <0.0005. Prolif.: Proliferation medium; RA: Retinoic Acid; cAMP: cyclic Adenosine Monophosphate; Syn.: Synaptophysin; ns: not significant. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

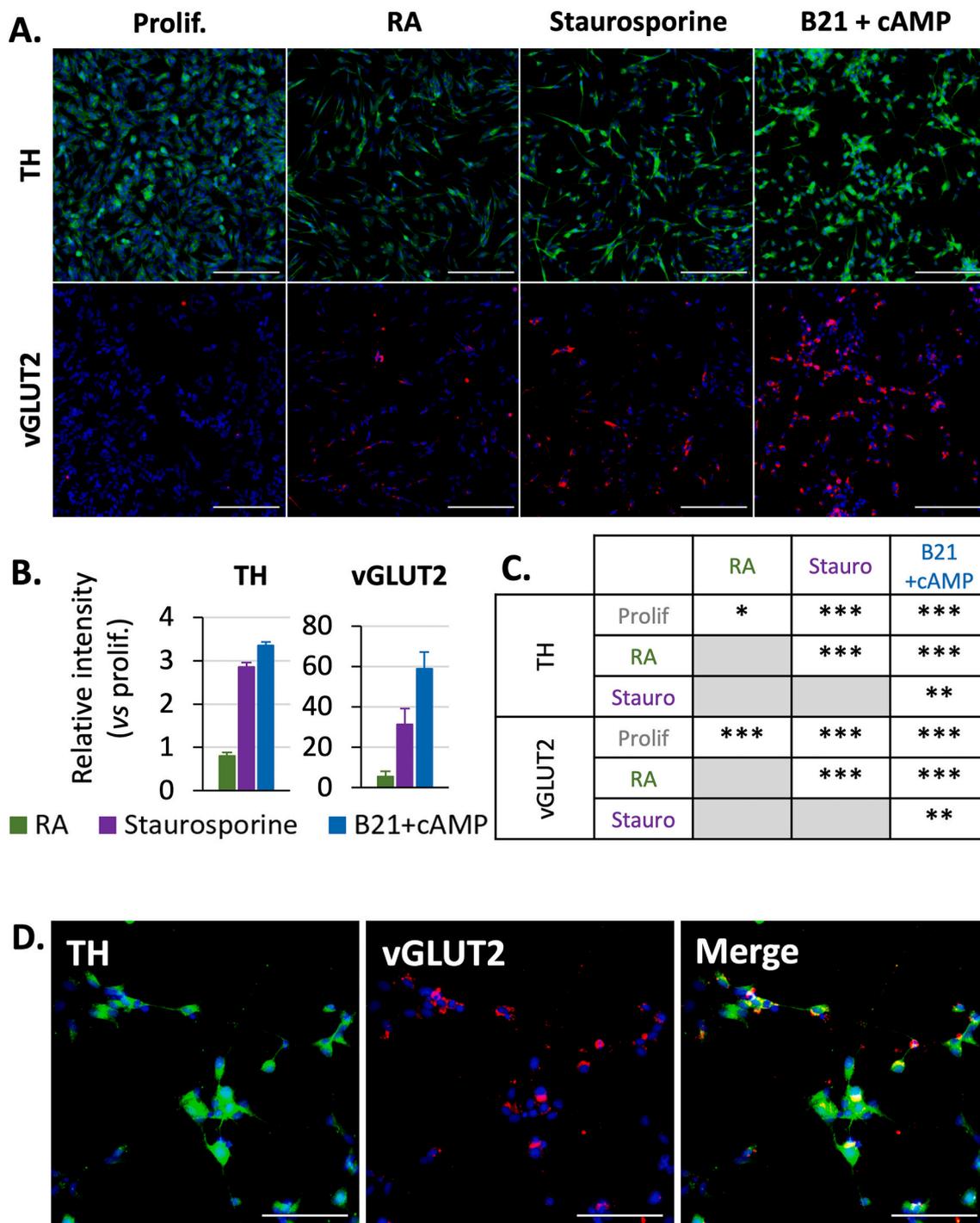


Fig. 5. Analysis of neuronal specificity of SH-SY5Y cells at day 5. **A.** Cellular localization of TH and vGLUT2. Cells were stained for nuclear DNA by Hoechst (in blue), for TH (in green), and for vGLUT2 (in red). Scale bar = 200 μ m. **B.** Quantitative analysis of immunostainings. The stain integrated intensity of differentiated cells was normalized to the stain integrated intensity of proliferating cells ($n = 24$). Error bar represents the SEM. **C.** Statistical analysis. Mean values were significantly different according to Student test for parametric samples with equal variances, Welch test for parametric samples with different variances, or Wilcoxon test for non-parametric samples. * p -value <0.05; ** p -value <0.005; *** p -value <0.0005. **D.** Co-expression of TH and vGLUT2 in SH-SY5Y cells differentiated in B21 + cAMP medium. Scale bar = 200 μ m. Prolif.: Proliferation medium; RA: Retinoic Acid; cAMP: cyclic Adenosine Monophosphate; TH: Tyrosine Hydroxylase; vGLUT2: vesicular Glutamate Transporter 2. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

medium (Fig. 6). Interestingly, tamoxifen exerted a neurotoxic effect more efficiently on cells differentiated in staurosporine medium, and not in B21 + cAMP, with LC50 = 11 μ M in staurosporine medium, 21 μ M in B21 medium, and 24 μ M in RA medium (Fig. 6).

3.6. Cell proliferation in 3D

In the context of the growing development of 3D cell culture technologies, we also tested the effects of the previously selected differentiation media (RA, staurosporine and B21 + cAMP media) in 3D cell culture, by using a hyaluronic acid-based hydrosccaffold™

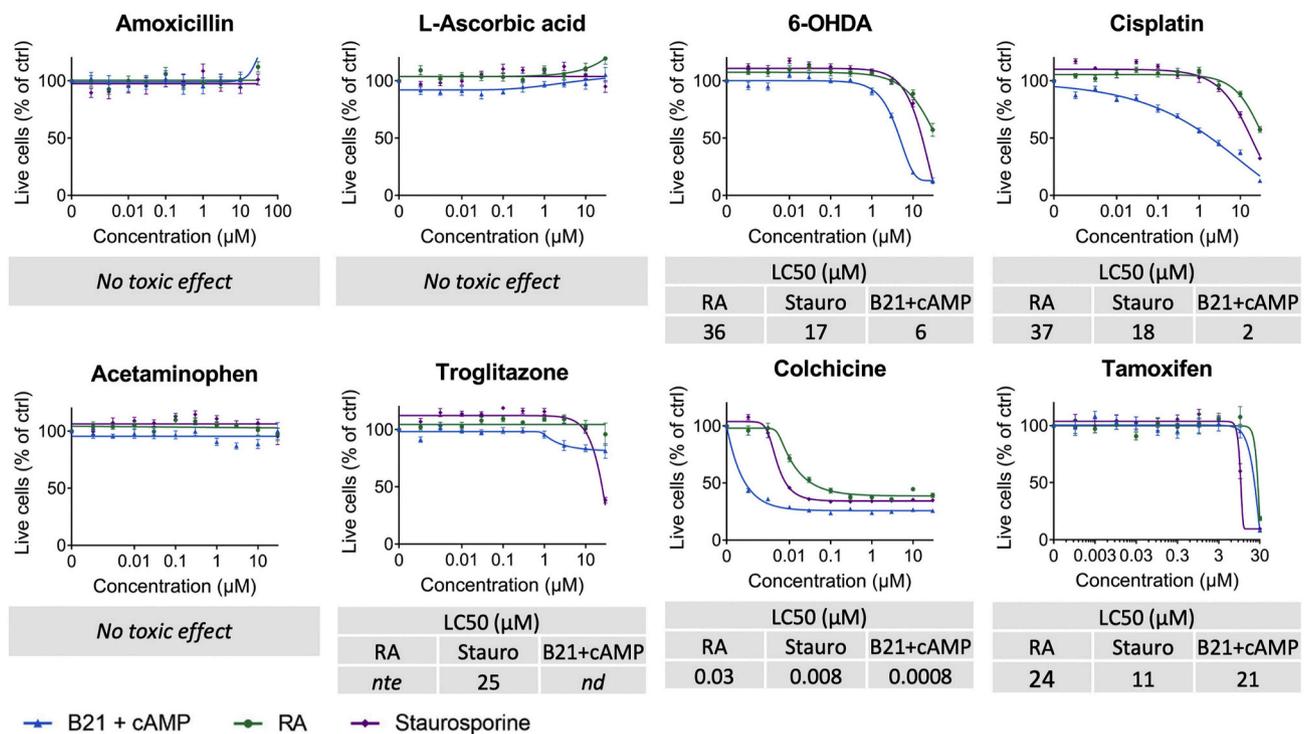


Fig. 6. SH-SY5Y cell viability after a 48 h exposure to a set of compounds of known toxicity. Amoxicillin and L-ascorbic acid are known as non-toxic compounds. Acetaminophen and troglitazone are known as toxic but non-neurotoxic compounds. 6-OHDA, colchicine, cisplatin and tamoxifen are known as neurotoxic compounds. The number of live cells exposed to the compounds was normalized to the number of live cells in vehicle control ($n = 12$). Error bar represents the SEM. RA: Retinoic Acid; cAMP: cyclic Adenosine Monophosphate; 6-OHDA: 6-hydroxydopamine; *nd*: not determined; *n*: no toxic effect.

(BIOMIMESYS® Brain technology).

In BIOMIMESYS® Brain hydrosc scaffold™, SH-SY5Y formed spheroids in all tested media, with no neurite outside the spheroids (Fig. 7A).

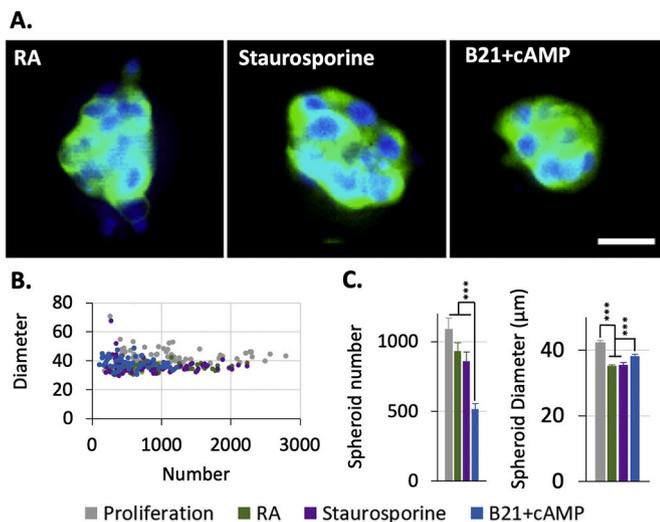


Fig. 7. Culture of SH-SY5Y cells in a 3D hydrosc scaffold for 5 days. A. Spheroid organization. Nuclei were stained by Hoechst (blue) and TUBB3 was immunostained (green). Scale bar = 20 µm. B. Correlation between the number of spheroids per well and their diameter. C. Cell proliferation ($n = 72$). Mean values were significantly different according to Student test for parametric samples with equal variances, Welch test for parametric samples with different variances, or Wilcoxon test for non-parametric samples. * p -value < 0.05; ** p -value < 0.005; *** p -value < 0.0005. Error bar represents the SEM. RA: Retinoic Acid; cAMP: cyclic Adenosine Monophosphate. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

There was no correlation between the number of spheroids per well and the diameter of spheroids (Fig. 7B). Therefore, variations in spheroid size were not linked to variations in cellular clustering. The number of spheroids was linked to the number of cells which survived and adhered to the matrix, and the diameter indicated the proliferation of cells (Fig. 7C). In the three differentiation media, spheroid diameters were significantly lower than in the proliferation medium (35.4 ± 0.3 µm in RA medium, 36.1 ± 0.7 µm in staurosporine medium, 38.4 ± 0.5 in B21 + cAMP medium, and 42.8 ± 0.7 µm in proliferation medium) (Fig. 7C). Thus, the differentiation media previously selected in 2D led also to a slowdown in cell proliferation in 3D cell culture. Interestingly, the number of spheroids was lower in the B21 + cAMP medium.

3.7. Impact of differentiation media on neuronal marker expression in 3D

NeuN and vGLUT2 were not detected in SH-SY5Y in 3D (data not shown). In B21 + cAMP medium, the intensities of the three markers (TUBB3, Synaptophysin and TH) were significantly increased compared to proliferation medium (TUBB3: ratio = 2.6 ± 0.3 , p -value = 0.0001055; Synaptophysin: ratio = 2.1 ± 0.2 , p -value = 0.0008879; TH: 1.7 ± 0.2 , p -value = 0.004435). In staurosporine, TUBB3 and TH expression were also significantly enhanced (TUBB3: ratio = 1.6 ± 0.2 , p -value = 0.00007174; TH: ratio = 1.4 ± 0.1 , p -value = 0.03128), but not synaptophysin (ratio = 1.4 ± 0.2 , p -value = 0.05966). In the RA medium, there was no neuronal marker increased (ratios < 1 for the three markers) (Fig. 8, all panels).

3.8. Neurotoxicity assessment in 3D

No toxicity was observed for non-neurotoxic compounds, in any differentiation media, except for troglitazone in staurosporine medium, like in 2D, but with a shift in the LC50 ($LC50_{Troglitazone} = 90$ µm in 3D, and 26 µm in 2D) (Fig. 9). All neurotoxic molecules led a toxic effect in the three media, with difference in LC50 according to the medium. Cells

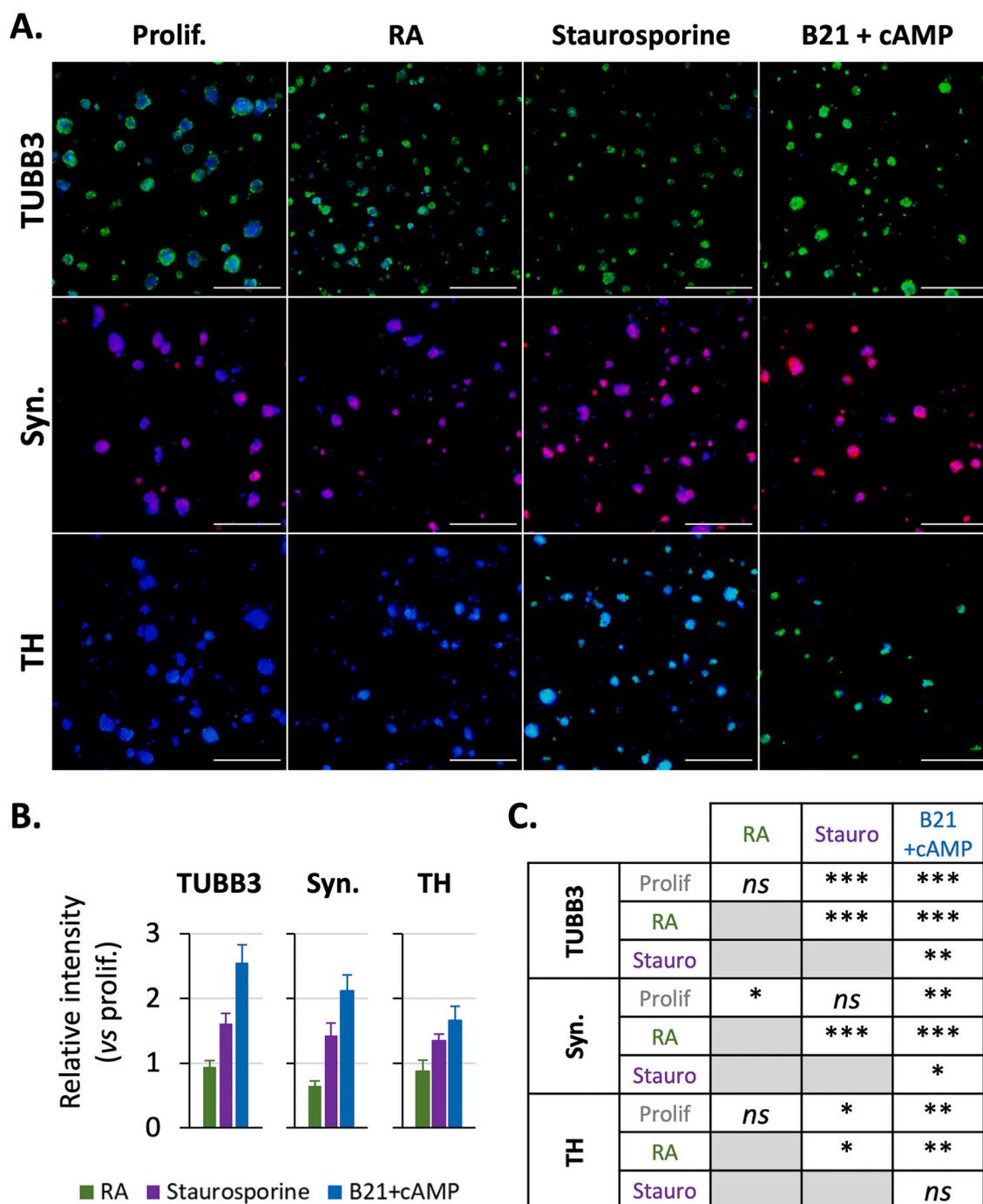


Fig. 8. Expression of neuronal markers in SH-SY5Y cells at day 5 in 3D culture. A. Neuronal marker expression. Cells were stained for nuclei by Hoechst (in blue), for TUBB3 (in green), Synaptophysin (in red), and TH (in green). Scale bar = 200 μ m. B. Quantitative analysis of immunostainings. The stain average intensity of differentiated cells was normalized to the stain average intensity of proliferating cells ($n = 12$). Error bar represents the SEM. C. Statistical analysis. Mean values were significantly different according to Student test for parametric samples with equal variances, Welch test for parametric samples with different variances, or Wilcoxon test for non-parametric samples. * p -value < 0.05 ; ** p -value < 0.005 ; *** p -value < 0.0005 . Prolif.: Proliferation medium; RA: Retinoic Acid; cAMP: cyclic Adenosine Monophosphate; Syn.: Synaptophysin; TH: Tyrosine Hydroxylase; *ns*: not significant. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

