

Etude multi-échelle de l'interaction cellule-biomatériau par microscopie confocale et environnementale

Akkiz Bekel

▶ **To cite this version:**

Akkiz Bekel. Etude multi-échelle de l'interaction cellule-biomatériau par microscopie confocale et environnementale. Matériaux. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSEI033 . tel-03783227

HAL Id: tel-03783227
https://theses.hal.science/tel-03783227

Submitted on 22 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.

N°d'ordre NNT : 2022LYSEI033

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Institut National des Sciences Appliquées de LYON

Ecole Doctorale N° ED34
Ecole Doctorale Matériaux de Lyon

Spécialité de doctorat :

Matériaux

Soutenue publiquement le 13/04/2022, par :
Akkiz BEKEL

Etude multi-échelle de l'interaction cellule-biomatériau par microscopies confocale et environnementale

Devant le jury composé de :

MARCO, Sergio	Directeur de Recherche, Institut Curie/ Sanofi	Rapporteur
PODOR, Renaud	Ingénieur de Recherche HDR, CNRS	Rapporteur
COMBES, Christèle	Professeure, INP-ENSIACET	Examinatrice
GREIMILLARD, Laurent	Directeur de Recherche, INSA-Lyon	Examinateur
MASENELLI-VARLOT, Karine	Professeure, INSA-Lyon	Directrice de thèse
ROIBAN, Lucian	Maître de Conférence HDR, INSA-Lyon	Co-directeur de thèse
GAILLARD, Claire	Maître de Conférence, UCBL-1	Invitée
ROUSSEAU, Marthe	Chargée de Recherche, CNRS	Invitée

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Département FEDORA – INSA Lyon - Ecoles Doctorales

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	**CHIMIE DE LYON** **https://www.edchimie-lyon.fr** Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage secretariat@edchimie-lyon.fr	**M. Stéphane DANIELE** C2P2-CPE LYON-UMR 5265 Bâtiment F308, BP 2077 43 Boulevard du 11 novembre 1918 69616 Villeurbanne **directeur@edchimie-lyon.fr**
E.E.A.	**ÉLECTRONIQUE, ÉLECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE** **https://edeea.universite-lyon.fr** Sec. : Stéphanie CAUVIN Bâtiment Direction INSA Lyon Tél : 04.72.43.71.70 secretariat.edeea@insa-lyon.fr	**M. Philippe DELACHARTRE** INSA LYON Laboratoire CREATIS Bâtiment Blaise Pascal, 7 avenue Jean Capelle 69621 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.43.88.63 **philippe.delachartre@insa-lyon.fr**
E2M2	**ÉVOLUTION, ÉCOSYSTÈME, MICROBIOLOGIE, MODÉLISATION** **http://e2m2.universite-lyon.fr** Sec. : Sylvie ROBERJOT Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 secretariat.e2m2@univ-lyon1.fr	**M. Philippe NORMAND** Université Claude Bernard Lyon 1 UMR 5557 Lab. d'Ecologie Microbienne Bâtiment Mendel 43, boulevard du 11 Novembre 1918 69 622 Villeurbanne CEDEX **philippe.normand@univ-lyon1.fr**
EDISS	**INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTÉ** **http://ediss.universite-lyon.fr** Sec. : Sylvie ROBERJOT Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 secretariat.ediss@univ-lyon1.fr	**Mme Sylvie RICARD-BLUM** Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS) - UMR 5246 CNRS - Université Lyon 1 Bâtiment Raulin - 2ème étage Nord 43 Boulevard du 11 novembre 1918 69622 Villeurbanne Cedex Tél : +33(0)4 72 44 82 32 **sylvie.ricard-blum@univ-lyon1.fr**
INFOMATHS	**INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES** **http://edinfomaths.universite-lyon.fr** Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage Tél : 04.72.43.80.46 infomaths@univ-lyon1.fr	**M. Hamamache KHEDDOUCI** Université Claude Bernard Lyon 1 Bât. Nautibus 43, Boulevard du 11 novembre 1918 69 622 Villeurbanne Cedex France Tél : 04.72.44.83.69 **hamamache.kheddouci@univ-lyon1.fr**
Matériaux	**MATÉRIAUX DE LYON** **http://ed34.universite-lyon.fr** Sec. : Yann DE ORDENANA Tél : 04.72.18.62.44 yann.de-ordenana@ec-lyon.fr	**M. Stéphane BENAYOUN** Ecole Centrale de Lyon Laboratoire LTDS 36 avenue Guy de Collongue 69134 Ecully CEDEX Tél : 04.72.18.64.37 **stephane.benayoun@ec-lyon.fr**
MEGA	**MÉCANIQUE, ÉNERGÉTIQUE, GÉNIE CIVIL, ACOUSTIQUE** **http://edmega.universite-lyon.fr** Sec. : Stéphanie CAUVIN Tél : 04.72.43.71.70 Bâtiment Direction INSA Lyon mega@insa-lyon.fr	**M. Jocelyn BONJOUR** INSA Lyon Laboratoire CETHIL Bâtiment Sadi-Carnot 9, rue de la Physique 69621 Villeurbanne CEDEX **jocelyn.bonjour@insa-lyon.fr**
ScSo	**ScSo*** **https://edsciencessociales.universite-lyon.fr** Sec. : Mélina FAVETON INSA : J.Y. TOUSSAINT Tél : 04.78.69.77.79 melina.faveton@univ-lyon2.fr	**M. Christian MONTES** Université Lumière Lyon 2 86 Rue Pasteur 69365 Lyon CEDEX 07 **christian.montes@univ-lyon2.fr**

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Remerciements

Je remercie tout d'abord les rapporteurs de cette thèse, Sergio MARCO et Renaud PODOR, pour avoir examiné mon manuscrit et avoir apporté leurs remarques et leur expertise. Je remercie également Christèle COMBES et Laurent GREMILLARD d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je voudrais remercier ma directrice de thèse, Karine MASENELLI-VARLOT, mon co-directeur de thèse, Lucian ROIBAN et Claire GAILLARD pour la liberté sans fin que vous m'avez accordée.

Je remercie le CLYM pour la formation au MEB et l'accès aux équipements. Je tiens également à remercier Frédéric COQUELLE, Cédric MESSAOUDI,Marie-Noëlle SOLER et Laëtitia BESSE pour votre accueil à l'Institut Curie et la formation en microscopie confocale.

Je remercie également les équipes I2B et SNMS pour leurs accueils. Je tiens spécialement à remercier Thierry DOUILLARD et Victor TRILLAUD pour la vulgarisation de la microscopie. Je remercie Dr HENRY et Dr DASSONNEVILLE pour votre soutien et surtout pour les pauses café qui ont souvent été le moment de discussions qui m'ont permis de débloquer certaines situations.

Je tiens à remercier la « team hydrogel » à savoir Jérôme SOHIER, Marianna, Louise (mon idole) et Dr FERI (la base des Dr Locos), grâce vous j'avais l'ambiance des labos de bio comme je les aime mêlant le travail et la rigolade.

Je suis très reconnaissante à Laurence VICO de m'avoir accueillie au laboratoire SAINBIOSE le temps de l'étude de minéralisation. Je remercie particulièrement Marthe ROUSSEAU pour nos discussions très enrichissantes tant sur le plan professionnel que personnel. Je remercie Sylvie, Mireille, Marie-Thérèse, Priyanka, Dalia et toute l'équipe pour leur accueil à St Etienne.

Je remercie Solène TADIER et Nathalie DOUARD de m'avoir fourni les biomatériaux qui m'ont permis d'appliquer la méthodologie développée au cours de ma thèse.

J'adresse également mes remerciements à Cyril LANGLOIS et Sounkalo DEMBELE pour nos échanges sur la partie concernant la quantification qualitative des images et la reconstructions 3D des images MEB.

Je remercie les gestionnaires sans qui le laboratoire ne tournerait pas : Antonia, Alexandra, Sandrine, Corinne, Véronique et Dalila.

Je remercie tous les doctorants MATEIS, particulièrement Zeina, Sid, Aslihan, Carmen Jesbeer, Xavier, Matthias, Mathilde, Clément, Romain, Julien, Laurabelle et tous les autres.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Je suis très reconnaissante à mon collègue doctorant Louis-Marie qui est arrivé sur la fin de ma thèse, j'ai apprécié nos brainstormings, ta patience et ton calme légendaire, c'était très agréable de travailler avec toi.

Je voudrais également remercier les stagiaires Joseph et Alvin pour leur aide.

La thèse, c'est également de très belles rencontres, la première personne à laquelle je pense c'est bien évidemment toi ma chère Pauline, pas parce qu'on s'est rencontrées le jour des nouveaux arrivants INSA, mais parce que tu as été la rencontre la plus marquante. Je remercie toutes les rencontres que je te dois Pauline, forcément il y a Melissa et Dolorès et toute la clique de Lederer.

Je remercie Morgane, Amélie <3, Lydie, Sylvie, Tugba <3, Frédéric, Marie-Yvonne, Erick et toute la clique du QG Cusset.

Je remercie tous mes amis et anciens collègues de Strasbourg pour leurs soutiens à distance. J'ai une pensée particulière pour mon mentor en biologie Pierre EFTEKHARI d'avoir entretenu et nourri ma passion pour l'humain.

Finalement, je voudrais bien évidemment remercier ma famille. Merci à ma sœur aînée Sati pour les coups de fil quotidien de motivation pendant la rédaction. Zizou et Doudou je ne vous remercierai jamais assez pour votre soutien infaillible, de m'avoir supportée pendant ma rédaction et juste avant ma soutenance, et surtout merci d'avoir préparé mon pot de thèse. Merci à mes neveux et nièces. Je tiens également à remercier ma cousine Gul qui a été des plus grands soutiens ici à Lyon.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

A mes parents,

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

« A mon avis aucune science ne peut procurer autant de satisfaction à l'Homme que celle qui l'instruit sur son Corps, ses différentes parties, leurs fonctions et leurs activités »

Thomas Jefferson

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Table des matières

Introduction générale 1

Chapitre 1 : Etat de l'art des méthodes d'étude des interactions cellules-biomatériaux 3

1 Biomatériaux 3

1.1 Différentes classes de biomatériaux 4

1.1.1 Les métaux et leurs alliages 4

1.1.2 Les polymères 5

1.1.3 Les céramiques 5

1.1.4 Les composites 6

1.2 Biocompatibilité 6

2 Généralités sur la cellule 9

2.1 Composants d'une cellule eucaryote 9

2.2 La morphologie cellulaire à travers le cytosquelette d'actine 11

2.3 L'adhésion cellulaire 13

3 Etudes *in vitro* des interactions cellules-biomatériaux 15

3.1 Types cellulaires 15

3.1.1 Cellules primaires 15

3.1.2 Lignées cellulaires 16

3.2 Exemples d'études *in vitro* d'interactions cellule-biomatériau 17

4 Apport des techniques de microscopie pour l'étude des interactions cellules/biomatériaux 19

4.1 La microscopie confocale 19

4.2 La microscopie électronique à balayage (MEB) 23

4.2.1 MEB environnementale (MEBE) 26

4.2.2 La microscopie électronique à balayage en mode transmission et liquide (MEBT-liquide ou Wet-STEM en anglais) 28

5 Positionnement de la thèse 30

Chapitre 2 : Matériels et méthodes 32

1 Choix biomatériaux 32

2 Choix des cellules 33

2.1 Les cellules NIH-3T3 33

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

2.2 Les cellules MC3T3-E1 33
2.3 Les cellules MG-63 33
2.4 Les cellules 3T3-L1 33
3 Préparation des biomatériaux 34
3.1 Polissage miroir 34
3.2 Préparation des disques de titane pour le MEBE 36
3.3 Stérilisation des biomatériaux 36
4 Maintien des cultures cellulaires 36
4.1 Matériels 36
4.2 Maintien des cellules NIH-3T3 37
4.3 Maintien des cellules MC3T3-E1 37
4.4 Maintien des cellules MG-63 38
4.5 Maintien des cellules 3T3-L1 38
5 Etude de l'adhésion et de la morphologie cellulaire 38
5.1 Matériels 38
5.2 Culture des cellules sur les biomatériaux 38
5.3 Marquage fluorescent des sites d'ancrage, de l'actine et du noyau 39
5.3.1 Microscopie confocale 39
5.3.2 Microscopie électronique à balayage (MEB) 39
6 Etude de la minéralisation de la MEC des cellules MC3T3-E1 cultivées sur HA et CHA 40
6.1 Matériels 40
6.2 Culture et différenciation des cellules MC3T3-E1 40
6.3 Evaluation de la différenciation et de la minéralisation par RT-PCR 41
6.4 Evaluation de la composition chimique de la MEC par EDX 42
7 Etude de l'effet de la température et du milieu sur la viabilité cellulaire 42
7.1 Test de viabilité comptage manuel (NIH-3T3) 42
7.1.1 Matériels 42
7.1.2 Mode opératoire 43
7.2 Test de viabilité Celltiter Glo® (NIH-3T3 et MG-63) 44
7.2.1 Matériels 44
7.2.2 Mode opératoire 44

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

7.3 Effet de la température et du tampon : mesure du changement d'impédance électrique xCELLigence (NIH-3T3 et MG-63) 44
7.3.1 Matériels..... 44
7.3.2 Mode opératoire 45
7.4 Mesure de la viabilité et mortalité cellulaire par fluorescence : méthode live & dead (NIH-3T3 et MG-63) 45
7.4.1 Matériels..... 45
7.4.2 Détermination de la concentration de NAC à utiliser (test 1 avec NIH-3T3) 45
7.4.3 Détermination de la concentration de NAC à utiliser (test 2, NIH-3T3 et MG-63) ... 46
7.4.4 Etude de l'effet du milieu et de la température d'incubation sur les cellules au cours du temps (NIH-3T3 et MG-63)..... 46
8 Encapsulation des cellules avec de l'oxyde de graphène 47
8.1 Matériels 47
8.2 Evaluation de la cytotoxicité des NPs d'OG par impédancemétrie.....47
8.3 Détermination du volume minimum de milieu de culture requis pour maintenir les cellules en vie 47
9 Tests statistiques 47
Chapitre 3 : Méthodologie d'étude des interactions cellule-biomatériau par microscopies confocale et électronique 49
1 Analyse des sites d'ancrage de la cellule sur le biomatériau 49
1.1 Traitement préliminaire des images 50
1.2 Analyse de la surface de contact de la cellule avec le biomatériau 53
2 Analyse morphologique cellulaire par MEB 57
2.1 Densité et étalement cellulaire.....57
2.2 Interface cellule biomatériau 60
2.3 Volume 3D 63
3 Analyse de la morphologie cellulaire en MEBE 67
4 Faisabilité d'étudier la morphologie cellulaire en 3D par tomographie STEM en phase liquide.....68
5 Conclusion.....74
Chapitre 4 : Etude de cas 77
1 Etude des interactions cellule-biomatériau par microscopie.....77
1.1 Quantification des sites d'ancrage 78

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

1.2 Analyse de la densité et de l'étalement cellulaire 80
1.3 Interface cellule biomatériau 83
2 Etude de la minéralisation 85
2.1 Etude de la minéralisation par évaluation de l'expression génique des marqueurs 86
2.2 Détermination de la composition chimique de la MEC par EDX 89
3 Conclusion.....93
Chapitre 5 : Faisabilité de l'étude de cellules vivantes en ESEM 94
1 Etude du milieu et de la température sur la viabilité cellulaire 94
1.1 Effet de la température et du tampon : comptage cellulaire (NIH-3T3) ..94
1.2 Effet de la température et du milieu : mesure de l'ATP (NIH-3T3 et MG-63) 96
1.3 Effet de la température et du tampon : mesure du changement d'impédance électrique (NIH-3T3 et MG-63).....98
1.4 Mesure de la viabilité et mortalité cellulaire par fluorescence : méthode live & dead 101
1.4.1 Test préliminaire 1 : faisabilité 102
1.4.2 Test préliminaire 2 : sensibilité du test 103
1.4.3 Etude de l'effet du milieu et de la température d'incubation sur les cellules au cours du temps 106
2 Encapsulation des cellules avec de l'oxyde de graphène 109
2.1 Evaluation de la toxicité des NPs d'OG 109
2.2 Détermination du volume minimum requis pour maintenir l'hydratation des cellules par Cytation (3T3-L1).....111
3 Paramètres d'acquisition et dose d'électrons 113
4 Conclusion.....118
Conclusion 120
Perspectives 122
Bibliographie.....124

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Liste des abréviations et des acronymes

2D : Deux dimensions

3D : Trois dimensions

β-TCP : Phosphate tricalcique

A-488 : Alexa-488

AA : Antibiotique - antimycotique

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messager

ATP : Adénosine triphosphate

BF : Champ clair (Bright Field)

BSA : Sérum albumine bovine

BSP : Sialoprotéine osseuse

CHA : Hydroxyapatite carbonaté

Col1 : Collagène de type 1

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

Dex : Dexaméthasone

DF : Champ sombre (Dark field)

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EDTA : acide ethylènediaminetétraacétique

EDX : Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie

ET : Ecart-type

FA : Adhésion focale

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

FAK : Focal adhesion kinase

FDA : Food and drug administration

FI : Filament intermédiaire

HA : Hydroxyapatite

HBSS : Hank’s Balanced Salt Solution

HEPES : acide 4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic

HPRT : Hypoxanthine phosphoribosyltransférase

HR : Humidité relative

IP : Iodure de propidium

ISO : Organisation internationale de normalisation

MCBL : Microscope confocale à balayage laser

MEB : Microscopie électronique à balayage

MEBE : Microscopie électronique à balayage en mode environnemental

MEBT : Microscopie électronique à balayage en transmission

MEBHV : Microscopie électronique à balayage sous haut vide

MEC : Matrice extracellulaire

MEME : Minimum Essential Medium Eagle

NAC : N-acétylcystéine

NPs : Nanoparticules

OCN : Ostéocalcine

OG : Oxyde de graphène

ON : Ouverture numérique

OPN : ostéopontine

PBS : Phosphate buffered saline

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

RT-PCR : PCR en temps réel (Real time PCR)

PFA : Paraformaldéhyde

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

RFU : Unité relative de fluorescence

ROS : Espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species)

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

Runx2 : Runt-related transcription factor-2

SIFT : Scale-invariant feature transformation

SVB : Sérum de veau bovin

SVF : Sérum de veau fœtal

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Liste des figures

Figure 1 : Exemple de tests de biocompatibilité. 8
Figure 2 : Schéma général d'une cellule eucaryote 10
Figure 3 : Schéma simplifié du cycle de l'actine. 11
Figure 4 : Représentation schématique des différentes structures de l'actine 12
Figure 5 : Schéma simplifié d'un point d'adhésion focale. 14
Figure 6 : Influence de la chimie de surface sur les interactions cellule-biomatériau..... 17
Figure 7 : Image de microscopie confocale sur l'influence de la rigidité du matériau sur la morphologie cellulaire et l'organisation du cytosquelette d'actine. 18
Figure 8 : Schéma d'un microscope confocal à balayage laser 20
Figure 9 : Visualisation de la distribution d'actine (rouge) et de vinculine (vert) par microscopie confocale 21
Figure 10 : Exemple d'application de reconstruction 3D de Z-stack 22
Figure 11 : Schéma d'un MEB avec les différents signaux types détectés produits par l'interaction électrons-matière de l'os 23
Figure 12 : Micrographie électronique réplique de platine du cytosquelette 24
Figure 13 : Réseau de FI obtenu après extraction de la membrane plasmique de cellule Panc1, ...25
Figure 14 : Schéma d'un MEBE 26
Figure 15 : Diagramme de phase de l'eau 27
Figure 16 : Comparaison de la morphologie de cellule déshydratées et hydratées. 28
Figure 17 : Schéma du portoir MEBT-liquide conçu pour l'imagerie en mode champ sombre annulaire. 29
Figure 18 : MEBT-liquide images à 30 kV et en mode champ sombre annulaire (ADF) d'une mini-émulsions aqueuse 29
Figure 19 : Polissage des échantillons 35
Figure 20 : Test de coupe à la scie à fil (image de droite). 36
Figure 21 : Plan de plaque de l'étude de la minéralisation de la MEC par les MC3T3-E1 différenciées en ostéoblastes. 41
Figure 22 : Exemple de transformation d'un stack d'image. 51
Figure 23 : Traitement d'image pour éliminer le bruit de fond 52
Figure 24 : Traitement d'image pour éliminer les marquages aspécifiques 53
Figure 25 : Mesure de la surface totale et de contact de la cellule 54
Figure 26 : Evolution de la proportion des sites d'ancrage au cours du temps..... 55
Figure 27 : Evolution de la proportion des sites d'ancrage au cours du temps.....56
Figure 28 : Exemple d'analyse de l'étalement de la cellule. 58
Figure 29 : Exemple d'analyse pour le comptage des cellules. 58
Figure 30 : Evolution de la densité A) et de la surface B) cellulaire au cours du temps. 59

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Figure 31 : Schéma du montage du porte-échantillon pour l'imagerie de l'interface entre les cellules et le biomatériau 60
Figure 32 : Evaluation des paramètres spéciaux du microscope. 61
Figure 33 : Images MEB obtenues en collectant les électrons secondaires à une inclinaison de 85° de l'échantillon. Cellules MC3T3-E1 cultivées sur du titane à différents temps 62
Figure 34 : Montage de l'échantillon de pour l'acquisition des images pour les analyses 3D. 63
Figure 35 : Exemple d'images acquises sur une cellule NIH-3T3 cultivée 30 minutes sur un disque de titane à différents angles d'inclinaison et de rotation 64
Figure 36 : Interface du logiciel Meshroom 65
Figure 37 : Exemple de reconstruction 3D incomplètes.....66
Figure 38 : Volume 3D de la surface d'une cellule NIH-3T3 cultivée 30 minutes sur du titane. A) Images MEB obtenues en collectant les électrons secondaires à 2 kV avec une inclinaison de 8° et une rotation de -90° B). Objet reconstruit à partir de la série d'images tiltées et tournées en utilisant le logiciel Meshroom.....66
Figure 39 : Images MEB de cellules MC3T3-E1 cultivées 30 minutes sur du titane. 68
Figure 40 : Schéma du portoir STEM développé au laboratoire 69
Figure 41 : Schéma des électrons collectés pour acquérir les images STEM. 69
Figure 42 : Exemple d'images collectées en mode BF à différents angles d'inclinaison ...70
Figure 43 : Images STEM en mode BF d'une cellule NIH-3T3 cultivée sur une grille TEM 71
Figure 44 : Sections orthogonales du volume reconstruit d'une cellule NIH-3T3 à partir d'images collectées à différents angles. 72
Figure 45 : Vue sagittale des modèles d'une cellule NIH-3T3 obtenus après segmentation 72
Figure 46 : A) & B) Plan yz (sagittal) et C) & D) plan xz (coronal) au même emplacement dans les volumes d'une cellule NIH-3T3.....73
Figure 47 : Etude d'une cellule NIH-3T3 fixée et hydratée.. 75
Figure 48 : Mesure de la surface totale et de contact des cellules MC3T3-E1 78
Figure 49 Mesure de la surface totale et de contact des cellules MC3T3-E1 79
Figure 50 : Evolution de la proportion des sites d'ancrage au cours du temps.....80
Figure 51 : Evaluation de la densité cellulaire et de l'étalement cellulaire.....81
Figure 52 : Evolution de la densité cellulaire au cours du temps des cellules MC3T3-E1 82
Figure 53 : Evolution au cours du temps de l'étalement des cellules MC3T3-E1 82
Figure 54 : Images MEB de l'interface entre les MC3T3-E1 et le HA 84
Figure 55 : Marqueurs ostéogéniques exprimés au cours des différentes phases. matrice extracellulaire par les ostéoblastes tardifs.....86
Figure 56 : Exemple de données générées par PCR pour l'évaluation du niveau d'expression du gène Col1a pour l'ensemble des échantillons. 87

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Figure 57 : Niveau d'expression des différents marqueurs de différenciation et de minéralisation des cellules 88
Figure 58 : Exemple d'analyse MEB-EDX effectuée sur des cultures de 14 jours post-induction de cellules. 90
Figure 59 : Mesure de la composition chimique de la MEC à 14 jours A) et à 21 jours B) d'incubation des cellules MC3T3-E1 avec du milieu ostéogénique. 92
Figure 60 : Etude du milieu et de la température d'incubation sur la viabilité des cellules NIH-3T3 au cours du temps. 95
Figure 61 : Etude de l'effet des conditions de culture sur les cellules NIH-3T3 et MG-63 97
Figure 62 : Effet de la température et de l'HBSS en présence de concentrations croissantes en NAC sur la prolifération des cellules NIH-3T3. 99
Figure 63 : : Effet de la température et de l'HBSS en présence de concentrations croissantes en NAC sur la prolifération des cellules MG-63. 100
Figure 64 : Effet de la température et de l'HEPES en présence de concentrations croissantes en NAC sur la prolifération des cellules NIH-3T3. 100
Figure 65 : : Effet de la température et de l'HEPES en présence de concentrations croissantes en NAC sur la prolifération des cellules MG-63. 101
Figure 66 : Etude de l'effet de l'incubation dans différents milieux en présence de concentrations croissantes en NAC à +4°C 102
Figure 67 : Etude de l'effet de l'incubation dans différents milieux en présence de concentrations croissantes en NAC à 37°C et à +4°C 104
Figure 68 : Etude de l'effet de l'incubation dans différents milieux en présence de concentrations croissantes en NAC à 37°C et à +4°C 105
Figure 69 : Etude de l'effet de l'incubation dans différent milieu en présence de 10 mM de NAC à 37°C et à +4°C 107
Figure 70 : Etude de l'effet de l'incubation dans différent milieu en présence de 10 mM de NAC à 37°C et à +4°C 108
Figure 71 : Suivi de l'impédance des cellules 3T3-L1 au cours du temps avant et après ajout de différentes concentrations de NPs d'OG. 110
Figure 72 : Evaluation de l'effet de la concentration de NPs d'OG sur la prolifération des cellules 3T3-L1. 110
Figure 73 : Evaluation de la reprise de prolifération après enlèvement des NPs d'OG. 111
Figure 74 : Images numériques prise à 3h30 d'incubation de cellules 3T3-L1 avec différents volumes de milieu de culture, barre d'échelle de 100 µm. 112
Figure 75 : Montage des images acquises à 4h d'incubation avec 30 µL de milieu, 3,1 µg/mL ou 6,25 µg/mL de NPs d'OG. 112
Figure 76 : Dose d'électrons en fonction de la vitesse de balayage et de la taille de l'image 114

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Figure 77 : Images MEB haut vide d’une zone d’accroche entre une cellule et son support 115
Figure 78 : Images MEB haut vide obtenues pour déifférentes vitesses de balayage ...117
Figure 79 : Influence du réglage du C&B sur la variance normalisée.....118

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classes des biomatériaux, caractéristique et application 7
Tableau 2 : tableau récapitulatif des cellules et biomatériaux utilisés dans les différentes études 34
Tableau 3 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour la RT-PCR. 42
Tableau 4 : Résultats du test de la plus petite différence significative (LSD) de Fisher effectuée pour comparer la proportion des sites d'ancrage au cours du temps. 56
Tableau 5 : Résultats de l'ANOVA à 2 facteurs effectué pour comparer la densité cellulaire au cours du temps des deux lignées cellulaires. 59
Tableau 6 : Résultats de l'ANOVA à 2 facteurs effectué pour comparer l'étalement cellulaire au cours du temps des deux lignées cellulaires. 59
Tableau 7 : Résultats du test ANOVA à 2 facteurs effectué pour comparer la différence de proportion des sites d'ancrage entre HA et CHA au cours du temps. 80
Tableau 8 : Résultats du test ANOVA à 2 facteurs effectué pour comparer la différence de densité cellulaire entre HA et CHA au cours du temps. 82
Tableau 9 : Résultats du test ANOVA à 2 facteurs effectué pour comparer l'étalement des cellules MC3T3-E1 sur les pastilles de HA ou de CHA au cours du temps. 83
Tableau 10 : Récapitulatif des paramètres d'acquisition des images MEB, de la dose d'électrons correspondante et évaluation de la qualité des images 115
Tableau 11 : Dose d'électrons correspondant au point d'inflexion de la courbe de variance normalisée en fonction de la dose d'électrons pour un grossissement donné. 117

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Introduction générale

Le corps humain est une machinerie fascinante dont le fonctionnement et le maintien de ses fonctions sont régis par un ensemble de systèmes. Lorsqu'une fonction du corps humain est altérée, le recours à un implant pour rétablir ou minimiser cette perte de fonction est chose courante. Dans l'histoire de la civilisation, les premiers implants sont rencontrés dès l'Egypte Ancienne. En effet, les dents de personnes décédées ou d'animaux servaient d'implants dentaires[1]. De nos jours, les implants sont synthétiques et constitués de biomatériaux. Les biomatériaux sont des matériaux destinés à interagir avec les systèmes biologiques ; ils peuvent être de différentes natures : métaux, alliages métalliques, céramiques ou polymères. L'implantation des biomatériaux soulève la question de leur sécurité et de leur devenir dans le corps humain. Suite à de nombreux cas de scandales sanitaires, la réglementation a évolué pour assurer une meilleure traçabilité de ces implants mais également pour renforcer l'évaluation clinique de ces biomatériaux. Leur biocompatibilité est évaluée mais l'étude sur les interactions biomatériaux/vivant se limitent surtout à l'examen de la toxicité de ces biomatériaux et peu d'essais sont dédiés à l'impact de ceux-ci sur les aspects fonctionnels du milieu biologique concernés dans les normes existantes (norme 10993).

La biotolérance et la biofonctionnalité regroupent des notions relatives aux interactions entre le biomatériau et le corps. La cellule biologique est un constituant élémentaire permettant de mener des recherches scientifiques qui touchent le vivant. Le développement de lignées cellulaires s'est fait progressivement : la première culture de cellule *in vitro* a été effectuée au début du XXème siècle par Ross Harrison dans le cadre d'une culture tissulaire d'explant d'embryon de grenouille. De nombreux tests *in vitro* utilisant la cellule ont été développés afin d'évaluer la toxicité et le phénotype induits par la présence de composés inhabituels/exogènes. Les cellules sont donc un outil incontournable dans le développement de composés destinés à entrer dans le corps humain. Il est par conséquent indispensable de développer des méthodes afin d'étudier les cellules en fonction de leur environnement. L'environnement de la cellule peut affecter aussi bien sa morphologie que la chimie cellulaire. La morphologie cellulaire donne une indication sur l'état physiologique de la cellule ; les études microscopiques apportent ainsi des informations complémentaires aux techniques d'analyse biochimique.

Il existe deux grandes familles de microscopes utilisés en biologie : les microscopes optiques, qui utilisent les photons pour créer une image, et les microscopes électroniques, dont la source de lumière est un faisceau d'électrons. La microscopie optique permet une

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

étude des cellules dans un environnement proche de leur état naturel, même si la microscopie confocale requiert le recours à des marqueurs fluorescents pour visualiser les structures cellulaires. La microscopie électronique nécessite habituellement de placer les échantillons sous vide. Elle nécessite par conséquent une préparation des échantillons biologiques : fixation, déshydratation, et introduction d'un contrastant, ou bien congélation. Cependant, ces étapes de préparation sont susceptibles d'introduire des artefacts. Le développement de nouvelles techniques comme le mode environnemental en microscopie électronique à balayage, ou l'utilisation de porte-objets « liquide » permettent de contrer certains artefacts liés à la déshydratation.

Objectif de la thèse

La recherche sur le développement de nouveaux biomatériaux est en pleine expansion. L'interaction entre la surface du biomatériau et les cellules constitue une étape clé pour le devenir du matériau. Le respect de l'état natif des cellules pour ce type d'étude est primordial, le mode environnemental du microscope électronique à balayage permet d'envisager d'étudier les cellules dans leur état natif voire vivante. L'exploration de cette question permettrait d'ouvrir la porte sur de nouvelles approches. Dans ce travail, nous proposons de mettre en place une méthodologie pour étudier les sites d'ancrage de la cellule sur le matériau et la réponse morphologique de la cellule en alliant la microscopie confocale et la microscopie électronique à balayage. Dans un premier chapitre, nous développerons la procédure pour étudier les sites d'ancrages de la cellule sur un biomatériau de référence par microscopie confocale, ainsi que la morphologie de la cellule par microscopie électronique à balayage. Dans un second chapitre, nous appliquerons la méthodologie développée à l'étude de l'interaction entre les cellules MC-3T3-E1 et l'hydroxyapatite carbonaté. Dans un troisième chapitre, nous évaluerons la possibilité d'étudier des cellules dans leur état natif dans un microscope électronique à balayage en mode environnemental. L'ensemble de ces résultats sera finalement discuté pour déterminer si la méthodologie proposée permet une appréhension suffisante du devenir des biomatériaux et ainsi proposer de nouvelles voies de développement technique pour enrichir la méthodologie.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Chapitre 1 : Etat de l'art des méthodes d'étude des interactions cellules-biomatériaux

Le corps humain est une machinerie passionnante. Son fonctionnement repose sur onze systèmes, parmi lesquels on peut citer le système nerveux, cardiovasculaire, squelettique etc. Les systèmes s'organisent sur plusieurs niveaux : les organes, les tissus et les cellules. Lorsqu'une fonction du corps humain s'altère, que ce soit par l'usure liée à l'âge ou par accident, il est possible d'avoir recours à des prothèses pour restaurer la fonction ou *a minima* limiter les conséquences de cette perte de fonction. Les prothèses sont fabriquées à partir de biomatériaux, des matériaux non vivants destinés à interagir avec des systèmes biologiques sans porter atteinte à l'intégrité de l'hôte. Le développement de nouveaux biomatériaux est en expansion d'une part pour améliorer leurs propriétés, mais également grâce au développement de nouveaux procédés de synthèse tels que la fabrication additive (impression 3D). Le devenir de l'implant dans le corps humain dépend grandement de l'interaction entre les cellules et le biomatériau. Le but de ce chapitre est de situer le contexte cellulaire et de biomatériaux, ainsi que de décrire l'état de l'art des méthodes d'étude des interactions entre cellules et biomatériaux par microscopie confocale et électronique.

1 Biomatériaux

Le marché des biomatériaux est en pleine expansion : il est passé de 82 milliards d'euros en 2011 à 118 milliards d'euro en 2017 [2]. Cette augmentation est liée à de nombreux facteurs tels que le vieillissement de la population, qui engendre une utilisation croissante d'implants. Les matériaux peuvent également présenter des signes de rejet par l'organisme [3] ou une défaillance [4] et ne plus assurer leur fonction. Depuis le début des années 2000, les biomatériaux sont développés comme support d'ingénierie tissulaire pour permettre à l'organisme de régénérer le tissu lésé. La fabrication de biomatériaux fiables, durables, régénérateurs et peu coûteux constitue un challenge pour les chercheurs et l'industrie.

Depuis les années soixante, les attentes vis-à-vis des biomatériaux ont évolué. On distingue maintenant quatre générations de biomatériaux [5]. La première génération est celle des biomatériaux dits inertes. Ils étaient utilisés pour remplacer un tissu endommagé.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Leur principale fonction était le support structural pour minimiser l'impact de la perte pour le patient. Les biomatériaux de deuxième génération visaient à augmenter l'efficacité du dispositif médical en apportant des modifications chimiques de surface ou un revêtement. On les appelle les biomatériaux bioactifs. Les biomatériaux bioactifs, pour certains d'entre eux, ont généré des infections causées par des processus toxiques ou immunologiques [6]. Leurs effets indésirables ont conduit au développement de biomatériaux de troisième génération. Ces derniers sont des biomatériaux pouvant être dégradés et éliminés par l'organisme, minimisant les inconvénients des implants permanents. On parle alors de biomatériaux biodégradables. La quatrième et dernière génération à ce jour est celle des biomatériaux dit intelligents. Il s'agit de matériaux ayant la capacité de stimuler l'organisme pour réparer et/ou régénérer les tissus endommagés. La conception des biomatériaux doit donc tenir compte de l'objectif et du site d'implantation.

Par ailleurs, les biomatériaux sont fabriqués à partir de trois classes de matériaux, selon les applications visées : les métaux et leurs alliages, les céramiques et les polymères. Les composites sont des matériaux composés d'au moins deux types différents de matériaux et constituent ainsi une quatrième classe de biomatériaux [7]. Une brève présentation de chaque classe de biomatériaux est présentée ci-dessous.

1.1 Différentes classes de biomatériaux

1.1.1 Les métaux et leurs alliages

Les métaux sont les ancêtres des biomatériaux : ce sont les premiers à avoir été implantés et représentent la plus grande part du marché des biomatériaux. Les métaux présentent des propriétés communes : une température de fusion élevée (sauf pour le mercure), une bonne conductivité et une bonne malléabilité. Les métaux sont des matériaux cristallins, c'est-à-dire que les atomes sont arrangés avec un ordre parfait dans les trois directions. Utilisés comme biomatériaux, les métaux utilisés purs présentent de mauvaises propriétés physico-chimiques ou mécaniques. En effet, certains d'entre eux sont toxiques (cuivre, plomb, etc.), sujet à la corrosion (fer), trop malléable (or) ou inhibiteur de certains processus biologiques (zinc) [8]. Le titane pur est le seul métal encore utilisé pour sa bonne adhérence à l'os et pour ses bonnes propriétés mécaniques.