were more sensitive to 6-OHDA in B21 + cAMP ($LC_{50_{6OHDA}} = 41 \mu$ M), followed by staurosporine ($LC_{50_{6OHDA}} = 94 \mu$ M), and RA (not determined). Under cisplatin exposure, viability of staurosporine and RA-differentiated cells remained at 100% until 0.3 μ M, whereas a toxic effect was detected from the first concentration (0.003 μ M) in B21 + cAMP. However, the curve slopes were very different (-0.1 in B21 + cAMP, -0.5 in RA, and -10.2 in staurosporine medium): cells were more sensitive to cisplatin for low concentrations ($< 1 \mu$ M) with B21 +

cAMP-induced differentiation, then more sensitive with staurosporine-induced differentiation for the higher concentrations. The LC_{50} was not measurable with the tested concentrations. Under colchicine exposure, the viability stabilized to 83% at 0.01 μ M in B21 + cAMP, to 85% in RA and to 68% in staurosporine medium both at 0.03 μ M. Tamoxifen exposure caused also observed a toxic effect in the three media, with a higher sensitivity in staurosporine (Fig. 9).

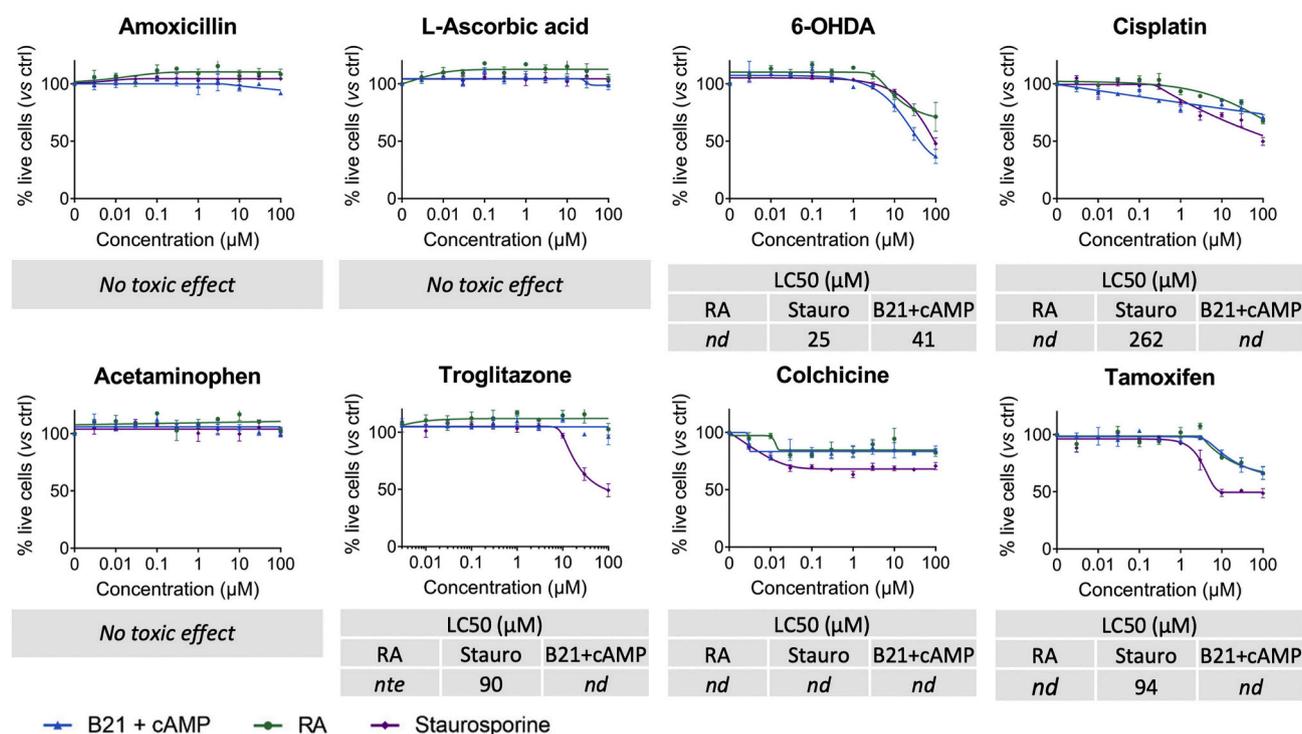


Fig. 9. SH-SY5Y cell viability after a 48 h exposure to a set of compounds of known toxicity in 3D culture. Amoxicillin and L-ascorbic acid are known as non-toxic compounds. Acetaminophen and troglitazone are known as toxic but non-neurotoxic compounds. 6-OHDA, colchicine, cisplatin and tamoxifen are known as neurotoxic compounds. The percentage of live cells per well exposed to the compounds was normalized to the percentage of live cells per well in vehicle control ($n=3$). Error bar represents the SEM. RA: Retinoic Acid; cAMP: cyclic Adenosine Monophosphate; 6-OHDA: 6-hydroxydopamine; *nd*: not determined; *n*te: no toxic effect.

4. Discussion

This is the first study that compares the neuronal phenotypes and the neurotoxic responses of SH-SY5Y cells cultured in different differentiation environments. It tended to respond to the concerns raised by the pharmaceutical industry about the use of a relevant *in vitro* cell model for CNS high content screening.

Among our results, it should be noted that even non-differentiated SH-SY5Y cells displayed some neuronal features, including neurite outgrowth and some neuronal marker expression like TUBB3, synaptophysin and TH, as found in cells originating from neuroblastoma. However, the differentiation media clearly enhanced the neuronal phenotype in 2D and in 3D cultures. Overall, differentiated SH-SY5Y cells displayed a dopaminergic neuron phenotype in all the tested media, as showed by the enhanced TH expression. Interestingly, the glutamatergic marker vGLUT2, which also present in some dopaminergic neurons as a secondary neurotransmitter, was also expressed in 2D cultures (Kawano et al., 2006; Trudeau, 2004). Still, the variations in the marker protein profile obtained here might evoke the highly variable results in neurotoxicity assays observed here and in the literature when a single method of differentiation is used (Tieu et al., 1999). Therefore, the action of each differentiating factor on SH-SY5Y cells needs to be considered in neurotoxicity assays, as discussed in the following sections.

Retinoic acid is a well-known morphogen able to induce cellular differentiation as well as a potent inhibition of cell proliferation (Lotan, 1996; Melino et al., 1997). It is the most commonly used differentiating factor for SH-SY5Y cells (Xicoy et al., 2017). However, in our culture conditions and time frame, RA was the least effective compound in inducing a neuronal phenotype, when compared to staurosporine or B21 + cAMP. Indeed, although RA slew cell proliferation down and promoted neurite elongation, the expression of neuronal proteins was only slightly increased compared to non-differentiated SH-SY5Y cells in

2D, and even not increased at all in 3D cell cultures. Since the lowest sensitivity to neurotoxic compounds was found in our both 2D and 3D cultures under RA, one might consider this result as a direct consequence of the less differentiated phenotype of SH-SY5Y cells induced by this compound. This is still consistent with the well-known RA-induced activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in SH-SY5Y cells, which promotes cell survival (López-Carballo et al., 2002). Also the opposite upregulation of anti-apoptotic Bcl-2 protein and downregulation of apoptotic p53 protein by RA are potential modifiers of the neurotoxic response observed here (Itano et al., 1996; Tieu et al., 1999).

Staurosporine is a well-known PKC inhibitor, which promotes cell cycle arrest and neurite outgrowth in SH-SY5Y cells (Leli et al., 1993; Tieu et al., 1999). In our study, the differentiating action of staurosporine was confirmed, to an intermediate extent between B21 + cAMP and RA, in 2D and 3D cultures. Consistent with these results, an intermediate sensitivity to neurotoxic compounds was observed in 2D cultures, except for tamoxifen, to which our SH-SY5Y cells were interestingly the most sensitive. This higher sensitivity, compared to the one in RA-differentiated cells, had already been reported and explained by the decreased levels of Bcl-2 and increased levels of p53 after staurosporine exposure, contrary to after RA exposure (Itano et al., 1996; Tieu et al., 1999). Of notice, staurosporine itself is a neurotoxic compound, which has been used in this study at non-toxic concentrations for differentiation purposes (Tieu et al., 1999). This might elicit an exacerbated neurotoxic response to the set of compounds tested. Indeed, the observed mortality of staurosporine-differentiated cells after troglitazone exposure, although intended as a non-neurotoxic exposure, warns about the use of staurosporine as a differentiating factor, and needs further investigation. In line with this observation, the higher sensitivity of our cells to tamoxifen despite a less differentiated phenotype of SH-SY5Y cells compared to the ones under B21-cAMP, imply yet unknown molecular interactions that need to be clarified.

The cAMP + B27 supplement is also known to promote SH-SY5Y differentiation (Kovalevich and Langford, 2013). Our combination of B21 (a B27-derived supplement) with cAMP was particularly interesting because it induced the most potent neuronal differentiation regarding all the tested criteria (slowdown of cell proliferation, promotion of neurite outgrowth and neuronal marker expression) in 2D and in 3D cultures. The highest sensitivity to neurotoxic compounds found in 2D cultures, except for tamoxifen as previously discussed, strongly suggests the link between the level of differentiation into neurons and the neurotoxic response. As cAMP + B21 was a chemically defined medium (FBS-free and more generally animal-free), it holds strong potential for the relevance and reproducibility required by the high content screening procedures in the pharmaceutical industry. As for staurosporine, cAMP is known to decrease Bcl-2 expression, and also to enhance TH expression (Kume et al., 2008). This was confirmed in this study. Otherwise, the SH-SY5Y cells under B21 + cAMP displayed the strongest dopaminergic phenotype, supported by the highest TH expression among our conditions. Consistently, these cells were the most sensitive to OHDA, both in 2D and 3D cultures. This relates to the ability of this molecule to provoke neurodegeneration of dopaminergic neurons (Ungerstedt, 1968). Cisplatin and colchicine are both anti-proliferative and neurotoxic compounds. Cisplatin kills both cancerous and neuronal cells by similar apoptosis mechanisms (Gill and Windebank, 1998), whereas the toxic effect of colchicine is linked to an interaction with tubulin, leading to the disruption of microtubules (Alkadi et al., 2018). As proliferation of our SH-SY5Y cells was strongly slowed down whatever the differentiation medium, we might observe here the sole neurotoxic effect of these two compounds. Consistently, the global cytotoxicity observed here was higher under B21 + cAMP, which also represented the most potent differentiating environment, the weakest being RA in 2D cell cultures.

Interestingly, results were different in 3D cultures. Exactly, a higher sensitivity of SH-SY5Y cells to colchicine and to high cisplatin concentrations was found when cells were previously differentiated with staurosporine than with B21 + cAMP, despite a higher neuronal differentiation in B21 + cAMP medium. These results could be explained by the anti-proliferative effect of colchicine and cisplatin, when the neuronal differentiation was not sufficient. Moreover, the cell sensitivity to compounds was overall lower in 3D compared to the 2D conditions, as often described in the literature (Ko et al., 2020). A shift in the LC50 or a sub-population of resistant cells was observed in 3D. This lower sensitivity can be explained by several hypotheses. First, the cell organization in spheroids can modify the exposition of cells to the compounds, although the spheroids were quite small. In addition, the strengthened cell-cell interactions in spheroids could lead to resistances to the toxic compounds. Moreover, the ECM impacts on molecule bioavailability, that might change the diffusion of both toxic compounds and differentiation factors (Clause and Barker, 2013; Sainio and Järveläinen, 2020; Su et al., 2017). Consequently, the neuronal differentiation can be delayed or reduced, as showed here by a lower expression of studied neuronal markers, in particular in RA medium where the neuronal marker expression was not increased, but also in staurosporine and B21 + cAMP media where NeuN was not detected. Therefore, the differentiation conditions in 2D should not be applied in 3D in a strictly similar way. It seems essential to optimize the differentiation protocols in 3D by adjusting concentrations and times to get an optimal and homogeneous cell maturation, as described (Harris et al., 2017).

To conclude, the given differentiation environment to SH-SY5Y cells *in vitro* has a great impact on the acquisition of the neuronal phenotype, with consequences on the response to neurotoxic compounds. The B21 + cAMP medium was particularly interesting for acute neurotoxicity assessment by high content screening in pharmaceutical industries, because it is chemically-defined and induced the strongest neuronal phenotype, associated with an overall higher sensitivity to compounds. The 3D cell device mimicking the ECM also impacted differentiation and neurotoxic response, and requires a more optimized culture conditions

compared to the straightforward 2D culture. The assessment of neurotoxicity with a neuronal cell line requires the *in vitro* differentiation environment to be considered carefully in research as well as in drug discovery.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105235>.

Funding

This work was supported by the French National Association for the Research and Technology (ANRT, fellowship to V. De Conto, agreement n°2017/1060), by the Public Investment Bank (BPI France), by Région Hauts-de-France, and by HCS Pharma, France.

Declaration of Competing Interest

Vincent Bérézowski declares that he has no conflict of interest. All other authors were employed by HCS Pharma, and their research and authorship of this article was completed within the scope of their employment with HCS Pharma. Nathalie Maubon owns shares in HCS Pharma.

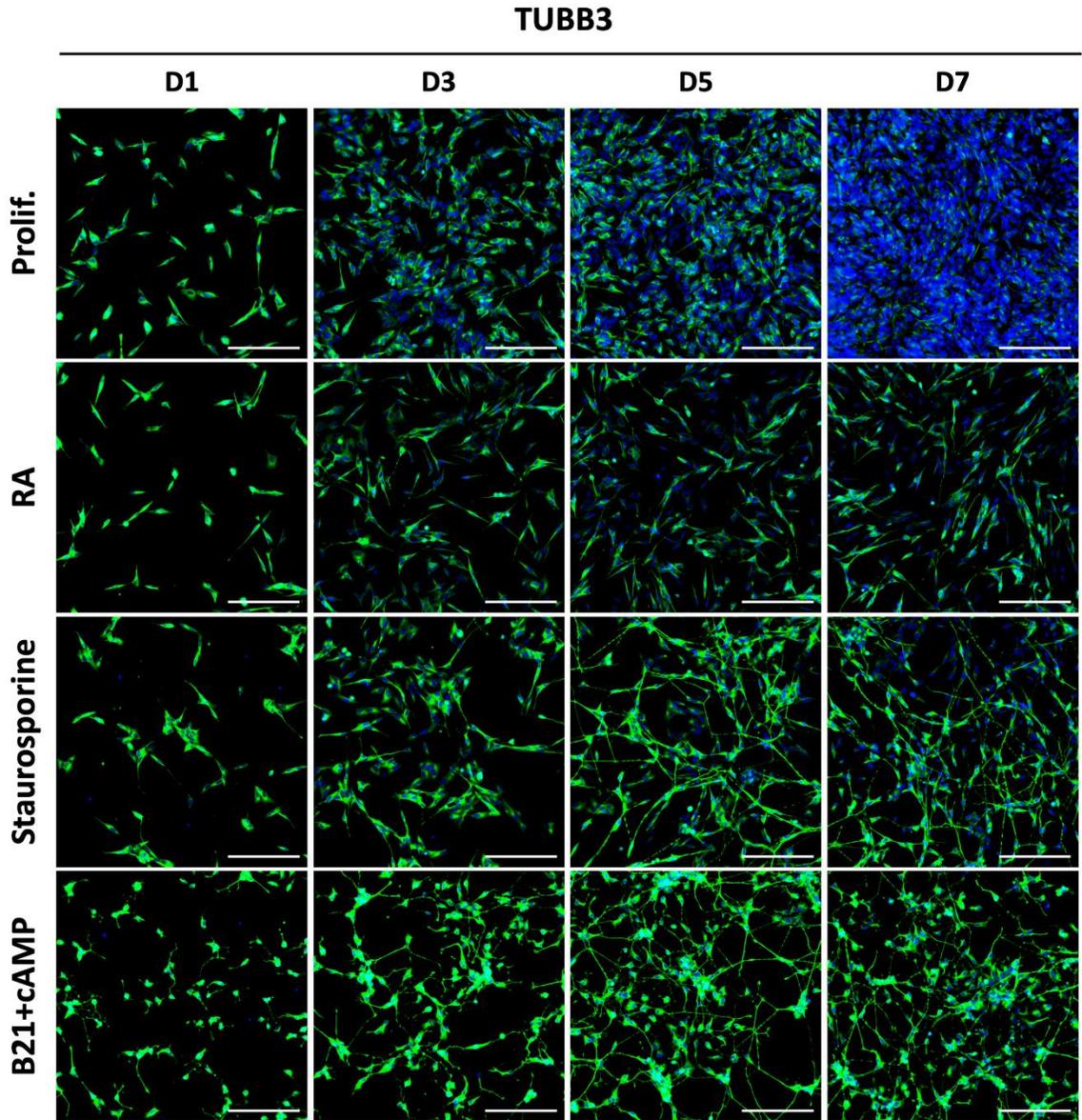
Acknowledgements

The authors thank Laura Mahoney Sanchez for her help concerning the validation of primary antibodies.

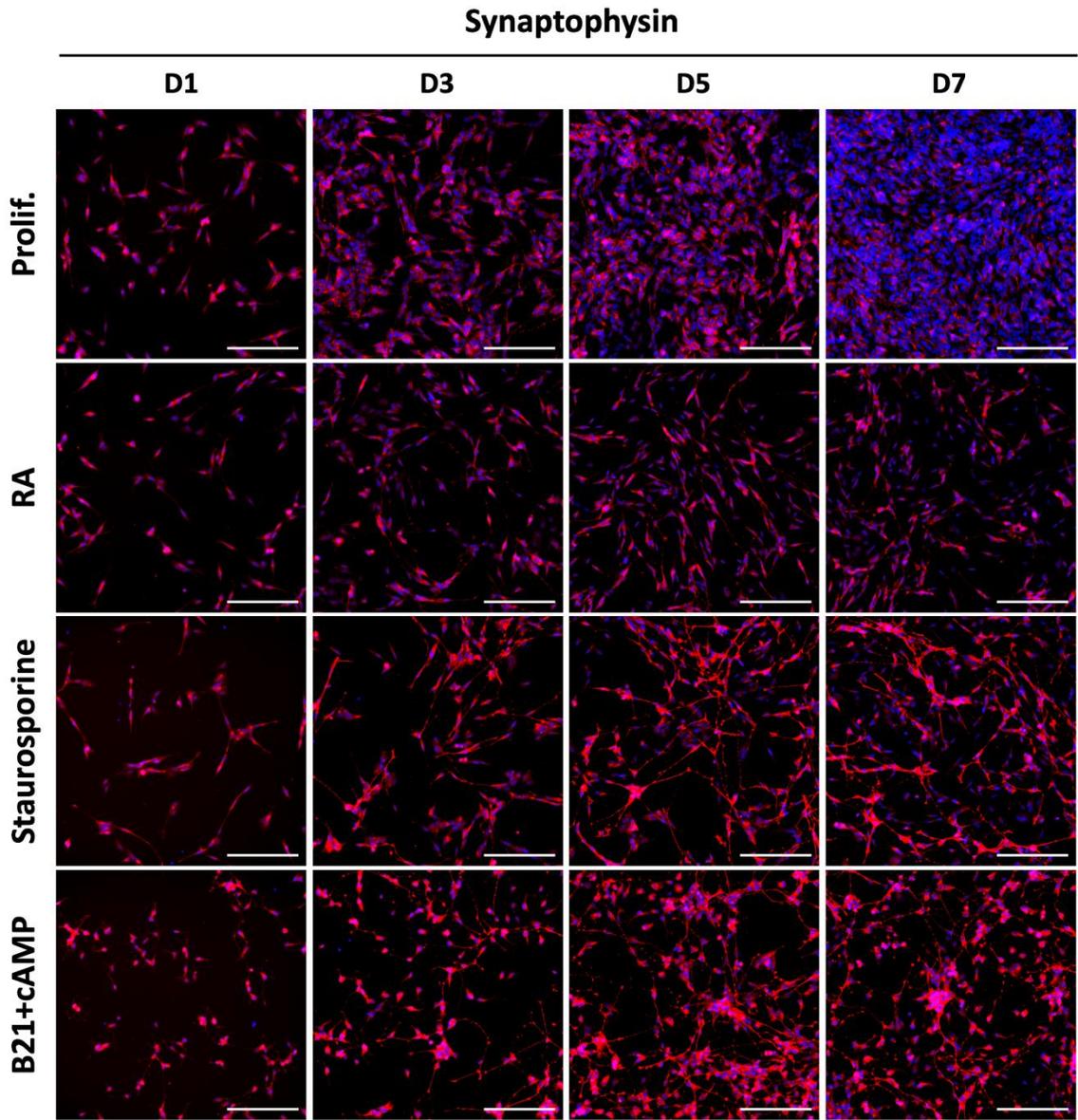
References

- Alkadi, H., Khubeiz, M.J., Jbeily, R., 2018. Colchicine: a review on chemical structure and clinical usage. *Infect. Disord. Drug Targets* 18, 105–121. <https://doi.org/10.2174/1871526517666171017114901>.
- Clause, K.C., Barker, T.H., 2013. Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 830–833. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.04.011>.
- Cook, D., Brown, D., Alexander, R., March, R., Morgan, P., Satterthwaite, G., Pangalos, M.N., 2014. Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 419–431. <https://doi.org/10.1038/nrd4309>.
- Gill, J.S., Windebank, A.J., 1998. Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle. *J. Clin. Invest.* 101, 2842–2850. <https://doi.org/10.1172/JCI1130>.
- Harris, G., Hogberg, H., Hartung, T., Smirnova, L., 2017. 3D differentiation of LUHMES cell line to study recovery and delayed neurotoxic effects. *Curr. Protoc. Toxicol.* 2017 <https://doi.org/10.1002/cptx.29>.
- Itano, Y., Ito, A., Uehara, T., Nomura, Y., 1996. Regulation of Bcl-2 protein expression in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: positive and negative effects of protein kinases C and A, respectively. *J. Neurochem.* 67, 131–137. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67010131.x>.
- Kawano, M., Kawasaki, A., Sakata-Haga, H., Fukui, Y., Kawano, H., Nogami, H., Hisano, S., 2006. Particular subpopulations of midbrain and hypothalamic dopamine neurons express vesicular glutamate transporter 2 in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 498, 581–592. <https://doi.org/10.1002/cne.21054>.
- Ko, K.R., Tam, N.W., Teixeira, A.G., Frampton, J.P., 2020. SH-SY5Y and LUHMES cells display differential sensitivity to MPP+, tunicamycin, and epoxomicin in 2D and 3D cell culture. *Biotechnol. Prog.* 36, e2942 <https://doi.org/10.1002/btpr.2942>.
- Kovalevich, J., Langford, D., 2013. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1078, 9–21. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5_2.
- Kume, T., Kawato, Y., Osakada, F., Izumi, Y., Katsuki, H., Nakagawa, T., Kaneko, S., Niidome, T., Takada-Takatori, Y., Akaike, A., 2008. Dibutyryl cyclic AMP induces differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into a noradrenergic phenotype. *Neurosci. Lett.* 443, 199–203. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.07.079>.
- Leli, U., Shea, T.B., Cataldo, A., Hauser, G., Grynspan, F., Beermann, M.L., Liepkalns, V. A., Nixon, R.A., Parker, P.J., 1993. Differential expression and subcellular localization of protein kinase C alpha, beta, gamma, delta, and epsilon isoforms in SH-SY5Y neuroblastoma cells: modifications during differentiation. *J. Neurochem.* 60, 289–298. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb05850.x>.
- López-Carballo, G., Moreno, L., Masiá, S., Pérez, P., Barettoni, D., 2002. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 277, 25297–25304. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201869200>.
- Lotan, R., 1996. Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 10, 1031–1039. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.9.8801164>.

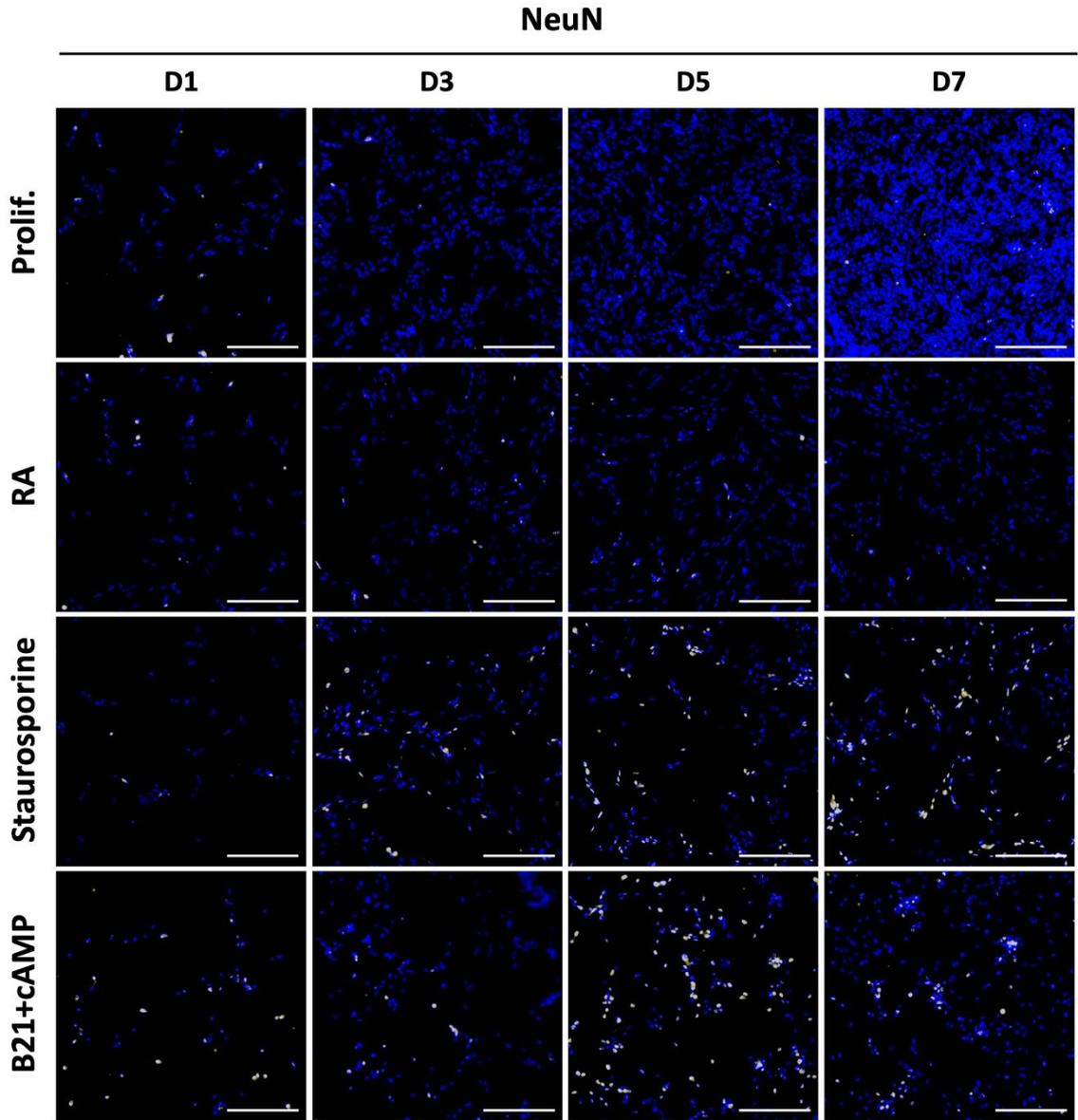
- Melino, G., Thiele, C.J., Knight, R.A., Piacentini, M., 1997. Retinoids and the control of growth/death decisions in human neuroblastoma cell lines. *J. Neuro-Oncol.* 31, 65–83. <https://doi.org/10.1023/a:1005733430435>.
- Sainio, A., Järveläinen, H., 2020. Extracellular matrix-cell interactions: focus on therapeutic applications. *Cell. Signal.* 66, 109487. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109487>.
- Su, W., Foster, S.C., Xing, R., Feistel, K., Olsen, R.H.J., Acevedo, S.F., Raber, J., Sherman, L.S., 2017. CD44 transmembrane receptor and hyaluronan regulate adult hippocampal neural stem cell quiescence and differentiation. *J. Biol. Chem.* 292, 4434–4445. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.774109>.
- Tieu, K., Zuo, D.M., Yu, P.H., 1999. Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells: involvement of bcl-2 and p53 proteins. *J. Neurosci. Res.* 58, 426–435.
- Trudeau, L.-E., 2004. Glutamate co-transmission as an emerging concept in monoamine neuron function. *J. Psychiatry Neurosci. JPN* 29, 296–310.
- Ungerstedt, U., 1968. 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 5, 107–110. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(68\)90164-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(68)90164-7).
- Wilson, M.S., Graham, J.R., Ball, A.J., 2014. Multiparametric high content analysis for assessment of neurotoxicity in differentiated neuronal cell lines and human embryonic stem cell-derived neurons. *Neurotoxicology* 42, 33–48. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.03.013>.
- Xicoy, H., Wieringa, B., Martens, G.J.M., 2017. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol. Neurodegener.* 12 <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>.



Supp. Fig. 1. Kinetic analysis of TUBB3 expression in SH-SY5Y cells. Cells were stained for nuclear DNA by Hoechst (in blue) and for TUBB3 (in green). Scale bar = 200 μ m. Prolif.: Proliferation medium; RA: Retinoic Acid; cAMP: cyclic Adenosine Monophosphate.



Supp. Fig. 2. Kinetic analysis of Synaptophysin expression in SH-SY5Y cells. Cells were stained for nuclear DNA by Hoechst (in blue) and for Synaptophysin (in red). Scale bar = 200 μ m. Prolif.: Proliferation medium; RA: Retinoic Acid; cAMP: cyclic Adenosine Monophosphate.



Supp. Fig. 3. Kinetic analysis of NeuN expression in SH-SY5Y cells. Cells were stained for nuclear DNA by Hoechst (in blue) and for NeuN (in yellow). Scale bar = 200 μ m. Prolif.: Proliferation medium; RA: Retinoic Acid; cAMP: cyclic Adenosine Monophosphate.