Les alliages sont des matériaux composés de plusieurs éléments chimiques dont le principal constituant est un métal, et pour lesquels les caractéristiques sont celles d'un matériau métallique. Les alliages présentent une meilleure résistance à la corrosion que les métaux purs [9]. Les trois grandes catégories d'alliages pour des applications en santé sont les aciers inoxydables, les alliages à base de cobalt et les alliages à base de titane. Le

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

biomatériau le plus utilisé parmi les alliages de titane est le Ti-6Al-4V, un alliage de titane qui contient 6% d'aluminium et 4% de vanadium. L'aluminium permet d'augmenter la résistance mécanique et de diminuer la densité, et le vanadium sert de chélateur pour prévenir la corrosion [10]. Le Ti-6Al-4V est notamment utilisé dans les implants dentaires, les pacemakers, les valves cardiaques artificielles, les vis, etc.

1.1.2 Les polymères

Les biomatériaux polymères ont fait leur apparition dans les années 1950 et occupent la deuxième place du marché des biomatériaux. Les polymères sont des macromolécules composées par l'assemblage répétitif d'un monomère, c'est-à-dire une molécule de faible poids moléculaire. Les polymères sont des matériaux naturellement amorphes, c'est-à-dire que les atomes sont arrangés de manière « aléatoire ». Cependant, il est possible d'obtenir des polymères semi-cristallins en fonction des conditions de synthèse.

Les polymères actuellement utilisés en santé peuvent être biodégradables ou non et classés sous trois catégories. On trouve les polymères d'origine naturelle (latex, cellulose, etc.), les polymères synthétiques (polyéthylène, téflon, etc.) et les polymères semi-synthétiques obtenus par modification des polymères naturels (nitrocellulose, caoutchouc vulcanisé, etc.) [11]. Il existe donc une très grande variété de polymères utilisés. Ils sont cependant tous légers, avec des propriétés élastiques modulables et proches de celles des tissus biologiques. C'est pourquoi on retrouve des polymères dans tous les grands domaines d'application des biomatériaux tels que l'orthopédie, les chirurgies cardiovasculaire et dentaire et l'ophtalmologie [12]. Les polymères sont également prometteurs comme support de la régénération tissulaire. On pourra citer notamment le cas des hydrogels DGL/PEG injectables pour la régénération musculaire [13].

1.1.3 Les céramiques

Les céramiques sont des matériaux fabriqués à partir de minéraux. Tout comme les métaux, les céramiques sont habituellement des matériaux cristallins. L'augmentation de l'utilisation des céramiques comme biomatériaux s'explique par leur biocompatibilité, leur résistance à la corrosion et à la compression, leur faible conductivité thermique et électrique.

Les céramiques peuvent être divisées en deux groupes : les céramiques inertes telles que l'alumine, la zircone et les matériaux à base de carbone ; et les céramiques bioactives comme l'hydroxyapatite (HA), les phosphates tricalciques et les bioverres [14].

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Le graphène peut avoir un comportement métallique notamment du point de vue de la conductivité électrique. Synthétisé à partir des années 2000, il est composé d'une couche monoatomique et bidimensionnelle d'atomes de carbone formant des hexagones. La forte conductivité électrique, la résistance mécanique, la stabilité thermique et sa biocompatibilité font du graphène un matériau intéressant pour une application médicale, mais également pour des techniques d'imagerie [15].

Les céramiques bioactives ont la particularité de promouvoir la régénération osseuse. Dans le tissu osseux, les minéraux sont en effet présents sous forme de cristaux d'apatite. Les HA synthétiques ont une composition chimique et une structure très similaire au HA naturel, ce qui les rend extrêmement biocompatibles [11]. Le HA est donc un biomatériau de choix comme substitut osseux ostéoconducteur. L'utilisation de HA comme support (« scaffold ») pour de la culture tridimensionnelle d'ostéoblastes est en cours d'étude [16].

1.1.4 Les composites

Les composites proviennent de combinaison de deux ou plusieurs matériaux différents dans le but d'obtenir un biomatériau présentant des propriétés mécaniques ou bioactives améliorées comparées aux matériaux seuls. Par exemple, la combinaison de zircone et de HA, favorise les propriétés mécaniques de la zircone et permet une adhésion au tissu osseux grâce à l'HA [17]. Un autre exemple est la combinaison de polymères et de HA pour obtenir un matériau biocompatible, bioactif et présentant des propriétés mécaniques proche de l'os [18].

1.2 Biocompatibilité

Les domaines d'applications des biomatériaux sont très variés. Le Tableau 1**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** résume les différents groupes de biomatériaux et quelques exemples d'applications, en mettant en avant les avantages et inconvénients [5]. Les biomatériaux nécessitent encore d'être développés/améliorés pour répondre aux exigences fonctionnelles et de biocompatibilité.

Les caractéristiques des biomatériaux sont déterminées par la fonction que le biomatériau doit exercer. On peut citer quelques caractéristiques importantes :

- Propriétés mécaniques : résistance à la contrainte, à la déformation, ductilité, élasticité, etc.
- Propriétés physiques : masse volumique, conductivité électrique et thermique, etc.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

- Propriétés chimiques : résistance à la corrosion, résistance à la stérilisation, résistance aux irradiations, biodégradabilité plus ou moins prononcée en fonction de l'application
- Géométrie : texturation de surface ou non
- Facilité d'emploi et mise en œuvre
- Compatibilité avec les autres matériaux
- Biocompatibilité

Tableau 1 : Classes des biomatériaux, caractéristique et application. Adapté de [5].

Matériaux	Avantages	Inconvénients	Applications
Métaux & alliages	- Ductilité - Haute résistance à l'usure et aux chocs - Stables lors de la stérilisation	- Faible résistance à la corrosion dans un environnement physiologique - Bonne conductivité thermique et électrique - Propriétés mécaniques très différentes des tissus biologiques	Agrafes, plaques et fils, prothèses d'articulations, implants dentaires
Polymères	- Facile à produire - Faible densité - Propriétés mécanique proche des tissus biologiques - Fonctionalisable	- Faible résistance mécanique - Facilement dégradable - Interaction avec certains médicaments	Fils de sutures, cathéters, tendons artificiels, scaffold, libération contrôlée de principe actif, implants
Céramiques	- Biocompatibilité élevée - Résistants à la corrosion - Inerte -Faible conductivité thermique et électrique - Stables lors de la stérilisation	- Faible résistance aux chocs - Difficile de reproduire les propriétés - Difficile à fabriquer et transformer	Revêtements, équipements et outils médicaux, cupules de têtes de prothèses fémorales, comblement osseux

La biocompatibilité est ce qui distingue les biomatériaux des autres matériaux. Lorsqu'un biomatériau est introduit ou en contact avec l'hôte, un certain nombre d'interactions peuvent se produire. Chen *et al.* font état de la mesure de la viabilité cellulaire, de la formation de tumeurs, des dommages génétiques, de la réponse immunitaire et de la formation de caillots sanguins comme tests de biocompatibilité [8]. Devant toute cette batterie de tests, la FDA (Food and Drug Administration) résume tout simplement en définissant la biocompatibilité des biomatériaux comme étant des matériaux ne causant aucun préjudice au patient, ce qui est une définition beaucoup plus restrictive.

L'évaluation de la biocompatibilité des biomatériaux et des dispositifs médicaux est très complexe car il faut tenir compte de facteurs variables comme la nature chimique, les propriétés physiques du matériau, la fonction, le site de contact chez l'hôte et la durée de contact. Le guide ISO 10 993 a été créé pour aider les fabricants à évaluer la biocompatibilité des biomatériaux aux différentes phases de développement. D'après les lignes directrices ISO 10 993, Bernard *et al.* ont par exemple proposé un ensemble de tests pour évaluer la biocompatibilité d'un biomatériaux en polymère en fonction des différentes

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

phases du développement [19]. Dans un premier temps, ils évaluent les propriétés physico-chimiques du polymère sous sa forme de granule, puis des tests *in vitro* sont effectués sur le polymère polymérisé. A ce stade, on peut déterminer si le matériau présente une toxicité cellulaire. La capacité du polymère à résister à la stérilisation est également évaluée. Enfin, sur le matériau quasi final, on peut évaluer en plus de la cytotoxicité, la réponse inflammatoire *in vitro* de macrophage et le stress oxydant en présence du matériau. Des tests *in vivo* viennent compléter les tests de biocompatibilité pour prédire au mieux l'impact du biomatériau sur son hôte et vice-versa.

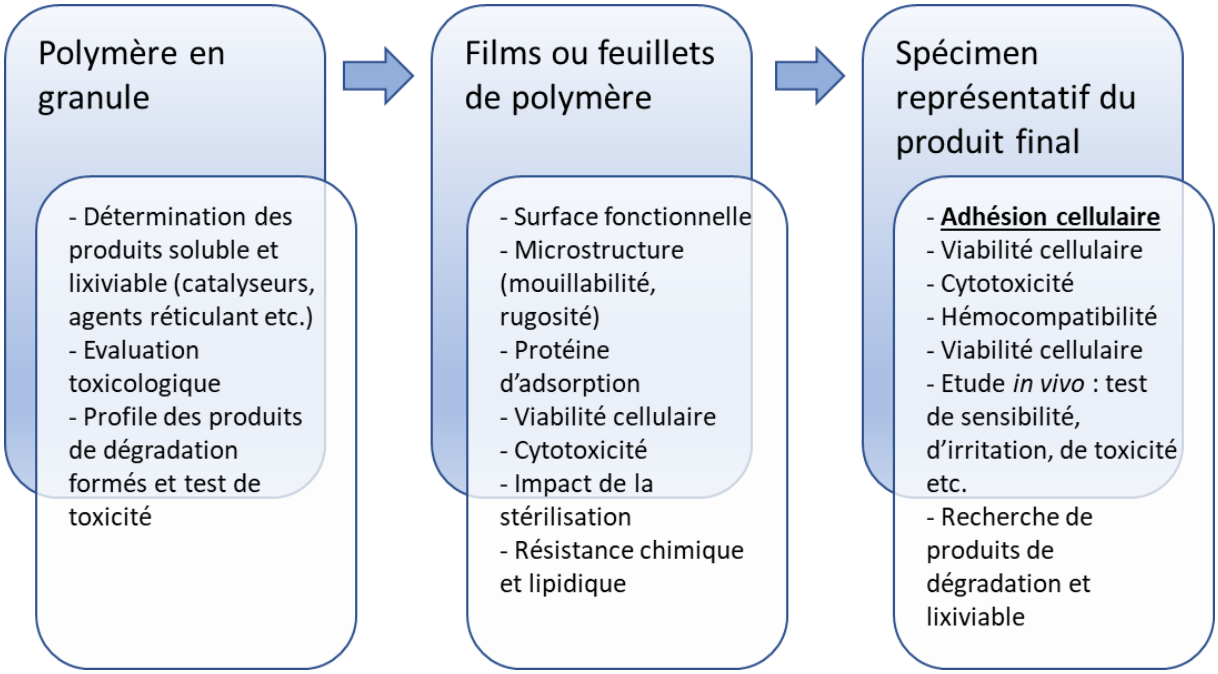


Figure 1 : Exemple de tests de biocompatibilité effectués au cours des différentes phases de développement d'un biomatériau à base de polymères. Adapté de [19].

Même si de nombreux aspects de toxicité sont à évaluer comme la cytotoxicité, la génotoxicité ou la toxicité systémique, la norme ISO 10993 présente néanmoins certaines limites car celle-ci porte essentiellement sur la tolérance du matériau et la biocompatibilité « négative », c'est-à-dire sur la non-toxicité du biomatériau. L'étude du microenvironnement cellulaire et en particulier de la matrice extracellulaire est cependant essentiel pour déterminer si les cellules arrivent à maintenir leur activité une fois le dispositif implanté. Par exemple, la phosphatase alcaline, l'ostéocalcine, le collagène sont des éléments importants de la matrice osseuse et leur expression est un indicateur de la viabilité cellulaire.

Les tests *in vitro* et *in vivo* restent indispensables pour évaluer correctement la cytocompatibilité et la biocompatibilité d'un matériau. Au cours de ces tests, l'adhésion des cellules sur les biomatériaux constitue la première interaction entre l'hôte et le biomatériau. L'adhésion et la morphologie cellulaire sont ainsi des critères d'évaluation de

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

la biocompatibilité très répandus dans la recherche de biomatériaux [20], [21]. L'adhésion et la morphologie cellulaire sont des états dynamiques mettant en jeu un ensemble complexe d'éléments cellulaires. Ces éléments sont succinctement décrits dans la section suivante.

2 Généralités sur la cellule

La cellule est la plus petite unité de vie autonome et fonctionnelle. On distingue deux types de cellules. Les cellules eucaryotes possèdent un matériel génétique compartimenté par une membrane dans un « vrai noyau ». Les cellules eucaryotes peuvent être unicellulaires, comme les levures, mais sont le plus souvent organisées en organismes pluricellulaires (végétaux et animaux). Au contraire, le matériel génétique des cellules procaryotes baigne directement dans le cytoplasme. Les cellules procaryotes sont des organismes unicellulaires comme les bactéries et les archées. On se limitera ici à la description des cellules eucaryotes, qui constituent l'être humain, pour lequel la majeure partie des biomatériaux sont développés.

2.1 Composants d'une cellule eucaryote

Une cellule eucaryote est schématisée en Figure 2. Elle est séparée de l'extérieur par une membrane cytoplasmique. La membrane est composée d'une bicouche de phospholipides contenant de nombreuses protéines permettant à la fois la communication avec son environnement et l'adhésion cellulaire. La cellule contient de nombreux compartiments, appelés organites, indispensables à son bon fonctionnement et à sa reproduction. Les organites sont également individualisés par une membrane phospholipidique. Parmi les organites, le noyau renferme sous forme génétique l'information nécessaire pour maintenir la fonction et la reproduction cellulaire. Cette information génétique est transcrite dans le noyau, puis traduite en protéines dans le cytoplasme avant de subir la maturation structurale dans les organites dédiés : le réticulum endoplasmique rugueux et l'appareil de Golgi. Les autres principaux compartiments sont :

- le réticulum endoplasmique lisse, où sont synthétisés les lipides et constitue le stock de calcium de la cellule ;
- le lysosome, qui permet la dégradation de l'ensemble des molécules biologiques, qu'elles soient d'origine intracellulaire ou extracellulaire ;

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

- la mitochondrie, qui est à la fois les poumons et la centrale énergétique de la cellule. En effet la structure particulière de cette dernière est propice pour constituer une chaîne respiratoire et produire la molécule d'ATP, qui représente l'énergie de la cellule. La mitochondrie joue également un rôle important dans l'apoptose (mort cellulaire programmée).

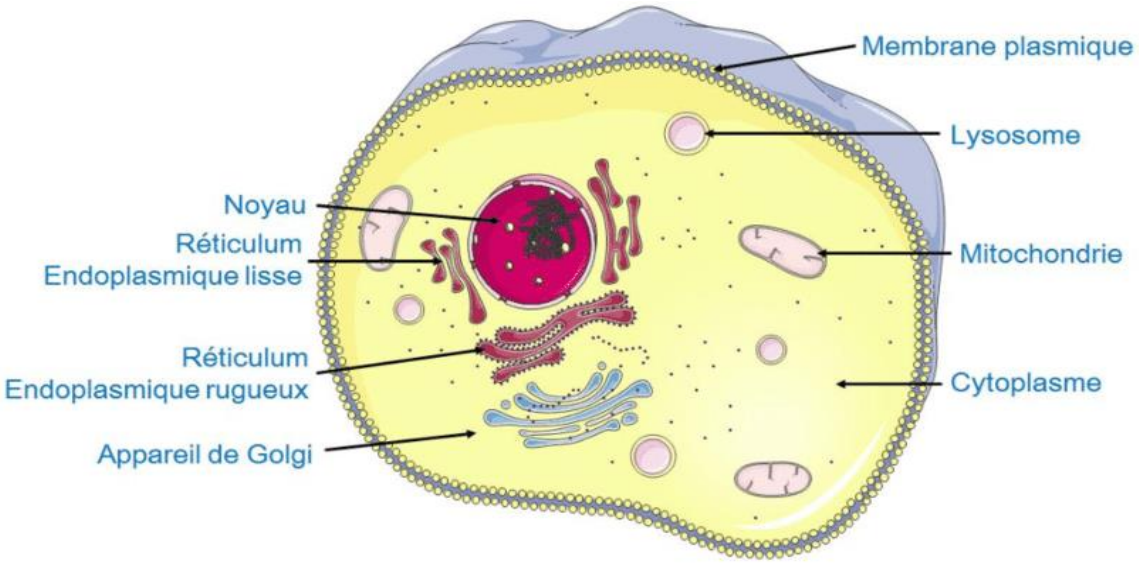


Figure 2 : Schéma général d'une cellule eucaryote avec ses principaux organites. Extrait de [22].

Tous les organites sont contenus dans le cytoplasme de la cellule et baignent dans un gel, nommé cytosol, où ont lieu de nombreuses réactions biochimiques. Tous ces compartiments sont interdépendants et communiquent grâce au cytosquelette. Le cytosquelette est un réseau de trois types majeurs de filaments : les microtubules, les filaments intermédiaires et les filaments d'actine (également appelés microfilaments). Les microtubules assurent l'agencement des organites, le trafic intracellulaire et forment le fuseau mitotique lors de la division cellulaire. Les filaments intermédiaires forment un réseau de maille et renforcent ainsi la solidité mécanique de la cellule. Les filaments d'actine sont responsables de la forme de la surface cellulaire et sont nécessaires pour la motilité cellulaire. Ils jouent également un rôle dans la scission de la cellule lors de la division cellulaire [23], [24], [25]. Dans ce chapitre, nous nous focaliserons sur les filaments d'actine. Les cellules vont synthétiser et sécréter un ensemble de macromolécules qui apportent un support structurel et biochimique aux cellules environnantes. Ces macromolécules sécrétées forment la matrice extracellulaire (MEC), la MEC joue un rôle important dans l'adhésion cellulaire et la communication intercellulaire [26].

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

2.2 La morphologie cellulaire à travers le cytosquelette d'actine

Les filaments d'actine soutiennent la bicouche lipidique conférant à la cellule sa forme et sa force. Les filaments d'actine sont une structure souple composés de deux brins d'hélice d'un diamètre de 5 à 9 nm avec un pas de l'ordre de 37 nm (voir Figure 3). L'unité de base est l'actine globulaire (actine-G), une protéine de 42 kDa et d'environ 5 nm de diamètre [27], l'actine polymérisée en filament est appelé actine fibrillaire (actine-F). Les filaments d'actine présentent une extrémité plus (+) où la polymérisation du filament est plus rapide qu'à l'extrémité moins (-). La polymérisation des microfilaments est régulée par de nombreuses protéines. On peut notamment citer la formiline, qui catalyse l'élongation des filaments, le complexe Arp2/3 impliqué dans l'embranchement des filaments, et le complexe ADF/cofiline responsable de la dissociation du filament [28].

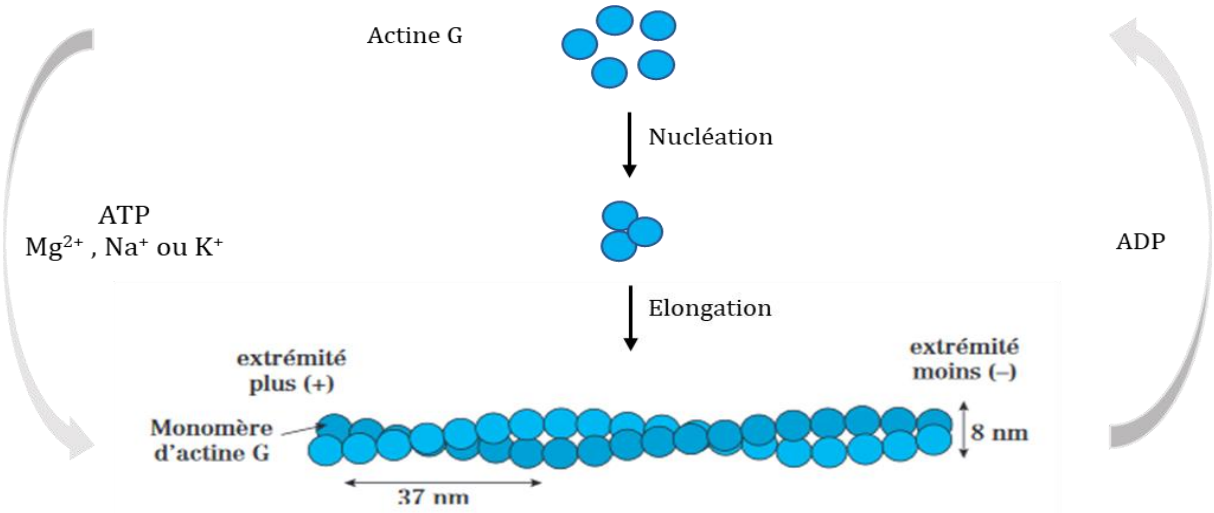


Figure 3 : Schéma simplifié du cycle de l'actine. Les monomères d'actine (actine G) sont dans un premier temps nuclées sous forme de dimère ou trimère puis l'actine G s'assemble pour former les filaments d'actine (actine F). La polymérisation est dépendante de la liaison de l'ATP à l'actine G. Adapté de https://mystidia.com/resume-2-2/ d'après [29].

Le cytosquelette d'actine est impliqué dans de nombreux processus nécessitant la déformation de la membrane cellulaire tels que la motilité cellulaire ou le trafic vésiculaire. Il a également un rôle dans le maintien de la morphologie. Les fonctions du cytosquelette d'actine peuvent être assurées grâce à un agencement particulier des filaments d'actine les uns par rapport aux autres. On dénombre quatre types d'organisation des filaments d'actine :

- Les faisceaux contractiles : les filaments d'actine sont reliés transversalement par un homodimère d'α-actinine. Le sens des extrémités (+) et (-) entre deux filaments d'actine est alors inversé, d'où l'autre appellation de faisceaux antiparallèles. Le faisceau ainsi obtenu est lâche, de sorte à permettre l'insertion du moteur protéique, la myosine II, et générer une contraction.
- Les faisceaux parallèles : les filaments d'actine sont reliés par une protéine nommée fimbrine. Les extrémités (+) et (-) des filaments sont alors alignées dans

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

le même sens. Le faisceau obtenu est serré car la distance entre les filaments est plus réduite : elle est égale à 14 nm pour les faisceaux parallèles contre 30 nm pour les faisceaux contractiles.

- Les réseaux réticulés : les filaments d'actine sont embranchés grâce au complexe Arp2/3. Ils forment un « Y » avec un angle de 70° entre deux filaments.
- Les réseaux dendritiques : les filaments d'actine sont connectés par un homodimère de filamine en formant un « X », avec un angle flexible de 90° entre les deux filaments.

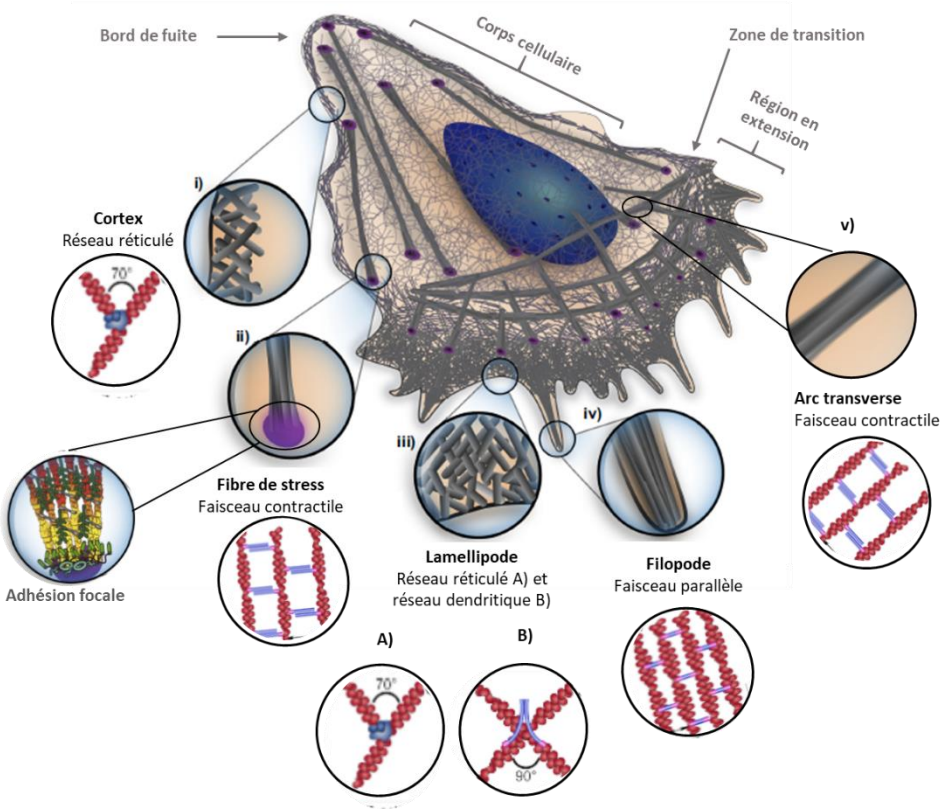


Figure 4 : Représentation schématique des différentes structures de l'actine : i) cortex d'actine contenant des filaments organisés sous forme de réseaux réticulées, ii) fibres de stress d'actine, iii) lamellipodes d'actine présentant deux types d'organisation sous forme de réseaux réticulés A) et sous forme de réseaux dendritiques B), iv) filopodes d'actine avec une organisation de l'actine sous forme de faisceaux parallèles, v) arcs transverses d'actine se présentant sous la forme de faisceaux contractiles. Extrait de [30] *et adapté de* [25] *d'après* [31].

La Figure 4 résume les différentes architectures de l'actine dans la cellule et les structures résultantes. Le maintien de la forme de la cellule repose sur le cortex, les fibres de stress et les arcs transverses. Les filaments d'actine forment un réseau réticulé au niveau du cortex. Les filaments d'actine forment des faisceaux contractiles aux niveaux des arcs transverses et des fibres de stress. Contrairement aux arcs transverses, les fibres de stress présentent un complexe de protéines permettant à la cellule de s'ancrer à son environnement, autrement dit une adhésion focale, à ses extrémités. Les lamellipodes et les filopodes permettent la migration cellulaire [32]. Les lamellipodes sont constitués de

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

réseaux réticulés et dendritiques d'actine en orientant préférentiellement l'extrémité (+) vers le front de migration [33]. Les filopodes sont constitués de faisceaux parallèles d'actine. Ils servent de guide de repère et d'exploration de l'environnement cellulaire [34].

Le cytosquelette d'actine est responsable de la forme et des changements morphologiques que la cellule peut subir à travers les différentes formes que le réseau d'actine peut prendre. Le cytosquelette d'actine a également la particularité de créer un contact avec les zones de la membrane cytoplasmique en contact avec soit une autre cellule soit la matrice extracellulaire (MEC). Les sites d'ancrage de la cellule sur la MEC sont les points focaux d'adhésion. Ces sites peuvent être intéressant pour l'études de l'interaction cellule-biomatériau.

2.3 L'adhésion cellulaire

L'adhésion cellulaire est la capacité d'une cellule individuelle à se fixer à une autre cellule ou à une MEC. L'adhésion est un processus complexe permettant à la cellule d'interagir avec des cellules adjacentes ou de s'accrocher à la MEC. Dans ce travail, on s'intéresse à l'adhésion de la cellule à la MEC. L'adhésion est un processus fondamental permettant à la cellule d'interagir et de communiquer avec son microenvironnement. Cette adhésion permet la transduction de signal activant des voies de signalisation induisant une réponse cellulaire tels que la prolifération, la migration, la différenciation ou l'apoptose [35], [36].

L'adhésion est assurée notamment par des interactions spécifiques entre des récepteurs, les intégrines, et leurs ligands présents dans la MEC. Les intégrines sont une grande famille de protéines transmembranaires hétérodimériques formées par l'association non-covalente des sous-unités α et β. Il existe 18 isoformes sous-unités α et 8 isoformes sous-unités β. On retrouve 24 combinaisons d'hétérodimères αβ d'intégrines dans la nature [37]. Les isoformes de sous-unités α et β exprimés dépendent du type cellulaire [38]. Les sous-unités α et β se dimérisent via leur domaine extracellulaire, tandis que le complexe focal se forme au niveau du domaine intracellulaire de la sous-unité β [39]. Les ligands de la MEC reconnus par les intégrines dépendent des sous-unités α et β s'associant. Par exemple, l'association d'une sous-unité αIIb, αv, α5 ou α8 avec une sous-unité β1 ou β3 permet de reconnaitre une séquence d'acide aminé Arginine-Glycine-acide Aspartique (motif RGD) contenue notamment dans la fibronectine [37]. Le complexe d'adhésion focale (FA) se forme au niveau du domaine intracellulaire de la sous-unité β. Un schéma de ce complexe protéique est représenté Figure 5.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

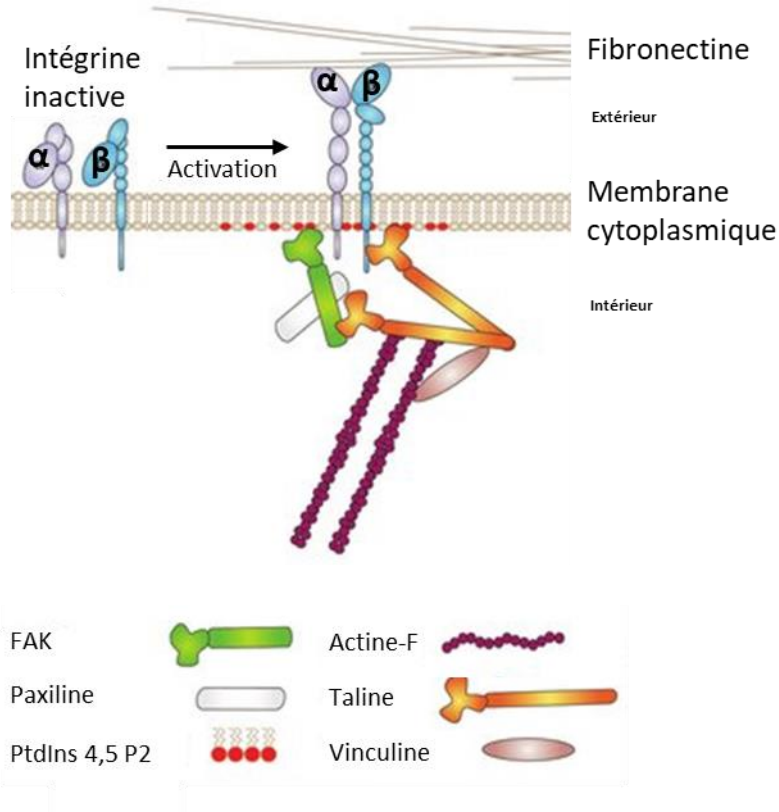


Figure 5 : Schéma simplifié d'un point d'adhésion focale. L'engagement de l'interaction du domaine extracellulaire de l'intégrine avec la fibronectine de la MEC conduit à la génération de phosphatidylinositol-4,5 biphosphate (PtdIns 4,5 P2). S'en suit le recrutement des protéines du complexe d'adhésion focale, ici composé de la « focal adhesion kinase » (FAK), de la paxiline, de la taline et de la vinculine. Le complexe est lié aux filaments d'actine (Actine-F) via la taline et la vinculine. Adapté de [40].

L'ordre de recrutement des protéines du complexe FA fait l'objet de questionnement. C. Lawson *et al.* [35] proposent une hiérarchie d'assemblement du FA tel que suit : l'intégrine est présente dans la membrane cytoplasmique sous une forme repliée dite inactive. Lorsque la MEC contient un ligand de l'intégrine, ici la fibronectine, elle change de conformation pour se lier à son ligand. Cet engagement conduit à la génération de phosphatidylinositon-4,5 biphosphate (PtdIns 4,5 P2), ce qui conduit au recrutement de la FAK et de la paxiline. Ce recrutement génère davantage de PtdIns 4,5 P2. La taline présente sous forme repliée change de conformation et se dimérise en présence PtdIns 4,5 P2 pour se lier d'une part au domaine intracellulaire de la sous-unité β de l'intégrine et de l'autre part à la FAK. Le changement de conformation de la taline permet de mettre en évidence les sites de liaison au filament d'actine et à la vinculine. La vinculine, présente dans le cytoplasme sous une forme repliée, est à son tour activée pour se lier à la taline et au filament d'actine [40]. Bien que la taline présente des sites de liaison au filament d'actine, la vinculine constitue la principale connexion entre le complexe FA et les filaments d'actine [41]. Cette caractéristique de la vinculine en fait un bon candidat pour étudier le FA.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

3 Etudes *in vitro* des interactions cellules-biomatériaux

Les interactions cellule-biomatériau désignées par la suite feront référence à l'adhésion et à la morphologie cellulaire. Les interactions cellule-biomatériau sont très largement étudiées pour déterminer la biocompatibilité des matériaux. Cette interaction dépend d'une part des cellules impliquées, mais aussi de la nature chimique, de la rigidité, des charges, de la mouillabilité et de la géométrie de la surface du matériau.

3.1 Types cellulaires

Le corps humain est constitué de 10^{13}-10^{14} cellules. Les cellules sont différenciées pour remplir une fonction particulière dans l'organisme. Ainsi pour les études *in vitro,* il est important de choisir le bon modèle cellulaire en fonction de la question qui est posée, étant donné que la réponse cellulaire obtenue sera dépendante des conditions expérimentales. Les études cellulaires *in vitro* utilisent soit des cellules dites lignées, soit des cellules primaires. Dans les deux cas, les cellules peuvent être à un stade de différenciation plus ou moins avancé. Pour présenter les différents types de cellules, on va se situer dans un contexte de régénération osseuse.

3.1.1 Cellules primaires

Les cellules primaires sont des cellules isolées à partir d'un tissu animal ou humain. L'utilisation de cellules primaires pour les études *in vitro* est attrayante car leur comportement est plus à même de refléter la réponse *in vivo.* Il est alors plus facile d'appliquer les résultats aux études cliniques et précliniques. Cependant, les cellules ont un nombre de divisions limité et génétiquement programmé. Les cellules primaires ont donc une durée d'utilisation limitée dans le temps. La quantité de cellules isolées est souvent également limitée, d'où la nécessité d'avoir recours à plusieurs donneurs. Un des inconvénients majeurs est en outre la grande variabilité des cellules d'un individu à l'autre, ainsi les résultats obtenus d'un test à l'autre peuvent fortement varier.

Cellules primaires humaines

Le principal avantage des cellules primaires humaines est la conservation de l'espèce pour l'extrapolation des résultats aux études cliniques. Il est ainsi possible de tester des thérapies. Cependant le profil du donneur, notamment l'âge et le sexe, va influencer la réponse cellulaire. On peut citer l'exemple de l'utilisation d'ostéoblastes primaires : pour

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

des donneurs âgés de plus de 60 ans, les cellules prolifèrent et synthétisent moins de collagène de type I que les ostéoblastes provenant de donneurs âgés de moins de 30 ans [42], [43]. Le site de prélèvement des cellules peut également impacter les résultats. Les ostéoblastes isolés à partir de la tête fémorale prolifèrent moins mais sécrètent plus d'ostéocalcine que les cellules issues du fémur distal [44]. Il est donc important de tenir compte de ces paramètres lors de l'interprétation des résultats.

Les inconvénients majeurs restent la faible l'accessibilité de ce type de cellules, ainsi que l'impossibilité de choisir les donneurs.

Cellules primaires animales

Les principaux avantages des cellules primaires murines (*i.e.* de souris) par rapport aux cellules primaires humaines sont l'accessibilité et le choix de la sélection des donneurs. De plus dans le cas des souris, il est possible d'isoler les cellules à partir d'animaux génétiquement modifiés. Les modifications géniques des cellules en culture sont en effet fastidieuses, d'autant que l'efficacité et la stabilité sont difficiles à contrôler.

Tout comme les cellules primaires humaines, l'âge du donneur et le site de prélèvement des cellules influencent le phénotype cellulaire observé. Par exemple, dans les mêmes conditions de culture, la synthèse d'ostéocalcine est 6 fois plus importante quand les cellules proviennent de calvaria de souriceaux âgés de 2-3 jours comparée à des donneurs de 5-6 jours [45].