DISCUSSION GENERALE : Bilan et perspectives scientifiques et industrielles

1. Rappel du contexte de l'étude

L'industrie pharmaceutique fait face à un important problème qui est l'échec de 90% des molécules en phase clinique (Biotechnology Innovation organization *et al.*, 2016). Le SNC est particulièrement concerné, à la fois par les échecs liés à un manque d'efficacité et par les échecs liés à la toxicité. Ce constat révèle un manque de pertinence des modèles utilisés pour l'évaluation préclinique des molécules. Parmi ces modèles, les modèles *in vitro* représentent une piste prometteuse puisqu'ils peuvent être réalisés avec des cellules humaines, et ainsi contourner les différences inter-espèces (Lin *et al.*, 2014). Cependant, les modèles cérébraux *in vitro* sont souvent trop simples en comparaison de la complexité du SNC. Souvent centrés sur les cellules neuronales, ils ne tiennent pas compte du microenvironnement. Dans cette étude, trois composantes du microenvironnement ont été considérées : le milieu moléculaire extracellulaire, la matrice extracellulaire, et l'environnement glial. Les données de la littérature montrent que ces éléments interagissent entre eux et avec les neurones, et sont ainsi totalement impliqués dans le fonctionnement neuronal, et plus généralement dans le fonctionnement du SNC, en conditions physiologiques mais également pathologiques (Sainio and Järveläinen, 2020; Bonneh-Barkay and Wiley, 2009; Wiese *et al.*, 2012; Miyazaki and Asanuma, 2020; Song and Dityatev, 2018).

L'importance des microenvironnements moléculaire, matriciel et glial ont ici été étudiés dans deux modèles cérébraux *in vitro* utilisables en criblage phénotypique, développés en parallèle : un modèle pathologique pour la recherche de nouveaux médicaments contre la maladie de Parkinson, et un modèle sain pour évaluer les effets neurotoxiques de molécules.

Dans cette étude, les analyses ont majoritairement été réalisées par imagerie et analyse d'images quantitative automatisée. En effet, cette technique offre différents avantages. Tout d'abord, l'analyse de l'expression protéique par imagerie permet de mesurer l'expression finale, et donc de tenir compte des mécanismes de régulation qui peuvent intervenir par exemple au niveau transcriptionnel. De plus, l'imagerie permet d'obtenir des informations sur la localisation des protéines. L'automatisation de l'imagerie et des analyses permet d'obtenir des résultats

objectifs et à haut débit. Cette méthode a également été choisie par rapport à l'utilisation finale des modèles développés, qui est le criblage phénotypique.

2. Importance du microenvironnement moléculaire en culture 2D et mise au point d'un modèle pour évaluer la neurotoxicité par criblage phénotypique à haut débit

L'importance du microenvironnement soluble a été évaluée au travers de l'étude de la méthode de différenciation des cellules SH-SY5Y, en 2D dans un premier temps. En effet, ces cellules couramment utilisées pour les tests de neurotoxicité peuvent être différenciées en neurones par plusieurs milieux de culture variant dans leur composition en facteurs de différenciation. Des études avaient préalablement montré des différences dans les voies de signalisation activées et dans la régulation de protéines pro- ou anti-apoptotiques, ainsi que dans la réponse cellulaire, selon la méthode de différenciation (Tieu *et al.*, 1999).

Une originalité de la présente étude était le nombre de conditions de différenciation comparées expérimentalement en simultané. En effet, les méthodes de différenciation étaient souvent étudiées de manière indépendante, sans comparaison avec les autres méthodes (Kume *et al.*, 2008; López-Carballo *et al.*, 2002). Quelques études comparatives ont été menées expérimentalement, mais ne concernaient qu'un petit nombre de méthodes ; par exemple Tieu *et al.* avaient comparé l'influence de la staurosporine et de l'acide rétinoïque sur la vulnérabilité des cellules et l'expression des protéines Bcl-2 et p53 (Tieu *et al.*, 1999). La plus grande comparaison entre les méthodes de différenciation des cellules SH-SY5Y a été réalisée par Kovalevich et Langford en 2013, mais de manière non-expérimentale, par révision de la littérature (Kovalevich and Langford, 2013). Une seconde particularité de notre étude reposait sur la méthode d'analyse employée, avec l'utilisation d'imagerie à fluorescence automatisée suivie de l'analyse quantitative d'images.

Les résultats de cette étude ont montré que le phénotype neuronal, et en particulier le niveau de maturité neuronal, variait en fonction de la méthode de différenciation. De manière cohérente, les cellules les plus matures présentaient une plus grande sensibilité aux composés neurotoxiques en 2D. Deux exceptions ont cependant été observées : les cellules SH-SY5Y

différenciées à la staurosporine, moins matures que celles différenciées en B21+AMPC, étaient les plus sensibles au tamoxifène, connu pour être neurotoxique, et présentaient également une sensibilité à la troglitazone, pourtant connue pour être non neurotoxique. Ces observations soulignaient que la méthode de différenciation n'influe pas uniquement sur la maturité neuronale mais pouvait également modifier la réponse neuronale au travers d'autres mécanismes moléculaires inductibles, qui mériteraient d'être davantage étudiés.

Cette étude soulignait donc l'importance de considérer avec précaution les milieux de culture utilisés, qui peuvent fortement impacter la réponse cellulaire et donc les conclusions tirées en recherche académique comme industrielle, dans le contexte où de nombreuses études utilisant la lignée SH-SY5Y ne précisent pas la méthode de différenciation utilisée : par exemple, 2% des études sur la maladie de Parkinson utilisant les cellules SH-SY5Y ne précisent pas la méthode de culture (Xicoy *et al.*, 2017).

Bien qu'il soit moins cité dans la littérature que l'acide rétinoïque, l'AMPC en milieu neurobasal supplémenté en B27 – dont dérive le B21 – avait plusieurs fois été décrit pour son effet différenciant sur les SH-SY5Y (Kume *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2004; Sayas *et al.*, 1999; Xicoy *et al.*, 2017). Le milieu B21+AMPC a démontré ici plusieurs avantages qui en font un milieu d'intérêt pour le criblage de molécules. Premièrement, il a entraîné la plus haute différenciation neuronale parmi toutes les conditions testées. Deuxièmement, il ne contient pas de SVF, ce qui permet d'obtenir un modèle plus reproductible et sans produit d'origine animale.

La majorité des étapes de cette étude a été réalisée de manière automatisée sur une plateforme robotique, en plaques 96 ou 384 puits, montrant que ce modèle est adapté au criblage phénotypique à haut débit.

L'influence de la méthode de différenciation sur le phénotype neuronal et la sensibilité des cellules SH-SY5Y a ensuite été étudiée sur un modèle 3D.

3. Développement de l'*hydroscaffold*[™] BIOMIMESYS[®] *Brain* et étude de l'importance du microenvironnement matriciel sur les cellules Luhmes et les cellules SH-SY5Y

L'*hydroscaffold*[™] BIOMIMESYS[®] *Brain* a été développé en parallèle de cette étude. Cette matrice à base d'AH permet aux cellules de s'organiser en 3D dans un environnement mimant la MEC. La technologie BIOMIMESYS[®] avait déjà été développée pour la culture de cellules cancéreuses, hépatiques et adipeuses ; elle a ici été adaptée à la culture de cellules cérébrales. Les différentes matrices synthétisées ont principalement été testées avec les cellules Luhmes, choisies en raison de plusieurs avantages. Tout d'abord, puisqu'il s'agit d'une lignée cellulaire, elles peuvent être amplifiées et ainsi être utilisées pour réaliser les nombreux tests de manière reproductible et peu coûteuse, contrairement aux cellules primaires. De plus, ces cellules ne sont pas d'origine cancéreuse et restent ainsi assez sensibles, ce qui augmente la chance que la matrice sélectionnée soit adaptée à la culture d'autres cellules, contrairement aux cellules SH-SY5Y dont la culture est moins exigeante. Cependant, dans un second temps, les matrices ont aussi été testées avec d'autres cellules, dont les cellules SH-SY5Y et les astrocytes primaires humains. Plusieurs compositions moléculaires ont été testées, ainsi que plusieurs modules d'élasticité, en format 96 et 384 puits. Une version a été validée et commercialisée en format 96 puits, composée d'AH, de RGDS, de collagène IV et d'un polymère cationique. Cette composition présentait un intérêt d'un point de vue physiologique. En effet, la MEC cérébrale est extrêmement riche en AH (Bignami et al., 1993; Ruoslahti, 1996). Le RGSD est un fragment de la fibronectine impliqué dans l'adhésion cellulaire, que l'on retrouve dans la MEC cérébrale, et le collagène IV est le principal type de collagène présent dans le cerveau, retrouvé au niveau de la lame basale (Stephenson and Yong, 2018). Un système d'assurance qualité a aussi été mis en place afin de garantir la reproductibilité des matrices. La production en plaques 384 puits à l'échelle industrielle est encore en cours d'optimisation.

Dans BIOMIMESYS[®] *Brain*, les cellules Luhmes se sont organisées en amas relativement peu compacts en comparaison des sphéroïdes obtenus dans les cultures en 3D en plaques anti-adhésion, avec la présence de neurites. Cette organisation présentait un intérêt vis-à-vis de l'homogénéité de l'exposition des cellules à leur environnement. En effet, dans les gros sphéroïdes, des différences sont observées entre les cellules situées au cœur et les cellules situées

en surface des sphéroïdes (différences d'accès aux nutriments, différences d'exposition aux molécules testées, différences dans le stade du cycle cellulaire) (Edmondson *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2008). Cependant, cette organisation cellulaire dépendait du type de cellules : les astrocytes restaient majoritairement isolés, alors que les cellules SH-SY5Y formaient des sphéroïdes compacts.

Une fois développé, BIOMIMESYS® *Brain* a été utilisé comme outil pour évaluer l'impact du microenvironnement matriciel. Les cellules Luhmes et les cellules SH-SY5Y ont toutes les deux présenté des sensibilités plus faibles aux composés neurotoxiques dans BIOMIMESYS® *Brain* comparé aux cellules cultivées en 2D. Cette sensibilité plus faible des cellules cultivées en 3D est fréquemment décrite dans le cadre d'études sur le cancer (Edmondson *et al.*, 2014). Concernant les études en neurosciences, Ko *et al.* ont comparé la sensibilité des cellules SH-SY5Y et des cellules Luhmes cultivées en 2D et en 3D dans du Matrigel®. Ils avaient eux aussi noté une sensibilité plus faible des cellules SH-SY5Y cultivées en 2D par rapport à celles cultivées en 3D. En revanche, ils n'avaient pas observé de différence de sensibilité entre les cellules Luhmes cultivées en 2D et celles cultivées en 3D (Ko *et al.*, 2020).

La première hypothèse proposée pour expliquer cette différence observée dans notre étude était qu'une partie des molécules était retenue dans la matrice, diminuant leur disponibilité pour les cellules. En effet, la matrice *in vivo* interagit avec les molécules du milieu extracellulaire, et influence leur diffusion et leur biodisponibilité (Kihara *et al.*, 2013; Stylianopoulos *et al.*, 2010). Cette hypothèse a donc été testée pour la matrice BIOMIMESYS® *Brain* au travers de l'étude de la rétention des iMP dans BIOMIMESYS® *Brain*. Les résultats ont montré qu'une partie des molécules était effectivement retenue dans la matrice, mais n'expliquait pas la totalité de la différence observée entre 2D et 3D. En perspective d'études complémentaires, l'effet de la matrice pourrait aussi être testée par une comparaison entre des cellules cultivées dans BIOMIMESYS® *Brain* et des cellules cultivées dans un système 3D sans matrice (par exemple en plaque anti-adhésion). Cette comparaison permettrait d'observer les effets de la présence vs l'absence de la matrice, avec des cellules organisées en 3D dans les deux cas. Cependant, l'organisation des cellules en 3D devra être prise en compte, car elle varie selon les systèmes de culture en 3D (organisation en amas ou en sphéroïdes, taille des regroupements cellulaires

différente) ce qui pourrait aussi impacter la réponse cellulaire (Edmondson *et al.*, 2014). Par exemple, dans BIOMIMESYS® *Brain* les cellules Luhmes étaient regroupées en grappe d'une centaine de micromètres, alors que dans le système sous agitation giratoire, les Luhmes s'organisaient en sphéroïdes compacts d'environ 200 µm à J5 (Smirnova *et al.*, 2016).

La rétention des molécules toxiques dans la matrice n'expliquant pas la totalité de la différence observée entre 2D et 3D, une seconde hypothèse pouvant expliquer ce phénomène a donc été étudiée. Cette hypothèse était que la différenciation neuronale était plus faible dans BIOMIMESYS® *Brain* qu'en 2D, entraînant alors une sensibilité plus faible aux composés neurotoxiques, comme cela avait été constaté dans l'étude sur les SH-SY5Y en 2D. Les analyses par imagerie ont montré que le pourcentage de cellules Luhmes différenciées exprimant positivement la TH était plus faible dans BIOMIMESYS® *Brain* qu'en culture en 2D, tout comme NeuN. De même, pour les cellules SH-SY5Y, l'acide rétinoïque n'a pas entraîné d'augmentation de l'expression des marqueurs protéiques de maturité neuronale par rapport aux cellules non différenciées dans BIOMIMESYS® *Brain*, contrairement à la même condition en 2D. De plus, NeuN n'avait pas pu être détecté par immunomarquage dans les cellules SH-SY5Y différenciées dans BIOMIMESYS® *Brain*, y compris en milieu B21+AMPC qui entraînait pourtant la plus haute différenciation neuronale. Il a aussi été observé que dans BIOMIMESYS® *Brain*, les cellules SH-SY5Y différenciées par la staurosporine, et pourtant moins bien différenciées qu'en milieu B21+AMPC, étaient plus sensibles à la colchicine et aux plus fortes concentrations de cisplatine, deux composés neurotoxiques mais également antiprolifératifs ; une différenciation insuffisante pouvait alors expliquer ce résultat. La quantification de TUBB3 chez les cellules SH-SY5Y et de la TH chez les cellules Luhmes par test ELISA ont confirmé la plus faible expression de ces protéines en 3D, bien que des répétitions de ces tests soient nécessaires pour valider ce résultat. Tous ces résultats semblent converger vers une même conclusion, qui est que les cellules différenciées dans BIOMIMESYS® *Brain*, à la fois les cellules Luhmes et les cellules SH-SY5Y, présentaient une différenciation neuronale moins importante que les cellules différenciées en 2D.

Smirnova *et al.* avaient eux aussi observé une différenciation insuffisante des cellules Luhmes cultivées en 3D lorsque les conditions de culture étaient identiques aux conditions de culture en 2D. Ils avaient alors optimisé les conditions de culture pour obtenir au final une différenciation

neuronale supérieure en 3D qu'en 2D (Smirnova *et al.*, 2016). Des tests d'optimisation de la composition du milieu de différenciation des cellules Luhmes ont été réalisés pour améliorer leur maturité dans BIOMIMESYS® *Brain*, sans succès. Cette différence de maturité entre les cellules cultivées en 2D et celles cultivées dans BIOMIMESYS® *Brain* peut s'expliquer par différents facteurs pouvant s'additionner. Tout d'abord, puisque la matrice peut retenir des fractions des molécules toxiques et ainsi diminuer leur effet sur les cellules, il peut en être de même pour les facteurs de différenciation. De plus, la densité cellulaire à l'ensemencement est environ 4 fois plus importante en 3D qu'en 2D, ce qui peut modifier la réponse cellulaire. Ensuite, les cellules étant regroupées, notamment dans le cas des SH-SY5Y qui formaient des sphéroïdes compacts bien que petits (environ 50 µm), il est possible que les cellules centrales soient moins exposées aux facteurs de différenciation, et ne présentent pas la même maturité que les cellules situées à la surface des sphéroïdes, entraînant une hétérogénéité de maturité entre les cellules. De plus, la culture en 3D modifie de manière générale les interactions entre les cellules, ainsi qu'entre les cellules et la matrice, pouvant moduler la différenciation neuronale ainsi que la réponse à des traitements (Novak and Kaye, 2000; Sainio and Järveläinen, 2020; Sood *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2017).

Une importante perspective est l'augmentation du temps de maintien des cellules dans BIOMIMESYS® *Brain*. En effet, le maintien des cellules en culture dans BIOMIMESYS® *Brain* sur plus long terme permettrait peut-être d'obtenir une meilleure maturité. De plus, un modèle *in vitro* physiologique pouvant être maintenu pendant une longue période présente un intérêt pour les tests d'évaluation de la neurotoxicité. En effet, des tests d'exposition en faibles doses répétées pourraient permettre de détecter les risques de toxicité chronique. Un modèle *in vitro* pathologique maintenu dans le temps présente également un intérêt pour la recherche de molécules thérapeutiques contre les maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson car ces maladies évoluent le plus souvent lentement, sur plusieurs années. Des études réalisées sur une longue période seraient donc plus pertinentes pour dévoiler les mécanismes pathologiques chroniques, bien que le long terme *in vitro* ne soit pas à la même échelle que le long terme *in vivo* chez l'Homme. Les cultures cellulaires peuvent être en général maintenues pendant seulement quelques semaines (21 jours pour le modèle de cellules Luhmes en 3D de

Smirnova *et al.* 2016), bien que des modèles d'organoïdes cérébraux aient pu être maintenus pendant 20 mois (Sloan *et al.*, 2017).

Les tests d'optimisation des conditions n'ayant pas permis d'améliorer le maintien et la maturité des Luhmes en culture, une nouvelle stratégie d'amélioration du modèle est l'optimisation de la composition de la matrice. En effet, bien que BIOMIMESYS® *Brain* contienne des éléments de la MEC cérébrale, il ne contient pas de PG, pourtant très abondants dans le cerveau. Les PGHS et les PGCS sont en effet des éléments clefs du fonctionnement cérébral (Bonneh-Barkay and Wiley, 2009; Cui et al., 2013; Dityatev and Schachner, 2006). Leur présence dans la matrice BIOMIMESYS® *Brain* pourrait permettre d'améliorer le réseau neuronal obtenu et donc les connexions entre les cellules, pouvant ainsi modifier leur réponse. Inclure davantage de molécules d'adhésion pourrait peut-être améliorer la survie cellulaire.

4. Importance du microenvironnement cellulaire et mise au point d'une co-culture

L'importance du microenvironnement cellulaire, et plus précisément astrocytaire, a quant à lui été étudié dans une co-culture de cellules Luhmes et d'astrocytes primaires humains en 2D. En effet, les astrocytes sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques, et peuvent également être impliqués dans des mécanismes pathologiques (Miyazaki and Asanuma, 2020). Ces effets astrocytaires divers peuvent avoir des répercussions pharmacologiques. Il a par exemple été montré que l'efficacité de molécules neuroprotectrices différait chez les Luhmes exposées au MPP+ cultivées seules ou en co-culture avec des astrocytes, avec, selon les molécules, un effet neuroprotecteur uniquement en monoculture ou uniquement en co-culture (Efremova *et al.*, 2017). La présence d'astrocytes pouvant impacter la réponse neuronale, il est donc important de la considérer dans la recherche de nouveaux médicaments.

Un des défis techniques de cette étude était l'analyse phénotypique des cellules en co-culture. En effet, les neurones se superposaient aux astrocytes, rendant complexe l'attribution d'un noyau cellulaire à un soma positif à la GFAP (astrocytes) ou à TUBB3 (neurone). De plus, l'expression de ces marqueurs pouvait être perdue dans les cellules mortes, ne permettant pas d'identifier le type cellulaire d'une cellule morte par imagerie. Le comptage des cellules vivantes pour chaque

type cellulaire n'était donc pas possible par cette méthode. De plus, pour les astrocytes, deux phénomènes contraires pouvaient influencer l'expression de la GFAP : les iMP pouvaient entraîner une mort astrocytaire, et donc une diminution générale de l'expression de la GFAP, mais également une activation astrocytaire, et donc une augmentation générale de l'expression de la GFAP. L'intensité globale de la GFAP ne permettait donc pas d'estimer la viabilité des astrocytes. De même, la mesure de l'activation astrocytaire nécessitait de rapporter l'intensité totale de la GFAP au nombre d'astrocytes, qui n'était pas déterminable. Un marqueur astrocytaire indépendant de l'activation, comme la vimentine ou GLAST par exemple, aurait pu aider à estimer la perte astrocytaire en co-culture mais n'a pas été utilisé ici. La réponse des astrocytes aux iMP a par conséquent été mesurée en monoculture uniquement, montrant une faible sensibilité des astrocytes à ces molécules.

En revanche, la sensibilité des LHMes a pu être mesurée en 2D en monoculture comme en co-culture par l'analyse de la longueur des neurites marqués par TUBB3, qui étaient parfaitement distinguables et spécifiques des neurones, permettant ainsi l'observation de l'effet de la présence des astrocytes sur la réponse neuronale. Ainsi, un rôle majoritairement protecteur des astrocytes envers les LHMes exposées aux iMP a été observé. La principale hypothèse pour expliquer cet effet neuroprotecteur est la production de molécules anti-oxydantes par les astrocytes, puisqu'il s'agit là d'une propriété connue des astrocytes et que la mort neuronale induite par ces iMP est fortement liée à un important stress oxydant (Bélanger and Magistretti, 2009; Miyazaki and Asanuma, 2020). Cependant, les astrocytes pouvant sécréter un large panel de molécules comme des facteurs de croissance, il est tout à fait probable que d'autres effets aient également participé à la neuroprotection (Bélanger and Magistretti, 2009; Boghdadi *et al.*, 2020).

En conditions pathologiques, les astrocytes peuvent aussi entraîner une amplification de la mort neuronale *via* leur rôle dans la neuroinflammation, qui est une des caractéristiques majeures des maladies neurodégénératives. Bien que les astrocytes puissent être directement activés par les neurones en dégénérescence, par exemple *via* l' α -synucléine, ils sont aussi activés par des molécules pro-inflammatoires libérées par les cellules microgliales, elles-mêmes activées suite à la mort neuronale ou par des facteurs extérieurs (Wang *et al.*, 2015). Les cellules microgliales, non incluses dans le modèle présenté ici, jouent un rôle important dans ce

processus. Pour permettre la mise en place d'un phénomène neuroinflammatoire dans un modèle *in vitro*, une tri-culture de neurones, d'astrocytes et microglie serait plus pertinente, avec une analyse de l'activation astrocytaire et des molécules inflammatoires sécrétées. L'optimisation de l'analyse d'images pour distinguer des différents types cellulaires serait cependant nécessaire.

Un autre effet des astrocytes observé ici est la sécrétion de molécules d'adhésion, soulignant le lien entre le microenvironnement cellulaire et matriciel. Afin de développer un modèle complexe tenant compte de ces deux paramètres, la co-culture de cellules LHMES et d'astrocytes humains a été transposée dans BIOMIMESYS® *Brain*.

5. Perspectives scientifiques

Pour résumer ce qui a été proposé au cours de la discussion des différentes parties de ce travail, les perspectives pour améliorer la pertinence du modèle en 3D sont : *i)* l'amélioration de la matrice BIOMIMESYS® par l'ajout de davantage de composants présents dans la MEC cérébrale *in vivo*, *ii)* la réalisation d'une tri-culture de cellules neuronales, astrocytaires et microgliales (Figure 60). Dans ce cadre, la caractérisation des différentes molécules pouvant être libérées par les cellules neuronales ou gliales, notamment l' α -synucléine et les molécules de l'inflammation, serait intéressante pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Dès lors que le temps de maintien en culture le permettra, la réalisation de tests d'exposition de composés à faibles doses répétées, pour mimer un traitement ou une maladie chroniques sera particulièrement intéressante.

De plus, la caractérisation du modèle a été centrée sur les aspects cellulaires. Il serait à présent important de caractériser également les aspects matriciels, avec la mise en évidence des interactions cellule-matrice, par exemple en regardant l'expression de CD44 et de son interaction avec l'AH. Il serait aussi intéressant d'étudier les modifications de la matrice par les cellules *via* la synthèse de molécules de la MEC, ou à l'inverse la dégradation de la matrice, ainsi que la modification de sa rigidité. Cela pourrait apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes

pathologiques, et constituerait aussi un modèle permettant de tester des thérapies ciblant la MEC.

En parallèle de ce projet, un modèle de BHE humaine a aussi été développé en plaques 96 puits dans le cadre du projet européen Nanostem dont fait partie HCS Pharma (Moya *et al.*, 2021). L'objectif de ce modèle est d'être à terme superposé au modèle neuronal, afin d'évaluer à la fois le passage et l'effet des molécules sur le cerveau sain (pour évaluer la toxicité) ou pathologique (pour évaluer l'efficacité).

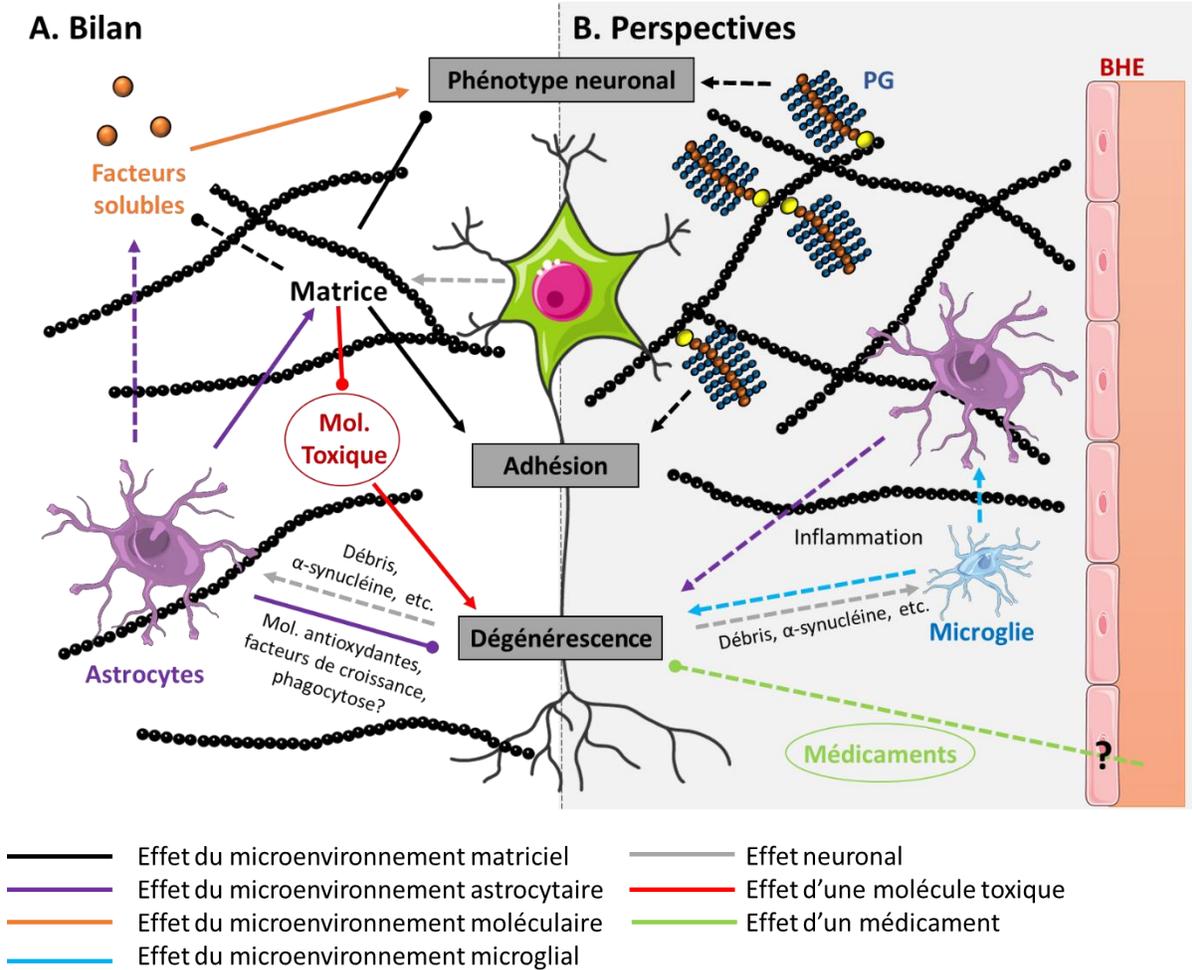


Figure 60 : Bilan et perspectives des éléments du microenvironnement étudiés et de leurs interactions.

A. Schéma récapitulatif des éléments étudiés. Les facteurs solubles et la matrice influent sur la maturité et sur la sensibilité neuronale. Les astrocytes modifient aussi la sensibilité des neurones et peuvent sécréter des molécules de la matrice. **B.** Perspectives d'amélioration du modèle. Ajout de PG dans la matrice ; Ajout de cellules microgliales pouvant mettre en place le processus neuroinflammatoire ; ajout d'une BHE tester le passage des médicaments ; Etude des sécrétions neuronales (composés de la matrice, α -synucléine, etc.). En trait plein les effets observés, pointillés les effets hypothétiques. Flèches à bout pointue : effet positif (induction, sécrétion, etc.) ; Flèches à bout rond : effet négatif. BHE : Barrière Hémato-Encéphalique. BHE : Barrière Hémato-encéphalique ; PG : Protéoglycane. Réalisé avec Servier Medical Art.

Une comparaison avec une culture cellulaire réalisée dans de la matrice issue d'un cerveau décellularisé serait intéressante, afin de valider que BIOMIMESYS® *Brain* mime la MEC de manière pertinente, que le modèle est réellement plus physiologique et permet d'obtenir des résultats plus prédictifs.

6. Stratégie de HCS Pharma pour la recherche et le développement de nouveaux médicaments

Cette étude s'est inscrite dans une stratégie globale d'amélioration des modèles précliniques pour diminuer le taux d'échec en phase clinique. En effet la société HCS Pharma, spécialisée dans le criblage phénotypique pour la sélection de molécules d'intérêt, vise à optimiser le processus de sélection des molécules en améliorant des modèles *in vitro* utilisés à toutes les étapes de la R&D.

Fondée sur l'hypothèse que la MEC est une composante essentielle de l'organisme sain et pathologique, la stratégie est d'inclure la matrice dans l'intégralité du processus de recherche et de développement de molécules thérapeutiques. En effet, les modèles *in vitro* ont jusqu'à présent été essentiellement centrés sur les cellules, alors qu'un nombre grandissant d'études démontrent le rôle indispensable de la MEC dans le fonctionnement des organes sains, mais également son rôle dans les mécanismes pathologiques, au niveau cérébral comme étudié ici, mais également dans l'ensemble de l'organisme (Theocharis *et al.*, 2019).

L'utilisation des modèles en 3D pour le criblage à haut débit reste cependant un défi technique (Langhans, 2018). La technologie BIOMIMESYS® qui mime la matrice représente une solution prometteuse, synthétisable de manière contrôlée et à l'échelle industrielle. Cet outil permettra ainsi d'inclure la composante matricielle et l'organisation tridimensionnelle des organes au niveau de toutes les étapes de la R&D de nouveaux médicaments. En effet, les cellules seraient amplifiées en 3D grâce à l'utilisation de bioréacteurs et de BIOMIMESYS® sous forme de poudre ; des premiers essais prometteurs ont été réalisés à petite échelle.

Le criblage primaire serait ensuite réalisé en 3D sur des lignées cellulaires cultivées dans BIOMIMESYS® ; c'est donc dans le contexte de la mise en place de cette étape qu'a été réalisée cette thèse. Lorsque les conditions permettant une différenciation optimale des cellules neuronales dans BIOMIMESYS® *Brain* seront déterminées et que les plaques format 384 puits seront développées, un criblage pourra être réalisé pour rechercher des molécules anti-ferroptotiques en 3D. Les résultats pourront alors être comparés aux résultats du criblage qui avait été réalisé précédemment en 2D, en collaboration entre HCS Pharma et l'INSERM (unité

1172, « Troubles cognitifs dégénératives et vasculaires »). De même, le modèle réalisé avec les cellules SH-SY5Y différenciées en B21+AMPc pourra être utilisé pour évaluer la neurotoxicité de molécules.

Dans la suite du processus de R&D, le criblage secondaire serait ensuite réalisé sur des modèles *in vitro* encore plus complexes : des organoïdes issus d'iPSCs formés dans BIOMIMESYS®. Une preuve de concept a été réalisée au travers du développement d'organoïdes de foie à partir d'iPSCs, dans le cadre de la thèse de Méryl Roudaut (2020) (Brevet et article en cours). Ce travail sera prochainement transposé pour le développement d'organoïdes cérébraux. Enfin, les tests plus avancés seront réalisés sur des puces microfluidiques, voire à terme sur des *human-on-a-chip*, c'est-à-dire tous les organes du corps humain modélisés *in vitro* et reliés entre eux par un système fluide. Ici encore, des premiers essais ont montré la possibilité technique d'inclure BIOMIMESYS® à l'intérieur d'une puce microfluidique (thèse de Thomas Meynard, en cours, en collaboration entre HCS Pharma et le laboratoire Canther, Unité Mixte de Recherche (UMR) 9020 Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR INSERM 1277, équipe « mucines, cancer et résistance aux drogues »).