3.1.2 Lignées cellulaires

La première lignée cellulaire humaine est la lignée HeLa, issue d'un prélèvement de biopsie à l'insu de la patiente Henritta Lacks en 1951. Le chercheur en cancérologie était surpris de la capacité des cellules à proliférer en culture au laboratoire [46]. Les lignées cellulaires ont donc, contrairement aux cellules primaires, la capacité de se diviser indéfiniment. Cette immortalité est le fruit d'une transformation génétique conférant à la cellule une capacité de prolifération permanente par échappement aux mécanismes régulant le nombre de divisions et conduisant à la mort cellulaire. La transformation génétique peut survenir spontanément. Il s'agit dans ce cas de mutations affectant les mécanismes de régulation du cycle cellulaire et conduisant à des cancers (par exemple mutation sur la protéine p53). La transformation peut également être induite par l'utilisation d'un virus porteur d'un gène immortalisant. Ce type de lignée cellulaire est dit « non-cancéreuse ».

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

La population de cellules lignées est homogène et stable même après plusieurs divisions successives. De ce fait, les réponses cellulaires observées sont relativement reproductibles d'un test à l'autre pour un stade de culture assez proche. Cependant, il peut arriver d'observer des dérives lorsque les cellules sont gardées trop longtemps en culture [47].

3.2 Exemples d'études *in vitro* d'interactions cellule-biomatériau

La littérature compte de nombreuses publications sur l'influence de la rigidité, de la topographie, de la chimie ou de la charge de surface du biomatériau sur la réponse adhésive et morphologique de la cellule. Ces études d'interactions cellule-biomatériau sont principalement conduites par microscopie confocale et MEB.

Lotfi *et al.* ont étudié l'impact de la composition chimique et de la charge électrique de films multicouches de polyélectrolytes sur l'adhésion de fibroblastes [48]. Différents couples de polycations et polyanions ont été testés. La Figure 6 reprend uniquement les résultats obtenus pour le couple acide poly-L-glutamique (PGA)/poly-L-lysine (PLL) dont la dernière couche est chargée négativement, et le couple acide hyaluronique (AH)/PLL)-AH dont la dernière couche est l'AH, chargée positivement.

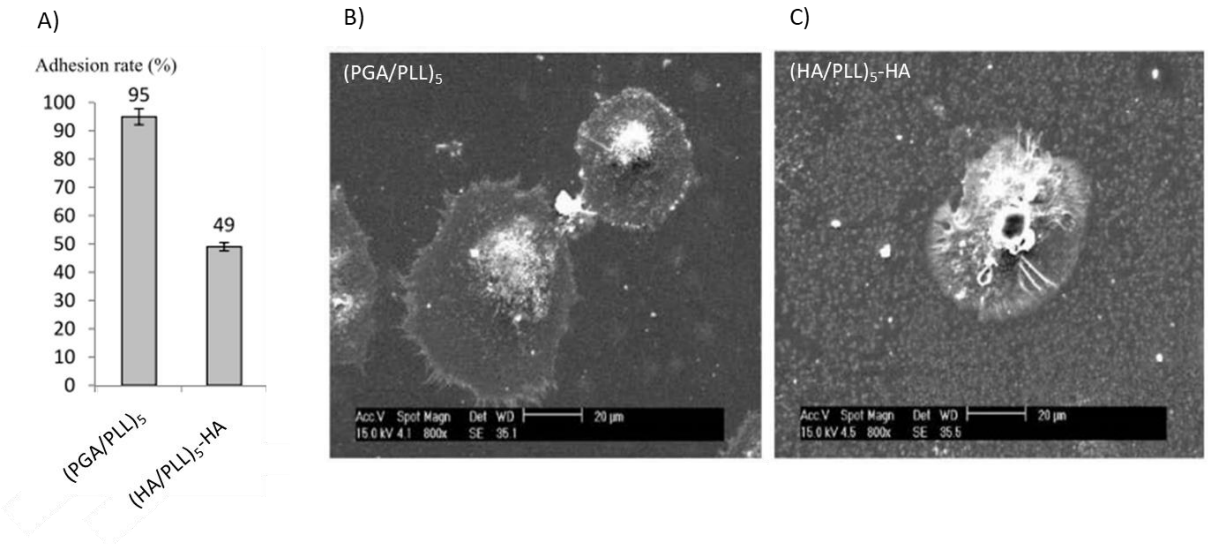


Figure 6 : Influence de la chimie de surface sur les interactions cellule-biomatériau. A) Taux d'adhésion de fibroblastes sur du $(PGA/PLL)_5$ et sur du $(AH/PLL)_5$-AH au bout de 2h après ensemencement. Image MEB sur de l'adhésion et de la morphologie de fibroblastes incubés 24h sur B) du $(PGA/PLL)_5$ et C) du $(AH/PLL)_5$-AH. Adapté de [48].

La Figure 6A montre que les cellules adhèrent mieux sur une surface chargée négativement. La morphologie cellulaire est également différente d'un film à l'autre. En effet, les cellules sont plus étalées sur le film chargé négativement (Figure 6B). Sur celui

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

chargé positivement, la cellule s'étale et la zone contenant le noyau a l'air plus bombée (Figure 6C).

Prager-Khoutorsky *et al.* ont travaillé sur l'influence de la rigidité du matériau sur la polarisation et la morphologie cellulaire de fibroblastes [49]. La morphologie des fibroblastes humains de prépuces (HFF) cultivés a été évaluée après 6 heures d'incubation sur un matériau de polydiméthylsiloxane (PDMS) rigide (2 MPa) ou souple (5 kPa) recouvert de fibronectine.

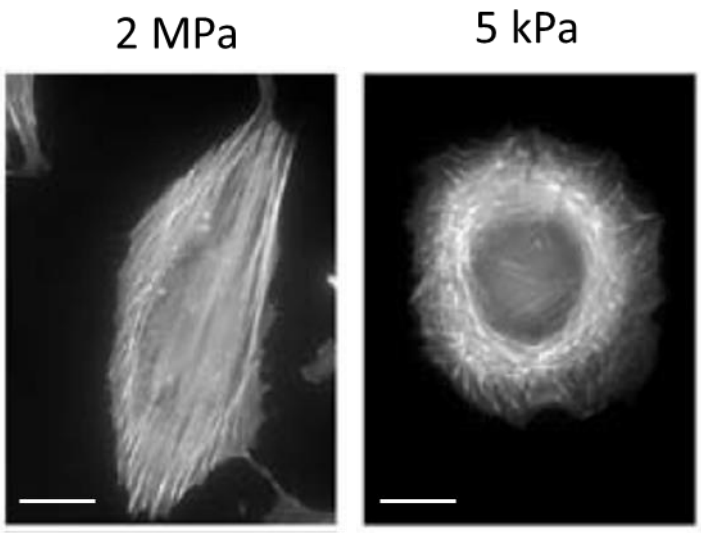


Figure 7 : Image de microscopie confocale sur l'influence de la rigidité du matériau sur la morphologie cellulaire et l'organisation du cytosquelette d'actine. Cellules HFF cultivées sur du PDMS à 2MPa (image de gauche) ou 5 kPa (image de droite), les fibroblastes ont été fixés au bout de 6h d'incubation puis l'actine a été marqué avec de la phalloïdine-TRITC. Barres d'échelle 25 µm. Adapté de [49].

La Figure 7 met en évidence une organisation différente des fibres de stress en fonction de la rigidité du matériau. Les fibres de stress sont longues lorsque le matériau est rigide, alors qu'elles sont très courtes sur le PDMS souple. De plus, la cellule est plutôt circulaire sur le PDMS souple alors qu'elle est allongée sur le PDMS rigide. Bien que la forme de la cellule soit différente, les auteurs indiquent que l'aire de la cellule reste similaire.

Ces dernières années, quelques équipes de recherches comme Gadeggaard *et al.* et Anselme *et al.* se sont intéressées à la relation qui existe entre la réponse morphologique de la cellule au biomatériau et l'expression des gènes. Ces études sont essentiellement menées sur des cellules cultivées sur des biomatériaux présentant une nanotopographie [50], [51]. En effet, la relation entre l'adhésion de la cellule à la MEC et la réponse cellulaire est étroitement liée grâce aux phénomènes de mécano-détection et de mécano-transduction [52], [53].

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

4 Apport des techniques de microscopie pour l'étude des interactions cellules/biomatériaux

Les exemples présentés ci-dessous montrent que les études d'adhésion des cellules sur les biomatériaux et leur réponse morphologique sont essentiellement effectuées par microscopies. Les points focaux d'adhésion et le cytosquelette d'actine sont généralement analysés par microscopie confocale grâce au marquage fluorescent des protéines d'intérêt. La morphologie cellulaire est quant à elle le plus souvent examinée par microscopie électronique à balayage (MEB) en collectant les électrons secondaires pour distinguer la topographie de la surface cellulaire. Le principe de ces techniques est présenté ci-après.

4.1 La microscopie confocale

La microscopie confocale fait partie de la microscopie photonique, c'est-à-dire que l'image est formée grâce à un faisceau de photons éclairant l'échantillon. La microscopie photonique est une technique extrêmement répandue pour l'étude des différents types de matériaux. La principale limite de la microscopie photonique est sa résolution spatiale, qui est dépendante de la longueur d'onde de la lumière et de l'ouverture numérique (ON) (voir équation (1)). L'ouverture numérique représente la capacité d'une lentille objectif à collecter la lumière (voir équation (2)), où n est l'indice de réfraction du milieu et α le demi-angle au sommet du cône de lumière pouvant entrer ou sortir de la lentille. La résolution d'un microscope photonique classique est d'environ 200 nm (avec une ON maximale atteignable de 0,95, un indice de réfraction de 1 en considérant l'air comme milieu). En microscopie confocale, la résolution peut atteindre 100 nm en utilisant de l'huile comme milieu.

$$R = {}^{\lambda}/_{2\mathrm{ON}} \qquad (1) \qquad\qquad ON = n \sin \alpha \qquad (2)$$

De nos jours, la microscopie confocale s'opère sur des microscopes confocaux à balayage laser (MCBL), développés dans les années 80. Le microscope confocal nécessite en effet une source de lumière d'excitation intense et focalisée, d'où l'utilisation de laser comme source lumineuse. La Figure 8 schématise les différents composants d'un MCBL, ainsi que le chemin parcouru par la lumière. Le faisceau du laser d'excitation (en vert) passe à travers un miroir dichroïque puis est envoyé sur des miroirs qui permettent le balayage rapide de l'échantillon. Le laser va alors exciter les marqueurs fluorescents présents dans l'échantillon. Le fluorophore excité va émettre une lumière (en rouge) d'une longueur d'onde supérieure à celle d'excitation. La lumière émise va faire le chemin inverse jusqu'au miroir dichroïque puis parvenir au détecteur (photomultiplicateur) en traversant le diaphragme confocal (pinehole). Le signal électrique émis par le photomultiplicateur est

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

amplifié et envoyé à l'ordinateur. Une image va pouvoir être construite point par point sur le moniteur.

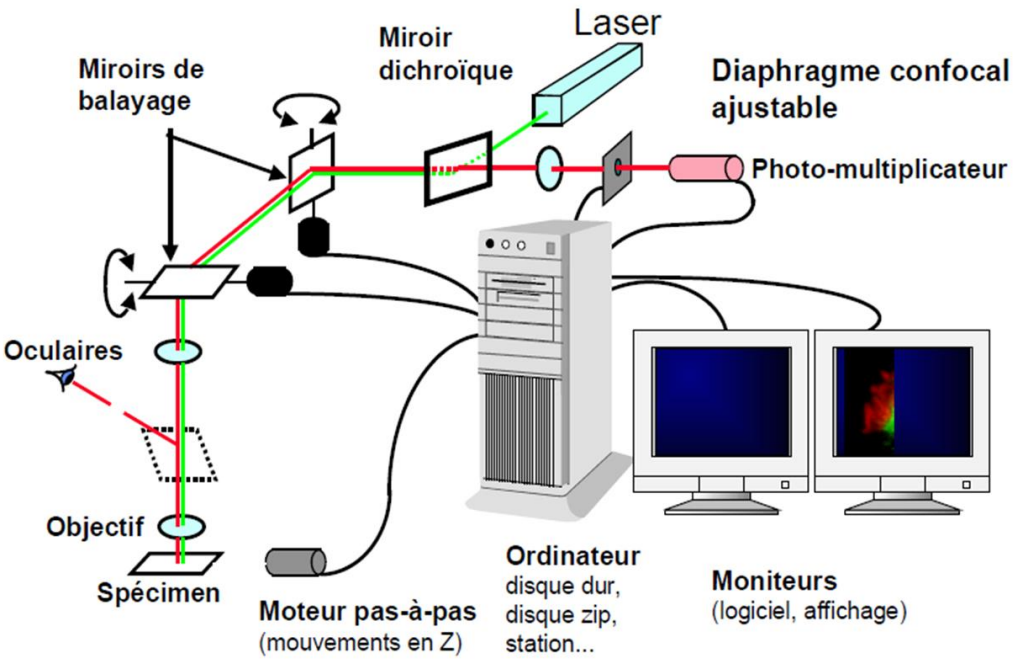


Figure 8 : Schéma d'un microscope confocal à balayage laser, extrait du guide d'utilisation du LSM-800 de Zeiss.

Le diaphragme confocal joue un rôle très important, car il contrôle la résolution spatiale. En effet, l'épaisseur de la coupe optique est proportionnelle au diamètre d'ouverture du diaphragme, les signaux émanant des plans hors focus sont éliminés.

La microscopie confocale permet d'étudier des échantillons hydratés, fixés ou encore vivants. La préparation des cellules fixées est relativement simple mais nécessite une optimisation des conditions de marquage fluorescent. La préparation des cellules vivantes pour l'imagerie requiert la transfection ou la transduction des cellules avec un gène de la protéine d'intérêt couplé à un fluorophore (par exemple la protéine fluorescente verte (GFP), ou la protéine fluorescente jaune (YFP), etc.) [54]. Cette opération peut être transitoire ou permanente.

Les applications de la MCBL sont très nombreuses en biologie. La microscopie confocale peut également être utilisée en sciences des matériaux pour caractériser des matériaux. La MCBL est largement utilisée pour l'étude interactions cellule-biomatériau au cours du développement de biomatériaux. Par exemple, la Figure 9 montre l'étude de l'influence sur l'adhésion cellulaire de la concentration de NaOH utilisée pour neutraliser des films de chitosane. Les points focaux d'adhésion, flèches jaune et blanche Figure 9(a) & Figure 9(b), sont révélés par la présence de vinculine (vert) et l'étalement cellulaire mise en évidence par le marquage de l'actine (rouge). Les cellules cultivées sur une lame de verre ou un film

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

de chitosane neutralisé pendant 10 minutes avec 0,1M de NaOH présentent à la fois des fibres de stress (rouge) et des points focaux d'adhésion (vert). Les images Figure 9(c) et Figure 9(d) montrent une inhibition des fibres de stress et des points focaux d'adhésion pour des concentrations élevées en NaOH.

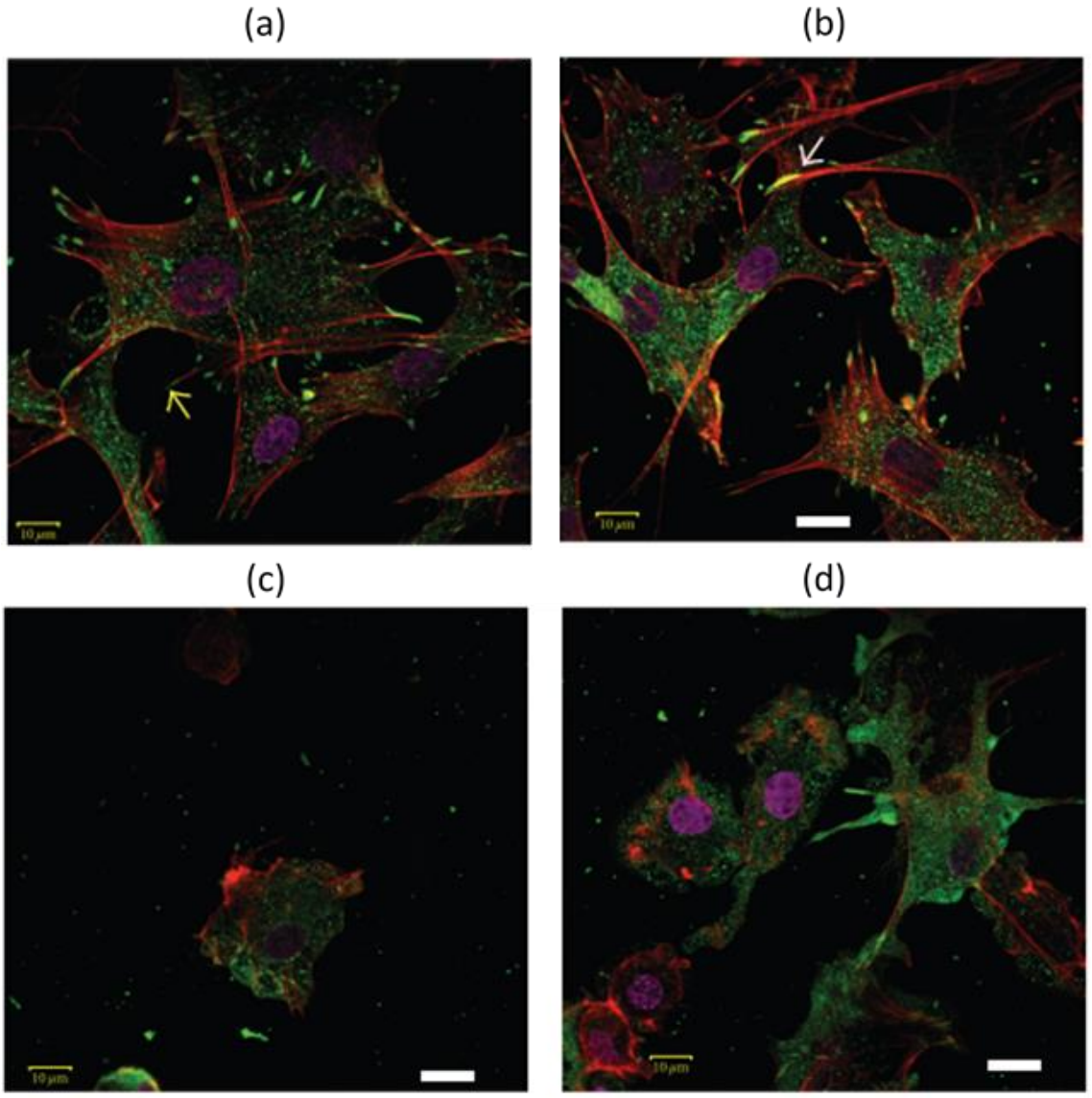


Figure 9 : Visualisation de la distribution d'actine (rouge) et de vinculine (vert) par microscopie confocale, les noyaux sont marqués en violet. Des chondrocytes primaires de veau ont été cultivés 2h sur (a) une lame de verre, (b) un film de chitosane neutralisé avec 0,1M NaOH pendant 10 minutes, (c) un film de chitosane neutralisé avec 0,25M NaOH pendant 10 minutes, (d) un film de chitosane neutralisé avec 0,5M NaOH pendant 10 minutes. La flèche jaune indique un point focal d'adhésion mis en évidence par le marquage vinculine, la flèche blanche indique une colocalisation de l'actine et de la vinculine. Barre d'échelle : 10 µm. Adapté de [55].

Une des particularités du microscope confocal est de fournir la possibilité d'effectuer des analyses en 3D grâce à l'acquisition d'images en série, appelées Z-stack. Les images de la série correspondent à différents plans dans l'échantillon. L'étude de la morphologie cellulaire en 3D offre des perspectives intéressantes pour étudier les interactions entre cellule et biomatériau. La Figure 10 représente la reconstruction 3D d'images acquises en

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Z-stack grâce au marquage du cytosquelette d'actine de cellules MG-63 cultivées sur du titane. Les cellules sont très fines, avec une forme allongée assez conforme à la morphologie de cellules cultivées sur un matériau rigide (voir Figure 7).

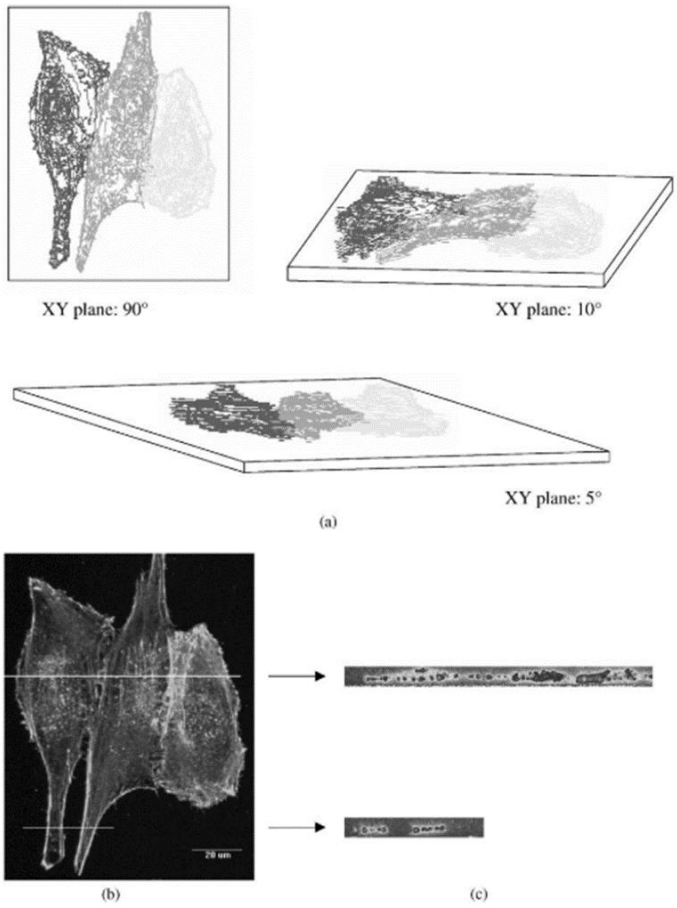


Figure 10 : Exemple d'application de reconstruction 3D de Z-stack acquis avec un MCBL. (a) Reconstruction 3D d'ostéoblastes MG-63 obtenu à partir d'une série de sections optiques. Les cellules ont été cultivées 4 jours sur du titane. (b) images 2D d'ostéoblastes marqués avec de la phalloïdine-FITC. (c) images 2D perpendiculaire au plan de section du stack. Adapté de [56].

Bien que les avancées technologiques aient permis d'améliorer la résolution spatiale en microscopie confocale, la longueur d'onde de la lumière, les lentilles optiques et la profondeur de champs restent des facteurs limitants pour atteindre la résolution atteinte en microscopie électronique.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

4.2 La microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique utilise le rayonnement électronique comme source pour former une image. Les électrons possèdent une longueur d'onde bien inférieure à celles des photons visibles. Ceci permet ainsi d'atteindre une meilleure résolution que la microscopie photonique.

L'imagerie classique en MEB permet d'étudier la surface des échantillons dits massifs sous un vide poussé. La préparation de l'échantillon dépend de sa nature et de ce que l'on cherche à mettre en évidence.

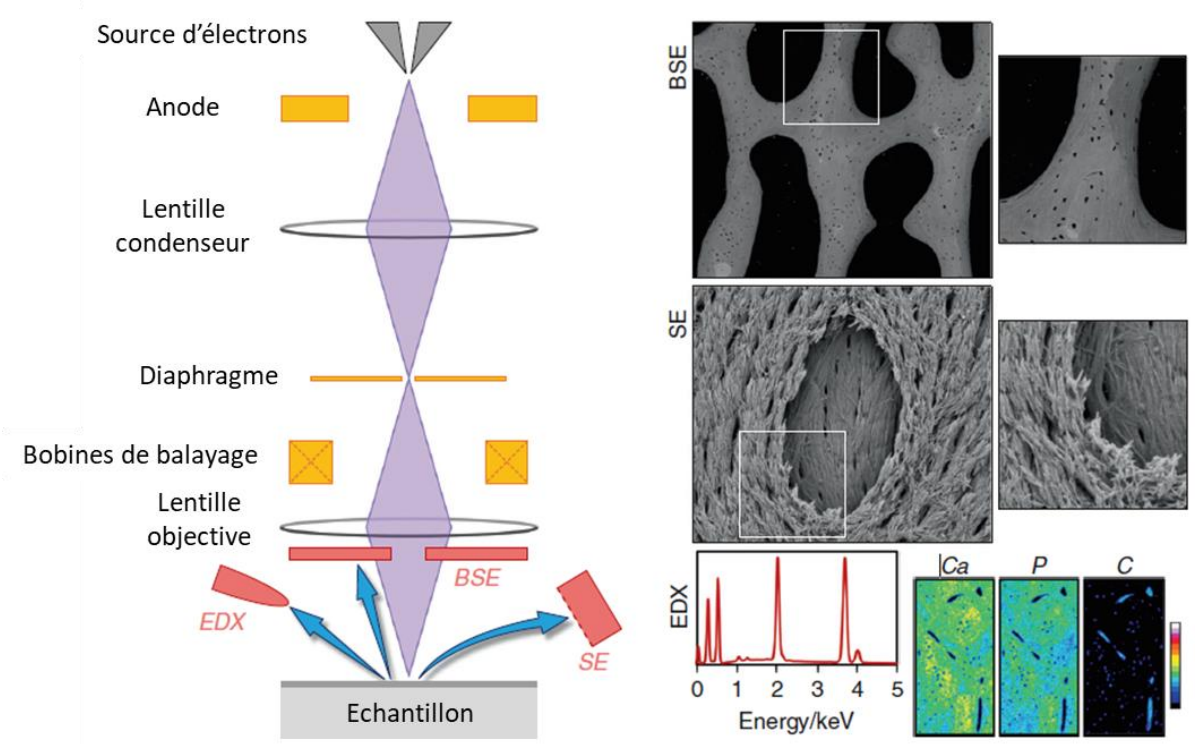


Figure 11 : Schéma d'un MEB avec les différents signaux types détectés produits par l'interaction électrons-matière de l'os : les électrons secondaires (SE), les électrons rétrodiffusés (BSE), les rayons-X (EDX). Adapté de [57].

La Figure 11 schématise le fonctionnement d'un MEB ainsi qu'un exemple d'application à l'observation de l'os. Brièvement, les électrons émis par une source forment un faisceau qui va passer au travers de différentes lentilles et d'un diaphragme, de manière à être focalisé en un point sur la surface de l'échantillon. Des bobines de balayage permettent de déplacer ce point sur la surface, ce qui permet alors de former l'image point par point. L'interaction des électrons incidents avec l'échantillon génère différents types de signaux en collectant des séquences d'intérêt tels que :

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

- Les électrons secondaires, qui donnent l'idée de la topographie de l'échantillon. Ce signal est indépendant du numéro atomique de l'échantillon.
- Les électrons rétrodiffusés, qui dépendent du numéro atomique de l'échantillon. Ce signal donne donc une indication sur la chimie de l'échantillon (surtout si l'échantillon est plan).
- Les rayons X émis par l'échantillon sont exploités pour faire de la spectroscopie EDX pour analyser la composition chimique de l'échantillon.

Il existe d'autres signaux générés par l'interaction électron-matière tels que les électrons Auger qui ne sont pas présentés sur ce schéma. La détection des électrons Auger nécessite cependant un fonctionnement sous ultravide, ce qui n'est pas le cas dans les MEB conventionnels.

L'étude de cellules biologiques requiert une fixation car les cellules sont sensibles au faisceau d'électrons. Il est également nécessaire de les déshydrater, pour résister au vide poussé requis pour l'imagerie, ce qui peut générer des artéfacts morphologiques [58]. La métallisation est possible pour prévenir les effets de charge, au risque de masquer certains détails de surface de la cellule. La Figure 12 est une réplique platine d'une cellule HeLa avec une partie du cytosquelette apparent, ça représente un exemple d'application de l'imagerie MEB.

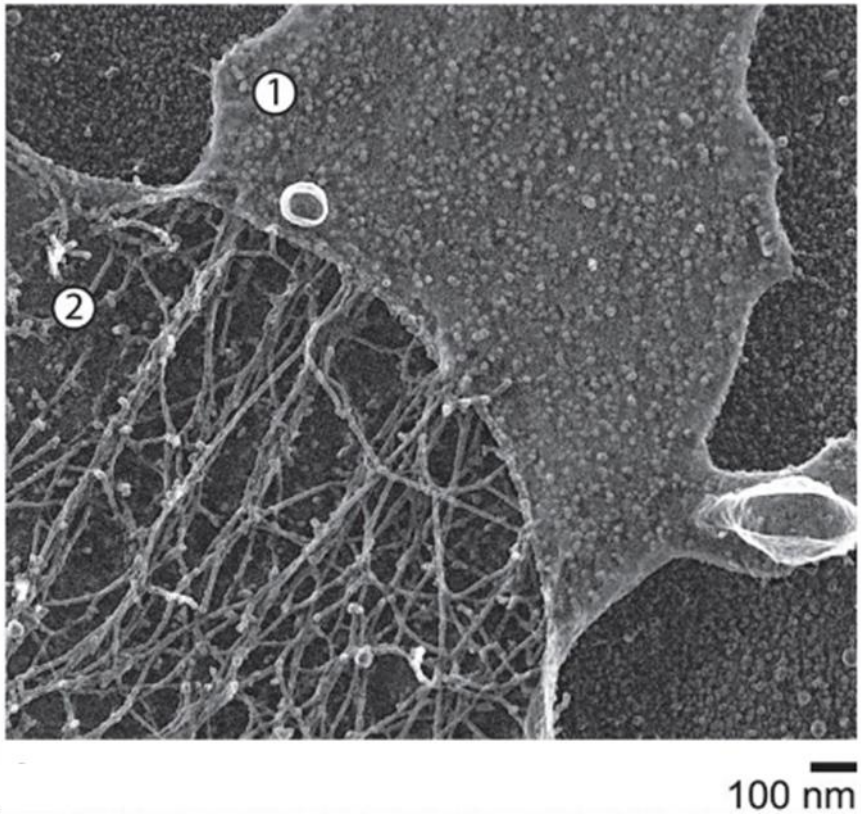


Figure 12 : Micrographie électronique réplique de platine. Vue d'une cellule HeLa avec la bicouche lipidique partiellement manquante montrant (1) la surface extérieure de la membrane plasmique et (2) la surface interne de la membrane plasmique. Adapté de [59].

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Lück *et al.* ont mené une étude 3D en MEB du réseau de filaments intermédiaires (FI). Les images ont été acquises avec un MEB Hitachi S-5200 in-lens opérant avec une tension d'accélération de 5 kV. Les échantillons ont été montés sur un porte échantillon pré-incliné à 35°, pour pallier la limite d'inclinaison à 40° du portoir MEB. Les électrons secondaires ont été collectés avec un échantillon incliné de +60° à +0° pour une rotation 0° et de 180° du portoir MEB. Ceci leur a permis d'obtenir une série d'images en électrons secondaires avec des angles d'inclinaison de -60° à + 60° [60]. Les tomogrammes MEB ont été reconstruits par rétroprojection pondéré avec le logiciel IMOD. La Figure 13 montre des images de la progression de la reconstruction du modèle 3D du réseau de FI.

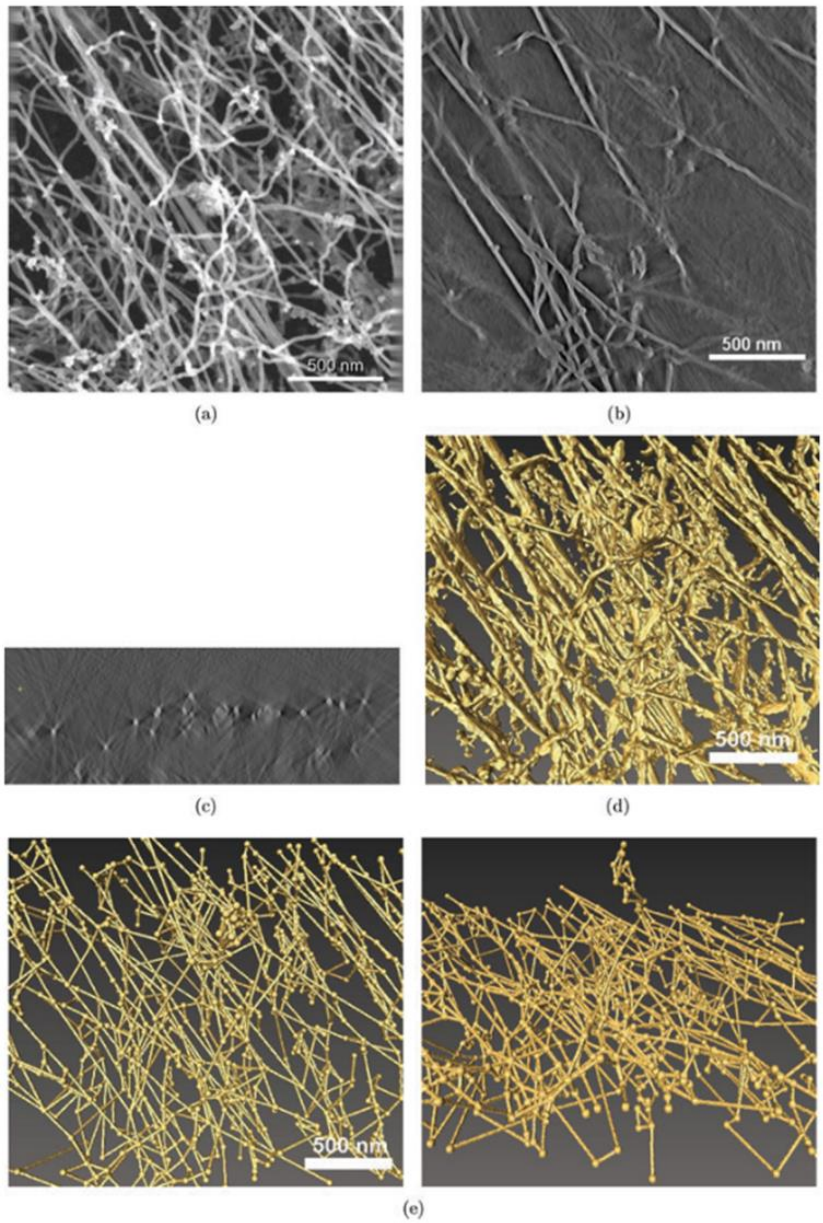


Figure 13 : Réseau de FI obtenu après extraction de la membrane plasmique de cellule Panc1, visualisé un grandissement de 50 000. Les filaments en profondeur sont clairement visibles avec un bon contraste sur le tomogramme. Le graphe extrait du tomogramme expose de manière fidèle la structure 3D. (a) Image MEB en électrons secondaires à 0° d'inclinaison. (b) Coupe horizontale à travers le tomogramme MEB. (c) Coupe verticale à travers le tomogramme MEB. (d) Tomogramme après binarisation (vue de haut). (e) Modèle du réseau extrait du tomogramme vue de dessus (gauche), vue après rotation de 40° autour de l'axe central (droite). Extrait de [60].

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Le vide poussé, nécessaire dans la colonne et dans la chambre de l'échantillon, limite l'utilisation du MEB pour les échantillons aqueux ou hydratés (comme les cellules). Différentes solutions techniques ont été proposées pour pallier à ce problème. Par exemple, un microscope électronique, airSEM, a été conçu pour étudier des échantillons biologiques dans des conditions ambiantes, grâce à une membrane isolant la colonne électronique de l'extérieur [61], [62]. Des chambres liquides scellées sont également disponibles sur le marché pour conserver à la fois l'hydratation et une certaine pression. Dans ce cas, l'échantillon est également isolé du vide par une membrane. Nous présentons ci-après le principe de la microscopie électronique « environnementale », qui permet l'étude d'échantillon en milieu liquide sans encapsulation par des membranes, grâce à un fonctionnement particulier.

4.2.1 MEB environnementale (MEBE)

Le mode environnemental est possible grâce à un système de pompage différentiel, qui permet d'obtenir différents niveaux de vide dans la colonne électronique (voir Figure 14A). Le canon est maintenu sous haut vide, alors que la pression de gaz dans la chambre accueillant l'échantillon peut atteindre plusieurs centaines de Pa. Le gaz sert d'amplificateur du signal d'électrons secondaires, comme schématisé en Figure 14B. En effet, les électrons secondaires émis par l'échantillon et attirés par le détecteur peuvent ioniser les molécules de gaz se trouvant sur leur chemin. Les électrons ainsi créés sont également attirés vers le détecteur, tandis que les cations sont attirés par la surface de l'échantillon et servent à neutraliser sa charge.