La complexification des modèles *in vitro* entraîne une complexification de l'analyse, comme cela a été ici mis en évidence dans l'exemple de la co-culture, qui restait pourtant un modèle relativement simple comparé aux modèles organoïdes. Un projet est en cours à HCS Pharma pour développer des méthodes d'analyse d'images plus performantes par intelligence artificielle (*machine learning* et *deep learning*), en collaboration avec l'Institut Supérieur de l'Electronique et du Numérique (ISEN) (thèse de Tarek Myalaa, en cours).

De nombreux projets internes ou collaboratifs sont donc en cours, chacun formant une des étapes d'un processus innovant pour la R&D de molécules d'intérêt dans les différents domaines de la santé (neurologie, maladies métaboliques, cancérologie, etc.). L'objectif final est ainsi d'améliorer drastiquement le taux de succès.

Cependant, l'amélioration du taux de succès par cette stratégie devra être prouvée. Dans un premier temps, les modèles devront être parfaitement caractérisés, montrant un phénotype mature et une viabilité à long terme. Le croisement de différentes méthodes d'analyse permettra

d'affiner la caractérisation, par exemple des dosages protéiques par ELISA et des analyses de l'expression de gènes par séquençage d'ARN. Les modèles devront ensuite être validés par l'utilisation de molécules connues, par exemple des molécules connues pour être non-toxiques ou à l'inverse toxiques sur l'organe d'intérêt, comme cela a été fait dans l'étude portant sur la différenciation des cellules SH-SY5Y. Ensuite, afin de démontrer l'intérêt de ce processus pour la R&D de nouveaux médicaments et de prouver que cette stratégie peut permettre une amélioration concrète du taux de succès, des molécules ayant échoué en phase clinique pourraient être testées. Par exemple, si une toxicité à l'origine d'un échec en phase clinique (et donc non détectée sur les modèles précliniques utilisés) pouvait être détectée sur le nouveau modèle, alors cela prouverait une meilleure prédiction. De même, la mise en évidence d'un manque d'efficacité sur un modèle pathologique pour une molécule en échec pour raison d'efficacité clinique, démontrerait l'intérêt du modèle.

7. Contextualisation du projet dans l'actualité scientifique : la diminution du recours à l'expérimentation animale

Ce projet ambitieux s'inscrit aussi dans une stratégie générale de recherche de méthodes alternatives à l'expérimentation animale, selon le principe des 3R établi en 1959 et incluse dans la réglementation européenne depuis 2010 (directive 2010/63/UE) et française depuis 2013 (décret n° 2013-118).

En effet, la diminution du recours à l'expérimentation animale s'accélère avec notamment l'interdiction de tester les ingrédients cosmétiques sur les animaux depuis 2009 dans l'UE. De même, l'Agence de Protection Environnementale des Etats-Unis (*Environmental Protection Agency*, EPA) prévoit l'arrêt des tests sur les mammifères pour les produits chimiques et les pesticides en 2035. Elle va pour cela consacrer 4,25 millions de dollars au développement de méthodes alternatives à l'expérimentation animale, pouvant inclure les technologies d'organes sur puce, les cultures cellulaires, et les modélisations informatiques (US EPA, 2019).

Dans le domaine médical, les tests sur animaux restent autorisés, et même obligatoires pour obtenir l'AMM. Cependant, si la possibilité de stopper complètement l'expérimentation animale

dans ce domaine reste discuté, des stratégies pour diminuer le recours aux animaux sont mises en place. Récemment, la commission européenne a adopté la résolution sur "les plans et mesures visant à accélérer le passage à une innovation sans recours aux animaux dans la recherche, les essais réglementaires et l'enseignement" par 667 voix pour, 4 contre et 0 abstention (débat de la Commission Européenne du 8 juillet 2021, <https://www.europarl.europa.eu>). Au travers de ce texte, les députés demandent un plan d'action à l'échelle européenne pour supprimer progressivement le recours aux animaux, incluant des objectifs concrets et des délais. Selon eux, le recours aux animaux devra être stoppé au profit des méthodes alternatives, dès que ce sera possible sur le plan scientifique et sans abaisser le niveau de protection de la santé humaine et de l'environnement. Pour ce faire, les députés demandent des financements à moyen et à long terme pour la mise au point, la validation et l'introduction de nouvelles méthodes d'expérimentation, notamment *via* un financement dans le cadre d'Horizon Europe. Par ailleurs, ils affirment que les scientifiques, les chercheurs et les techniciens doivent être formés pour utiliser des modèles alternatifs.

Le Parlement a tout de même reconnu que le recours à l'expérimentation animale a jusqu'à présent contribué à la recherche et aux avancées médicales, et que le remplacement des modèles *in vivo* par des modèles *in vitro* ne doit pas se faire au détriment de la santé publique. Pour cela, les modèles peuvent être validés par le Centre européen de validation des méthodes alternatives (EURL ECVAM), créée en 1991. L'EURL ECVAM a également mis en place une base de données accessible au public, qui collecte des informations techniques sur les différentes méthodes alternatives, sous forme de fiches techniques résumant les méthodes ou décrivant les protocoles, les études d'évaluation, etc. Elle se base sur les méthodes soumises à l'EURL ECVAM pour validation, ainsi que sur les méthodes décrites dans des revues spécialisées.

Cette thèse a cependant souligné la complexité du SNC, et plus largement du corps humain. L'intégration de l'ensemble des éléments impliqués dans les processus physiologiques ou pathologiques de l'organisme dans les modèles *in vitro* reste encore un défi, mais est pourtant nécessaire pour que ces modèles soient prédictifs. En effet, au travers de l'étude de l'influence du microenvironnement dans les modèles cérébraux *in vitro*, cette thèse a mis en évidence le fait que les composantes moléculaires, cellulaires et matricielles du microenvironnement modifient

la réponse des cellules *in vitro* et devraient par conséquent être considérées avec attention tant dans la recherche académique que dans la recherche industrielle.

BIOBLOGRAPHIE

Abbott, N.J. (2004). Prediction of blood-brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and in silico models. *Drug Discov Today Technol* 1, 407–416.

Abbott, N.J., Rönnbäck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7, 41–53.

Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37, 13–25.

Akhmanova, M., Osidak, E., Domogatsky, S., Rodin, S., and Domogatskaya, A. (2015). Physical, Spatial, and Molecular Aspects of Extracellular Matrix of In Vivo Niches and Artificial Scaffolds Relevant to Stem Cells Research. *Stem Cells Int* 2015, 167025.

Al-Bachari, S., Naish, J.H., Parker, G.J.M., Emsley, H.C.A., and Parkes, L.M. (2020). Blood–Brain Barrier Leakage Is Increased in Parkinson’s Disease. *Frontiers in Physiology* 11, 1636.

Andrade-Moraes, C.H., Oliveira-Pinto, A.V., Castro-Fonseca, E., da Silva, C.G., Guimarães, D.M., Szczupak, D., Parente-Bruno, D.R., Carvalho, L.R.B., Polichiso, L., Gomes, B.V., et al. (2013). Cell number changes in Alzheimer’s disease relate to dementia, not to plaques and tangles. *Brain* 136, 3738–3752.

Asghar, W., Chen, P., Shafiee, H., and Tasoglu, S. (2013). *Cancer Targeted Drug Delivery: An Elusive Dream* (New York: Springer-Verlag).

Asher, R., and Bignami, A. (1991). Localization of hyaluronate in primary glial cell cultures derived from newborn rat brain. *Exp. Cell Res.* 195, 401–411.

Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E.L., Leite, R.E.P., Jacob Filho, W., Lent, R., and Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* 513, 532–541.

Bandtlow, C.E., and Zimmermann, D.R. (2000). Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol. Rev.* 80, 1267–1290.

Barha, C.K., Nagamatsu, L.S., and Liu-Ambrose, T. (2016). Basics of neuroanatomy and neurophysiology. *Handb Clin Neurol* 138, 53–68.

Barnes, J.M., Przybyla, L., and Weaver, V.M. (2017). Tissue mechanics regulate brain development, homeostasis and disease. *J Cell Sci* 130, 71–82.

Barros, C.S., Franco, S.J., and Müller, U. (2011). Extracellular matrix: functions in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a005108.

Bartels, A.L., Willemsen, A.T.M., Doorduyn, J., de Vries, E.F.J., Dierckx, R.A., and Leenders, K.L. (2010). [11C]-PK11195 PET: quantification of neuroinflammation and a monitor of anti-inflammatory treatment in Parkinson's disease? *Parkinsonism Relat Disord* 16, 57–59.

von Bartheld, C.S., Bahney, J., and Herculano-Houzel, S. (2016). The Search for True Numbers of Neurons and Glial Cells in the Human Brain: A Review of 150 Years of Cell Counting. *J Comp Neurol* 524, 3865–3895.

Bélanger, M., and Magistretti, P.J. (2009). The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin Neurosci* 11, 281–295.

Benner, E.J., Banerjee, R., Reynolds, A.D., Sherman, S., Pisarev, V.M., Tsiperson, V., Nemachek, C., Ciborowski, P., Przedborski, S., Mosley, R.L., et al. (2008). Nitrated alpha-synuclein immunity accelerates degeneration of nigral dopaminergic neurons. *PLoS One* 3, e1376.

Bignami, A., and Asher, R. (1992). Some observations on the localization of hyaluronic acid in adult, newborn and embryonal rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience* 10, 45–57.

Bignami, A., Hosley, M., and Dahl, D. (1993). Hyaluronic acid and hyaluronic acid-binding proteins in brain extracellular matrix. *Anat Embryol (Berl)* 188, 419–433.

Biotechnology Innovation organization, Biomedtracker, and Amplion (2016). Clinical Development Success Rates 2006-2015.

Blinkov, S., and Glezer, I. (1968). *The Human Brain in Figures and Tables: A Quantitative Handbook* (New York: Plenum Press).

Boeri, L., Izzo, L., Sardelli, L., Tunesi, M., Albani, D., and Giordano, C. (2019). Advanced Organ-on-a-Chip Devices to Investigate Liver Multi-Organ Communication: Focus on Gut, Microbiota and Brain. *Bioengineering (Basel)* 6, E91.

Boghdadi, A.G., Teo, L., and Bourne, J.A. (2020). The Neuroprotective Role of Reactive Astrocytes after Central Nervous System Injury. *J Neurotrauma* 37, 681–691.

Bonneh-Barkay, D., and Wiley, C.A. (2009). Brain Extracellular Matrix in Neurodegeneration. *Brain Pathol* 19, 573–585.

Bosiacki, M., Gąssowska-Dobrowolska, M., Kojder, K., Fabiańska, M., Jeżewski, D., Gutowska, I., and Lubkowska, A. (2019). Perineuronal Nets and Their Role in Synaptic Homeostasis. *Int J Mol Sci* 20.

Bourguignon, L.Y.W., Singleton, P.A., Diedrich, F., Stern, R., and Gilad, E. (2004). CD44 interaction with Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem* 279, 26991–27007.

Bridges, L.C., and Bowditch, R.D. (2005). ADAM-Integrin Interactions: potential integrin regulated ectodomain shedding activity. *Curr. Pharm. Des.* *11*, 837–847.

Brückner, G., Morawski, M., and Arendt, T. (2008). Aggrecan-based extracellular matrix is an integral part of the human basal ganglia circuit. *Neuroscience* *151*, 489–504.

Bukalo, O., Schachner, M., and Dityatev, A. (2001). Modification of extracellular matrix by enzymatic removal of chondroitin sulfate and by lack of tenascin-R differentially affects several forms of synaptic plasticity in the hippocampus. *Neuroscience* *104*, 359–369.

Butcher, D.T., Alliston, T., and Weaver, V.M. (2009). A tense situation: forcing tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 108–122.

Canu, M.-H., Bérézowski, V., Duriez, P., Langlet, C., Mariot, P., and Pétrault, O. (2016). *Physiologie humaine* (Dunod).

Carulli, D., Buffo, A., and Strata, P. (2004). Reparative mechanisms in the cerebellar cortex. *Prog. Neurobiol.* *72*, 373–398.

Carulli, D., Rhodes, K.E., Brown, D.J., Bonnert, T.P., Pollack, S.J., Oliver, K., Strata, P., and Fawcett, J.W. (2006). Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *J. Comp. Neurol.* *494*, 559–577.

Carulli, D., Pizzorusso, T., Kwok, J.C.F., Putignano, E., Poli, A., Forostyak, S., Andrews, M.R., Deepa, S.S., Glant, T.T., and Fawcett, J.W. (2010). Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain* *133*, 2331–2347.

Chaillan, F.A., Rivera, S., Marchetti, E., Jourquin, J., Werb, Z., Soloway, P.D., Khrestchatisky, M., and Roman, F.S. (2006). Involvement of tissue inhibition of metalloproteinases-1 in learning and memory in mice. *Behav. Brain Res.* *173*, 191–198.

Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* *27*, 275–280.

Chang, C.-Y., Ting, H.-C., Liu, C.-A., Su, H.-L., Chiou, T.-W., Lin, S.-Z., Harn, H.-J., and Ho, T.-J. (2020). Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Based Neurodegenerative Disease Models for Phenotype Recapitulation and Drug Screening. *Molecules* *25*, E2000.

Cheung, Y.-T., Lau, W.K.-W., Yu, M.-S., Lai, C.S.-W., Yeung, S.-C., So, K.-F., and Chang, R.C.-C. (2009). Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology* *30*, 127–135.

Chia, S.J., Tan, E.-K., and Chao, Y.-X. (2020). Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* *21*, E2464.

Choi, D.H., Kim, E.M., Son, H.J., Joh, T.H., Kim, Y.S., Kim, D., Beal, M.F., and Hwang, O. (2008). A novel intracellular role of matrix metalloproteinase-3 during apoptosis of dopaminergic cells. *J.NEUROCHEM.* *106*, 405–415.

Choi, D.-H., Kim, Y.-J., Kim, Y.-G., Joh, T.H., Beal, M.F., and Kim, Y.-S. (2011). Role of matrix metalloproteinase 3-mediated alpha-synuclein cleavage in dopaminergic cell death. *J Biol Chem* *286*, 14168–14177.

Cohlberg, J.A., Li, J., Uversky, V.N., and Fink, A.L. (2002). Heparin and other glycosaminoglycans stimulate the formation of amyloid fibrils from alpha-synuclein in vitro. *Biochemistry* *41*, 1502–1511.

Congressional Budget Office (2021). Research and Development in the Pharmaceutical Industry.

Cook, D., Brown, D., Alexander, R., March, R., Morgan, P., Satterthwaite, G., and Pangalos, M.N. (2014). Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework. *Nat Rev Drug Discov* *13*, 419–431.

Corrò, C., Novellademunt, L., and Li, V.S.W. (2020). A brief history of organoids. *Am J Physiol Cell Physiol* *319*, C151–C165.

Csoka, A.B., Frost, G.I., and Stern, R. (2001). The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol.* *20*, 499–508.

Cui, H., Freeman, C., Jacobson, G.A., and Small, D.H. (2013). Proteoglycans in the central nervous system: role in development, neural repair, and Alzheimer's disease. *IUBMB Life* *65*, 108–120.

Dauer, W., and Przedborski, S. (2003). Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* *39*, 889–909.

De Conto, V., Cheung, V., Maubon, G., Souguir, Z., Maubon, N., Vandenhoute, E., and Bérézowski, V. (2021). In vitro differentiation modifies the neurotoxic response of SH-SY5Y cells. *Toxicol In Vitro* *77*, 105235.

De Groot, C.J.A., Theeuwes, J.M., Dijkstra, C.D., and Van Der Valk, P. (1995). Postmortem delay effects on neuroglial cells and brain macrophages from Lewis rats with acute experimental allergic encephalomyelitis: an immunohistochemical and cytochemical study. *Journal of Neuroimmunology* *59*, 123–134.

Delhaye-Bouchaud, N. (2001). Développement du système nerveux central chez les mammifères. *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology* *31*, 63–82.

DeMaagd, G., and Philip, A. (2015). Parkinson's Disease and Its Management. *P T* *40*, 504–532.

DeWitt, D.A., Richey, P.L., Praprotnik, D., Silver, J., and Perry, G. (1994). Chondroitin sulfate proteoglycans are a common component of neuronal inclusions and astrocytic reaction in neurodegenerative diseases. *Brain Res* 656, 205–209.

Dexter, D.T., Statton, S.A., Whitmore, C., Freinbichler, W., Weinberger, P., Tipton, K.F., Della Corte, L., Ward, R.J., and Crichton, R.R. (2011). Clinically available iron chelators induce neuroprotection in the 6-OHDA model of Parkinson's disease after peripheral administration. *J Neural Transm (Vienna)* 118, 223–231.

Ding, H.-Y., Xie, Y.-N., Dong, Q., Kimata, K., Nishida, Y., Ishiguro, N., and Zhuo, L.-S. (2019). Roles of hyaluronan in cardiovascular and nervous system disorders. *J Zhejiang Univ Sci B* 20, 428–436.

Dityatev, A., and Schachner, M. (2006). The extracellular matrix and synapses. *Cell Tissue Res* 326, 647–654.

Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., et al. (2012). Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell* 149, 1060–1072.

Do Van, B., Gouel, F., Jonneaux, A., Timmerman, K., Gelé, P., Pétrault, M., Bastide, M., Laloux, C., Moreau, C., Bordet, R., et al. (2016). Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson's disease that is regulated by PKC. *Neurobiol. Dis.* 94, 169–178.

Dowden, H., and Munro, J. (2019). Trends in clinical success rates and therapeutic focus. *Nature Reviews Drug Discovery* 18, 495–496.

Edmondson, R., Broglie, J.J., Adcock, A.F., and Yang, L. (2014). Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev Technol* 12, 207–218.

Efremova, L., Chovancova, P., Adam, M., Gutbier, S., Schildknecht, S., and Leist, M. (2017). Switching from astrocytic neuroprotection to neurodegeneration by cytokine stimulation. *Arch Toxicol* 91, 231–246.

Elkouzi, A., Vedam-Mai, V., Eisinger, R.S., and Okun, M.S. (2019). Emerging therapies in Parkinson disease - repurposed drugs and new approaches. *Nat Rev Neurol* 15, 204–223.

Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Ceña, V., Gallego, C., and Comella, J.X. (2000). Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J. Neurochem.* 75, 991–1003.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.

Fawcett, J.W., Oohashi, T., and Pizzorusso, T. (2019). The roles of perineuronal nets and the perinodal extracellular matrix in neuronal function. *Nat Rev Neurosci* 20, 451–465.

Ferrari, C.C., Pott Godoy, M.C., Tarelli, R., Chertoff, M., Depino, A.M., and Pitossi, F.J. (2006). Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1beta in the substantia nigra. *Neurobiol Dis* 24, 183–193.

Foscarin, S., Raha-Chowdhury, R., Fawcett, J.W., and Kwok, J.C.F. (2017). Brain ageing changes proteoglycan sulfation, rendering perineuronal nets more inhibitory. *Aging (Albany NY)* 9, 1607–1622.

Gagne, J.J., and Power, M.C. (2010). Anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson disease: a meta-analysis. *Neurology* 74, 995–1002.

Garcion, E., Faissner, A., and French-Constant, C. (2001). Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration. *Development* 128, 2485–2496.

Gendelman, H.E., Zhang, Y., Santamaria, P., Olson, K.E., Schutt, C.R., Bhatti, D., Shetty, B.L.D., Lu, Y., Estes, K.A., Standaert, D.G., et al. (2017). Evaluation of the safety and immunomodulatory effects of sargramostim in a randomized, double-blind phase 1 clinical Parkinson's disease trial. *NPJ Parkinsons Dis* 3, 10.

Gerhard, A., Pavese, N., Hotton, G., Turkheimer, F., Es, M., Hammers, A., Eggert, K., Oertel, W., Banati, R.B., and Brooks, D.J. (2006). In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 21, 404–412.

Gordon, K., Clouaire, T., Bao, X.X., Kemp, S.E., Xenophontos, M., de Las Heras, J.I., and Stancheva, I. (2014). Immortality, but not oncogenic transformation, of primary human cells leads to epigenetic reprogramming of DNA methylation and gene expression. *Nucleic Acids Res* 42, 3529–3541.

Götz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 777–788.

Gualandris, A., Jones, T.E., Strickland, S., and Tsirka, S.E. (1996). Membrane depolarization induces calcium-dependent secretion of tissue plasminogen activator. *J. Neurosci.* 16, 2220–2225.

Halassa, M.M., Fellin, T., and Haydon, P.G. (2007). The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* 13, 54–63.

Hall, P., Lamantia, A., and White, F. (2015). *Neurosciences* (Louvain-la-Neuve: De boeck Supérieur).

Haug, H. (1986). History of neuromorphometry. *J Neurosci Methods* 18, 1–17.

Hillen, A.E.J., Burbach, J.P.H., and Hol, E.M. (2018). Cell adhesion and matricellular support by astrocytes of the tripartite synapse. *Prog. Neurobiol.* 165–167, 66–86.

Hodge, R.D., Bakken, T.E., Miller, J.A., Smith, K.A., Barkan, E.R., Graybuck, L.T., Close, J.L., Long, B., Johansen, N., Penn, O., et al. (2019). Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature* 573, 61–68.

Holmes, B.B., DeVos, S.L., Kfoury, N., Li, M., Jacks, R., Yanamandra, K., Ouidja, M.O., Brodsky, F.M., Marasa, J., Bagchi, D.P., et al. (2013). Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E3138-3147.

Hoos, M.D., Vitek, M.P., Ridnour, L.A., Wilson, J., Jansen, M., Everhart, A., Wink, D.A., and Colton, C.A. (2014). The impact of human and mouse differences in NOS2 gene expression on the brain's redox and immune environment. *Mol Neurodegener* 9, 50.

<https://institutducerveau-icm.org> L'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière. Cerveau : comprendre le fonctionnement du cerveau humain [en ligne] consulté le 09/08/2021.

<https://www.ich.org> International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) [en ligne] consulté le 18/10/2021.

Humphrey, J.D., Dufresne, E.R., and Schwartz, M.A. (2014). Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 802–812.

Iozzo, R.V. (2005). Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 646–656.

Itano, N., and Kimata, K. (2002). Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life* 54, 195–199.

Jalava, A., Heikkilä, J., Lintunen, M., Akerman, K., and Pålman, S. (1992). Staurosporine induces a neuronal phenotype in SH-SY5Y human neuroblastoma cells that resembles that induced by the phorbol ester 12-O-tetradecanoyl phorbol-13 acetate (TPA). *FEBS Lett.* 300, 114–118.

Jana, M., Jana, A., Pal, U., and Pahan, K. (2007). A simplified method for isolating highly purified neurons, oligodendrocytes, astrocytes, and microglia from the same human fetal brain tissue. *Neurochem Res* 32, 2015–2022.

Jellinger, K.A. (1999). Post mortem studies in Parkinson's disease--is it possible to detect brain areas for specific symptoms? *J Neural Transm Suppl* 56, 1–29.

Jessen, K.R. (2004). Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1861–1867.

Jourdon, A. (2015). Prss56Cre, un nouvel outil pour l'étude de la neurogenèse adulte chez la souris. These de doctorat. Paris 6.

Jucaite, A., Svenningsson, P., Rinne, J.O., Cselényi, Z., Varnäs, K., Johnström, P., Amini, N., Kirjavainen, A., Helin, S., Minkwitz, M., et al. (2015). Effect of the myeloperoxidase inhibitor AZD3241 on microglia: a PET study in Parkinson's disease. *Brain* 138, 2687–2700.

Kab, S., Moisan, F., and Elbaz, A. (2017). Farming and incidence of motor neuron disease: French nationwide study. *Eur. J. Neurol.* 24, 1191–1195.

Kaneiwa, T., Mizumoto, S., Sugahara, K., and Yamada, S. (2010). Identification of human hyaluronidase-4 as a novel chondroitin sulfate hydrolase that preferentially cleaves the galactosaminidic linkage in the trisulfated tetrasaccharide sequence. *Glycobiology* 20, 300–309.

Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., and Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci* 14, 910–919.

Kawano, M., Kawasaki, A., Sakata-Haga, H., Fukui, Y., Kawano, H., Nogami, H., and Hisano, S. (2006). Particular subpopulations of midbrain and hypothalamic dopamine neurons express vesicular glutamate transporter 2 in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 498, 581–592.

Kihara, T., Ito, J., and Miyake, J. (2013). Measurement of biomolecular diffusion in extracellular matrix condensed by fibroblasts using fluorescence correlation spectroscopy. *PLoS One* 8, e82382.

Kim, E.-M., and Hwang, O. (2011). Role of matrix metalloproteinase-3 in neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry* 116, 22–32.

Kim, Y.S., Choi, D.H., Block, M.L., Lorenzl, S., Yang, L., Kim, Y.J., Sugama, S., Cho, B.P., Hwang, O., Browne, S.E., et al. (2007). A pivotal role of matrix metalloproteinase-3 activity in dopaminergic neuronal degeneration via microglial activation. *FASEB J* 21, 179–187.

King, J.A., and Miller, W.M. (2007). Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation. *Curr Opin Chem Biol* 11, 394–398.

Klein, C., and Westenberger, A. (2012). Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a008888.

Ko, K.R., Tam, N.W., Teixeira, A.G., and Frampton, J.P. (2020). SH-SY5Y and LUHMES cells display differential sensitivity to MPP+, tunicamycin, and epoxomicin in 2D and 3D cell culture. *Biotechnol Prog* 36, e2942.

Kovalevich, J., and Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol. Biol.* 1078, 9–21.

Kriks, S., Shim, J.-W., Piao, J., Ganat, Y.M., Wakeman, D.R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., Buch, A., et al. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 480, 547–551.

Kumar, A., and Starly, B. (2015). Large scale industrialized cell expansion: producing the critical raw material for biofabrication processes. *Biofabrication* 7, 044103.

Kume, T., Kawato, Y., Osakada, F., Izumi, Y., Katsuki, H., Nakagawa, T., Kaneko, S., Niidome, T., Takada-Takatori, Y., and Akaike, A. (2008). Dibutyryl cyclic AMP induces differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into a noradrenergic phenotype. *Neurosci Lett* 443, 199–203.

Lachaier, E., Louandre, C., Ezzoukhry, Z., Godin, C., Mazière, J.-C., Chauffert, B., and Galmiche, A. (2014). La ferroptose, une nouvelle forme de mort cellulaire applicable au traitement médical des cancers. *Med Sci (Paris)* 30, 779–783.

Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L.S., Hurles, M.E., Homfray, T., Penninger, J.M., Jackson, A.P., and Knoblich, J.A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501, 373–379.

Langhans, S.A. (2018). Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front. Pharmacol.* 9.

Lau, A., and Tymianski, M. (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 460, 525–542.

Lau, L.W., Cua, R., Keough, M.B., Haylock-Jacobs, S., and Yong, V.W. (2013). Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 722–729.

Lee, H., and Pienaar, I.S. (2014). Disruption of the blood-brain barrier in Parkinson's disease: curse or route to a cure? *Front Biosci (Landmark Ed)* 19, 272–280.

Leem Recherche et développement.

Lehri-Boufala, S., Ouidja, M.-O., Barbier-Chassefière, V., Hénault, E., Raisman-Vozari, R., Garrigue-Antar, L., Papy-Garcia, D., and Morin, C. (2015). New Roles of Glycosaminoglycans in α -Synuclein Aggregation in a Cellular Model of Parkinson Disease. *PLoS One* 10, e0116641.

Leist, M., and Hartung, T. (2013). Inflammatory findings on species extrapolations: humans are definitely no 70-kg mice. *Arch Toxicol* 87, 563–567.

Lewerenz, J., and Maher, P. (2015). Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases—What is the Evidence? *Frontiers in Neuroscience* 9, 469.

Lin, R.-Z., Lin, R.-Z., and Chang, H.-Y. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J* 3, 1172–1184.

Lin, S., Lin, Y., Nery, J.R., Urich, M.A., Breschi, A., Davis, C.A., Dobin, A., Zaleski, C., Beer, M.A., Chapman, W.C., et al. (2014). Comparison of the transcriptional landscapes between human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 17224–17229.

Lo, E.H., Wang, X., and Cuzner, M.L. (2002). Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J. Neurosci. Res.* 69, 1–9.

Long, K.R., and Huttner, W.B. (2019). How the extracellular matrix shapes neural development. *Open Biol* 9, 180216.

López-Carballo, G., Moreno, L., Masiá, S., Pérez, P., and Baretino, D. (2002). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 277, 25297–25304.

Lorenzl, S., Albers, D.S., Narr, S., Chirichigno, J., and Beal, M.F. (2002). Expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-1 and their endogenous counterregulators TIMP-1 and TIMP-2 in postmortem brain tissue of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 178, 13–20.

Lotharius, J., Barg, S., Wiekop, P., Lundberg, C., Raymon, H.K., and Brundin, P. (2002). Effect of mutant alpha-synuclein on dopamine homeostasis in a new human mesencephalic cell line. *J Biol Chem* 277, 38884–38894.

Maeda, N., Ishii, M., Nishimura, K., and Kamimura, K. (2011). Functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate in the developing brain. *Neurochem. Res.* 36, 1228–1240.

Maiti, P., Manna, J., and Dunbar, G.L. (2017). Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. *Transl Neurodegener* 6.

Martin-Bastida, A., Ward, R.J., Newbould, R., Piccini, P., Sharp, D., Kabba, C., Patel, M.C., Spino, M., Connelly, J., Tricta, F., et al. (2017). Brain iron chelation by deferiprone in a phase 2 randomised double-blinded placebo controlled clinical trial in Parkinson's disease. *Sci Rep* 7, 1398.

McCoy, M.K., Martinez, T.N., Ruhn, K.A., Szymkowski, D.E., Smith, C.G., Botterman, B.R., Tansey, K.E., and Tansey, M.G. (2006). Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 26, 9365–9375.

McGeer, P.L., Itagaki, S., Boyes, B.E., and McGeer, E.G. (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38, 1285–1291.

Melchor, J.P., and Strickland, S. (2005). Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thromb. Haemost.* 93, 655–660.

Mestre-Ferrandiz, J., Sussex, J., and Towse, A. (2012). *The R&D Cost of a New Medicine* (Office of Health Economics).

Milev, P., Monnerie, H., Popp, S., Margolis, R.K., and Margolis, R.U. (1998). The core protein of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan is a high-affinity ligand of fibroblast growth factor-2 and potentiates its mitogenic activity. *J. Biol. Chem.* *273*, 21439–21442.

Miyata, S., and Kitagawa, H. (2017). Formation and remodeling of the brain extracellular matrix in neural plasticity: Roles of chondroitin sulfate and hyaluronan. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* *1861*, 2420–2434.

Miyazaki, I., and Asanuma, M. (2020). Neuron-Astrocyte Interactions in Parkinson's Disease. *Cells* *9*, E2623.

Moreau, C., Rolland, A.S., Guyon, P., Devedjian, J.C., Deplanque, D., Bordet, R., Carrière, N., Defebvre, L., and Devos, D. (2019). Nouvelle stratégie de neuroprotection basée sur la chélation conservatrice du fer dans la maladie de Parkinson. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* *203*, 415–423.

Morgan, P., Brown, D.G., Lennard, S., Anderton, M.J., Barrett, J.C., Eriksson, U., Fidock, M., Hamrén, B., Johnson, A., March, R.E., et al. (2018). Impact of a five-dimensional framework on R&D productivity at AstraZeneca. *Nat Rev Drug Discov* *17*, 167–181.

Moya, E.L.J., Vandenhoute, E., Rizzi, E., Boucau, M.-C., Hachani, J., Maubon, N., Gosselet, F., and Dehouck, M.-P. (2021). Miniaturization and Automation of a Human In Vitro Blood-Brain Barrier Model for the High-Throughput Screening of Compounds in the Early Stage of Drug Discovery. *Pharmaceutics* *13*, 892.

Neal, M.L., Boyle, A.M., Budge, K.M., Safadi, F.F., and Richardson, J.R. (2018). The glycoprotein GPNMB attenuates astrocyte inflammatory responses through the CD44 receptor. *J Neuroinflammation* *15*, 73.