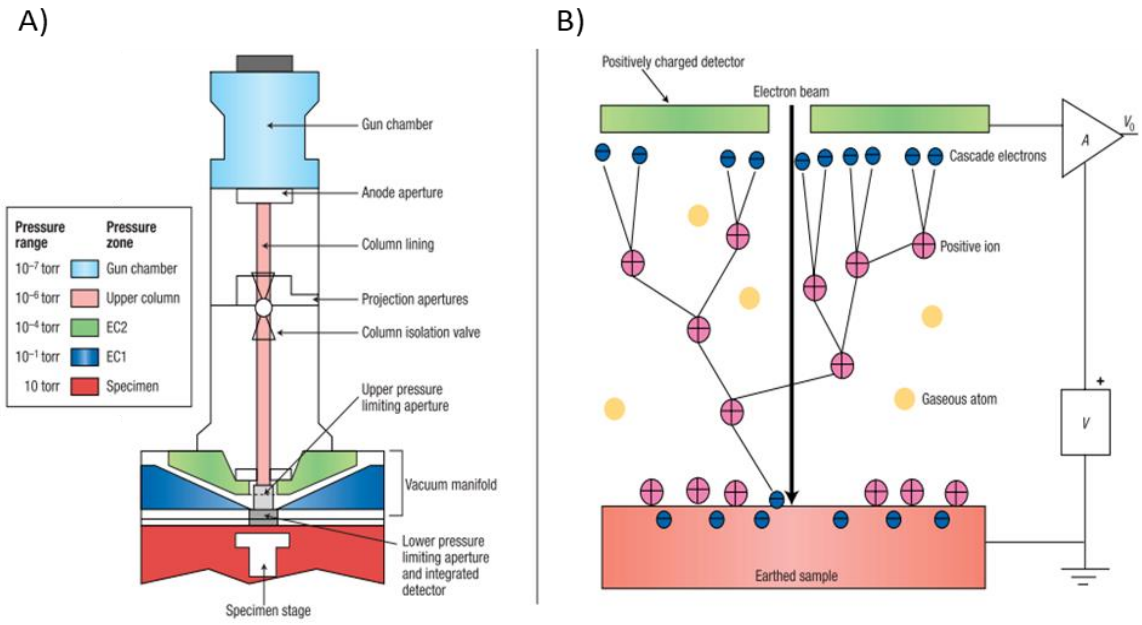


Figure 14 : Schéma d'un MEBE avec A) les différentes zones de pression dans la colonne et B) la cascade d'amplification d'électrons. Extrait de [63].

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Différents gaz peuvent être injectés pour casser en vide dans la chambre. Pour les échantillons biologiques, on privilégie la vapeur d'eau. En effet, l'hydratation de l'échantillon peut être maintenue en maintenant l'équilibre liquide-vapeur de l'eau. Ceci est obtenu en ajustant la pression de vapeur d'eau et la température de l'échantillon d'après le diagramme de phase de l'eau, voir Figure 15. Le contrôle de la température de l'échantillon est assuré par une platine Peltier. Il est en outre possible de condenser ou évaporer de l'eau sur l'échantillon en modifiant la pression de vapeur d'eau dans la chambre.

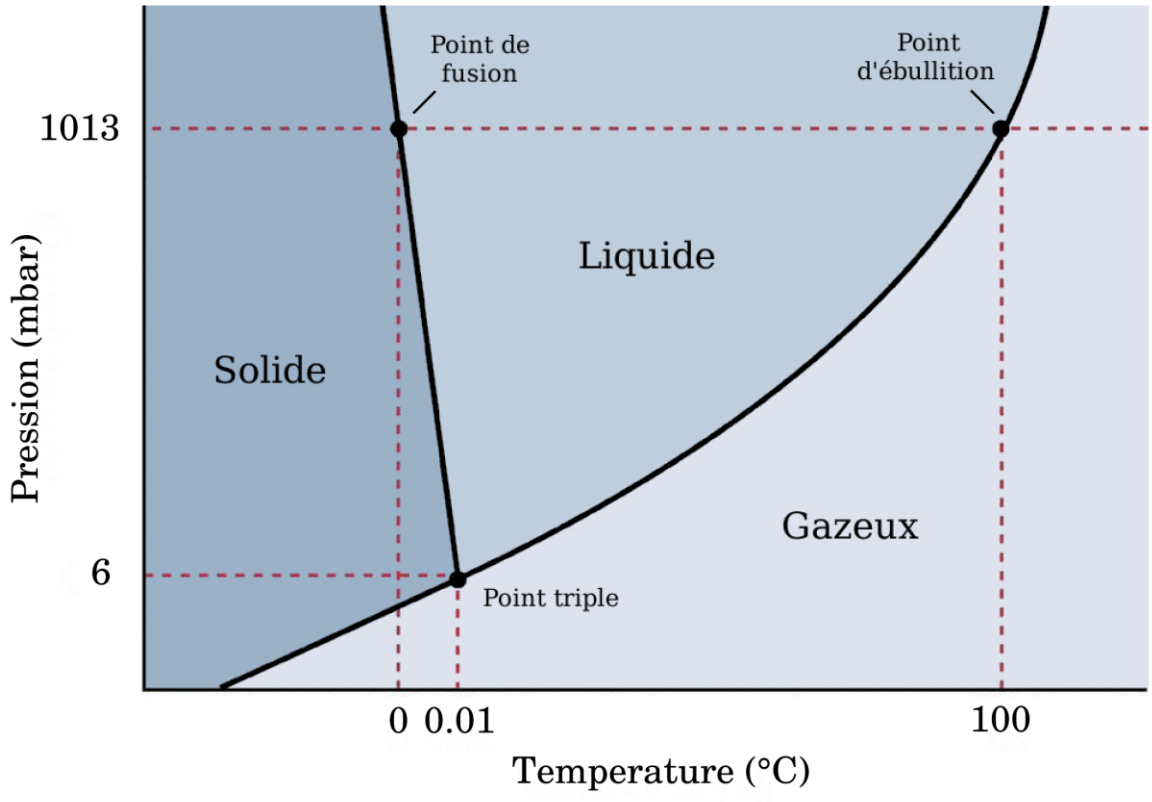


Figure 15 : Diagramme de phase de l'eau [64].

La Figure 16 donne un exemple d'images obtenues sur des cellules ostéoblastes humains primaires (HOB) cultivées sur du titane [58]. Les images ont été acquises en collectant les électrons secondaires en mode haut vide (Figure 16a et b) ou en collectant les électrons secondaires en mode environnemental (Figure 16c et d) Ces images montrent la variation des bords de la cellule (différentes flèches sur les images a à d), ainsi que la différence surfacique de la membrane cellulaire en fonction de son hydratation. On voit que la déshydratation crée bien des artefacts morphologiques.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

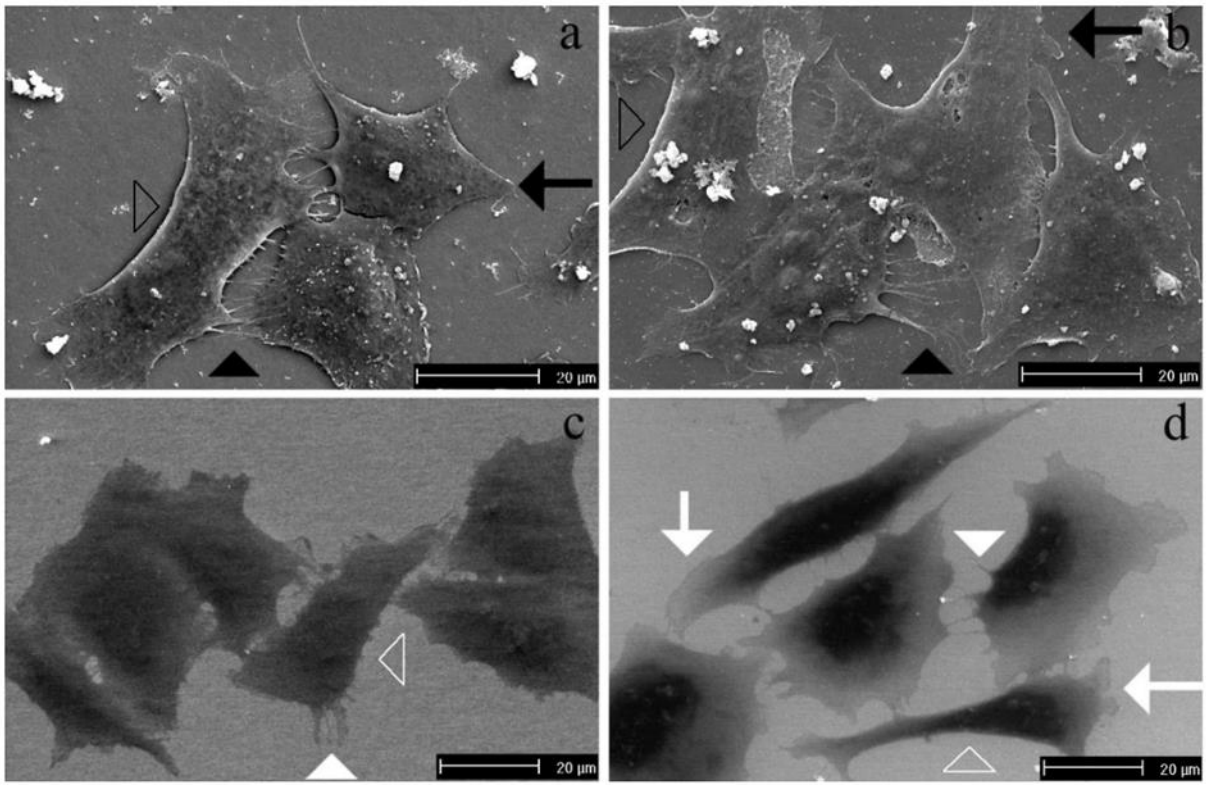


Figure 16 : Comparaison de la morphologie de cellule déshydratées et hydratées. a,b) Images MEB haut vide de cellules HOB cultivées sur du titane puis déshydratées; c,d) Images MEBE d'échantillons équivalents mais toujours hydratés. Les échantillons ont été fixés après a,c) 90 minutes and b,d) 6 heures (barre d'échelle = 20 µm). Extrait de [58]

Bien que le mode environnemental permette d'étudier des échantillons en limitant les dommages causés par la déshydratation, ce mode possède quelques inconvénients, tels que la perte de résolution liée à l'interaction des électrons incidents avec les molécules de vapeur d'eau. Ce phénomène s'appelle le « skirt effect » et augmente avec la pression en vapeur d'eau. Dans le cas d'étude des interactions cellules-biomatériaux, le MEBE présente en outre un inconvénient majeur : les électrons secondaires donnent des informations uniquement surfaciques. Pour l'étude d'adhésion des cellules sur le biomatériau, les sites d'ancrage se situent à l'interface entre la cellule et le biomatériau et ne sont donc pas accessibles. La collecte des électrons transmis serait *a priori* plus pertinente pour permettre l'analyse des sites d'ancrage.

4.2.2 La microscopie électronique à balayage en mode transmission et liquide (MEBT-liquide ou Wet-STEM en anglais)

La MEBT-liquide a été développée pour caractériser des suspensions de nano-objets non seulement maintenus, mais également immergés dans un liquide [65]. En MEBT-liquide, l'acquisition de l'image est basée sur la collecte des électrons transmis (champ clair, mode BF) ou diffusés (champ sombre, mode DF). Dans les deux cas, la collecte des électrons se fait grâce à un détecteur placé sous l'échantillon. Le contraste obtenu en mode

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

DF est de type masse-épaisseur : plus l'échantillon est épais - ou dense - ou contient des éléments de numéro atomique élevés, plus les électrons sont diffusés et l'échantillon paraît clair. Le contraste en mode BF est inversé.

Le MEBT-liquide est possible grâce à un porte échantillon spécialement conçu. Le premier prototype a été conçu au laboratoire MATEIS. Il est schématisé en Figure 17.

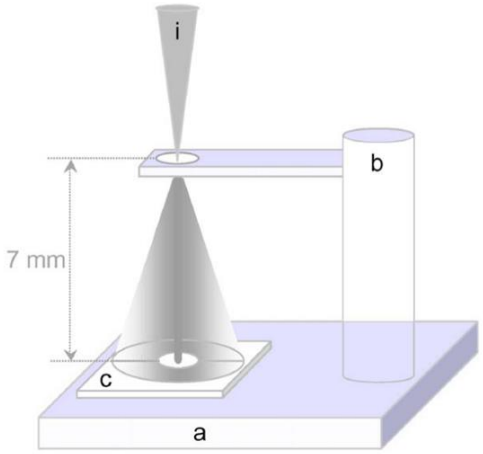


Figure 17 : Schéma du portoir MEBT-liquide conçu pour l'imagerie en mode champ sombre annulaire. (a) Platine Peltier, (b) porte échantillon de la grille MET avec la goutte de suspension, (c) positionné sous l'échantillon et (i) le faisceau d'électrons incidents. Adapté de [65].

Bien que la tension d'accélération soit relativement faible dans un MEB (la valeur maximale est de 30kV), une quantité suffisante d'électrons parvient à traverser un échantillon de quelques µm d'épaisseur. Ce mode d'imagerie MEBT-liquide a été appliqué à de nombreux échantillons en suspension tels que les nanoparticules d'or, le latex, du polystyrène voir Figure 18, etc. Acquises en mode DF, les images des différents échantillons présentaient une bonne résolution et un bon contraste sans préparation particulière des spécimens. Des images de bactéries vivantes en suspension dans l'eau ont également été obtenues. Dans ce cas, les dégâts d'irradiation étaient tels que les images devaient être acquises dès le premier balayage [66].

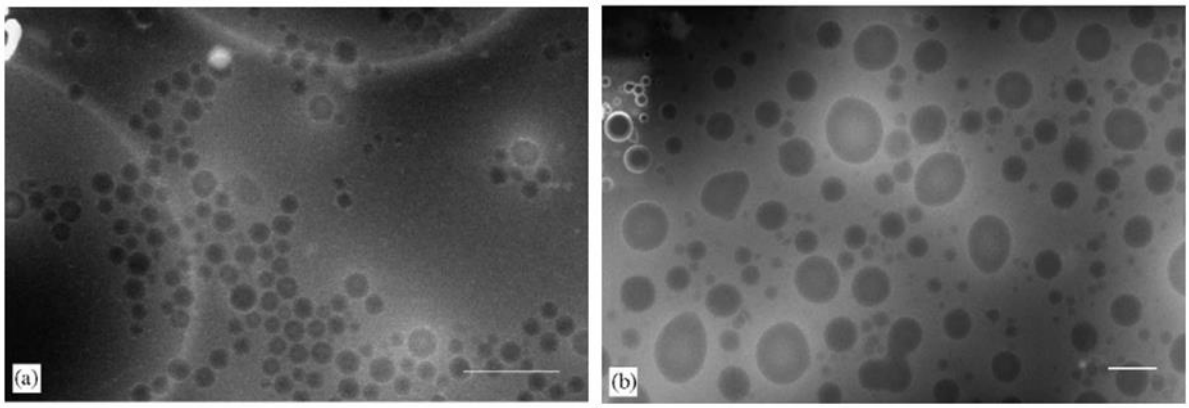


Figure 18 : MEBT-liquide images à 30 kV et en mode champ sombre annulaire (ADF) d'une mini-émulsions aqueuse (a) styrène dans de l'eau, (b) polystyrène-styrène dans de l'eau. Les grands cercles de plusieurs mm de diamètre sont les trous de la couche de carbone de la grille MET. Barre d'échelle 1 mm. Adapté de [65].

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Le portoir a été amélioré de sorte à pouvoir incliner l'échantillon permettant des études 3D d'échantillons hydratés proche de leur état naturel [67]. Durant sa thèse, J. Xiao a en outre montré qu'il était possible d'étudier des suspensions de latex et de tensioactif dans l'eau [68].

5 Positionnement de la thèse

L'adhésion des cellules sur le biomatériau et la morphologie qu'elles adoptent sont les premiers paramètres permettant d'évaluer la biocompatibilité d'un biomatériau. Les études publiées analysant l'adhésion des cellules sur le biomatériau, à savoir la position des points focaux, sont menées en microscopie confocale. La microscopie confocale permet de visualiser les sites d'ancrage grâce au marquage fluorescent des protéines impliquées dans le complexe d'adhésion focale comme la vinculine et de l'actine. La plupart des études publiées sur l'adhésion cellulaire sur les biomatériaux sont effectuées par MEB. D'un point de vue biologique, ces études mettent davantage en évidence la morphologie cellulaire que l'adhésion à proprement parler. Le MEB est une technique de choix car il offre d'une part une meilleure résolution que la microscopie confocale, d'autre part il permet de visualiser à la fois la cellule et le biomatériau. Cependant, le MEB requiert la déshydratation des cellules, en plus de la fixation, pour permettre d'analyser sous vide. Or, la déshydratation des cellules peut induire artéfacts morphologiques.

Le développement du mode environnemental en MEB permet d'analyser des échantillons hydratés. De plus, différents modes d'imageries sont devenus accessibles selon le type de signal utilisé pour former l'image. Il est possible de collecter les électrons secondaires, les électrons transmis ou les électrons diffusés. L'amélioration du portoir MEBT permet en plus de faire des analyses 3D en mode transmission. Quelques études rapportent l'observation brève de cellules vivantes en MEBT [69], [70].

Dans ce contexte, cette thèse vise à élaborer un protocole permettant l'étude de l'adhésion et de la morphologie cellulaire dans les cas de cellules eucaryotes cultivées sur des biomatériaux, après fixation cellulaire. Les deux techniques de microscopie étant complémentaires, nous utiliserons à la fois la microscopie confocale et la MEB sur un même échantillon. La microscopie confocale sert de référence pour l'analyse de l'adhésion focale, ainsi une méthode de quantification des sites d'ancrage sera proposée, grâce à un marquage de la vinculine, avec le logiciel Fiji. La MEB sous les différents modes d'imageries : MEB et MEBE permet une analyse morphologique des cellules et la visualisation du couple cellule-biomatériau. En MEB, l'analyse morphologique en 2D sera effectuée avec le logiciel Fiji, l'analyse 3D sur une rotation de 360° du couple-biomatériau

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

sera explorée avec le logiciel Meshroom. L'étude morphologique des cellules hydratées sera conduite en MEBE et MEBT-liquide.

Le protocole ainsi développé sera appliqué dans le cadre du développement d'un substitut osseux ostéoconducteur sur un couple pré-ostéblastes/hydroxyapatite.

Enfin, le MEBE offre la possibilité d'étudier des échantillons hydratés. Une partie de la thèse sera dédiée à l'évaluation quantitative de la compatibilité des conditions expérimentales utilisées en MEBE avec l'observation des cellules dans leur état natif non encapsulées. Deux conditions expérimentales limitantes ont été détectées en amont qui sont la température et la dose d'électrons [71]. L'évaluation portera principalement sur l'effet de la température et du milieu environnant (milieu de culture ou tampons) sur l'état des cellules, et sur la corrélation entre les paramètres d'acquisition des images et la qualité des images pour limiter la dose d'électrons reçue par la cellule.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Dans ce chapitre, nous présentons les biomatériaux et les méthodes de préparation utilisées. Nous donnerons également les informations relatives aux cellules choisies ainsi que les conditions de culture correspondantes. Nous listons ensuite toutes les techniques utilisées, que ce soit en microscopie (confocale et électronique) ou en biologie, pour l'évaluation de la viabilité cellulaire et de la minéralisation osseuse.

1 Choix biomatériaux

Le biomatériau le plus utilisé dans les dispositifs médicaux implantables est le Ti-6Al-4V. Les analyses en microscopie électronique pour les alliages de titane sont plus faciles vu leur excellente conductivité. C'est donc naturellement que dans cette première étape nous avons choisi le Ti-6Al-4V comme biomatériau modèle pour étudier les interactions cellule-biomatériau. Pour simplifier l'écriture, le terme « titane » fera référence au Ti-6Al-4V dans le manuscrit.

Une fois la méthodologie développée, nous avons cherché à l'appliquer sur des biomatériaux en développement. Une collaboration entre le laboratoire MATEIS et le laboratoire SAINBIOSE de l'Ecole des Mines de St Etienne était en cours. Nous avons proposé à Dr. Nathalie Douard de mettre en application la méthodologie sur les pastilles d'hydroxyapatite carbonaté (CHA) développées par son équipe. Les hydroxyapatites (HA) ont toujours été de bons candidats pour la régénération de l'os. L'obstacle résidait dans l'absence de procédés de fabrication pour passer de l'état de poudre naturel à une structure implantable. Depuis, les procédés de frittage ont émergé, rendant possible sa transformation. Des études ont montré que la forme carbonatée du HA présente une meilleure efficacité dans la régénération de l'os et une meilleure biodégradabilité [72]. L'utilisation des CHA, et HA comme matériaux de référence, ont paru attrayants pour appliquer la méthodologie et mettre en évidence les points à améliorer. Contrairement au titane, ces matériaux sont composés d'éléments légers et sont sensibles au faisceau électronique.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

2 Choix des cellules

2.1 Les cellules NIH-3T3

Les cellules NIH-3T3 sont une lignée cellulaire de fibroblastes provenant d'embryons de souris. Cette lignée est essentiellement utilisée pour déterminer leur capacité à adhérer, proliférer et migrer sur les biomatériaux en développement [73]–[75]. Ces cellules ont été acquises chez LGC (Molsheim, France) sous la référence NIH-3T3 ATCC - CRL-1658.

2.2 Les cellules MC3T3-E1

Les cellules MC3T3-E1 sont une lignée de cellules précurseurs d'ostéoblastes issues de la calvaria (os crâniens) de souriceaux. Les cellules MC3T3-E1 minéralisent la MEC par ajout d'acide ascorbique et de β-glycérophosphate dans le milieu de culture [76], ainsi les cellules MC3T3-E1 constituent un bon modèle *in vitro* d'ingénierie osseuse. Les cellules MC3T3-E1 ont été gracieusement fournies par le laboratoire SAINBIOSE LBTO INSERM U1059.

2.3 Les cellules MG-63

Les cellules MG-63 sont une lignée cellulaire d'ostéoblaste issue d'un ostéosarcome humain, cette lignée de cellules est une des plus couramment utilisée dans la recherche d'études d'interaction cellule-biomatériau dans le développement de dispositifs médicaux implantable en relation avec l'os [77], [78]. Cependant cette lignée est bloquée à un stade pré-ostéoblastique et malgré l'emploi d'un milieu inducteur de différenciation, elle conduit à des ostéoblastes matures ne produisant pas ou très peu de minéralisation osseuse [79], [80]. Les cellules MG-63 utilisées dans ce manuscrit ont été acquises chez LGC (Molsheim, France) sous la référence MG-63 ATCC-CRL-1427.

2.4 Les cellules 3T3-L1

Les cellules 3T3-L1 sont une lignée cellulaire précurseur d'adipocyte isolées à partir d'embryon de souris. Il s'agit de la lignée cellulaire utilisée en routine pour les expériences liées au métabolisme menées à l'Institut Carmen. Cette lignée a été utilisée pour l'étude de la cytotoxicité du volume minimum de milieu requis pour maintenir les cellules en vie à l'aide du Cytation de l'Institut CarMen.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Le Tableau 2 récapitule les différents types de cellules ainsi que leurs applications dans ce travail.

Tableau 2 : tableau récapitulatif des cellules et biomatériaux utilisés dans les différentes études

Type cellulaire	Espèce	Phénotype	Biomatériaux	Application dans cette thèse
NIH-3T3	Murine	Fibroblaste	Ti-6Al-4V /	- Etude de l'interaction cellule-biomatériau - Etude de survie des cellules à 4°C par xCelligence et par test live/dead
MC3T3-E1	Murine	Pré-ostéoblaste Minéralisation (+)	Ti-6Al-4V, HA & CHA HA & CHA	- Etude de l'interaction cellule-biomatériau - Etude de la minéralisation de la matrice extracellulaire
MG-63	Humaine	Pré-ostéoblaste Minéralisation (-)	/	- Etude de survie des cellules à 4°C par xCelligence et par test live/dead
3T3-L1	Murine	Pré-adipocyte	/ /	- Etude de cytotoxicité de l'oxyde de graphène - Etude volume minimum de milieu requis pour la survie des cellules

3 Préparation des biomatériaux

3.1 Polissage miroir

Des disques de Ti-6Al-4V, grade ELI (titane de grade biomédical) de 1 cm de diamètre et 2 mm d'épaisseur ont été fournis par ACNIS international (Chassieu, France). Ils ont été polis miroir à l'aide d'une polisseuse semi-automatique BUEHLER, ƐcoMet® 250 (Leinfelden-Echterdingen, Germany). Les échantillons ont été collés sur un disque de polissage à l'aide d'une colle sensible à la chaleur et à l'acétone (821-3 Crystalbond™ 509 Clear, Presi). Le polissage a été effectué en appliquant une force de 20 N sur les échantillons avec la tête et une vitesse de 60 rpm pour les différentes étapes de polissage. Différents tapis de polissage avec des tailles de grains décroissantes, fournis par Struers (France) ont été utilisés successivement : #320, #600, P800, P1200 et P2500 avec une vitesse rotation de 150 rpm pour le tapis en présence d'un filet d'eau pendant 5 minutes pour chaque étape. La dernière étape, le polissage miroir, a été effectuée avec un drap noir et une suspension non cristallisante de SPM de 0,03 µm (Presi, France), la force appliquée par la tête a été baissée à 5 N, la vitesse de rotation du drap était de 120 rpm pendant 30 minutes. Après rinçage et élimination des particules de SPM, les échantillons ont été décollés en chauffant, puis nettoyés avec de l'acétone.

Des pastilles de HA de 1 cm ou 2,5 mm de diamètre et 2 mm d'épaisseur ont été fournis par le laboratoire Sainbiose à l'Ecole de Mine de St-Etienne (St-Etienne, France). Elles ont été polies miroir à l'aide d'une polisseuse semi-automatique BUEHLER, ƐcoMet® 250 (Leinfelden-Echterdingen, Germany). Les échantillons ont été collés sur un disque de polissage à l'aide d'une colle sensible à la chaleur et à l'acétone (821-3 Crystalbond™ 509 Clear, Presi). Le polissage a été effectué en appliquant une force de 30 N sur les échantillons avec la tête et une vitesse de 60 rpm pour les différentes étapes de polissage.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Différents tapis de polissage avec des tailles de grains de diamants décroissantes (Struers) ont été utilisés successivement : MD-Piano P500 et MD-Piano P1200 avec une vitesse de rotation de 150 rpm pour le tapis en présence d'un filet d'eau pendant 4 minutes pour chaque étape. Les polissages plus fins ont été effectués avec des tapis en tissu synthétique (NWF, Presi) et une suspension de diamant (Presi) de taille décroissante de 6 µm, 3 µm et 1 µm, la vitesse de rotation du drap était de 150 rpm pendant 5 minutes. Après rinçage et élimination des particules de diamant, les échantillons ont été décollés en chauffant, puis nettoyés avec de l'éthanol.

Les pastilles de CHA ont été polies de la même manière que les pastilles de HA.

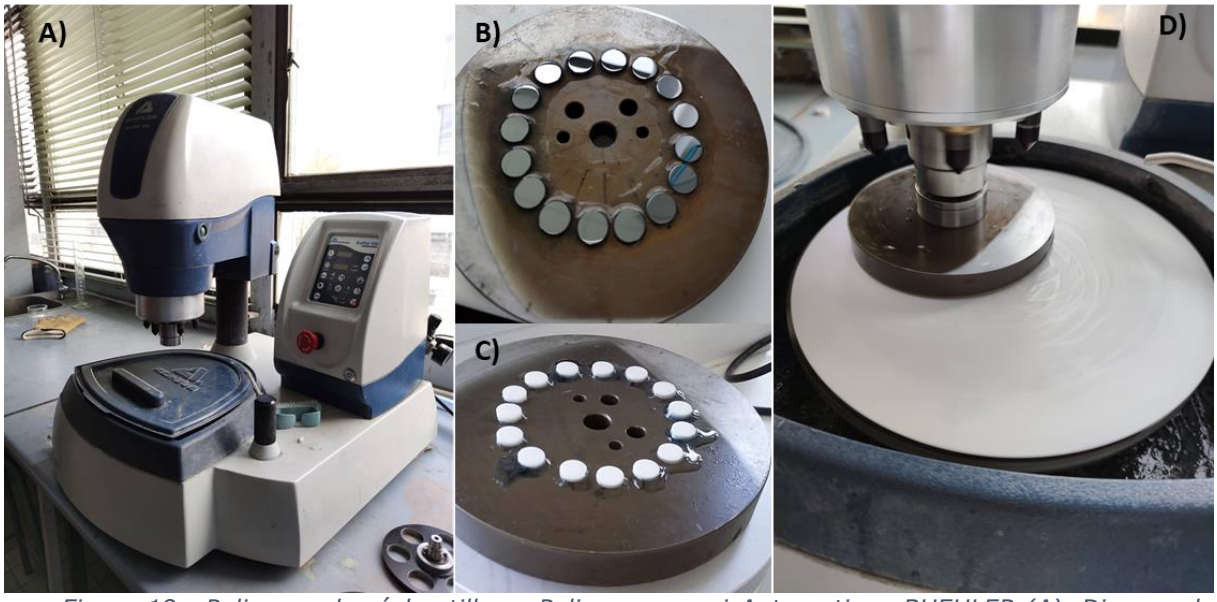


Figure 19 : Polissage des échantillons. Polisseuse semi-Automatique BUEHLER (A). Disques de titane (B) ou pastilles de HA (C) collés sur le disque de polissage. Polissage en cours sur un tapis en tissus NWF avec une suspension de diamant de 1 µm (D).

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

3.2 Préparation des disques de titane pour le MEBE

L'imagerie en mode environnemental nécessitant un contrôle de la température pour maintenir l'hydratation de l'échantillon, les disques de titane ont dû être découpés pour s'insérer dans le porte-échantillon de la platine Peltier. Pour ce faire, les disques de titane ont été découpés en carrés de 2,5 mm de côté à l'aide d'une scie à fil ESCIL. Les carrés obtenus ont été nettoyés puis polis miroir tel que décrit précédemment.



Figure 20 : Test de coupe à la scie à fil (image de droite).

3.3 Stérilisation des biomatériaux

Les disques de titane et les pastilles de HA et CHA ont été stérilisés par rayonnement UV 30 minutes sur chaque face pour l'étude de l'interaction cellule-biomatériau par microscopie.

Les pastilles de HA et CHA ont été stérilisées par chaleur sèche dans un four à 210°C pendant 30 minutes pour l'étude de la minéralisation.

4 Maintien des cultures cellulaires

4.1 Matériels

Les milieux Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)- 4,5 g/L de glucose avec L-glutamine (DMEM-high glucose), DMEM-L-glutamine (DMEM), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 avec L-glutamine, le pyruvate de sodium 100x, l'antibiotique antimycotique (AA) 100x 10 000 uI/mL (réf L0010-100), le sérum de veau fœtal (SVF, réf S181D-100), la trypsine - acide ethylènediaminetétraacétique (EDTA), le tampon

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

phosphate salin (PBS), le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le compteur de cellule automatique SCEPTER ont été achetés chez Dominique Dutscher (Brumath, France). Le sérum de veau bovin (SVB) a été acheté chez LGC (Molsheim, France). Le milieu Minimum Essential Medium Eagle (MEME) a été acheté chez Sigma Aldrich (Saint-Louis, USA).

4.2 Maintien des cellules NIH-3T3

Les cellules NIH-3T3 étaient stockées dans les vapeurs d'azote liquide, et ont été décongelées pour amplification. Brièvement les cellules ont été transférées dans 10 fois leur volume de milieu DMEM-high glucose supplémenté avec 10 % de SVB, 1% de pyruvate, 1% d'AA (milieu DMEM-high glucose complet). Les cellules ont été centrifugées à 120 g à +4°C pendant 5 minutes. Le culot cellulaire a été re-suspendu dans du milieu complet enrichi en SVB à 20%. Les cellules ont été ensemencées dans une flasque T25 à une densité cellulaire comprise entre 5000 – 7000 cellules/cm² et incubées à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO_2.

Lorsque que la culture a atteint une confluence de 80%, elle a été rincée avec du PBS pour éliminer les traces de sérum. Les cellules ont ensuite été détachées par action de la trypsine-EDTA pendant 5 minutes à 37°C, puis deux fois le volume de DMEM-high glucose complet a été ajouté pour arrêter l'action de la trypsine. Les cellules ont été centrifugées à 120 g à +4°C pendant 5 minutes. Le culot cellulaire a été re-suspendu dans 10 mL du DMEM-high glucose complet. Les cellules ont été comptées à l'aide du SCEPTER, puis le volume de la suspension cellulaire nécessaire a été utilisée soit pour ensemencer une densité de 5 000 cellules/cm² dans une flasque T25. Les cultures ont été maintenues à 80% de confluence nécessitant deux passages par semaine.

Les cellules ont été utilisées entre les passages 4 et 12. Un stock de cellules a été constitué à un passage faible en congelant 10^6 cellules dans 1 mL de SVB contenant 10% de DMSO. La congélation s'est faite progressivement à -80°C grâce à l'utilisation d'une boîte de congélation dont la température diminue d'un degré par minute, les ampoules de cellules ont ensuite été transférées dans un container d'azote liquide.

4.3 Maintien des cellules MC3T3-E1

La culture des cellules MC3T3-E1 ont été cultivées dans le laboratoire SAINBIOSE des flasques T25, avec du milieu MEME supplémenté avec 1% de L-glutamine, 1% d'AA et 10 % de SVF (milieu MEME complet). Les cultures des cellules ont été maintenues à 80% de confluence en ensemençant 5000 cellules/cm². Les passages cellulaires ont été effectués

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

tel que décrit pour les cellules NIH-3T3. Les cellules MC3T3-E1 ont été utilisées entre les passages 4 et 19. Le laboratoire SAINBIOSE a gracieusement fourni une flasque de cellules MC3T3-E1 au laboratoire MATEIS. De même que les cellules NIH-3T3, un stock de cellules a été constitué après rapatriement des cellules de SAINBIOSE.

4.4 Maintien des cellules MG-63

Les cellules MG-63 ont été cultivées dans des flasques T25, avec du milieu RPMI 1640 avec L-glutamine supplémenté avec 1% d'AA et 10 % de SVF. Les cultures des cellules ont été maintenue à 80% en ensemençant 5000 cellules/cm². Les passages cellulaires ont été effectués avec la même procédure que celle décrite pour les cellules NIH-3T3.

4.5 Maintien des cellules 3T3-L1

Les cellules 3T3-L1 ont été cultivées au laboratoire CarMen tout au long des expériences menées dans le Chapitre 5. Les cellules ont été cultivés dans des flasques T75 avec du milieu DMEM supplémenté avec 1% d'AA et 10 % de SVF. Les cultures de cellules ont été maintenues à 80% de confluence.

5 Etude de l'adhésion et de la morphologie cellulaire

L'adhésion des cellules sur les biomatériaux est bon indicateur de la biocompatibilité du matériau [48]. Il est apparu pertinent de mener une étude de cinétique de cette adhésion afin de mieux caractériser cette dernière [81].

5.1 Matériels

La solution de formaldéhyde 36% (PFA), le glutaraldéhyde 25%, le Triton™ X-100, la l'albumine de sérum bovin (BSA), l'éthanol absolu et le 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI, réf D9542) ont été achetés chez Sigma Aldrich (Saint-Louis, USA). La phalloïdine-Rhodamine et le milieu de montage FluoromountG™ Invitrogen ont été achetés chez Fischer Scientific (Illkirch, France). L'anticorps anti-vinculine couplé à l'Alexa-488 (@Vinculine-A488, réf bs-6640R-A488) a été acheté chez CliniSciences (Nanterre, France). Les lamelles de microscopie n° 1,5 ont été acheté chez VWR (Pennsylvanie, USA).

5.2 Culture des cellules sur les biomatériaux

Les biomatériaux (titane, HA et CHA) stérilisés ont été transférés dans une plaque 24-puits. 5.10^4 cellules NIH-3T3 ou MC3T3-E1 ont été ensemencées par puits (soit environ 13.10^3 cellules/cm²) puis incubés pendant 15, 30, 60, 120, 240 minutes ou 24h. A la fin

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

du temps d'incubation, les cellules ont été rincées avec PBS puis fixées avec du PFA +4% pendant 15 minutes à température ambiante puis conservées dans du PBS à +4°C jusqu'au jour du marquage.

5.3 Marquage fluorescent des sites d'ancrage, de l'actine et du noyau

Le protocole qui suit est le résultat d'une optimisation des différentes étapes du marquage à savoir la dilution des marqueurs fluorescents, la température et la durée d'incubation.

Les cellules fixées au préalable ont été perméabilisées avec 0,1% de Triton™ X-100 pendant 5 minutes à température ambiante, puis rincées 3 fois avec du PBS pendant 5 minutes. Les cellules ont ensuite été saturées avec de la BSA à 2% pendant 30 minutes. La vinculine des sites d'ancrage a été marquée grâce à l'@Vinculine-A488 dilué au 200ème pendant 1h30 à température ambiante sous agitation orbitale. Les cellules ont été rincées 3 fois avec du PBS pendant 5 minutes. L'actine et le noyau des cellules ont été marqués simultanément avec de la phalloïdine-Rhodamine et du DAPI, à une dilution au 200ème pour chacun des marqueurs, pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules ont été rincées avec du PBS. Les biomatériaux ont été montés avec une lamelle de microscopie à l'aide du milieu de montage Fluoromount-G™.