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., and Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* *13*, 9–22.

Novak, U., and Kaye, A.H. (2000). Extracellular matrix and the brain: components and function. *J Clin Neurosci* *7*, 280–290.

Oddo, A., Peng, B., Tong, Z., Wei, Y., Tong, W.Y., Thissen, H., and Voelcker, N.H. (2019). Advances in Microfluidic Blood-Brain Barrier (BBB) Models. *Trends Biotechnol* *37*, 1295–1314.

Oh, S.H., Kim, H.N., Park, H.J., Shin, J.Y., Kim, D.Y., and Lee, P.H. (2017). The Cleavage Effect of Mesenchymal Stem Cell and Its Derived Matrix Metalloproteinase-2 on Extracellular α -Synuclein Aggregates in Parkinsonian Models. *Stem Cells Transl Med* *6*, 949–961.

Oksenberg, D., Marsters, S.A., O'Dowd, B.F., Jin, H., Havlik, S., Peroutka, S.J., and Ashkenazi, A. (1992). A single amino-acid difference confers major pharmacological variation between human and rodent 5-HT_{1B} receptors. *Nature* *360*, 161–163.

Ortolano, S., and Spuch, C. (2013). tPA in the central nervous system: relations between tPA and cell surface LRP. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 7, 65–76.

Påhlman, S., Odelstad, L., Larsson, E., Grotte, G., and Nilsson, K. (1981). Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Int. J. Cancer* 28, 583–589.

Påhlman, S., Ruusala, A.I., Abrahamsson, L., Mattsson, M.E., and Esscher, T. (1984). Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ.* 14, 135–144.

Pahwa, R., and Lyons, K.E. (2009). Levodopa-related wearing-off in Parkinson's disease: identification and management. *Curr Med Res Opin* 25, 841–849.

Perry, G., Richey, P., Siedlak, S.L., Galloway, P., Kawai, M., and Cras, P. (1992). Basic fibroblast growth factor binds to filamentous inclusions of neurodegenerative diseases. *Brain Res* 579, 350–352.

Peters, A., and Sherman, L.S. (2020). Diverse Roles for Hyaluronan and Hyaluronan Receptors in the Developing and Adult Nervous System. *Int J Mol Sci* 21, E5988.

Pozzi, A., Yurchenco, P.D., and Iozzo, R.V. (2017). The nature and biology of basement membranes. *Matrix Biol.* 57–58, 1–11.

Raeeszadeh-Sarmazdeh, M., Do, L.D., and Hritz, B.G. (2020). Metalloproteinases and Their Inhibitors: Potential for the Development of New Therapeutics. *Cells* 9, 1313.

Raghunathan, R., Hogan, J.D., Labadorf, A., Myers, R.H., and Zaia, J. (2020). A glycomics and proteomics study of aging and Parkinson's disease in human brain. *Sci Rep* 10, 12804.

Raines, E.W., and Ross, R. (1992). Compartmentalization of PDGF on extracellular binding sites dependent on exon-6-encoded sequences. *J Cell Biol* 116, 533–543.

Rauch, U. (2004). Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain. *Cell Mol Life Sci* 61, 2031–2045.

Ray, B., Chopra, N., Long, J.M., and Lahiri, D.K. (2014). Human primary mixed brain cultures: preparation, differentiation, characterization and application to neuroscience research. *Mol Brain* 7, 63.

Rempe, R.G., Hartz, A.M., and Bauer, B. (2016). Matrix metalloproteinases in the brain and blood–brain barrier: Versatile breakers and makers. *J Cereb Blood Flow Metab* 36, 1481–1507.

Richard, D., Camps, J.F., and Eugène, D. (2013). *Neurosciences (Paris)*.

Rizzi, G., and Tan, K.R. (2017). Dopamine and Acetylcholine, a Circuit Point of View in Parkinson's Disease. *Front Neural Circuits* 11, 110.

Rognan, D., and Bonnet, P. (2014). Les chimiothèques et le criblage virtuel. *Med Sci (Paris)* 30, 1152–1160.

Rowlands, D., Lensjø, K.K., Dinh, T., Yang, S., Andrews, M.R., Hafting, T., Fyhn, M., Fawcett, J.W., and Dick, G. (2018). Aggrecan Directs Extracellular Matrix-Mediated Neuronal Plasticity. *J. Neurosci.* 38, 10102–10113.

Ruoslahti, E. (1996). Brain extracellular matrix. *Glycobiology* 6, 489–492.

Saghatelyan, A.K., Dityatev, A., Schmidt, S., Schuster, T., Bartsch, U., and Schachner, M. (2001). Reduced perisomatic inhibition, increased excitatory transmission, and impaired long-term potentiation in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *Mol Cell Neurosci* 17, 226–240.

Saijo, K., Winner, B., Carson, C.T., Collier, J.G., Boyer, L., Rosenfeld, M.G., Gage, F.H., and Glass, C.K. (2009). A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* 137, 47–59.

Sainio, A., and Järveläinen, H. (2020). Extracellular matrix-cell interactions: Focus on therapeutic applications. *Cellular Signalling* 66, 109487.

Saksela, O., and Rifkin, D.B. (1990). Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. *J. Cell Biol.* 110, 767–775.

Saleh, A. (2017). Impact de la matrice extracellulaire sur la migration des cellules souches de glioblastome : un modèle tridimensionnel de culture et une nouvelle stratégie thérapeutique.

Samii, A., Etminan, M., Wiens, M.O., and Jafari, S. (2009). NSAID use and the risk of Parkinson's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Drugs Aging* 26, 769–779.

Sánchez, S., Jiménez, C., Carrera, A.C., Diaz-Nido, J., Avila, J., and Wandosell, F. (2004). A cAMP-activated pathway, including PKA and PI3K, regulates neuronal differentiation. *Neurochem Int* 44, 231–242.

Santé Publique France (2018). Fréquence de la maladie de Parkinson en France. Données nationales et régionales 2010-2015. 69.

Saunders, N.R., Habgood, M.D., Møllgård, K., and Dziegielewska, K.M. (2016). The biological significance of brain barrier mechanisms: help or hindrance in drug delivery to the central nervous system? *F1000Res* 5, F1000 Faculty Rev-313.

Sayas, C.L., Moreno-Flores, M.T., Avila, J., and Wandosell, F. (1999). The neurite retraction induced by lysophosphatidic acid increases Alzheimer's disease-like Tau phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *274*, 37046–37052.

Scholz, D., Pörtl, D., Genewsky, A., Weng, M., Waldmann, T., Schildknecht, S., and Leist, M. (2011). Rapid, complete and large-scale generation of post-mitotic neurons from the human LUHMES cell line. *J Neurochem* *119*, 957–971.

Shimohama, S., Taniguchi, T., Fujiwara, M., and Kameyama, M. (1986). Changes in nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in Alzheimer-type dementia. *J Neurochem* *46*, 288–293.

Slanzi, A., Iannoto, G., Rossi, B., Zenaro, E., and Constantin, G. (2020). In vitro Models of Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Dev Biol* *8*, 328.

Sloan, S.A., Darmanis, S., Huber, N., Khan, T.A., Birey, F., Caneda, C., Reimer, R., Quake, S.R., Barres, B.A., and Pasca, S.P. (2017). Human Astrocyte Maturation Captured in 3D Cerebral Cortical Spheroids Derived from Pluripotent Stem Cells. *Neuron* *95*, 779-790.e6.

Smirnova, L., Harris, G., Delp, J., Valadares, M., Pamies, D., Hogberg, H.T., Waldmann, T., Leist, M., and Hartung, T. (2016). A LUHMES 3D dopaminergic neuronal model for neurotoxicity testing allowing long-term exposure and cellular resilience analysis. *Arch Toxicol* *90*, 2725–2743.

Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* *119*, 7–35.

Song, I., and Dityatev, A. (2018). Crosstalk between glia, extracellular matrix and neurons. *Brain Res. Bull.* *136*, 101–108.

Sood, D., Chwalek, K., Stuntz, E., Pouli, D., Du, C., Tang-Schomer, M., Georgakoudi, I., Black, L.D., and Kaplan, D.L. (2016). Fetal brain extracellular matrix boosts neuronal network formation in 3D bioengineered model of cortical brain tissue. *ACS Biomater Sci Eng* *2*, 131–140.

Soria, F.N., Paviolo, C., Doudnikoff, E., Arotcarena, M.-L., Lee, A., Danné, N., Mandal, A.K., Gosset, P., Dehay, B., Groc, L., et al. (2020). Synucleinopathy alters nanoscale organization and diffusion in the brain extracellular space through hyaluronan remodeling. *Nat Commun* *11*, 3440.

Souza, G.R., Molina, J.R., Raphael, R.M., Ozawa, M.G., Stark, D.J., Levin, C.S., Bronk, L.F., Ananta, J.S., Mandelin, J., Georgescu, M.-M., et al. (2010). Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat Nanotechnol* *5*, 291–296.

Stephenson, E.L., and Yong, V.W. (2018). Pro-inflammatory roles of chondroitin sulfate proteoglycans in disorders of the central nervous system. *Matrix Biol.* *71–72*, 432–442.

Stiles, J., and Jernigan, T.L. (2010). The basics of brain development. *Neuropsychol Rev* *20*, 327–348.

- Stylianopoulos, T., Poh, M.-Z., Insin, N., Bawendi, M.G., Fukumura, D., Munn, L.L., and Jain, R.K. (2010). Diffusion of particles in the extracellular matrix: the effect of repulsive electrostatic interactions. *Biophys J* 99, 1342–1349.
- Su, W., Foster, S.C., Xing, R., Feistel, K., Olsen, R.H.J., Acevedo, S.F., Raber, J., and Sherman, L.S. (2017). CD44 Transmembrane Receptor and Hyaluronan Regulate Adult Hippocampal Neural Stem Cell Quiescence and Differentiation. *J. Biol. Chem.* 292, 4434–4445.
- Su, W., Matsumoto, S., Sorg, B., and Sherman, L.S. (2019). Distinct roles for hyaluronan in neural stem cell niches and perineuronal nets. *Matrix Biol.* 78–79, 272–283.
- Sung, J.Y., Park, S.M., Lee, C.-H., Um, J.W., Lee, H.J., Kim, J., Oh, Y.J., Lee, S.-T., Paik, S.R., and Chung, K.C. (2005). Proteolytic cleavage of extracellular secreted {alpha}-synuclein via matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 280, 25216–25224.
- Syková, E. (1997). The Extracellular Space in the CNS: Its Regulation, Volume and Geometry in Normal and Pathological Neuronal Function. *Neuroscientist* 3, 28–41.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Tao, Y., and Zhang, S.-C. (2016). Neural Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 19, 573–586.
- Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Gialeli, C., and Karamanos, N.K. (2016). Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 97, 4–27.
- Theocharis, A.D., Manou, D., and Karamanos, N.K. (2019). The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *The FEBS Journal* 286, 2830–2869.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- Tieu, K., Zuo, D.M., and Yu, P.H. (1999). Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells: involvement of bcl-2 and p53 proteins. *J. Neurosci. Res.* 58, 426–435.
- Tofoli, F.A., Semeano, A.T.S., Oliveira-Giacomelli, Á., Gonçalves, M.C.B., Ferrari, M.F.R., Veiga Pereira, L., and Ulrich, H. (2019). Midbrain Dopaminergic Neurons Differentiated from Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *Methods Mol Biol* 1919, 97–118.

- Tong, Z.-B., Hogberg, H., Kuo, D., Sakamuru, S., Xia, M., Smirnova, L., Hartung, T., and Gerhold, D. (2017). Characterization of three human cell line models for high-throughput neuronal cytotoxicity screening. *J Appl Toxicol* 37, 167–180.
- Toole, B.P. (2004). Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat. Rev. Cancer* 4, 528–539.
- Trudeau, L.-E. (2004). Glutamate co-transmission as an emerging concept in monoamine neuron function. *J Psychiatry Neurosci* 29, 296–310.
- Tucić, M., Stamenković, V., and Andjus, P. (2021). The Extracellular Matrix Glycoprotein Tenascin C and Adult Neurogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9, 1106.
- Urbán, N., and Guillemot, F. (2014). Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci* 8, 396.
- US EPA, O. (2019). Administrator Wheeler Signs Memo to Reduce Animal Testing, Awards \$4.25 Million to Advance Research on Alternative Methods to Animal Testing.
- Vaday, G.G., and Lider, O. (2000). Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. *J Leukoc Biol* 67, 149–159.
- Vandenbroucke, R.E., and Libert, C. (2014). Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nat Rev Drug Discov* 13, 904–927.
- Vargesson, N. (2015). Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. *Birth Defects Res C Embryo Today* 105, 140–156.
- Vlodavsky, I., Miao, H.Q., Medalion, B., Danagher, P., and Ron, D. (1996). Involvement of heparan sulfate and related molecules in sequestration and growth promoting activity of fibroblast growth factor. *Cancer Metastasis Rev.* 15, 177–186.
- Wahner, A.D., Bronstein, J.M., Bordelon, Y.M., and Ritz, B. (2007). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs may protect against Parkinson disease. *Neurology* 69, 1836–1842.
- Walz, W. (2000). Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int* 36, 291–300.
- Wang, L., Johnson, J.A., Zhang, Q., and Beahm, E.K. (2013). Combining decellularized human adipose tissue extracellular matrix and adipose-derived stem cells for adipose tissue engineering. *Acta Biomater* 9, 8921–8931.
- Wang, Q., Liu, Y., and Zhou, J. (2015). Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Transl Neurodegener* 4, 19.

Wang, W., Wang, J., and Li, F. (2017). Hyaluronidase and Chondroitinase. *Adv Exp Med Biol* 925, 75–87.

Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., and Couraud, P.-O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta* 1788, 842–857.

Wen, Y.-Q., Gao, X., Wang, A., Yang, Y., Liu, S., Yu, Z., Song, G.-B., and Zhao, H.-C. (2018). Substrate stiffness affects neural network activity in an extracellular matrix proteins dependent manner. *Colloids Surf B Biointerfaces* 170, 729–735.

Whitehouse, P.J., Price, D.L., Struble, R.G., Clark, A.W., Coyle, J.T., and Delon, M.R. (1982). Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215, 1237–1239.

Wiese, S., Karus, M., and Faissner, A. (2012). Astrocytes as a Source for Extracellular Matrix Molecules and Cytokines. *Front Pharmacol* 3, 120.

Wu, X., and Reddy, D.S. (2012). Integrins as Receptor Targets for Neurological Disorders. *Pharmacol Ther* 134, 68–81.

Xicoy, H., Wieringa, B., and Martens, G.J.M. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener* 12.

Xie, H., Hu, L., and Li, G. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin. Med. J.* 123, 1086–1092.

Yamada, S., and Nelson, W.J. (2007). Synapses: sites of cell recognition, adhesion, and functional specification. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 267–294.

Yamada, T., Kawamata, T., Walker, D.G., and McGeer, P.L. (1992). Vimentin immunoreactivity in normal and pathological human brain tissue. *Acta Neuropathol* 84, 157–162.

Yamaguchi, Y. (2000). Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 276–289.

Yamamoto, H., Tobisawa, Y., Inubushi, T., Irie, F., Ohyama, C., and Yamaguchi, Y. (2017). A mammalian homolog of the zebrafish transmembrane protein 2 (TMEM2) is the long-sought-after cell-surface hyaluronidase. *J Biol Chem* 292, 7304–7313.

Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P., and Ornitz, D.M. (1991). Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64, 841–848.

Yoshida, H., Nagaoka, A., Kusaka-Kikushima, A., Tobiishi, M., Kawabata, K., Sayo, T., Sakai, S., Sugiyama, Y., Enomoto, H., Okada, Y., et al. (2013). KIAA1199, a deafness gene of unknown

function, is a new hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 5612–5617.

Yoshino, Y., Goto, M., Hara, H., and Inoue, S. (2018). The role and regulation of TMEM2 (transmembrane protein 2) in HYBID (hyaluronan (HA)-binding protein involved in HA depolymerization/ KIAA1199/CEMIP)-mediated HA depolymerization in human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* *505*, 74–80.

Zhang, W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D.S., Wu, X., Block, M.L., Wilson, B., Zhang, W., Zhou, Y., Hong, J.-S., et al. (2005). Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J* *19*, 533–542.