5.3.1 Microscopie confocale

Les images des cellules cultivées à différents temps d'incubation sur les biomatériaux ont été acquises avec un microscope confocal à balayage laser (MCBL) le LSM-800 de Zeiss (Iéna, Allemagne). Détection des noyaux λ_{ex} 350 nm, λ_{em} 465 nm, détection de l'actine λ_{ex} 535 nm, λ_{em} 565 nm et détection de la vinculine λ_{ex} 488 nm, λ_{em} 517 nm. Les images ont été acquises en Z-stack avec une épaisseur de coupe optique de 190 nm en utilisant un objectif 63x à immersion dans l'huile (ON 1,4).

5.3.2 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Après l'acquisition des images au MCBL, les biomatériaux ont été immergés dans du PBS pour dissoudre le milieu de montage et retirer la lamelle. Les cellules ont été fixées une seconde fois avec du glutaraldéhyde 4% pendant 15 minutes à température ambiante, avant d'être déshydratées dans des bains d'alcools de concentration croissante : 25, 50, 75, 96 et 100%. Les échantillons ont été conservés au sec jusqu'à l'acquisition des images avec un MEB environnemental Quattro-S de ThermoFischer Scientific (Eindhoven, Pays-Bas). Les images MEB ont été acquises sous haut vide en collectant les électrons secondaires avec une tension d'accélération de 10 kV, une taille de sonde de 2,5, une

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

vitesse de balayage de 800 ns à un grossissement de 150, 600, 800, 1500 ou 4000 pour les cellules cultivées sur du titane. Les images des MC3T3-E1 cultivées sur les pastilles de HA ou CHA ont été acquises en mode vide partiel à une pression de de 80 Pa pour minimiser les phénomènes de charge, les électrons secondaires ont été collectés à une tension d'accélération de 10 kV, avec une vitesse de balayage de 3 µs.

6 Etude de la minéralisation de la MEC des cellules MC3T3-E1 cultivées sur HA et CHA

La culture cellulaire et la RT-PCR de cette étude ont été réalisée au laboratoire SAINBIOSE LBTO INSERM U1059. La mesure de la composition chimique de la MEC par EDX a été effectué au CLYM.

6.1 Matériels

L'acide ascorbique, le β-glycérophosphate et la dexaméthasone ont été acheté chez Sigma Aldrich (Saint-Louis, USA). Le chloroforme et le 2-propanol ont été acheté chez Merck (Darmstadt, Allemagne). L'éthanol 90° a été acheté chez Cooper (Melun, France). Le TRI Reagent®, le kit RNA StdSens analysis et le kit iScript cDNA Synthesis ont été acheté chez Biorad (Californie, USA). Le kit Invitrogen Quant-it Ribogreen RNA assay a été acheté chez Thermofischer Scientific (Illkirch, France). Le kit LC Fast Start DNA Master Plus SybrGreen a été acheté chez ROCHE diagnostics (Bâle, Suisse).

6.2 Culture et différenciation des cellules MC3T3-E1

Les pastilles de HA et CHA stérilisées ont été transférées dans quatre plaques 24 puits, 5.10^4 cellules MC3T3-E1 ont été ensemencées par puits (soit environ 13.10^3 cellules/cm²) puis incubés pendant 4 jours. Le 4ème jour, le milieu de culture des cellules a été supplémenté avec 50 µg/mL d'acide ascorbique et 10 mM de β-glycérophosphate pour induire la différenciation en ostéoblaste. L'ajout de 100 nM de dexaméthasone permet d'induire la minéralisation de la matrice extracellulaire et avoir un contrôle positif. La différenciation en ostéoblaste et la minéralisation de la MEC ont été évaluées à 14 et 21 jours post induction grâce à la mesure de l'expression de marqueurs ostéoblastiques par RT-PCR (2 plaques) et par l'évaluation de la composition de la MEC par EDX (2 plaques).

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

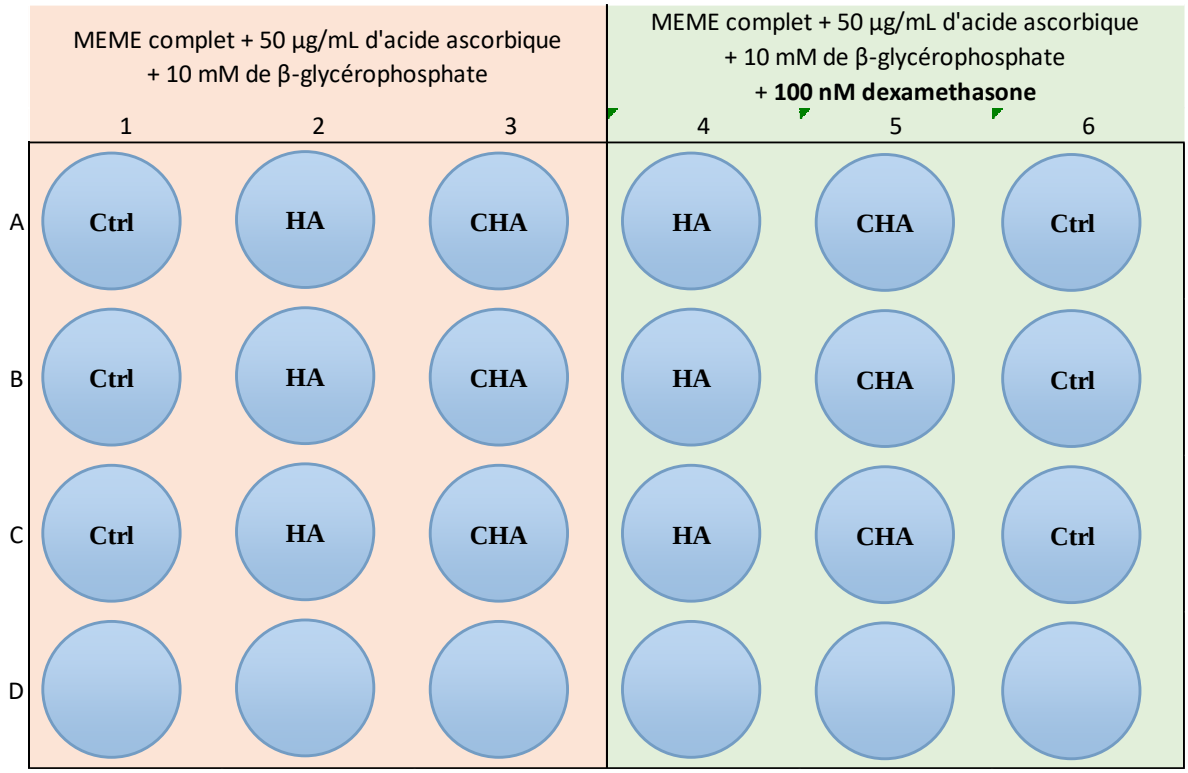


Figure 21 : Plan de plaque de l'étude de la minéralisation de la MEC par les MC3T3-E1 différenciées en ostéoblastes. Avec Ctrl = cellules cultivées sur la plaque 24 puits, HA = pastille HA, CHA = pastille CHA

6.3 Evaluation de la différenciation et de la minéralisation par RT-PCR

Les pastilles de HA et CHA ont été transférées dans un tube, puis les cellules ont été lysées à l'aide du TRI Reagent®. Les cellules cultivées directement sur la plaque ont été lysées dans les puits. Les biomatériaux ont été retirés et les lysats cellulaires des puits ont été transférés dans des tubes. L'ensemble des tubes a été incubé 30 minutes à -80°C. L'ARN a été extrait, purifié et redissout grâce à des incubations successives dans du chloroforme, du 2-propanol, de l'éthanol 70% et de l'eau RNAse free. La qualité de l'ARN a été évaluée grâce au kit RNA StdSens analysis, la quantité d'ARNm a été mesurée grâce au kit Quant-it Ribogreen RNA assay. L'ARNm a ensuite été retranscrite en ADNc grâce au kit iScript cDNA Synthesis. L'ADNc correspondant aux marqueurs de différenciation et de minéralisation choisis a été quantifié par RT-PCR avec le kit LC Fast Start DNA Master Plus SybrGreen, la séquence des oligonucléotides des marqueurs d'intérêt est donnée dans le Tableau 3.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Tableau 3 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour la RT-PCR.

Gène	**ref NM**	**Amorce sens**	**Amorce anti sens**
HPRT	NM_013556.2	tgttggatacaggccagact	caacttgcgctcatcttagg
OCN	NM_007541.3	ctctgacctcacagatgccaa	ctggtctgatagctcgtcaca
OPN	NM_001204201.1	cccggtgaaagtgactgattc	atggctttcattggaattgc
COL1a	NM_007742.3	caccctcaagagcctgagtc	ttaggcgcaggaaggtcagc
Runx2	NM_00145920.2	gacactgccacctctgactt	gcaggtacgtgtggtagtga
BSP	NM_008318.3	aatggagacggcgatag	gccttcttgggcagttg

6.4 Evaluation de la composition chimique de la MEC par EDX

L'analyse EDX a été effectuée sur les pastilles de HA ou CHA incubées avec les MC3T3-E1 en parallèle de l'étude de minéralisation par RT-PCR. Les pastilles de HA et CHA incubées avec les cellules MC3T3-E1 14 et 21 jours post-induction, en présence ou absence de dexaméthasone ont été fixées avec une solution de formaldéhyde à 4% puis déshydratées dans des bains d'éthanol de concentration croissante : 25, 50, 70 96 et 100%. Les pastilles ont été conservées au sec jusqu'au jour de l'analyse EDX. Les spectres EDX ont été obtenus sur les différents échantillons sous un vide partiel de 80 Pa, avec une tension d'accélération de 10 kV et une taille de sonde de 2,5, une gamme d'énergie de 20 keV, un temps de mise en forme de 4 µs et un temps de pose de 10 µs. Trois sites ont été analysés par échantillon pour estimer la minéralisation de la MEC.

7 Etude de l'effet de la température et du milieu sur la viabilité cellulaire

7.1 Test de viabilité comptage manuel (NIH-3T3)

7.1.1 Matériels

Le bleu de trypan (réf P08-34100) et la cellule de comptage (Malassez) ont été achetés chez Dominique Dutscher (Molsheim, France).

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

7.1.2 Mode opératoire

L'effet de la température sur la viabilité cellulaire a été évalué par comptage manuel au bleu de trypan des cellules incubées dans du milieu de culture ou du PBS à 4°C pendant 1, 2 et 6h. Des cellules incubées pendant les mêmes durées dans des conditions normales de culture ont servi de contrôle.

Brièvement, 10 boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre ont été ensemencées avec 75.10^3 cellules NIH3T3/boîte de Pétri, puis cultivées pendant 48h à 37°C en présence de 5 % de CO_2 en environnement humide. Le milieu de culture a été remplacé par 2 mL de milieu de culture frais ou 2 mL de PBS. Une partie des boîtes de Pétri contenant du milieu de culture et les boîtes de Pétri contenant le PBS ont été transférée au réfrigérateur (+4°C). Les boîtes de Pétri restantes sont maintenues dans des conditions de culture standard, à savoir avec du milieu de culture et à 37°C en présence de 5 % de CO_2. L'effet du milieu et de la température sur la viabilité cellulaire est mesuré à différent temps d'incubation après modification des conditions de culture : 0, 1h, 2h et 6h.

Pour effectuer le comptage au temps 0, le milieu est éliminé, les cellules sont rincées avec 2 mL PBS, puis incubées avec 500 µL de la trypsine-EDTA pendant 5 minutes à température ambiante. Un mL de milieu complet est ajouté pour arrêter l'action de la trypsine-EDTA. La suspension cellulaire a été centrifugée 5 minutes à 120 g à +4°C. Le culot a été resuspendu avec 2 mL de milieu de culture, 50 µL de la suspension cellulaire ont été dilués avec 50 µL de bleu de trypan pour compter les cellules vivantes et mortes à l'aide d'une cellule de Malassez. Le nombre de cellules comptées, sur la totalité de la cellule de Malassez, a été rapporté au volume de suspension et à la dilution effectuée pour déterminer le nombre de cellules vivantes et mortes dans la suspension cellulaire.

Pour le temps 1h, les 2 mL de milieu ou de PBS des boîtes de Pétri ont été transférés dans un tube pour comptabiliser les cellules éventuellement décrochées. Les procédures de trypsinisation et de centrifugation étaient identiques. Lors de l'élimination du surnageant après centrifugation, une partie du culot a été aspirée. Le comptage cellulaire a donc été biaisé. Pour les temps d'incubation ultérieurs, le comptage a été fait sans centrifuger la suspension cellulaire.

Pour les temps 2 et 6h, les 2 mL de milieu ou de PBS des boîtes de Pétri ont été transférés dans un tube pour comptabiliser les cellules éventuellement décrochées. Les cellules sont rincées avec 2 mL de PBS, le PBS de rinçage a été ajouté au tube précédent. Les cellules encore adhérées sont incubées avec 500 µL de la trypsine-EDTA pendant 5 minutes à température ambiante. Un mL de milieu complet est ajouté pour arrêter l'action de la trypsine-EDTA. La suspension cellulaire a été transférée dans le même tube que précédemment. Le comptage effectué sur une suspension diluée au demi avec du bleu de

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

trypan. Les cellules mortes et vivantes ont été comptées sur la totalité de la cellule de Malassez. Le nombre de cellules comptées a été rapporté au volume de suspension et à la dilution effectuée pour déterminer le nombre de cellules vivantes et mortes dans la suspension cellulaire.

7.2 Test de viabilité Celltiter Glo® (NIH-3T3 et MG-63)

7.2.1 Matériels

Le CellTiter-Glo® (réf G7572) a été acheté chez Promega (Charbonnières Les Bains, France). Les plaques blanches 96-puits ont été achetées chez Dominique Dutscher (Molsheim, France). Les mesures de luminescence ont été effectuées avec un lecteur de plaque TECAN infinite® 200.

7.2.2 Mode opératoire

Les cellules NIH-3T3 et MG-63 ont été mises en culture dans des plaques blanches 96-puits avec un ensemencement de 10 000 cellules/puits. Chacune des lignées a ensuite été cultivée pendant 48h à 37°C en présence de 5 % de CO_2. Le milieu de culture a été éliminé puis remplacé par 100 µL de milieu de culture frais pour la moitié de la plaque, et pour l'autre moitié par 100 µL de PBS. La moitié des plaques a été transférée dans un réfrigérateur à +4°C pour une durée de 30, 60, 120 et 180 minutes, tandis que l'autre moitié a été replacée dans l'incubateur. A la fin des différents temps d'incubation, les plaques ont été équilibrées à température ambiante pendant 5 minutes, puis 100 µL de solution de CellTiter-Glo® ont été ajoutés au puits. Les plaques ont été agitées sur un agitateur orbital pendant 5 minutes, puis la luminescence a été mesurée dans le lecteur de plaques.

7.3 Effet de la température et du tampon : mesure du changement d'impédance électrique xCELLigence (NIH-3T3 et MG-63)

7.3.1 Matériels

Les plaques munis de microélectrodes et xCelligence provenant de chez Aglient (Santa Clara, USA). L'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES, réf H0887-100ML), le tampon Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, réf H8264-500ML), le N-acétyl-L-cystéine (NAC, réf A9165) ont été achetés chez Sigma Aldrich (Saint-Louis, USA).

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

7.3.2 Mode opératoire

Les cellules NIH-3T3 et MG-63 ont été ensemencées avec une densité de 25.10^2 cellules/puits dans une plaque 96-puits munie de microélectrodes. Les cellules ont été incubées pendant 24 h à 37°C avec 5 % de CO_2. Les tampons et le milieu avec 10 mM de NAC ont été préparés par ajout d'une masse de NAC donnée à un volume calculé de tampon ou de milieu. Les différentes concentrations de NAC ont été obtenues par dilution des solutions à 10 mM de NAC. Le milieu de culture a ensuite été remplacé par du tampon HEPES ou HBSS contenant éventuellement 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM ou 10 mM de NAC puis la plaque a été placée pendant 5 h au réfrigérateur à +4°C. La plaque a ensuite été replacée dans l'incubateur, le changement d'impédance électrique de la culture a été suivi pendant 50 h. Puis, le milieu des différentes conditions a été remplacé par du milieu de culture, la mesure de l'impédance électrique a été suivie pendant 110 h supplémentaires.

7.4 Mesure de la viabilité et mortalité cellulaire par fluorescence : méthode live & dead (NIH-3T3 et MG-63)

7.4.1 Matériels

La calcéine-AM (réf 17783), l'iodure de propidium (IP, réf P4170) ont été achetés chez Sigma Aldrich (Saint-Louis, USA). Les plaques noires avec fond transparent 96-puits de culture (réf 655097) ont été achetées chez Dominique Dutscher (Molsheim, France).

7.4.2 Détermination de la concentration de NAC à utiliser (test 1 avec NIH-3T3)

Les cellules ont été ensemencées dans des plaques 96-puits avec une densité cellulaire de 4.10^3 cellules/puits, puis incubées pendant 48h à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO_2.

Une solution stock de NAC à 1 M a été préparée, les différentes concentrations de NAC ont été constituées à partir de cette solution stock.

Le milieu de culture des cellules a été remplacé par du nouveau milieu de culture ou de l'HBSS ou de l'HEPES 25 mM en présence de 2,5 mM, 5 mM et 10 mM de NAC, puis incubées 6h à +4°C. Les milieux respectifs ont été remplacés par le réactif contenant 5 µM de calcéine-AM et 5 µM d'IP, la fluorescence a été mesurée à l'issue de 10 minutes à température ambiante grâce au lecteur de plaque. Les cellules vivantes sont détectées grâce à l'émission d'une fluorescence à 535 nm (λ_{ex} 485 nm, λ_{em} 535 nm), tandis que les cellules mortes sont détectées grâce à l'émission d'une fluorescence à 610 nm (λ_{ex} 535 nm, λ_{em} 610 nm).

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

7.4.3 Détermination de la concentration de NAC à utiliser (test 2, NIH-3T3 et MG-63)

Les cellules NIH-3T3 et MG-63 ont été ensemencées en plaques 96-puits avec une densité cellulaire de 4.10^3 cellules/puits, puis incubées pendant 48h à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO_2.

Une solution stock de NAC à 1 M a été préparée. Les différentes concentrations de NAC ont été constituées à partir de cette solution stock.

Les milieux de culture ont été remplacés par du nouveau milieu de culture, de l'HBSS ou de l'HEPES en présence de NAC à 0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM et 10 mM. Une moitié des plaques a été incubée à +4°C tandis que l'autre moitié a été incubée à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO_2 pendant 5h. Les milieux respectifs ont été remplacés par le réactif contenant 5 µM de calcéine-AM et 5 µM d'IP. La fluorescence a été mesurée à l'issue de 10 minutes à température ambiante avec le lecteur de plaque.

7.4.4 Etude de l'effet du milieu et de la température d'incubation sur les cellules au cours du temps (NIH-3T3 et MG-63)

Les cellules NIH-3T3 et MG-63 ont été ensemencées en plaques 96-puits avec une densité cellulaire de 4.10^3 cellules/puits, puis incubées pendant 48h à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO_2.

Une solution stock de NAC à 1 M a été préparée en neutralisant le pH. Les différents milieux et tampons à 10 mM de NAC ont été constituées à partir de cette solution stock.

Puis, les milieux de culture ont été remplacés par du nouveau milieu de culture, de l'HBSS ou de l'HEPES 25 mM en absence ou présence de 10 mM de NAC. Une moitié des plaques a été incubée à +4°C tandis que l'autre moitié a été incubée à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO_2 pendant 90, 180, 270 et 360 minutes. A l'issue des différents temps d'incubation, les milieux respectifs ont été remplacés par le réactif contenant 5 µM de calcéine-AM et 5 µM d'IP. La fluorescence a été mesurée à l'issue de 10 minutes à température ambiante avec le lecteur de plaque.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

8 Encapsulation des cellules avec de l'oxyde de graphène

8.1 Matériels

Les nanoparticules (NPs) d'oxyde de graphène (OG) à une concentration de 1 mg/mL dans de l'eau ont été gracieusement fournis par Dr Bertrand Vilquin, du laboratoire INL. L'imageur de cellules cultivées en plaque de culture Cytation provenant d'Agilent (Santa Clara, USA) a été utilisé au laboratoire CarMen.

8.2 Evaluation de la cytotoxicité des NPs d'OG par impédancemétrie

Les cellules 3T3-L1 ont été ensemencées avec une densité de 25.10^2 cellules/puit dans une plaque 96-puits munie de microélectrodes, puis incubées 54 h à 37 °C en atmosphère humide et en présence de 5% de CO_2. Ensuite, le milieu de culture a été remplacé par du milieu de culture contenant les NPs d'OG à 0 µg/mL, 3,63 µg/mL, 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL et 400 µg/mL. Au bout de 24 h d'incubation avec les NPs d'OG, ces dernières ont été aspirées (« washout ») et remplacées par du milieu de culture. La mesure d'impédance électrique a été réalisée tout au long de l'expérience.

8.3 Détermination du volume minimum de milieu de culture requis pour maintenir les cellules en vie

Les cellules 3T3-L1 ont été ensemencées à une densité de 25.10^2 cellules/puits dans une plaque classique 96-puits, puis incubées pendant 24h à 37 °C en atmosphère humide et en présence de 5% de CO_2. Le milieu de culture a été remplacé par différents volumes de milieu de culture ou du milieu de culture contenant 6,25 µg/mL ou 3,1 µg/mL de NPs d'OG. Les volumes testés étaient : 0, 10, 20, 30, 40 et 100 µL. La plaque a été placée dans le Cytation à température ambiante en présence de 5 % CO_2 pendant 5 h. Une image a été acquise toutes les 30 minutes.

9 Tests statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel Graphpad Prism. En fonction des résultats, des tests paramétriques avec une analyse de la variance ANOVA à 2 voies ou des t-tests/mann-whitney ou Tukey ont été effectués. Les résultats sont

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

présentés sur les graphiques sous forme de moyenne +/- l'écart type. Les p-valeurs inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Chapitre 3 : Méthodologie d'étude des interactions cellule-biomatériau par microscopies confocale et électronique

L'interaction entre les cellules et les biomatériaux est une notion très vaste. L'interaction est définie comme la réaction réciproque qu'exercent l'un sur l'autre un ou plusieurs systèmes. Dans notre cas, l'interaction entre la cellule et le biomatériau peut se caractériser par des interactions physiques mais également par des interactions chimiques qui se traduiront par des modifications fonctionnelles au niveau de la cellule et des modifications physico-chimiques au niveau du biomatériau. L'adhésion de la cellule sur le biomatériau est l'initiation de l'interaction entre ces deux partenaires. Les propriétés physico-chimiques du biomatériau sont primordiales pour favoriser l'accroche de la cellule. Si l'ancrage de la cellule se réalise, le biomatériau peut induire différents signaux tels que la migration, la prolifération, la différenciation ou la mort cellulaire. De plus en plus d'études investiguent sur la relation entre la morphologie cellulaire et l'activité cellulaire [51]. Dans ce travail nous proposons de développer une méthode pour étudier les sites d'ancrage par microscopie confocale, en considérant uniquement les plans optiques de l'interface cellule-biomatériaux, et la morphologie cellulaire par microscopie électronique à balayage des mêmes échantillons. Pour cela, nous avons choisi de travailler avec le titane, Ti-6Al-4V grade ELI, un biomatériau très largement utilisé comme implant. Le choix des cellules s'est porté sur les cellules NIH-3T3 et MC3T3-E1, qui sont des lignées murines (fibroblastes d'embryons de souris et pré-ostéoblaste de calvaria de souriceaux respectivement).

1 Analyse des sites d'ancrage de la cellule sur le biomatériau

L'ancrage de la cellule est un processus qui se fait au cours du temps, aussi nous avons choisi de proposer une méthode pour déterminer la durée nécessaire pour l'adhésion cellulaire et l'apparition des sites d'ancrage après ensemencement des cellules sur le biomatériau. La cinétique peut donner une information importante sur l'interaction qui découlera entre les deux partenaires. Pour proposer un tel protocole, nous avons ensemencé 130 cellules/mm² sur un disque de titane poli miroir de 1 cm de diamètre. Le disque de titane a au préalable été marqué de trois rayures comme point de repère entre la microscopie confocale et électronique. Les cellules ont été rincées puis fixées avec 4%

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

de formaldéhyde 15, 30, 60, 120 minutes et 24h après ensemencement. Pour mettre en évidence les sites d'ancrage, la vinculine a été marquée de manière fluorescente en vert (l'immunomarquage est détaillé dans le chapitre 2 section 5.3 Marquage fluorescent des sites d'ancrage, de l'actine et du noyau). Une lamelle en verre de microscopie de 170 µm d'épaisseur a été montée grâce à du Fluoromount-G™. Ce milieu de montage a été choisi pour sa capacité à maintenir la lamelle collée au cours de l'acquisition et par sa capacité à se dissoudre dans du PBS pour démonter la lamelle. Le démontage de la lamelle a été un critère important pour pouvoir faire les analyses par microscopie électronique. Des images z-stack ont été acquises par microscopie confocale. Les images obtenues ont été analysées avec le logiciel Fiji. Les sites d'ancrage correspondent alors aux zones de contact entre la cellule et le biomatériau dans lesquelles la vinculine est présente. Pour avoir une mesure quantitative de l'ancrage, nous cherchons à mesurer la proportion entre l'aire occupée par les sites d'ancrage et l'aire de la cellule.

1.1 Traitement préliminaire des images

Afin d'étudier les sites d'ancrage, des stacks d'images de 190 nm d'épaisseur ont été acquis en microscopie confocale, avec une résolution intrinsèque de 400 nm en z. En premier lieu, seule la première image de chaque stack, au contact du biomatériau et présentant un marquage, a été analysée. Les séries d'images ont mis en évidence que la surface du titane était bien plate mais que le disque n'était pas parfaitement horizontal. En effet, en Figure 22A, l'intégralité de la cellule n'est pas visible dans l'image, la zone en bas à gauche n'étant pas visible. Il est donc nécessaire de modifier le stack pour avoir la totalité de la surface de contact entre la cellule et le biomatériau dans le même plan, c'est-à-dire dans la même image. Pour ce faire, le plugin Volume Viewer du logiciel Fiji a été utilisé pour déterminer les modifications à apporter au stack. Les Figure 22B et Figure 22C montrent la différence dans les images en effectuant des rotations autours des axes x, y et z. La Figure 22D présente le résultat après rotation du stack. On voit clairement l'intégralité de la cellule dans l'image, ce qui signifie que les sites d'ancrage sont dans le même plan.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

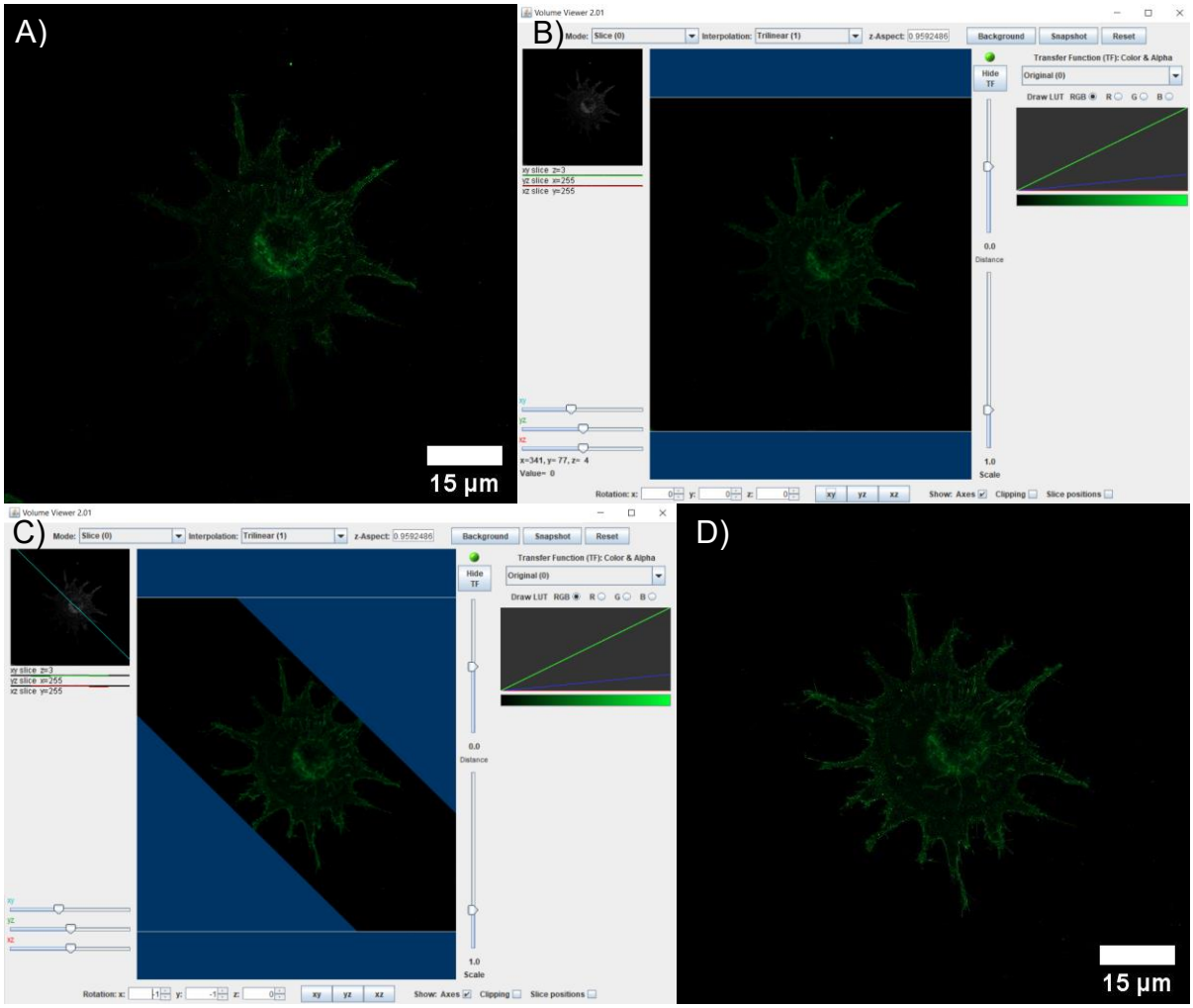


Figure 22 : Exemple de transformation d'un stack d'image. A) première image avec un marquage vinculine d'une cellule NIH-3T3 cultivée 2h sur un disque de titane. B) stack d'images ouvert avec le plugin Volume Viewer de Fiji pour déterminer les rotations du stack à appliquer pour obtenir toute la surface de contact de la cellule sur le biomatériau sur le même plan. C) prévisualisation du résultat pour des rotations autour des axes x, y et z. D) image obtenue après utilisation du plugin TransformJ Rotate. Pour ce stack, la rotation utilisée est de -1° autour de l'axe x et de -1° autour de l'axe y.

Même si cela n'est pas visible sur les images de la Figure 22, le traitement des stacks, et en particulier l'étape de segmentation, nécessite de diminuer le bruit. Il existe plusieurs méthodes pour réduire ou éliminer le bruit de fond des images. Dans un premier temps, il est possible de déterminer le bruit de fond généré par le chauffage du système d'acquisition d'images [82]. Pour ce faire, on mesure la valeur d'intensité dans une région sans cellule (rectangle jaune dans la Figure 23A). La valeur obtenue est ensuite soustraite à l'image (Figure 23B). Ce bruit est homogène sur la totalité de l'image, mais sa valeur change au cours du temps d'utilisation du microscope. Il faut donc mesurer ce bruit de fond et le soustraire pour chaque série d'images. Ce bruit de fond est homogène sur la totalité de l'image.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

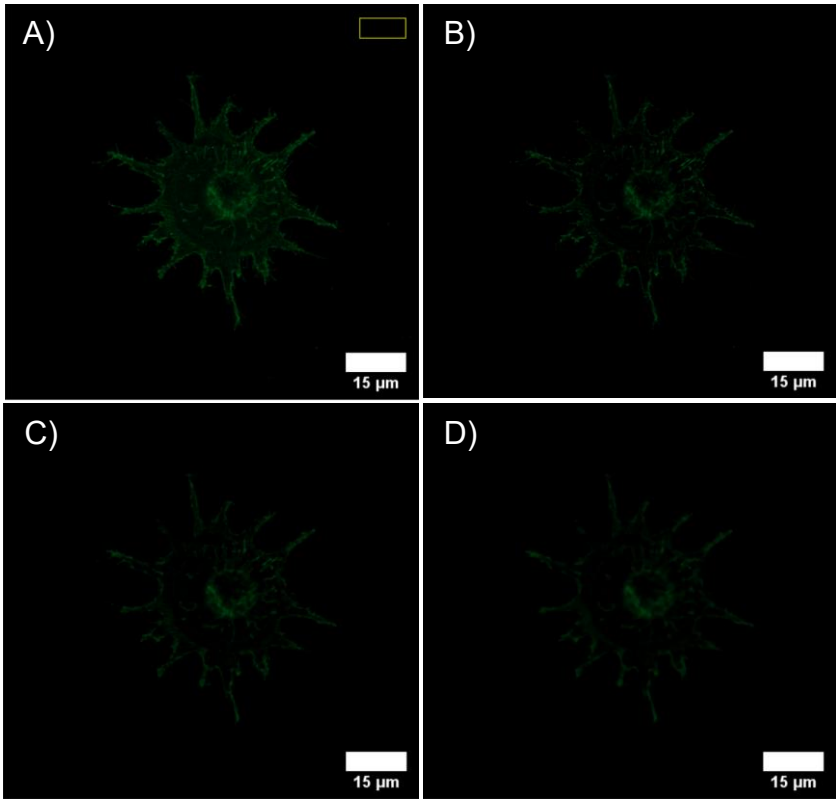


Figure 23 : Traitement d'image pour éliminer le bruit de fond, dans le cas d'images de microscopie confocale avec marquage de la vinculine de cellules NIH-3T3 cultivées pendant 2h sur un support de titane. A) image obtenue après réorientation du stack. Le rectangle jaune indique la sélection d'une région sans cellule pour déterminer l'intensité du bruit de fond. B) Image obtenue après soustraction de la valeur mesurée dans la région sélectionnée en A. C) image obtenue après application d'un filtre médian d'un rayon de 1 pixel à l'image B). D) image obtenue après application d'un filtre médian d'un rayon de 2 pixels à l'image B).

L'immunomarquage peut également générer du bruit par adsorption aspécifique des anticorps sur le biomatériau. Ce type de bruit est généralement très localisé sous forme de « spot ». Dans ce cas de figure, il est possible de filtrer les images pour réduire davantage le bruit (filtre médian) ou de lisser (filtre moyen) l'image de manière arithmétique en se basant sur les pixels environnants. Un exemple d'application sur le même exemple que précédemment est donné en Figure 23C et Figure 23D.

Afin de déterminer le meilleur filtre à appliquer et ses paramètres, les filtres médian et moyen ont été comparés sur plusieurs séries d'images, cf Figure 24. Le filtre médian permet d'éliminer des points fluorescents en dehors de la cellule, ce qui n'est pas le cas du filtre moyen (voir flèches jaunes Figure 24). On note également une perte d'intensité au niveau des filopodes lorsqu'on applique un filtre médian avec un rayon de 1 pixel, par comparaison avec l'image de départ (Figure 24B et Figure 24A, respectivement). L'analyse des sites d'ancrage se poursuivant avec une binarisation des images, cette perte d'intensité n'est pas critique. L'utilisation d'un rayon trop important peut conduire à la perte du marquage des filopodes (voir flèches blanches dans la Figure 24C).

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

La Figure 24D montre l'application d'un filtre moyen avec un rayon de 1 pixel. Ce filtrage permet de conserver le signal obtenu pour les filopodes tel que l'indiquent les flèches blanches. En revanche, ce filtre ne permet pas d'éliminer les pixels visibles dans les régions sans cellule (voir flèches jaunes Figure 24D). Le filtrage moyen ne semble donc pas pertinent pour l'analyse des sites d'ancrage.

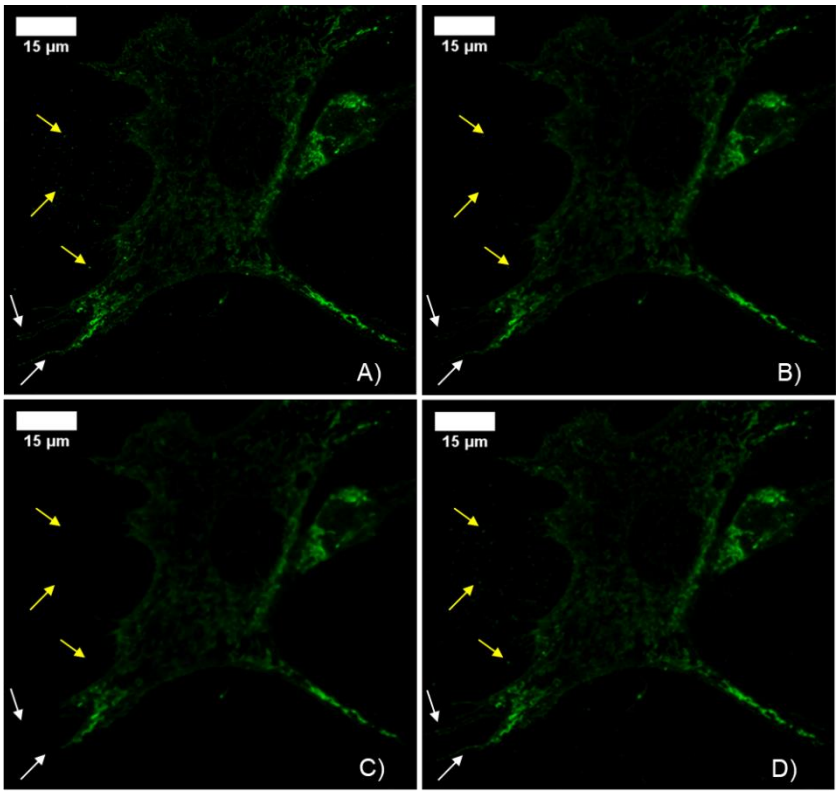


Figure 24 : Traitement d'image pour éliminer les marquages aspécifiques, dans le cas d'images de microscopie confocale avec marquage de la vinculine de cellules NIH-3T3 cultivées pendant 24h sur du titane. A) image de la surface de contact de la cellule après transformation du stack et soustraction de la valeur de l'intensité d'une région sans cellule. B) image avec un filtre médian d'un rayon de 1 pixel de l'image A). C) image avec un filtre médian d'un rayon de 2 pixels de l'image A). D) image avec un filtre moyen d'un rayon de 1 pixel de l'image A).

Le filtrage le plus adéquat est donc l'utilisation d'un filtre médian d'un rayon de 1 pixel, suite à la soustraction du bruit de fond. Par la suite, le débruitage des images est effectué de la même manière pour toutes les séries d'images afin de pouvoir comparer les différents temps d'incubation.

1.2 Analyse de la surface de contact de la cellule avec le biomatériau

Afin de quantifier les sites d'ancrage, des masques binaires ont été générés pour la cellule entière et pour les sites marqués. La surface totale de la cellule a été obtenue à partir d'une Z-projection des intensités maximales de chaque image. En effet, les premières images montrant un marquage vinculine correspondent aux zones de contact de la cellule avec le biomatériau, mais ne permettent pas de visualiser correctement

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

l'intégralité de la cellule. En revanche, dans une Z-projection des intensités maximales, chaque pixel contient l'intensité maximale mesurée à cet endroit dans tout le stack. Cela donne une meilleure visualisation de la cellule, qui est entièrement en vert (cf Figure 25A). Un seuillage adéquat est appliqué à l'image de la Figure 25A pour obtenir le masque binaire en Figure 25B. Le seuillage est l'étape critique de la binarisation. En effet, pour certaines images le seuillage ne permettait pas de remplir la totalité de la surface de la cellule. Dans ce cas, l'outil « Fill Holes » a permis de remplir les « trous » de la surface totale de la cellule. Dans d'autres cas, le masque binaire comportait des pixels noirs en dehors de la cellule. Ces pixels pouvaient représenter une surface plus importante que certaines zones de sites d'ancrage. Pour éviter de perdre des zones de sites d'ancrage en seuillant la taille des particules analysées, ces pixels ont été supprimés manuellement. A partir de ce masque « nettoyé », une région d'intérêt a été générée grâce à l'outil « Create Selection ». La région d'intérêt ainsi obtenue a permis de « nettoyer » de la même manière le masque binaire obtenu pour les sites d'ancrage.

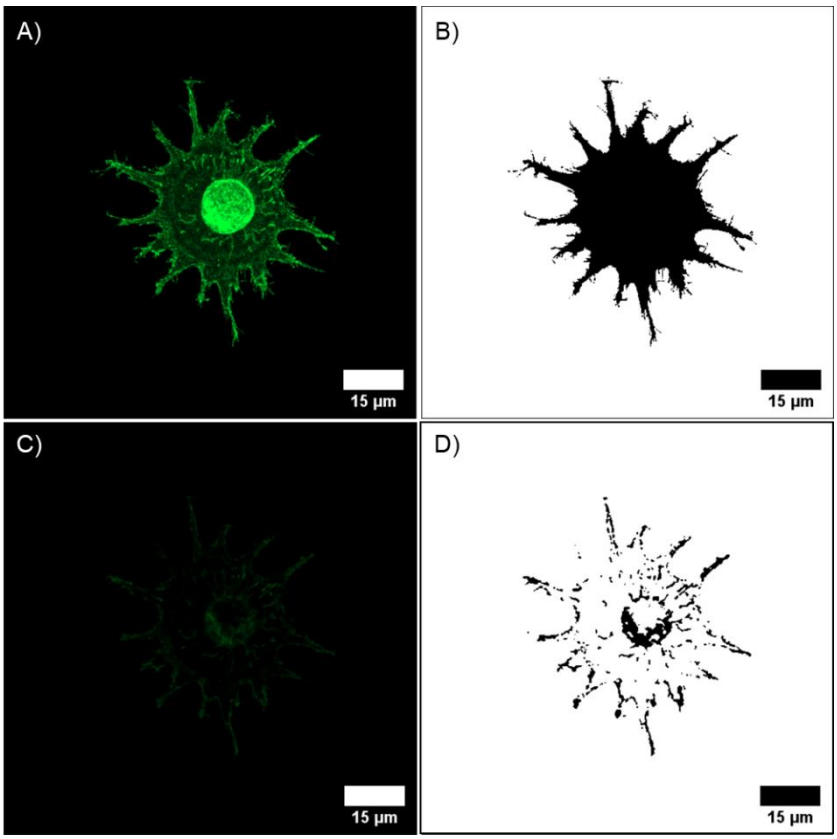


Figure 25 : Mesure de la surface totale et de contact de la cellule à partir d'images de microscopie confocale de cellules NIH-3T3 cultivées 2h sur un disque de titane après marquage vinculine. A) Z-projection de l'intensité maximale des images du stack. B) Masque binaire obtenu à partir du seuillage de l'image A) pour mesurer la surface totale de la cellule. C) Image débruitée du plan de la cellule en contact avec le biomatériau. D) Masque binaire obtenu à partir du seuillage de l'image C) pour quantifier les sites d'ancrage de la cellule.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Les images débruitées quant à elles permettent d'isoler la surface de la cellule en contact du biomatériau. Une image débruitée et le masque correspondant sont donnés respectivement en Figure 25C et Figure 25D.

Les aires sont mesurées sur les masques respectifs (outil « analyse de particules »). L'intervalle de taille des particules analysées est compris entre 0 et l'infini en µm. Pour les images présentant plus d'une cellule par image, une région d'intérêt est tracée pour permettre une analyse propre à chaque cellule.

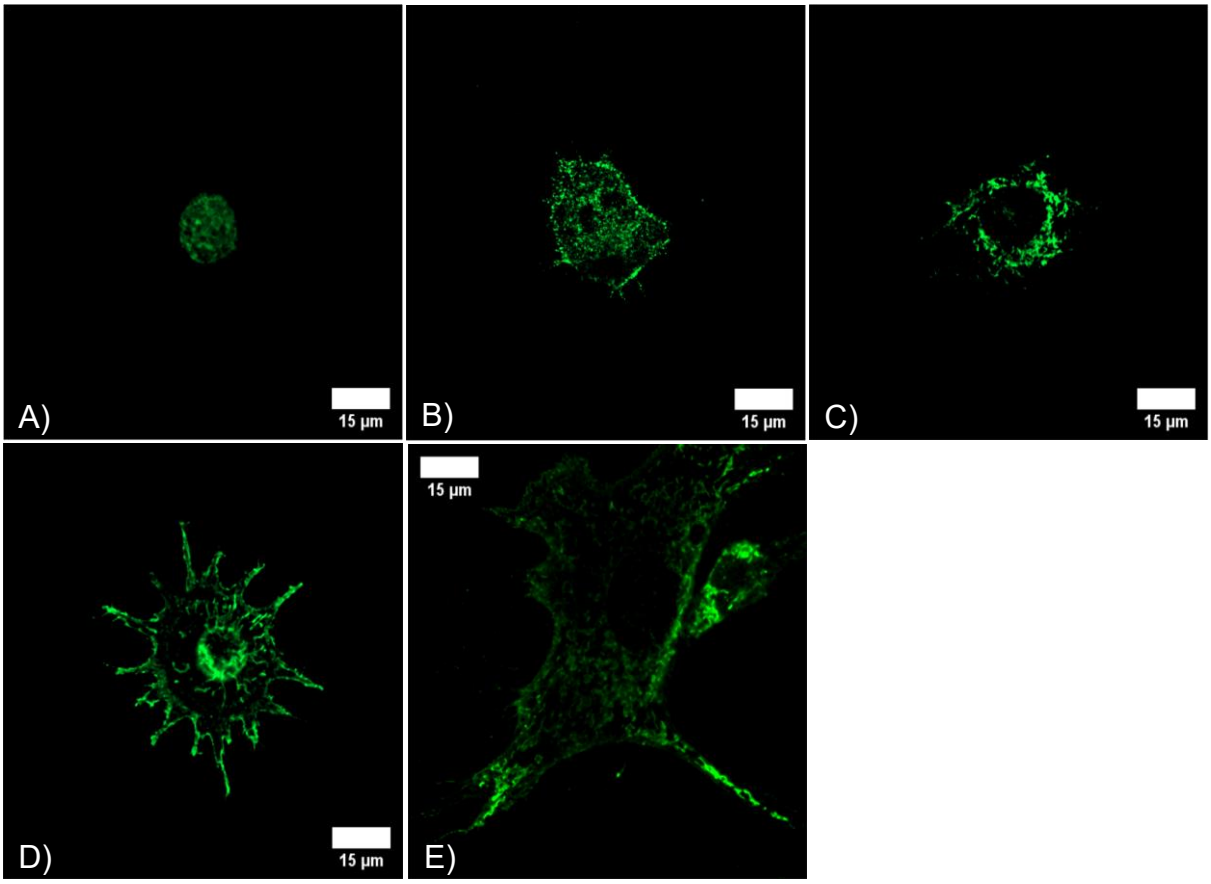


Figure 26 : Evolution de la proportion des sites d'ancrage au cours du temps. Marquage vinculine de cellules NIH-3T3 cultivées sur du titane pendant 15 minutes A), 30 minutes B), 1h C), 2h D ou 24h. Les images présentées ont un contraste et une brillance ajustés pour faciliter la visualisation des sites d'ancrage.

Cinq champs ont été acquis en Z-stack pour chaque temps d'incubation, de sorte à avoir au minimum 5 cellules à analyser. A partir de ces résultats, on peut calculer le pourcentage que représentent les sites d'ancrage par rapport à la surface totale de la cellule au cours du temps. Un exemple de série d'images obtenue est donné en Figure 26 dans le cas de cellules NIH-3T3 cultivées sur du titane pour différents temps d'incubation. Après traitement des images, la proportion surfacique des sites d'ancrage est donnée en fonction du temps d'incubation en Figure 27. Les résultats obtenus pour des cellules MC3T3-E1 cultivées sur du titane sont également indiqués.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

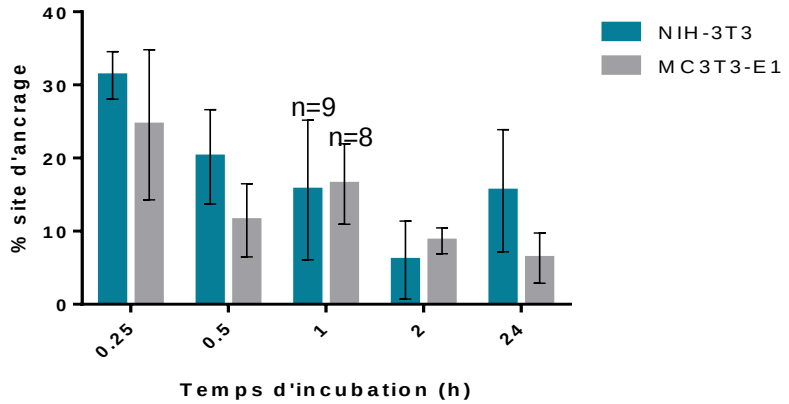


Figure 27 : Evolution de la proportion des sites d'ancrage au cours du temps pour les cellules NIH-3T3 et MC3T3-E1 cultivées sur du titane. Les valeurs correspondent à la moyenne calculée sur n=5 cellules, sauf pour 1h d'incubation où le nombre n de cellules analysées est indiqué. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type mesuré.

Tableau 4 : Résultats du test de la plus petite différence significative (LSD) de Fisher effectuée pour comparer la proportion des sites d'ancrage au cours du temps.

	Time (h)	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF	Significance
NIH-3T3	0.25 vs. 0.5	31,3	20,2	11,1	4,3	5	5	2,6	47	*
	0.25 vs. 1	31,3	15,6	15,7	3,8	5	9	4,2	47	***
	0.25 vs. 2	31,3	6,1	25,2	4,3	5	5	5,9	47	****
	0.25 vs. 24	31,3	15,5	15,8	4,3	5	5	3,7	47	***
	0.5 vs. 1	20,2	15,6	4,5	3,8	5	9	1,2	47	ns
	0.5 vs. 2	20,2	6,1	14,1	4,3	5	5	3,3	47	**
	0.5 vs. 24	20,2	15,5	4,7	4,3	5	5	1,1	47	ns
	1 vs. 2	15,6	6,1	9,6	3,8	9	5	2,6	47	*
	1 vs. 24	15,6	15,5	0,1	3,8	9	5	0,0	47	ns
	2 vs. 24	6,1	15,5	-9,5	4,3	5	5	2,2	47	*
MC3T3-E1	0.25 vs. 0.5	24,5	11,5	13,1	4,3	5	5	3,1	47	**
	0.25 vs. 1	24,5	16,5	8,1	3,8	5	8	2,1	47	*
	0.25 vs. 2	24,5	8,7	15,9	4,3	5	5	3,7	47	***
	0.25 vs. 24	24,5	6,3	18,2	4,3	5	5	4,3	47	****
	0.5 vs. 1	11,5	16,5	-5,0	3,8	5	8	1,3	47	ns
	0.5 vs. 2	11,5	8,7	2,8	4,3	5	5	0,7	47	ns
	0.5 vs. 24	11,5	6,3	5,2	4,3	5	5	1,2	47	ns
	1 vs. 2	16,5	8,7	7,8	3,8	8	5	2,0	47	*
	1 vs. 24	16,5	6,3	10,1	3,8	8	5	2,6	47	*
	2 vs. 24	8,7	6,3	2,4	4,3	5	5	0,6	47	ns

Les résultats du test de la plus petite différence significative (LSD) de Fisher sont présentés dans le Tableau 4. On observe une tendance à la diminution des sites d'ancrage au cours du temps. La diminution est significative entre le temps 15 minutes et tous les autres points de temps. Les résultats sont similaires pour les deux lignées cellulaires utilisées. Il est surprenant d'avoir un pourcentage aussi important de sites d'ancrage à 15 minutes (par rapport à l'image présentée en Figure 26A) et on s'attendrait plutôt à la formation d'extensions membranaires après sédimentation, donc très peu de sites

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

d'ancrage [83]. Toutefois, à 15 minutes, les cellules n'ont pas une bonne adhésion et sont probablement éliminées par les différentes étapes jusqu'à l'immunomarquage. Il est probable que le nombre de cellules non adhérentes diminue au cours du temps et que l'analyse de quelques cellules adhérentes ne reflète pas complètement le processus d'ancrage. Ces données sur le nombre de cellules à éliminer devront donc être considérées au même titre que la densité cellulaire et l'étalement de la cellule sur le biomatériau.

2 Analyse morphologique cellulaire par MEB

L'étude morphologique de la cellule a été effectuée avec les mêmes échantillons que ceux pour l'étude des sites d'ancrage. Après avoir retiré la lamelle, le milieu de montage a été éliminé dans des bains successif de PBS. Puis, les cellules ont à nouveau été fixées avec du glutaraldéhyde à 4% pour obtenir un bon contraste en microscopie électronique. Les cellules ont enfin été déshydratées grâce à des bains successifs d'éthanol de concentration croissante. Les cellules déshydratées ont été conservées au sec jusqu'au moment de l'acquisition des images.

2.1 Densité et étalement cellulaire

Des images MEB ont été acquises sous haut vide en collectant les électrons secondaires avec une tension d'accélération de 10 kV et une taille de sonde de 2,5. Le comptage des cellules a été effectué sur cinq images ayant un grossissement de 150. L'étalement cellulaire a été évalué sur des images ayant un grossissement de 600, 800, 1500 ou 4000 en fonction de la facilité à bien distinguer les contours.

Pour compter et mesurer la surface des cellules, la binarisation des images pour l'utilisation de l'outil « analyse de particules » a été explorée. Cependant le seuillage des images n'était pas satisfaisant, comme le montrent les Figure 29Figure 28B et Figure 29B. Le comptage des particules sur le masque binaire était biaisé, comme le montre l'ovale bleu sur la Figure 29C. En effet, pour une seule cellule, l'outil pouvait comptabiliser plusieurs particules (voir cellule entourée en rouge sur les Figure 29B et Figure 29C. Différents filtres, tels que « variance » ou « unsharp mask » ont été testés sans succès pour mettre en évidence les contours des cellules. Une analyse manuelle pour le comptage et la surface cellulaire a donc été privilégiée (cf Figure 28C et Figure 29D).

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

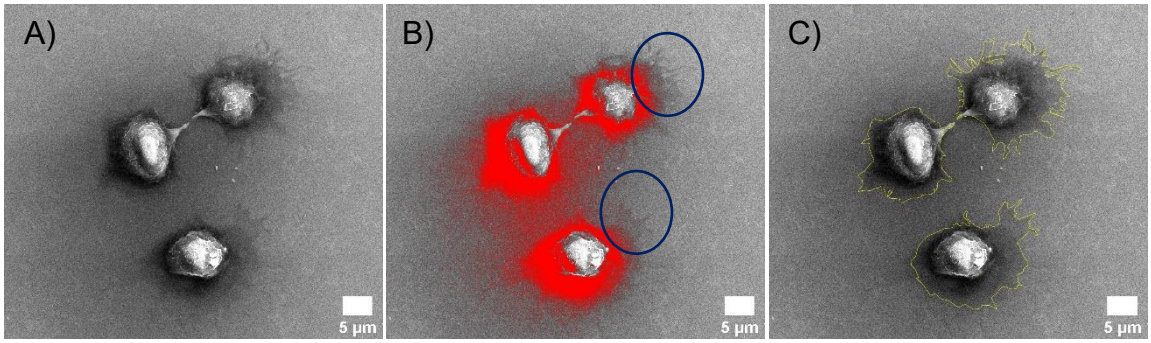


Figure 28 : Exemple d'analyse de l'étalement de la cellule. A) Image MEB après ajustement du contraste et de la brillance, B) seuillage de l'image A), C) dessin manuel du contour des cellules.

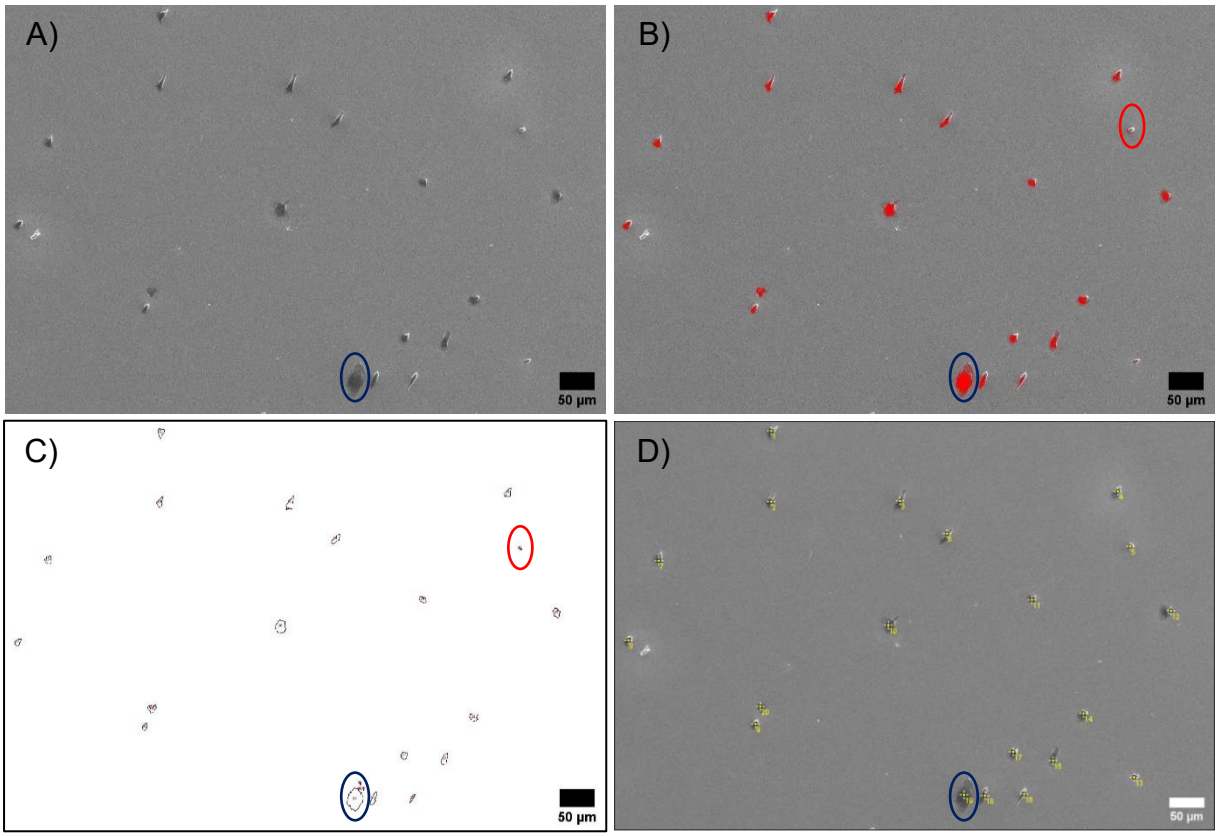


Figure 29 : Exemple d'analyse pour le comptage des cellules. A) Image MEB après ajustement du contraste et de la brillance, B) seuillage de l'image A), C) contour des particules comptabilisée pour une analyse de particule de taille comprise entre 5 et l'infini, D) comptage manuel des cellules.

La Figure 30 présente l'évolution de la densité cellulaire et de la surface cellulaire en fonction du temps d'incubation des cellules NIH-3T3 (en bleu) et MC3T3-E1 (en gris) sur du titane. Les résultats d'analyse de la variance à deux facteurs (type de cellule, temps d'incubation) sont présentés en Tableau 5 pour la densité cellulaire, et Tableau 6 pour l'étalement cellulaire. Ces analyses révèlent que la quantité totale des cellules ensemencées est adhérée sur le biomatériau à partir d'une heure d'incubation. La cinétique d'adhésion est la même pour les deux lignées cellulaires. La surface maximale d'étalement

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

des cellules est atteinte à 2h d'incubation pour les deux lignées cellulaires (Figure 30B). Cependant, on note une densité cellulaire statistiquement plus importante pour les cellules NIH-3T3 à 24h d'incubation (Figure 30A) comparée aux cellules MC3T3-E1. Ce résultat est cohérent avec le cycle cellulaire plus court observé pour les cellules NIH-3T3 dans les conditions de culture. On remarque également que les cellules MC3T3-E1 ont une disparité importante dans l'étalement cellulaire comparé aux cellules NIH-3T3.

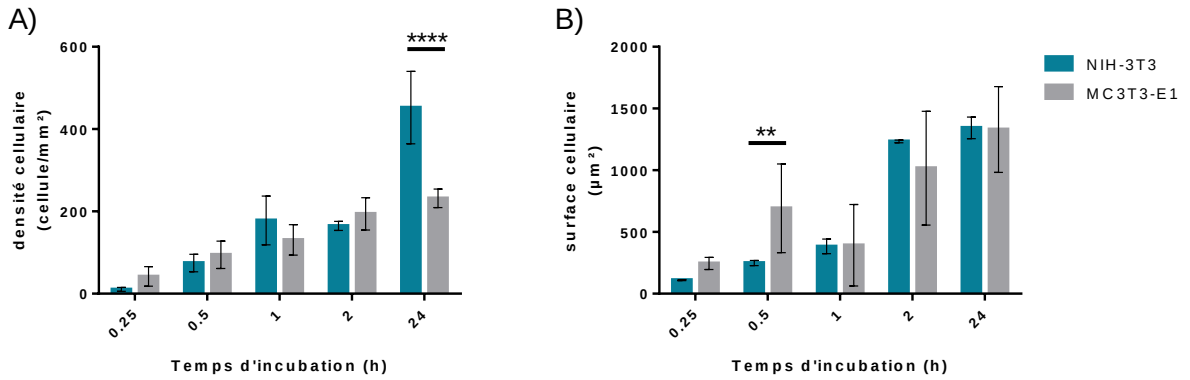


*Figure 30 : Evolution de la densité A) et de la surface B) cellulaire au cours du temps. Les résultats sont présentés comme la moyenne +/- ET, avec n=5 pour A) et n=20 pour B). Test statistique ANOVA à deux facteurs avec p<0,0001 ****.*

Tableau 5 : Résultats de l'ANOVA à 2 facteurs effectué pour comparer la densité cellulaire au cours du temps des deux lignées cellulaires.

NIH-3T3 - MC3T3-E1	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF	Significance
0.25	10,5	41,9	-31,4	26	5	5	1,2	40	ns
0.5	74,6	94,6	-20,0	26	5	5	0,8	40	ns
1	178,0	130,9	47,1	26	5	5	1,8	40	ns
2	164,6	194,0	-29,4	26	5	5	1,1	40	ns
24	452,3	231,8	220,5	26	5	5	8,5	40	****

Tableau 6 : Résultats de l'ANOVA à 2 facteurs effectué pour comparer l'étalement cellulaire au cours du temps des deux lignées cellulaires.

NIH-3T3 - MC3T3-E1	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF	Significance
0.25	110,2	245,3	-135	187,1	20	20	0,7216	126	ns
0.5	248,7	692,1	-443,4	122,5	20	20	3,62	126	**
1	382,8	562,6	-179,8	95,27	20	20	1,887	126	ns
2	1233	1017	216,1	139,5	20	20	1,55	126	ns
24	1343	1330	13,37	147	20	20	0,091	126	ns

Ces résultats mettent en évidence la capacité des deux lignées cellulaires à adhérer, à proliférer et à s'étaler sur le titane. La prolifération des cellules sur différents biomatériaux peut s'évaluer par des tests *in vitro* classiques type PrestoBlue® sur une grande quantité de cellules. Notre analyse porte certes sur un nombre limité de cellules mais permet également d'explorer l'interface cellule-biomatériau par MEB.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

2.2 Interface cellule biomatériau

Afin d'étudier les interactions physiques entre la cellule et le biomatériau, nous nous sommes intéressés à l'interface entre les deux partenaires. Cette analyse a été menée en mode haut vide sur les mêmes échantillons que précédemment. Pour visualiser l'interface, une pièce cylindrique a été usinée au laboratoire de sorte à avoir une pré-inclinaison de 45° de l'échantillon. Comme le montre la Figure 31, en cumulant cette pré-inclinaison avec une inclinaison de 40° du porte échantillon du microscope, nous avons pu atteindre une inclinaison totale de 85°.

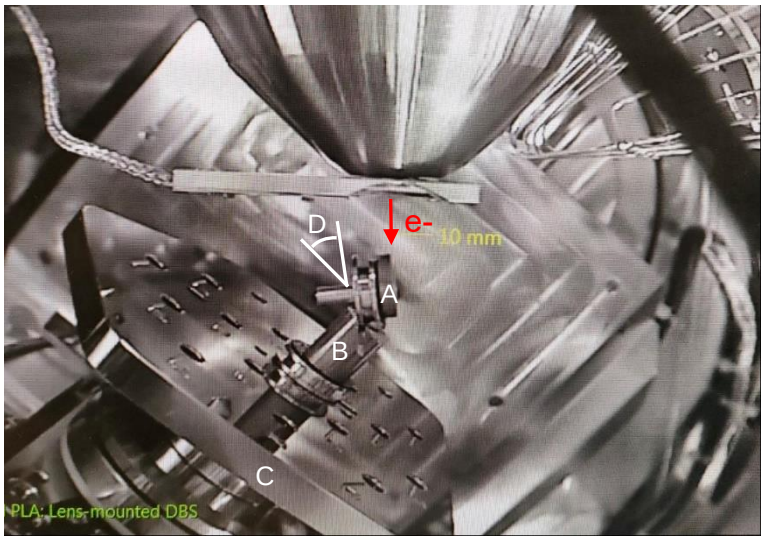


Figure 31 : Schéma du montage du porte-échantillon pour l'imagerie de l'interface entre les cellules et le biomatériau. A) Disque de titane avec des cellules NIH-3T3 cultivées 30 minutes, puis fixées et déshydratées. B) Cylindre usiné pour accueillir l'échantillon avec D) une pré-inclinaison de 45°. C) Porte échantillon du microscope incliné à 40°.

Le microscope dispose de paramètres spéciaux pour conserver la mise au point sur toute l'image pour l'acquisition d'images d'échantillon inclinés et corriger d'éventuelles déformations de la projection de l'échantillon engendrées par l'inclinaison. Ces paramètres sont le « dynamic focus » et le « tilt correction ». Pour le paramètre « tilt correction » il est également possible de renseigner l'angle de pré-inclinaison de l'échantillon le cas échéant. Afin de déterminer l'intérêt d'utiliser ces paramètres, des images MEB ont été collectées en conservant les paramètres d'acquisition standards (tension d'accélération, taille de sonde, vitesse de balayage, distance de travail, focus et grossissement). Un seul paramètre spécial a été changé à la fois. Le comparatif de ces paramètres est regroupé dans la Figure 32.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

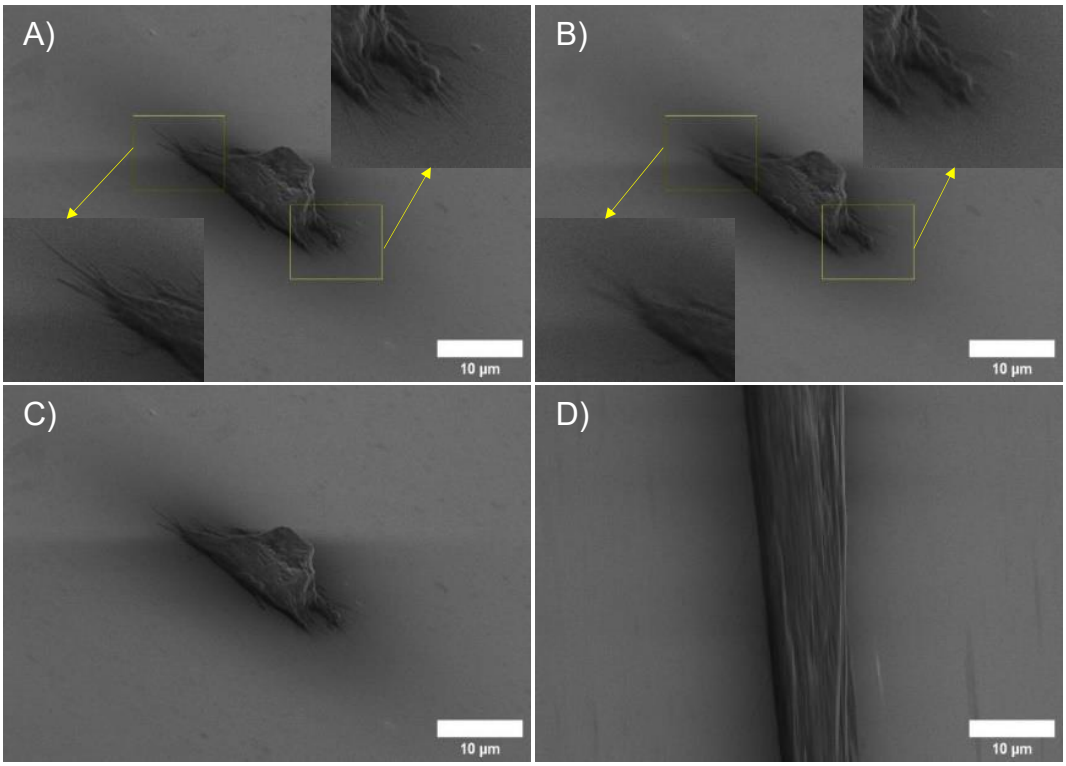


Figure 32 : Evaluation des paramètres spéciaux du microscope. A) « Dynamic focus » et « tilt correction » désactivés. B) « Dynamic focus » activé et « tilt correction » désactivé. C) « Dynamic focus » désactivé et « tilt correction » activé avec une pré-inclinaison de l'échantillon renseignée à 0°. D) « Dynamic focus » désactivé et « tilt correction » activé avec la réelle pré-inclinaison de l'échantillon de 45° renseignée. Distance de travail de 10 mm.

Lorsque le « dynamic focus » est désactivé, la mise au point est faite sur la cellule entière (cf rectangle Figure 32A). En revanche, lorsque l'on active le « dynamic focus » le centre de la cellule reste nette mais les extrémités deviennent floues, comme on peut le voir dans les rectangles Figure 32B. L'activation du « tilt correction » en renseignant la pré-inclinaison de l'échantillon de 45° conduit étonnamment à une projection étirée de la cellule (cf Figure 32D). En revanche, en ignorant la pré-inclinaison de l'échantillon, la projection reste cohérente avec les autres images (cf Figure 32C). Suite à ces résultats, l'acquisition des images a été effectué sans tenir compte de ces paramètres spéciaux.

L'imagerie de l'interface cellule-biomatériau met en évidence une diminution de l'épaisseur de la cellule au cours du temps (Figure 33). Ce résultat est cohérent avec l'augmentation de la surface cellulaire observée précédemment (Figure 30B). De même, on constate qu'à 2h d'incubation l'épaisseur de la cellule est comparable à l'épaisseur de la cellule à 24h d'incubation (Figure 33F-G). Cependant, cette méthode ne permet pas d'analyser l'interface cellule-biomatériau sur l'ensemble de la cellule. De plus, lorsque la membrane est très étalée, l'interface cellule-biomatériau n'est pas décelable même à fort grossissement comme le montrent les ovales rouges sur les Figure 33D et Figure 33H.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

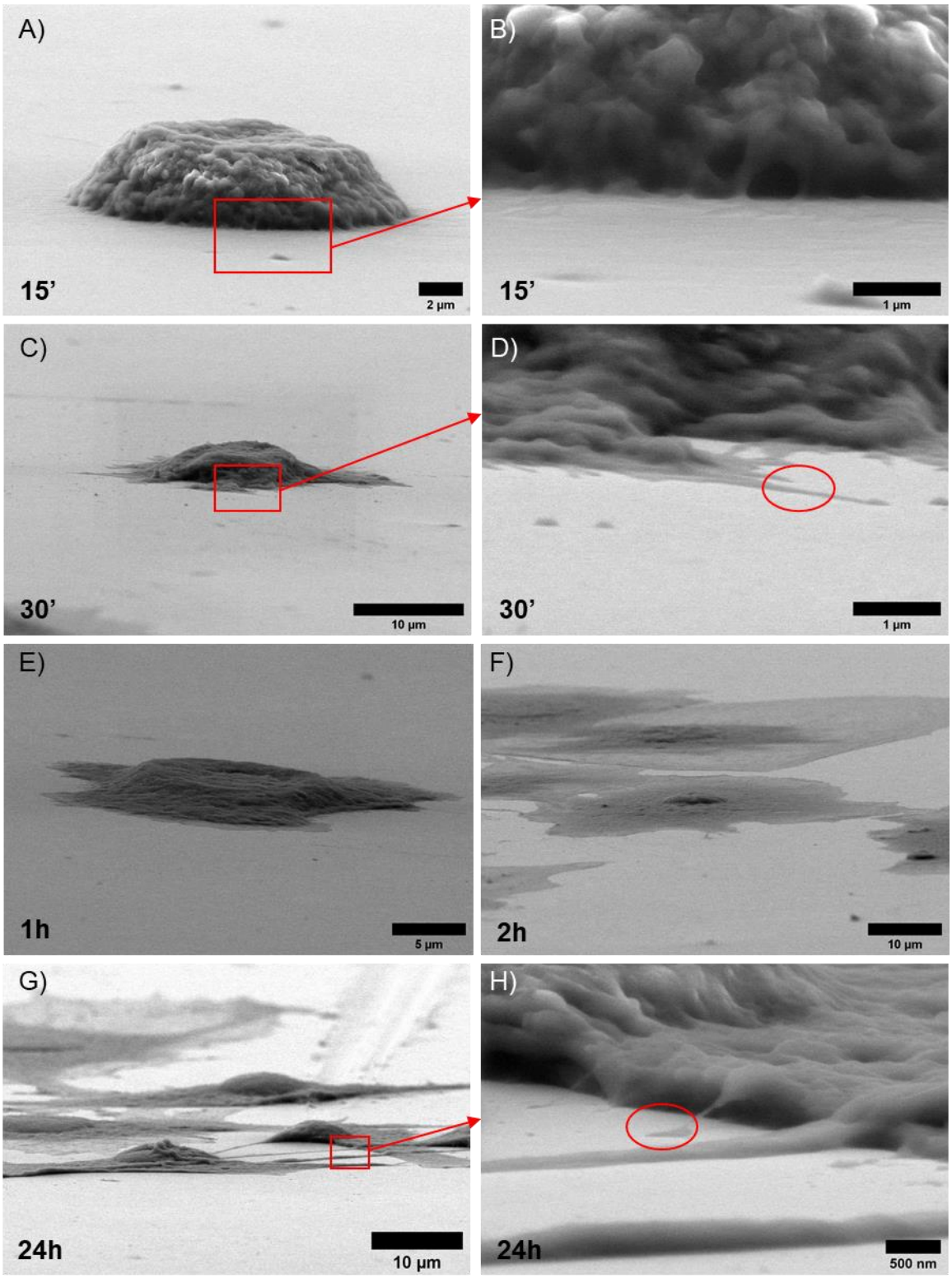


Figure 33 : Images MEB obtenues à une distance de travail de 10 mm en collectant les électrons secondaires à une tension d'accélération de 5 kV pour une inclinaison de 85° de l'échantillon. Cellules MC3T3-E1 cultivées sur du titane pendant 15 minutes A) et B), 30 minutes C) et D), 1h E), 2h F) ou 24h G) et H). Les images B), D) et H) correspondent à un grossissement des zones notifiées par un rectangles rouges sur les images A), C) et G) respectivement.

Nous avons choisi de poursuivre l'étude de la morphologie cellulaire en reconstruisant le volume 3D de la cellule, pour voir s'il était possible de quantifier l'épaisseur de la cellule et de visualiser l'interface cellule-biomatériau.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

2.3 Volume 3D

Des images MEB ont été acquises en collectant les électrons secondaires à différents angles d'inclinaison (-5°, 0°, 8°,16° 24°, 32° et 40°), et de rotation (pas de 45°) du porte-échantillon, l'échantillon étant pré-incliné à 45°. Ces mouvements sont illustrés dans la Figure 34.

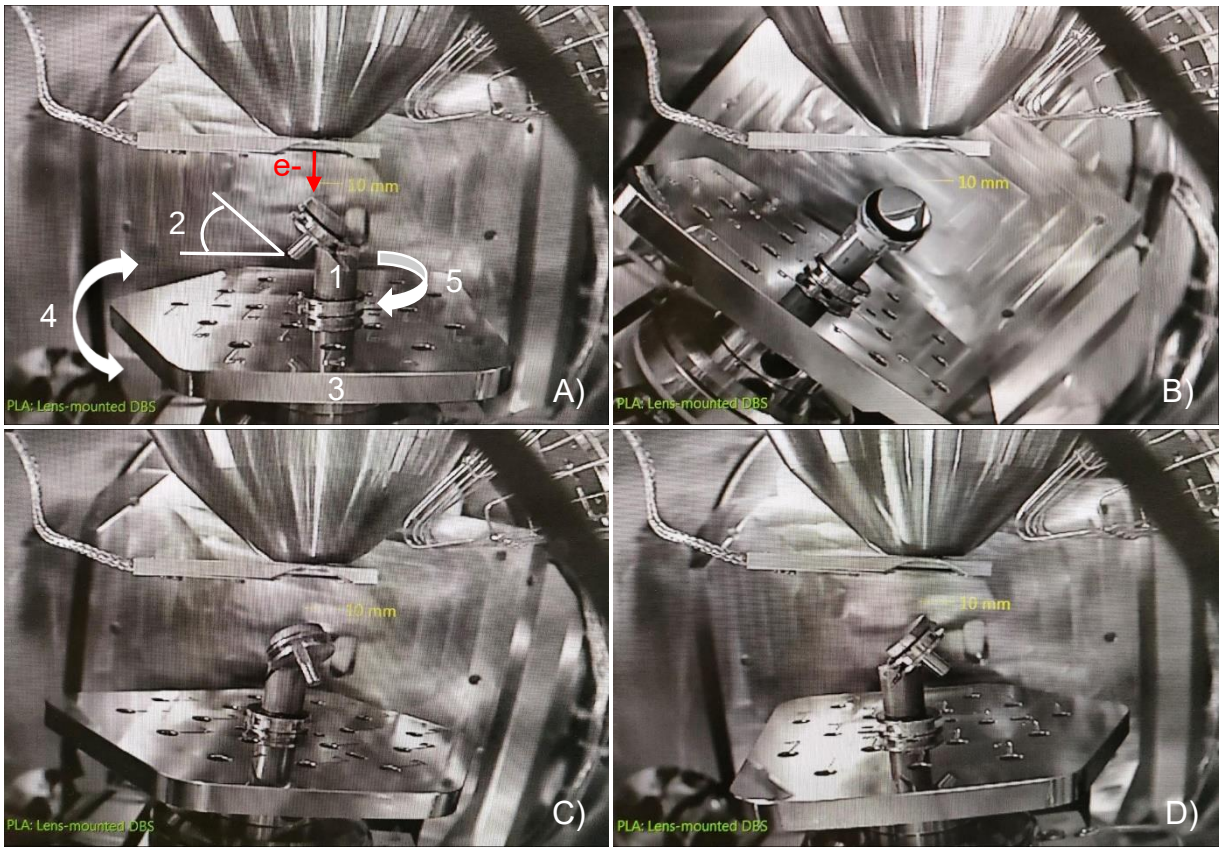


Figure 34 : Montage de l'échantillon de pour l'acquisition des images pour les analyses 3D. Explication des mouvements de l'échantillon dans le microscope 1) cylindre usiné pour accueillir l'échantillon, 2) pré-inclinaison de 45° de l'échantillon, 3) porte échantillon du microscope, 4) sens d'inclinaison du porte échantillon du microscope et 5) sens de rotation du porte échantillon du microscope. A) Porte échantillon avec une inclinaison et une rotation de 0°. B) Porte échantillon incliné à 40° et tourné à 90°. C) Porte échantillon incliné à 8° et tourné à 135°. D) Porte échantillon incliné à -5° et tourné à 180°.

Quelques images de la série sont représentées sur la Figure 35. La rotation sur 360° et l'inclinaison de l'échantillon permettent de mettre en évidence des informations sur le volume et la morphologie de la cellule. L'image Figure 35C montre une différence d'épaisseur de la cellule alors que l'image Figure 35F met en évidence que la partie de la cellule qui semble plus épaisse n'est pas en contact avec le matériau.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

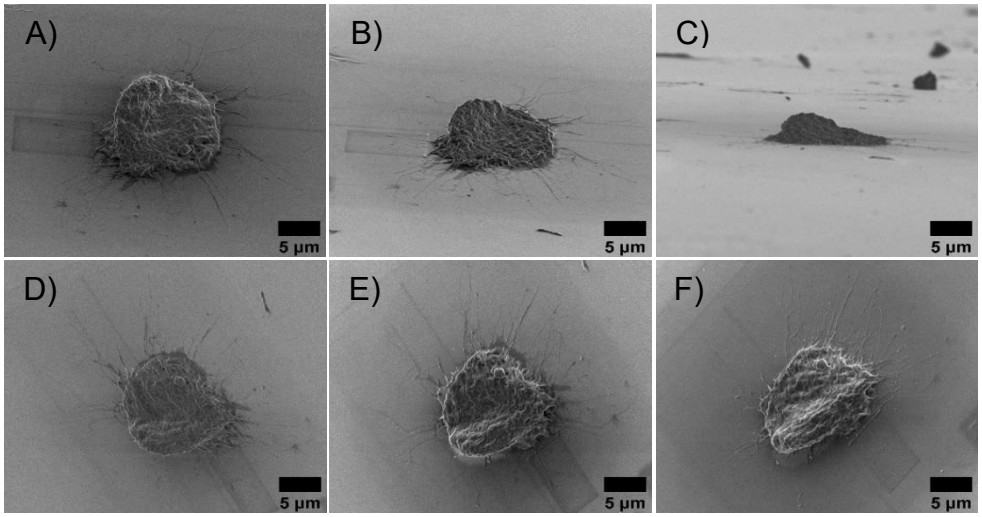


Figure 35 : Exemple d'images acquises sur une cellule NIH-3T3 cultivée 30 minutes sur un disque de titane, puis fixée et déshydratée. Les angles d'inclinaison et de rotation sont respectivement : A) –5° et 180°, B) 16° et 180°, C) 40° et 180°, D) –5° et 45°, E) 16° et 45°, F) 40° et 45°.

Le logiciel photogrammétrique libre d'accès Meshroom, téléchargeable sur le site internet https://alicevision.org/#meshroom, a été utilisé pour la reconstruction du volume de la cellule. Ce logiciel est normalement utilisé pour effectuer des reconstructions d'objets macroscopiques photographiés sous différents points de vue, tels que des immeubles ou des pièces de musée. Les images constituent les seules données d'entrée. Il n'est pas nécessaire de communiquer les différents angles (inclinaison et rotation) au logiciel. La reconstruction est composée d'un fil d'Ariane, c'est-à-dire une chaîne de calculs successifs modulables par l'utilisateur. Les différentes étapes de la chaîne de calcul sont expliquées sur le lien https://alicevision.org/#photogrammetry. Brièvement, la reconstruction repose sur :

- l'extraction des pixels communs à chaque image par le biais d'algorithmes. L'algorithme le plus couramment utilisé est le SIFT (scale-invariant feature transformation),
- le regroupement des images orientées de la même manière,
- l'appariement des images,
- la compréhension de la relation géométrique des images d'entrées,
- l'évaluation de la profondeur de chaque pixel à partir des informations géométriques,
- la représentation surfacique de l'échantillon en créant une maille,
- La texturation du maillage obtenu précédemment.

Toutes ces étapes comprennent de nombreuses options à sélectionner et peuvent être dupliquées par l'utilisateur en formant des ramifications de la chaîne de calcul. Un exemple de calcul est donné Figure 36. Seules deux séries d'images ont permis l'obtention d'un objet 3D en faisant varier à tâtons les paramètres des différentes étapes.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

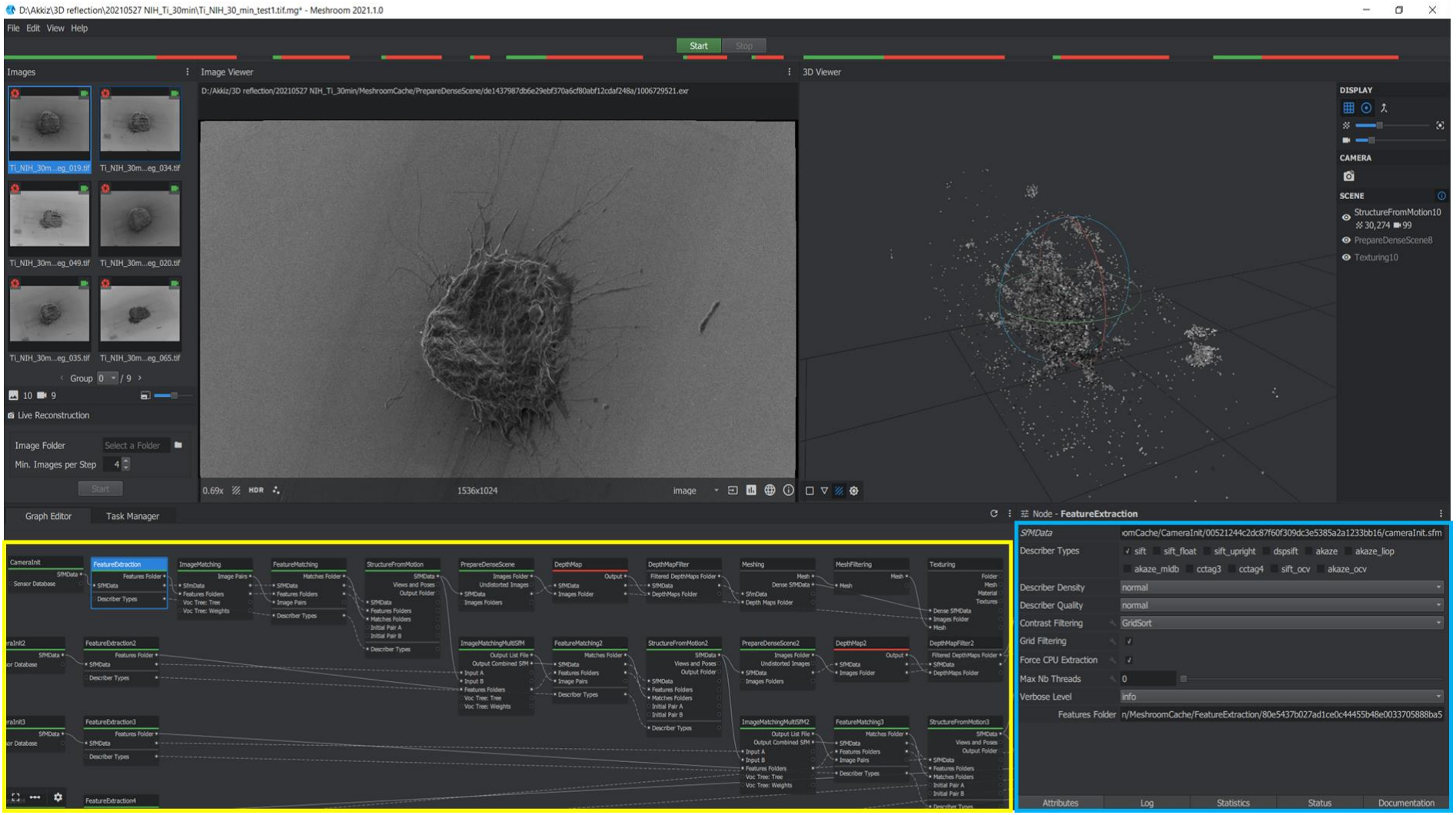


Figure 36 : Interface du logiciel Meshroom avec dans l'encadré jaune un exemple de ramification de la chaîne de calcul et dans l'encadré bleu les différentes options dont les algorithmes.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Deux exemples de reconstructions avec des informations manquantes sont donnés en Figure 37 (voir cercles rouges). On observe que la reconstruction obtenue avec une chaîne de calcul avec seulement une itération présente une surface plane pour le titane (voir Figure 37A). Les artefacts surfaciques du biomatériau, visibles sur la Figure 37B, sont probablement liés à la duplication des chaînes de calcul.

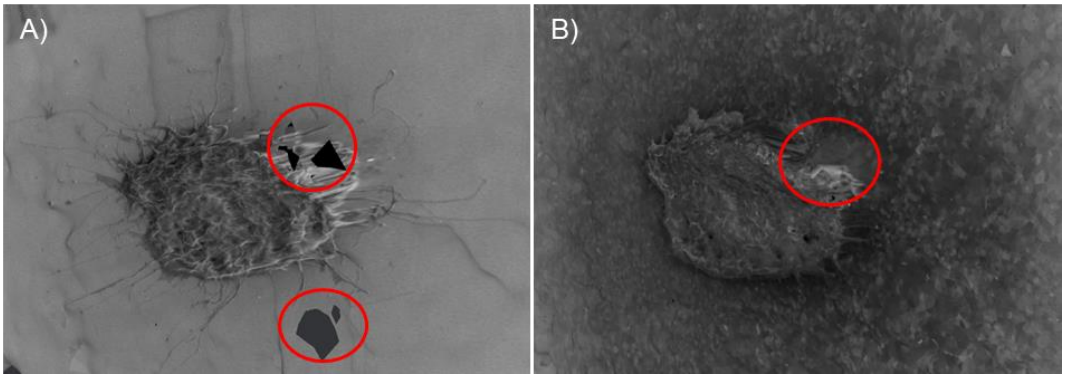


Figure 37 : Exemple de reconstruction 3D incomplètes. A) Reconstruction obtenue avec un seul calcul d'une itération de la chaîne de calcul. B) Reconstructions obtenue après 10 duplications de la chaîne de calcul.

Le volume 3D obtenu le plus fidèle aux images 2D est présenté Figure 38. La topographie de la surface de la cellule est comparable à la surface des images 2D. Néanmoins, le biomatériau apparaît rugueux alors que la surface est plane. De plus, les filopodes que l'on arrive à bien distinguer sur les images 2D (voir flèches Figure 38A) disparaissent avec la reconstruction. Une meilleure reconstruction est peut-être possible mais nécessite un fort investissement en temps pour comprendre le fonctionnement du logiciel.

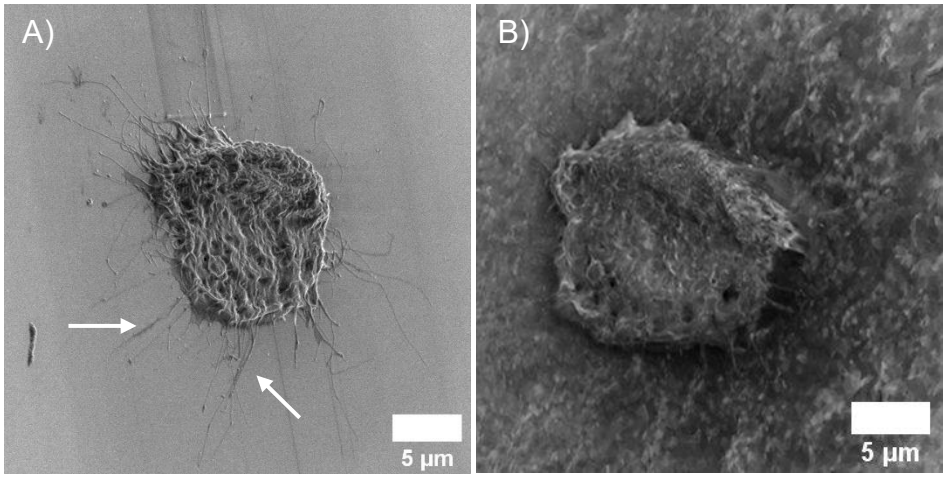


Figure 38 : Volume 3D de la surface d'une cellule NIH-3T3 cultivée 30 minutes sur du titane. A) Images MEB obtenues en collectant les électrons secondaires à 2 kV avec une inclinaison de 8° et une rotation de -90° B). Objet reconstruit à partir de la série d'images tiltées et tournées en utilisant le logiciel Meshroom.

En parallèle de l'utilisation de Meshroom, nous avons pris contact avec le Dr Sounkalo Dembélé, enseignant-chercheur à l'Université de Franche-Comté. Son équipe a développé un logiciel de modélisation 3D d'imagerie de microscopie électronique. La collaboration initiée a permis d'identifier des axes d'amélioration d'une part sur la qualité des images

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

acquises et d'autre part sur le développement du logiciel à une modélisation sur 360°. Ceci pourra être continué lors de travaux futurs.

Les artefacts de surface du biomatériau générés par la reconstruction 3D par Meshroom et la nécessité d'acquisition d'images de bonne qualité nous ont également poussé à explorer des méthodes de débruitage basées sur l'intelligence artificielle. Deux méthodes, connues grâce à la participation à une conférence, Noise2Void et CSBDeep, ont été testées en important les plugins dans le logiciel ImageJ. La première étape pour ce type de méthode est la génération d'un modèle basé sur l'entrainement d'images bruitées. Puis, il convient d'appliquer ce modèle sur une image à débruiter pour obtenir ce que l'on appelle une « prédiction » de ce que l'image serait sans le bruit. Malgré la génération d'un modèle les tests n'ont jamais abouti à une image débruitée satisfaisante. Ce point sera à creuser pour la suite de ce travail. Une autre source d'artéfact morphologique, non explorée dans cette partie, est la déshydratation des cellules pour l'imagerie MEB classique [58]. De ce fait, l'analyse des cellules en mode environnemental a été investiguée.

Gontard *et al.* ont mené des travaux de reconstruction surfacique de particule de $LiTi_2(PO_4)_3$ par MEB [84]. L'approche est similaire cependant les outils utilisés différent, ses travaux mettent en évidence de nouvelles pistes de reconstructions 3D par photogrammétrie.

3 Analyse de la morphologie cellulaire en MEBE

Des images en mode environnemental ont été acquises pour étudier la morphologie cellulaire dans un état se rapprochant de l'état natif de la cellule. Pour ce faire, il a fallu couper le disque de titane pour pouvoir l'insérer sur le porte échantillon de la platine Peltier. Après avoir testé de nombreuses techniques de coupe, la scie à fil a été la plus efficace. Nous avons ainsi obtenu des pièces de titane carré de 2,5 mm² de côté. Les pièces ont été polies miroir de la même manière que les disques. Les cellules ont été cultivées sur les pièces de titane pendant 30 minutes, puis fixées et conservées dans du milieu tampon jusqu'à l'observation. Le réglage des différents paramètres d'acquisition des images a été optimisé sur le couple NIH-3T3/titane. Une humidité relative (HR) inférieure ou égale 45% est nécessaire pour réussir à distinguer la cellule tout en maintenant son hydratation. Ce taux d'HR est cohérent avec ce qui est présenté dans la littérature [85].

Le mode environnemental permet certes de maintenir la cellule hydratée mais la qualité du signal et la topographie cellulaire sont altérées (Figure 39B). La perte de détails de surface peut s'expliquer d'une part par la présence de vapeur d'eau (« skirt effect »), et d'autre part par la présence d'un mucus à la surface de la cellule qui est conservé par l'hydratation [85]. Ce mucus empêche une analyse plus fine de la topographie de la surface

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

cellulaire. La perte du degré de texturation du mode environnemental sur des échantillons biologiques a déjà été reporté [86].

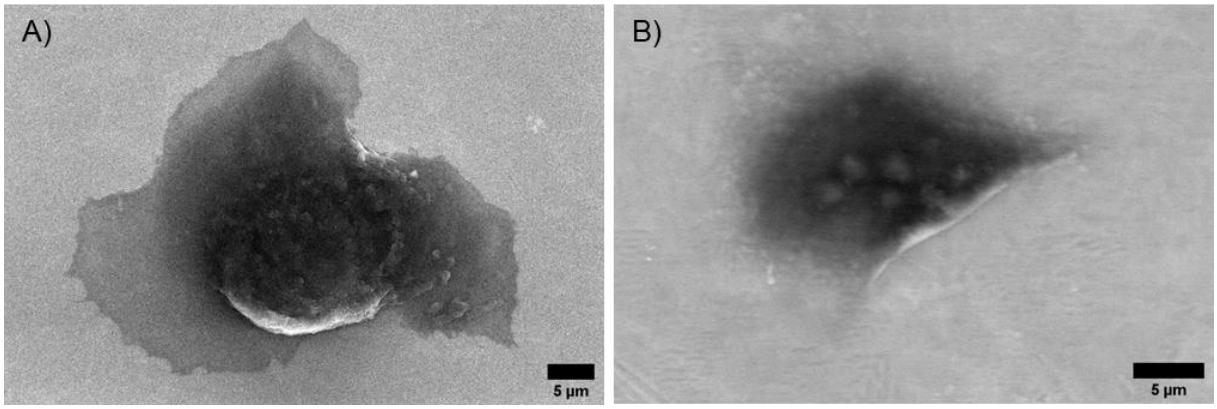


*Figure 39 : Images MEB de cellules MC3T3-E1 cultivées 30 minutes sur du titane. A) Image MEB d'une cellule fixée et **déshydratée** acquise en mode haut vide à une tension d'accélération de 10 kV, une vitesse de balayage de 800 ns, une taille de sonde de 2,5 et un courant de sonde à 49 pA. B) Image MEBE d'une cellule fixée et **hydratée** acquise en mode environnemental à 45% d'HR, soit 4°C à 360 Pa de vapeur d'eau, à une tension d'accélération de 10 kV, une vitesse de balayage de 10 µs, une taille de sonde de 5 et un courant de sonde de 1,6 nA.*

La collecte des électrons secondaires ne semble pas pertinente pour analyser les échantillons biologiques en mode environnemental, c'est pourquoi nous avons exploré la possibilité d'étudier une cellule entière par STEM en phase liquide.

4 Faisabilité d'étudier la morphologie cellulaire en 3D par tomographie STEM en phase liquide

Le STEM en phase liquide en MEBE est une technique ayant fait l'objet de nombreuses études au sein du laboratoire d'accueil de ce travail. Les études précédentes ont notamment mis en évidence la corrélation entre l'épaisseur du film d'eau à la surface de l'échantillon et la quantité d'électrons collectés donc le contraste qui en résulte [87]. Un portoir STEM tomographique a été développé dans le but d'étudier la structure et l'organisation de matériaux complexes [67]. Opérer en mode environnemental permet d'élargir l'application aux matériaux non-conducteurs [88]. L'application de cette technique aux cellules hydratées a été effectué grâce au portoir STEM tomographique présenté sur la Figure 40. L'épaisseur des disques de titane utilisée pour l'analyse des sites d'ancrage et de l'étalement était d'un millimètre. Cette épaisseur étant opaque aux électrons, nous avons décidé de mener ce test en utilisant une grille TEM en or recouverte d'un film de carbone recouvert de fibronectine. Les grilles TEM en or sont cytocompatibles contrairement aux grilles TEM en cuivre couramment utilisées en imagerie en transmission. Le film de carbone n'étant pas favorable à l'adhésion cellulaire, ce dernier a été incubé

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

avec la fibronectine qui est une protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire. Les cellules NIH-3T3 ont été cultivées 24h sur une grille en or avant d'être fixées au glutaraldéhyde, puis conservées dans du tampon phosphate à +4°C jusqu'à l'acquisition des images. La manipulation des grilles TEM a été très fastidieuse car elles sont très fragiles et s'endommagent facilement lors de la manipulation des échantillons pendant la culture cellulaire. Des NPs d'or de 20 nm de diamètre ont été ajoutées avant acquisition pour faciliter les réglages des conditions d'imagerie ainsi que l'alignement des images inclinées.

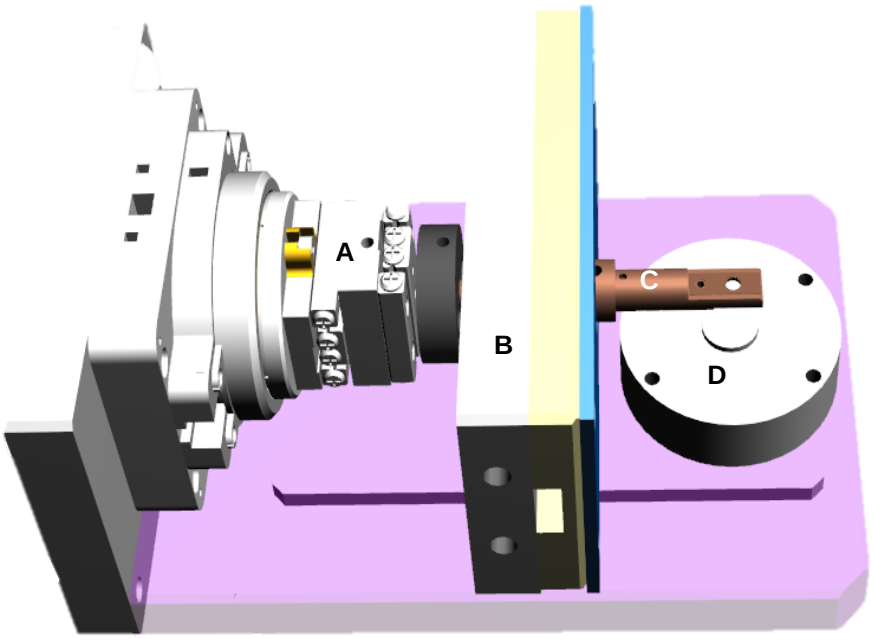


Figure 40 : Schéma du portoir STEM développé au laboratoire. A) Système piézoélectrique permettant la translation au point eucentrique et la rotation de l'échantillon. B) dispositif Peltier, C) porte échantillon, D) emplacement pour fixer le détecteur STEM. Image modélisée du portoir fournie par l'équipe d'ingénieure du laboratoire MATEIS.

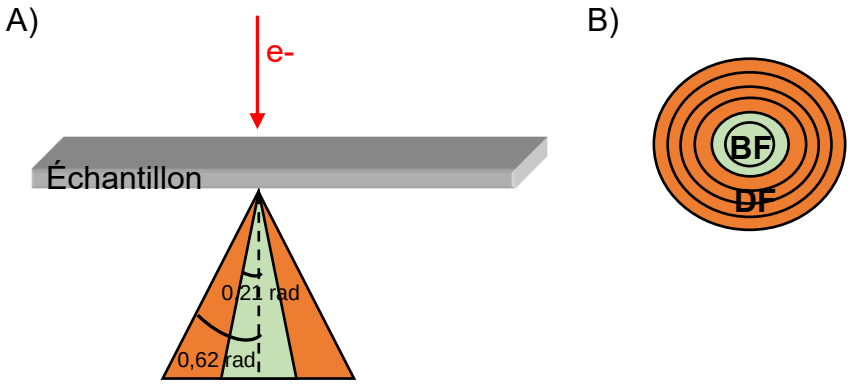


Figure 41 : Schéma des électrons collectés pour acquérir les images STEM. A) Chemin des électrons collectés. B) Schéma du détecteur STEM.

L'objectif de ce test étant d'analyser la cellule entière, nous avons choisi une cellule isolée et positionnée au centre d'un carreau du maillage de la grille TEM. Les images ont été acquises en mode champ clair (Bright Field BF) en collectant les électrons transmis au

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

centre du détecteur sur un angle βm de 0,21 rad et en mode champ sombre (Dark Field DF) en collectant les électrons diffusés sur un angle β_M compris entre 0,21 et 0,62 rad (voir Figure 41). L'échantillon a été maintenu hydraté grâce à une HR de 70% tout au long de l'acquisition, ce qui correspond à une pression partielle en vapeur d'eau de 530 Pa et à une température de 4°C. L'échantillon a été incliné de 58° à -44° avec un pas de 2°, les angles minimum et maximum d'inclinaison ayant été fixés de sorte à éviter toute inversion de contraste à l'intérieur de la cellule. Quelques images de la série en mode BF sont représentées sur la Figure 42.

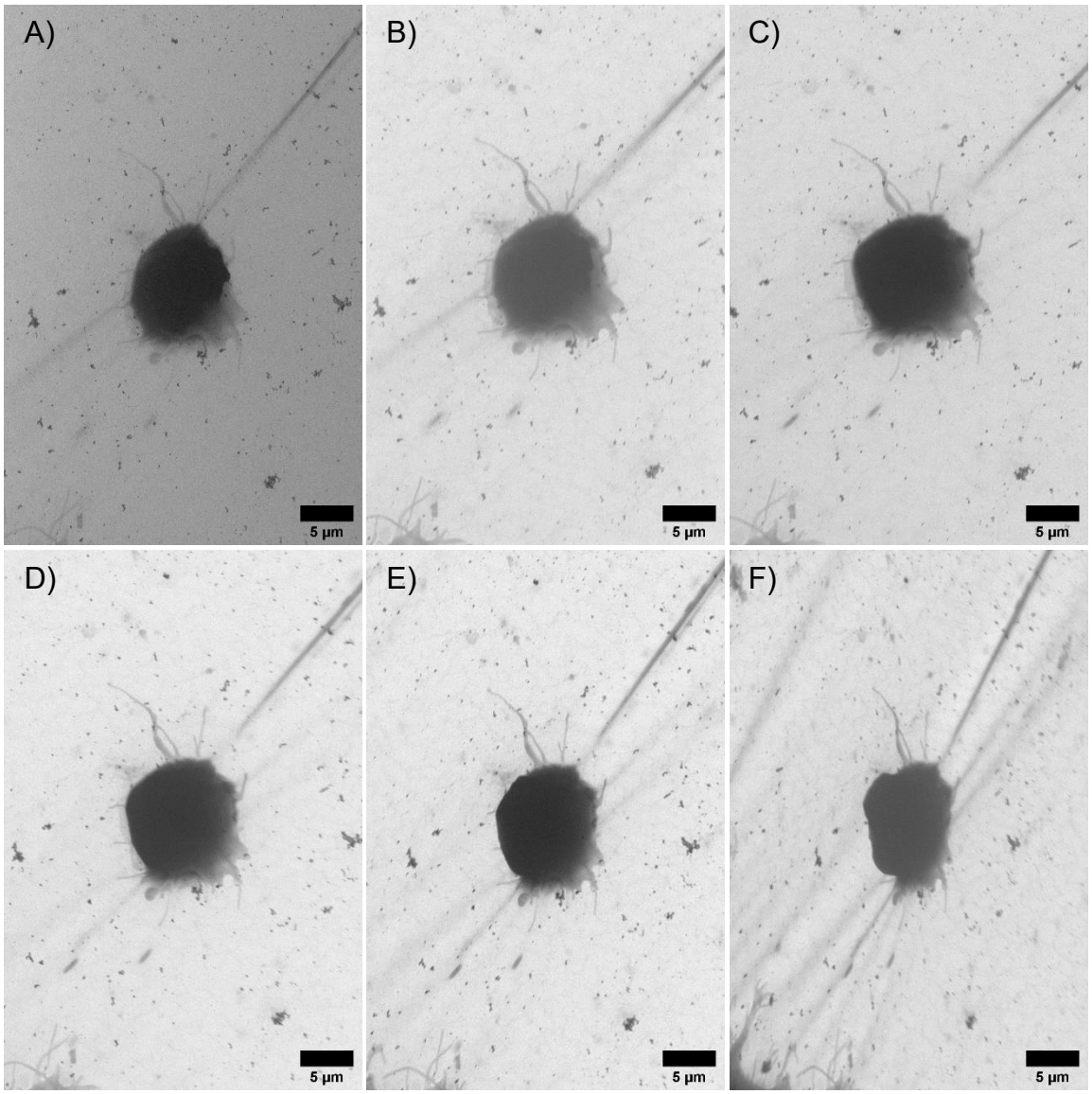


Figure 42 : Exemple d'images collectées en mode BF à différents angles d'inclinaison : A) -44°, B) -26°, C) 0°, D) 10°, E) 30° et F) 56°. Distance de travail 9 mm avec une tension d'accélération de 15 kV.

Les images obtenues ont été traitées pour une analyse 3D de la cellule. Le traitement d'images a été détaillé dans la thèse de Juan Xiao [89]. Brièvement le traitement d'images comporte trois étapes, qui sont :

- l'alignement : au cours de l'acquisition des images, on observe un déplacement

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

de la zone d'intérêt lorsque l'angle d'inclinaison est changé. Il peut s'expliquer par la précision du réglage du point eucentrique. L'alignement est effectué grâce au logiciel libre d'accès Etomo dans lequel les NPs d'or sont utilisées comme marqueur fiduciaire [90], [91]. L'alignement permet de fixer la position de la zone d'intérêt, ici la cellule, dans l'image. Les flèches de la Figure 43 mettent en évidence l'ajustement de l'image pour positionner la cellule au même endroit d'une image à l'autre. Autrement dit les images sont alignées dans un seul système de référence 3D.

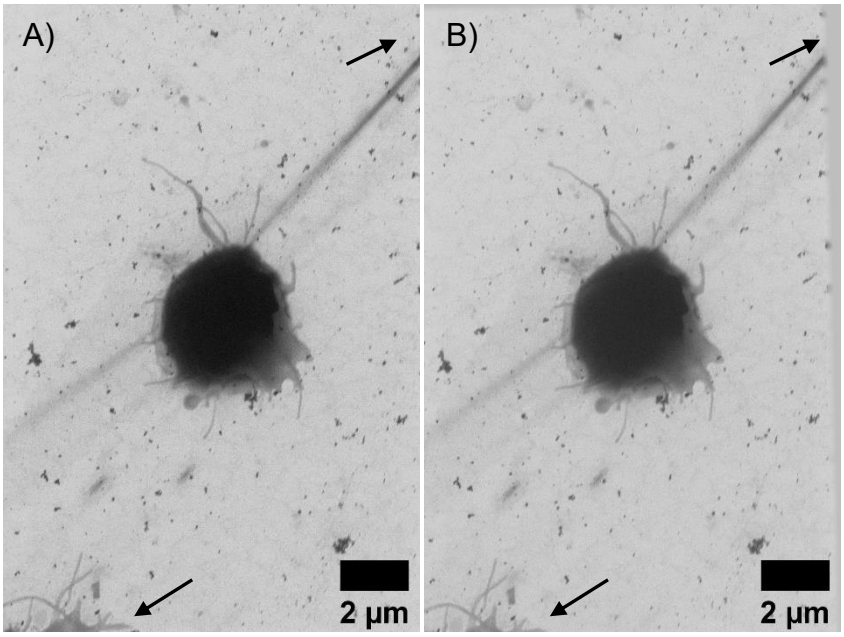


Figure 43 : Images STEM en mode BF d'une cellule NIH-3T3 cultivée 24h sur une grille TEM recouverte d'un film de carbone, fixée et hydratée avant A) et après B) alignement.

- La reconstruction du volume : le calcul de reconstruction du volume est réalisé sur les images alignées grâce au plugin TomoJ dans ImageJ. Il s'agit d'un plugin développé par Cédric Messaoudi *et al.* pour la tomographie en microscopie électronique en transmission [92]. L'algorithme OS-ART a été utilisé avec 16 itérations pour calculer les volumes des séries d'images en mode BF et DF.Après reconstruction, un filtre médian avec un rayon de 3 pixels, puis un filtre anisotropique 3D ont été appliqués au volume après reconstruction.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

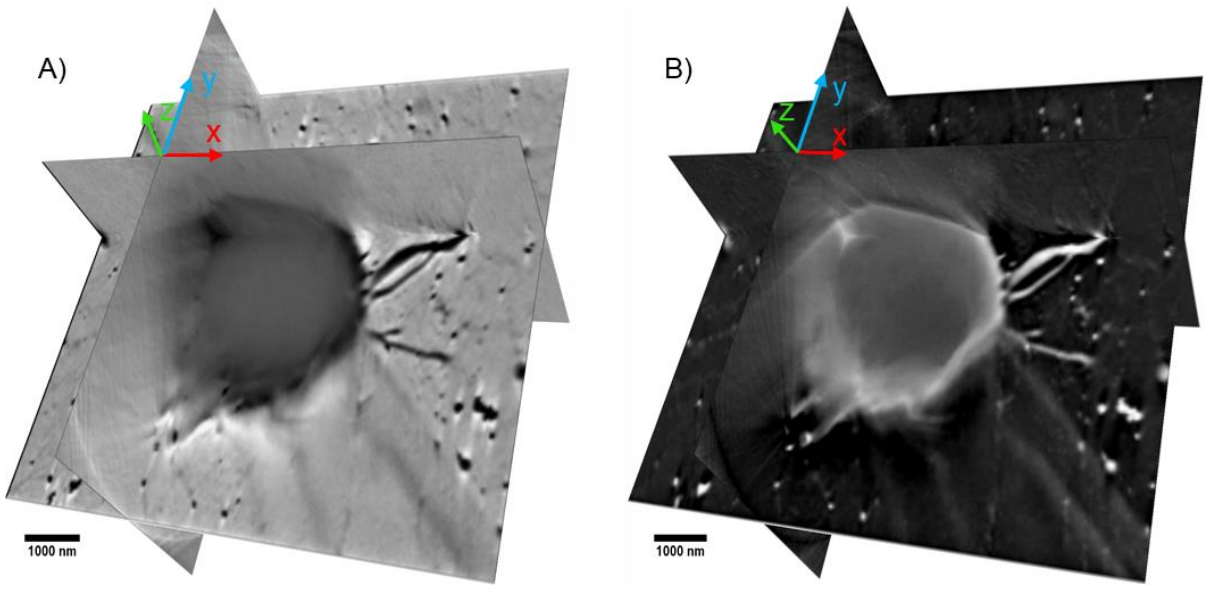


Figure 44 : Sections orthogonales du volume reconstruit d'une cellule NIH-3T3 à partir d'images collectées à différents angles. A) en mode BF ou B) en mode DF.

- La résolution spatiale d'un tomogramme peut être estimée grâce la méthode « Fourier Shell Correlation » (FSC) [93]. Au moment du calcul du volume dans TomoJ, il est possible de cocher l'option « FSC ». Concrètement, la série d'images alignées est subdivisée en deux en fonction du numéro des images. Le calcul du volume des séries d'images va générer deux volumes appelés « odd » et « even ». Ces deux volumes sont comparés avec l'algorithme FSC. La fréquence spatiale correspondant à l'intersection des courbes FSC et des critères définis en amont permettent d'estimer la résolution du volume [67]. Il est également possible d'estimer la résolution spatiale à partir des volumes « odd » et « even » sur le site suivant https://www.ebi.ac.uk/emdb/validation/fsc/.

- La segmentation est réalisée grâce au logiciel 3D Slicer. Elle permet de construire un modèle 3D (Figure 45) à partir du volume calculé. La segmentation est l'étape la plus fastidieuse et chronophage de la reconstruction 3D.

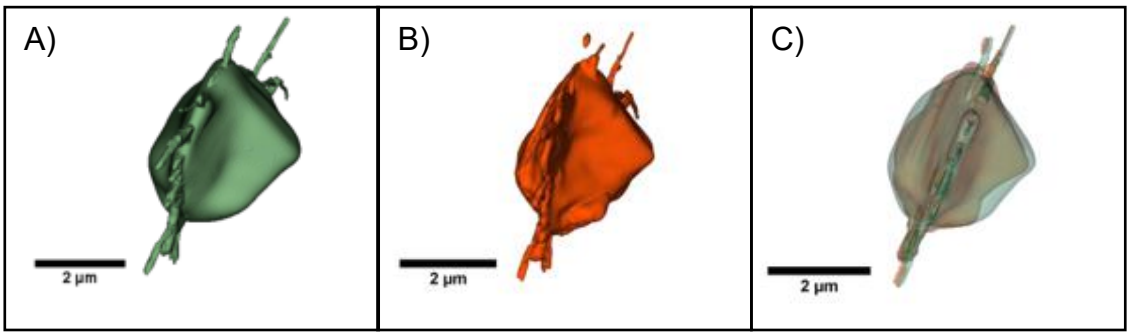


Figure 45 : Vue sagittale des modèles d'une cellule NIH-3T3 obtenus après segmentation des volumes reconstruits à partir d'images collectées A) en mode BF ou B) en mode DF. C) Superposition des deux modèles.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Le modèle 3D obtenu à partir de l'imagerie en mode BF permet de mesurer une épaisseur de cellule maximale de 3 µm et une épaisseur de filopodes variant entre 120 et 250 nm (Figure 45A). Avec le mode DF, les épaisseurs sont plus faibles, c'est-à-dire 2,5 µm pour la cellule et 70 à 250 nm pour les filopodes (Figure 45B). La différence de volume entre les deux modes a été évaluée à 13 ± 6 %. Lorsque l'on superpose les deux modèles, le volume cellulaire est plus important pour le mode BF. Les éléments chimiques constituant les cellules sont principalement le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, l'azote, le phosphore et le soufre. Ces éléments ont des numéros atomiques faibles c'est pourquoi le mode BF est habituellement choisi pour étudier les échantillons biologiques. La Figure 46 présente les plans yz (Figure 46A et B) et xz (Figure 46C et D) des volumes obtenus pour les modes BF (Figure 46A et C) et DF (Figure 46B et D), ces orientations ont une résolution spatiale moindre par rapport à l'orientation XY.

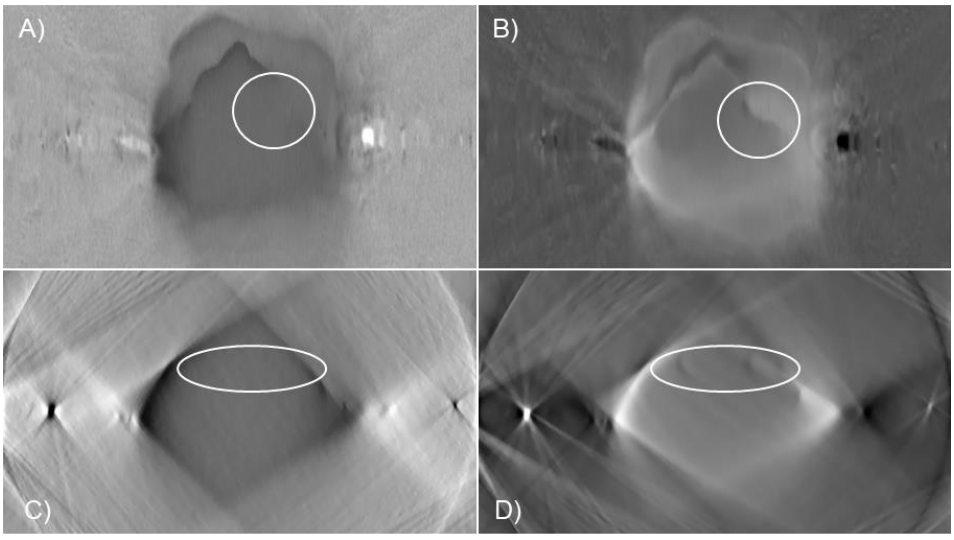


Figure 46 : A) & B) Plan yz (sagittal) et C) & D) plan xz (coronal) au même emplacement dans les volumes d'une cellule NIH-3T3 reconstruits à partir d'images collectées A) & C) en mode BF ou B) & D) DF.

Le volume obtenu avec le mode DF présente un meilleur contraste sur les contours de la cellule et ceci même en absence de NPs d'or (Figure 46B et D). Le modèle 3D construit à partir du mode DF semble ainsi plus fidèle à la réalité pour ce type d'analyse car lors de l'étape de segmentation, le contour de la cellule est mieux délimité.

Cette étude a permis de montrer qu'il est possible d'analyser une cellule entière et **hydratée** par STEM. Les contours de la cellule présentent un meilleur contraste en mode DF. L'acquisition de plus d'une centaine d'images pour les deux séries n'a causé aucun dommage visible/apparent à la cellule. L'acquisition des images a été effectuée à un grossissement de 7000, de sorte à analyser une cellule entière. La dose totale d'électrons pour l'acquisition des deux séries d'images était d'approximativement 3600 e-/nm². Cette dose est sous-estimée étant donné que l'échantillon continuait de recevoir des électrons entre 2 images (pendant le temps de réglage par exemple). Cependant cette dose est

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

nettement inférieure à la dose tolérée par les échantillons biologiques chimiquement fixés, qui est aux alentours de 10^5 e-/nm² [94]. Il est donc possible d'envisager des analyses à plus fort grossissement, l'intérêt de la microscopie électronique étant une meilleure résolution par rapport à la microscopie photonique.

Par ailleurs, les cellules ont été uniquement fixées avec du glutaraldéhyde 4%, c'est pourquoi on ne distingue que les contours de la cellule. Dans le futur, le protocole de préparation des cellules peut être adapté, par exemple avec une post-fixation à l'osmium, pour augmenter le contraste et visualiser davantage d'éléments cellulaires.

5 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons proposé une méthodologie alliant les microscopies confocale et électronique à balayage pour étudier les interactions entre les cellules et les biomatériaux. La quantification des sites d'ancrage des cellules sur les biomatériaux a été effectuée par microscopie confocale. L'étalement de la cellule a quant à lui été analysé par MEB. La surface de la cellule en contact avec le biomatériau diminue au cours du temps après ensemencement alors que l'étalement lui augmente, ce qui est cohérent. On peut estimer que les deux lignées cellulaires atteignent une stabilité d'ancrage et d'étalement 2h après ensemencement.

Le mode MEBE permet d'étudier des échantillons massifs hydratés, mais dans le cas des cellules, nous n'avons pas trouvé cette technique appropriée. Avec une préparation adéquate des cellules, le STEM est une technique plus prometteuse pour étudier des cellules hydratées en 2D. **En effet, les conditions d'acquisition d'images pour le MEBE nécessitent une dose d'électrons plus importante, avec pour conséquence une désintégration de la membrane cellulaire** (flèches sur la Figure 47B).

En STEM, l'humidité relative peut être plus importante étant donné que ce sont les électrons traversant l'échantillon qui sont collectés. En effet en MEBE, l'humidité relative fait l'objet d'un compromis : il faut qu'elle soit assez élevée pour que la cellule reste hydratée, en parallèle il faut qu'elle soit assez basse pour éviter une perte de résolution spatiale due à l'élargissement du faisceau incident (« skirt effect »).

Nous avons montré que l'analyse morphologique 3D par STEM est possible sur cellule entière. Le volume calculé à partir de projections acquises en mode DF semble permettre une reconstruction d'un modèle 3D plus fidèle à la réalité. L'étude de la morphologie cellulaire en 3D par STEM a permis également de mettre en évidence des limites techniques

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

et pratiques. Sur le plan pratique, la culture de cellules sur des grilles TEM a été extrêmement compliquée. Les grilles sont très fragiles : elles se pliaient très facilement et le film de carbone se déchirait au cours des différentes étapes de préparation. Une autre limite réside dans le choix de la cellule à imager, en effet cette dernière doit être placée au centre d'une maille de la grille TEM de sorte à ne pas être gêné par le maillage de la grille aux angles d'inclinaison importants. Sur le plan technique, nous avons également constaté l'importance de la position de l'échantillon par rapport au détecteur STEM. En effet, pour minimiser le « missing wedge » il est important que la zone d'intérêt se situe au-dessus du détecteur notamment pour le mode BF. La position du détecteur STEM est actuellement fixe et ne permet pas un tel réglage. Des modifications vont être apportées au portoir tomographie pour avoir un détecteur mobile en translation. Les études à plus fort grossissement nécessitent enfin l'optimisation du temps d'acquisition des images pour maintenir une dose d'électrons faible. Le changement de l'angle d'inclinaison et le recentrage de la zone d'intérêt sont des étapes automatisables pour une acquisition d'image plus rapide. Une interface logicielle est en cours de développement dans ce sens.

Avec ces améliorations, le STEM pourrait permettre d'étudier plus en détail les sites d'ancrage de la cellule sur des biomatériaux, sous réserve que le biomatériau soit assez fin, 50 à 100 nm d'épaisseur, pour être transparent aux électrons. Cependant, la rigidité du biomatériau impacte l'adhésion cellulaire. L'étude STEM réalisée montre en effet une déformation du film de carbone sous le poids de la cellule (Figure 42).

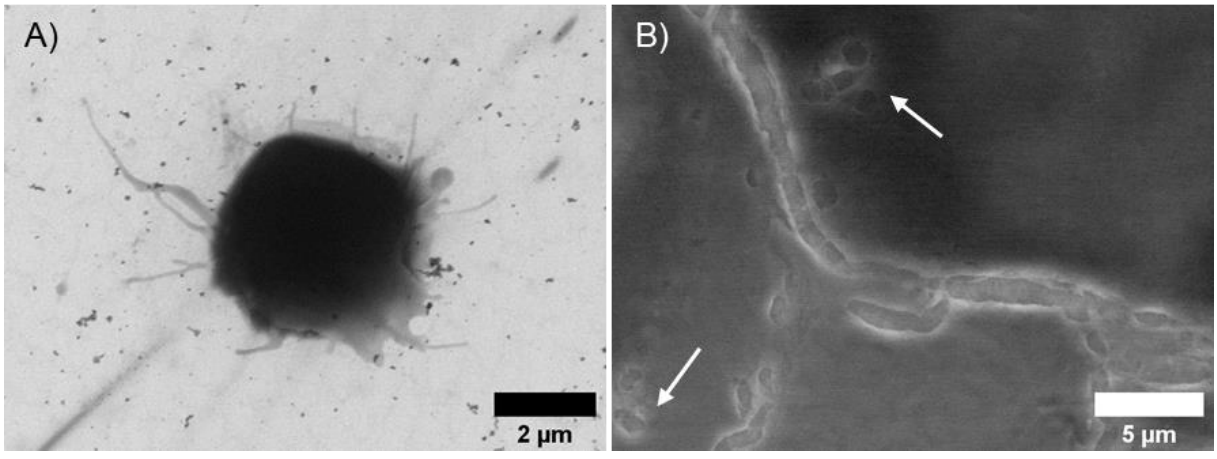


Figure 47 : Etude d'une cellule NIH-3T3 fixée et hydratée. A) Image STEM obtenue en collectant les électrons transmis avec une tension d'accélération de 15 kV, un courant de sonde de 0,12 nA, à 530 Pa, +4°C, ***70% d'HR****, un grossissement de 7000, une vitesse de balayage de 5 µs et une dose de* ***27 e-/nm²*** *par image. B) Image MEBE d'un autre échantillon obtenue en collectant les électrons secondaires avec une tension d'accélération de 10 kV, un courant de sonde de 1,6 nA, à 364 Pa,+ 4°C,* ***45% d'HR****, un grossissement de 3000, une vitesse de balayage de 10 µs et une dose de* ***131 e-/nm²*** *par image.*

Enfin, l'analyse morphologique 3D a été explorée via un logiciel de photogrammétrie Meshroom. Ce dernier permet d'aboutir à un modèle 3D complet mais présentant des artéfacts de surface pour le biomatériau et une perte d'information pour la cellule. On a

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

constaté que ces artefacts sont amplifiés avec la duplication des différents paramètres. L'impossibilité de renseigner les différents angles d'acquisitions des images et le manque d'informations derrière les calculs effectués constituent une limite à l'obtention d'un modèle 3D convenable. Le logiciel Pollen 3D est un logiciel développé pour analyser des images de microscopie électronique à balayage. Le développement de ce logiciel est prometteur car la collaboration avec le Dr Dembélé a déjà permis de mettre en évidence certaine que la qualité des images ayant servi à la reconstruction nécessite d'être améliorée. Un cahier des charges pour déterminer l'importance de certains paramètres tels que la distance de travail, le contraste et la brillance, etc., est en cours de préparation. Le développement d'algorithmes de débruitage d'image permettrait également de faciliter la reconstruction 3D.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Chapitre 4 : Etude de cas

Les céramiques à base de phosphate calcique sont des biomatériaux très largement utilisées en ingénierie osseuse, d'une part pour leur biocompatibilité et d'autre part pour leur capacité à favoriser la formation d'un nouvel os. Ces types de céramiques ont une composition chimique proche de la matrice osseuse, c'est pourquoi elles sont également appelées biocéramiques. Parmi les biocéramiques, on distingue l'hydroxyapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, HA), le phosphate tricalcique ($Ca_3(PO_4)_2$, β-TCP) et les phosphates de calcium biphasiques issus du mélange de HA et de β-TCP. Le Dr Douard et son équipe ont dans le passé déjà montré que les phosphates calciques favorisent la prolifération et la différenciation des cellules aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* [95], [96]. Cependant, ces biocéramiques présentent une faible résistance aux compressions mécaniques [97] et une faible biodégradabilité. Des études ont montré que la substitution de groupements OH^- par des groupements carbonate (CO_3^{2-}) sur l'hydroxyapatite, conduisant ainsi à l'obtention d'hydroxyapatite carbonatée (CHA), permet l'amélioration de la biodégradabilité et la bioactivité [72].

Le Dr Douard son équipe, au sein du laboratoire SAINBIOSE à l'Ecole de Mines de St-Etienne, ont développé une hydroxyapatite carbonatée comme substitut osseux ou scaffold pour la régénération osseuse [16], [95]. Dans ce chapitre, nous avons appliqué la méthode d'analyse des sites d'ancrage et de l'étalement de cellules MC3T3-E1 sur l'hydroxyapatite avant et après carbonatation, sur des échantillons fournis par le Dr Nathalie Douard dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire MATEIS. Nous allons également étudier les interactions MC3T3-E1/CHA, en évaluant la minéralisation de la matrice extracellulaire (MEC) des biomatériaux après induction de la différenciation des cellules MC3T3-E1 en ostéoblaste. L'étude de minéralisation est le fruit d'un partenariat avec le laboratoire SAINBIOSE LBTO INSERM U1059.

1 Etude des interactions cellule-biomatériau par microscopie

Les cellules MC3T3-E1 sont des cellules pré-ostéoblastiques capable de se différencier en ostéoblastes et de minéraliser la MEC, c'est pourquoi nous les avons choisies pour cette étude. La cinétique d'adhésion et d'étalement des cellules MC3T3-E1 sur des pastilles de HA ou de CHA (diamètre 1 mm) a été menée tel que décrit dans le chapitre 2 section 5.2 p. 38. Brièvement, 130 cellules/mm² ont été ensemencées sur les pastilles et incubées

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

pendant 15, 30, 60, 120 minutes et 24 heures avant d'être fixées. Les sites d'ancrage ont été quantifiés par microscopie confocale grâce à un marquage vinculine et l'étalement des cellules a été mesuré par MEB en mode haut vide.

1.1 Quantification des sites d'ancrage

Les images obtenues en microscopie confocale ont été analysées comme décrit dans le chapitre 3 section 1 p. 49. Les Figure 48 et Figure 49 sont des exemples d'images utilisées pour analyser la proportion des sites d'ancrage des cellules MC3T3-E1 cultivées 60 minutes sur les pastilles respectivement de HA et de CHA. Le temps 1h a été sélectionné pour les figures, car les sites d'ancrage et la densité cellulaire présentent une différence statistiquement significative entre les pastilles de HA et de CHA.

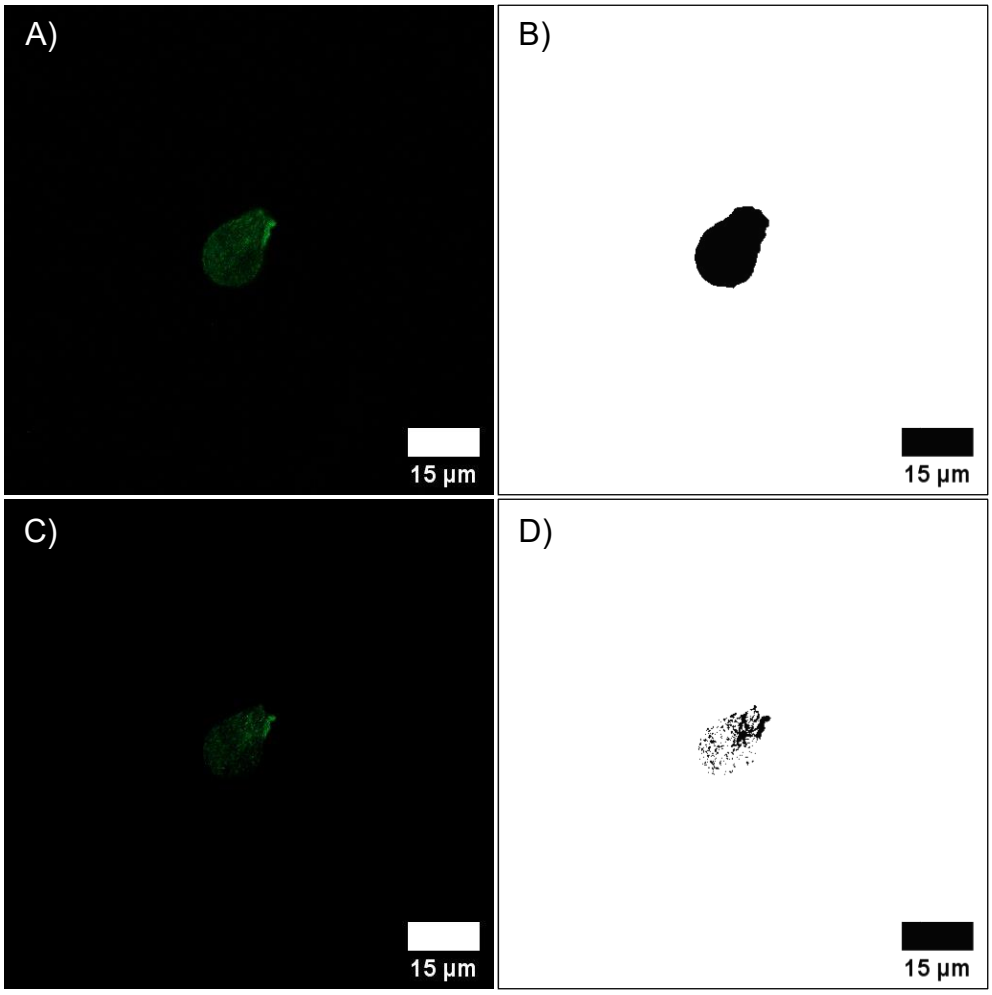


Figure 48 : Mesure de la surface totale et de contact des cellules MC3T3-E1 cultivées 1h sur une pastille de HA, à partir d'images de microscopie confocale obtenues après marquage de la vinculine. A) Image brute du plan de contact entre la cellule et le biomatériau. B) Masque binaire obtenu à partir de l'image A) pour la surface totale de la cellule. C) Image du plan de contact entre la cellule et le biomatériau après soustraction d'une valeur de 4 et application d'un filtre médian d'un rayon de 1 pixel, sans de modifications du stack requis. D) Masque binaire de la surface de contact de la cellule sur le biomatériau, obtenu à partir de l'image C).

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

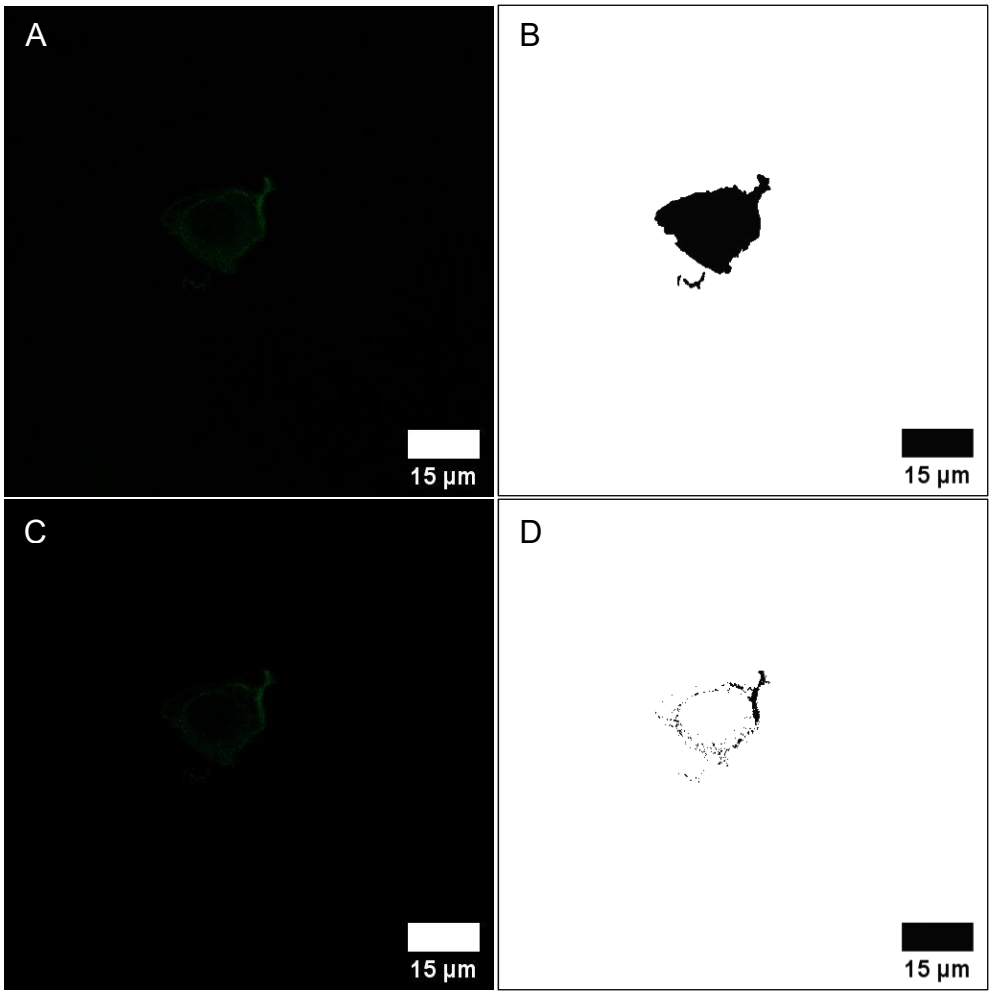


Figure 49 Mesure de la surface totale et de contact des cellules MC3T3-E1 cultivées 1h sur une pastille de CHA, à partir d'images de microscopie confocale obtenues après marquage de la vinculine. A) Image brute du plan de contact entre la cellule et le biomatériau. B) Masque binaire obtenu à partir de l'image A) pour la surface totale de la cellule. C) Image du plan de contact entre la cellule et le biomatériau après soustraction d'une valeur de 7 et application d'un filtre médian d'un rayon de 1 pixel, pas de modifications du stack requis. D) Masque binaire des surfaces de contact de la cellule sur le biomatériau obtenu à partir de l'image C).

Les cellules MC3T3-E1 se comportent différemment sur le HA et le CHA. En effet, l'évolution de la proportion des sites d'ancrage observée sur les pastilles de HA a l'allure d'une cloche avec un maximum de site d'ancrage à 1h d'incubation (voir Figure 50). Pour les pastilles de CHA on observe une courbe bimodale, avec un maximum de sites d'ancrage à 15 minutes et 2h d'incubation. On note un écart important dans les valeurs pour le CHA pour le temps 15 minutes, la différence avec le HA restant néanmoins significative (voir Tableau 7).

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

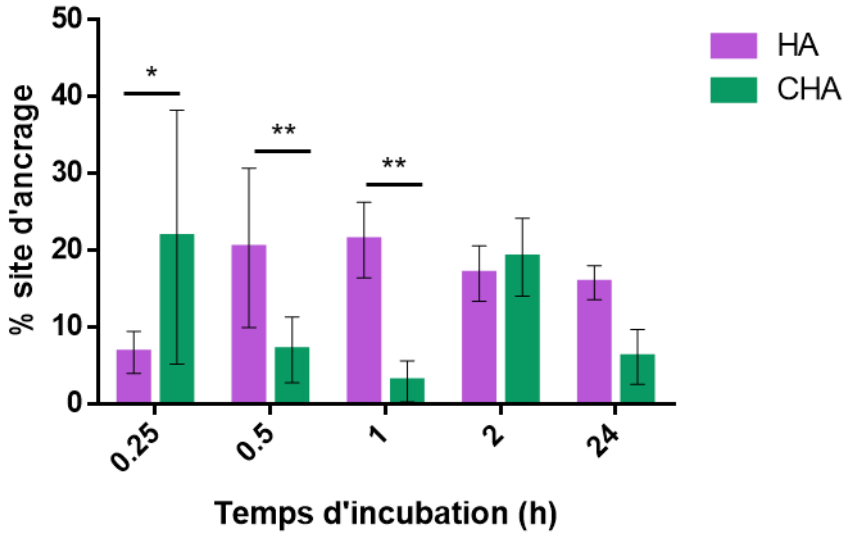


*Figure 50 : Evolution de la proportion des sites d'ancrage au cours du temps des cellules MC3T3-E1 cultivées 60 minutes sur des pastilles de HA ou de CHA. Les valeurs correspondent à la moyenne calculée pour n=5 cellules, les barres d'erreur représentent l'écart-type mesuré, test ANOVA à 2 facteurs avec p ≤ 0,05 * et p ≤ 0,01 **.*

Tableau 7 : Résultats du test ANOVA à 2 facteurs effectué pour comparer la différence de proportion des sites d'ancrage entre HA et CHA au cours du temps

HA - CHA	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF	Significance
0,25	6,7	21,8	-15,0	5,5	5	5	2,73	34	*
0,5	20,3	7,1	13,3	4,4	5	5	3,01	34	**
1	21,3	3,0	18,4	6,2	5	5	2,99	34	**
2	17,0	19,1	-2,1	4,8	5	5	0,45	34	ns
24	15,8	6,1	9,7	6,2	5	5	1,57	34	ns

1.2 Analyse de la densité et de l'étalement cellulaire

La densité cellulaire et l'étalement des cellules MC3T3-E1 sur les biomatériaux ont été mesurés comme décrit dans le chapitre 3 section 2 p. 57. Les images MEB ont été acquises en vide partiel à une pression de 80 Pa, pour minimiser les phénomènes de charge à la surface du HA et du CHA. Les électrons secondaires ont été collectés pour une tension d'accélération de 10 kV, une vitesse de balayage de 3 µs et un courant de sonde de 51 pA. Des exemples d'images analysées sont représentés en Figure 51 pour le temps 1h. On peut observer que la densité cellulaire augmente au cours du temps pour les deux biomatériaux. On peut estimer que la totalité des cellules ensemencées sont adhérées au bout d'une heure sur le HA alors qu'il faut 2h pour le CHA (voir Figure 52). De plus, la densité significativement plus importante à 24h pour le HA suggère une meilleure prolifération sur le HA comparé au CHA. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par un test de prolifération avec un nombre d'échantillon conséquent. Les études précédemment publiées mettaient

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

en avant une meilleure prolifération des cellules primaires hBMSCs sur le CHA pour incubation jusqu'à 28 jours [96]. Il faut toutefois souligner que la densité cellulaire ensemencée est de 130 cellules/mm², or on atteint une densité supérieure à 200 cellules/mm² dès 1h d'incubation pour le HA. Cette différence de numération cellulaire met en évidence une limite sur le choix des champs acquis sur le biomatériau, une autre limite de cette analyse étant l'analyse d'une seule pastille pour chaque point de temps. Il apparaît clairement une densité cellulaire plus importante pour le HA (cf. Figure 51A) comparée au CHA (Figure 51C). La surface cellulaire est similaire entre les deux biomatériaux (voir Figure 51B et D pour le temps 1h), avec une grande hétérogénéité (Figure 53). A 24 h d'incubation, les cellules sont plus étalées sur le HA (Figure 53).

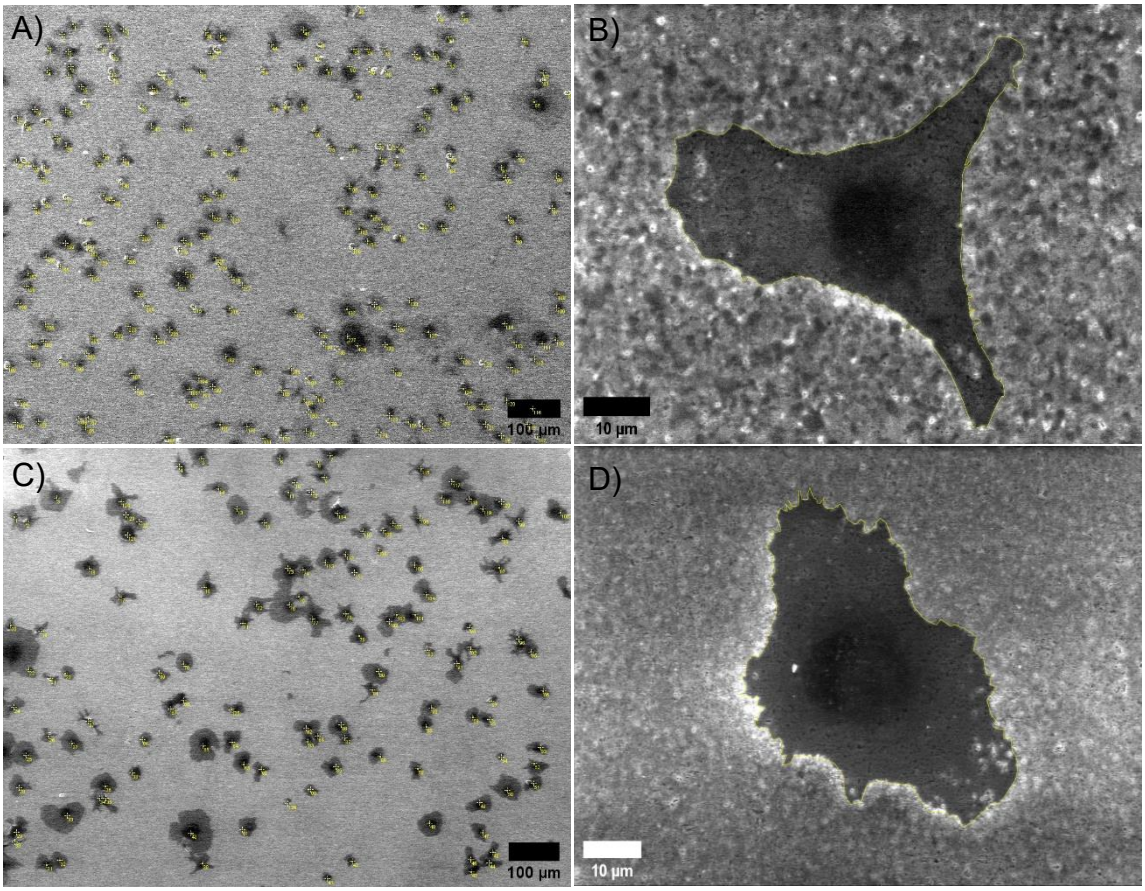


Figure 51 : Evaluation de la densité cellulaire A) & C) et de l'étalement cellulaire B) & D), à partir d'images MEB en mode haut vide en collectant les électrons secondaires. Cas de cellules MC3T3-E1 cultivées 60 minutes sur une pastille d'HA A) & B) ou de CHA C) & D).

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

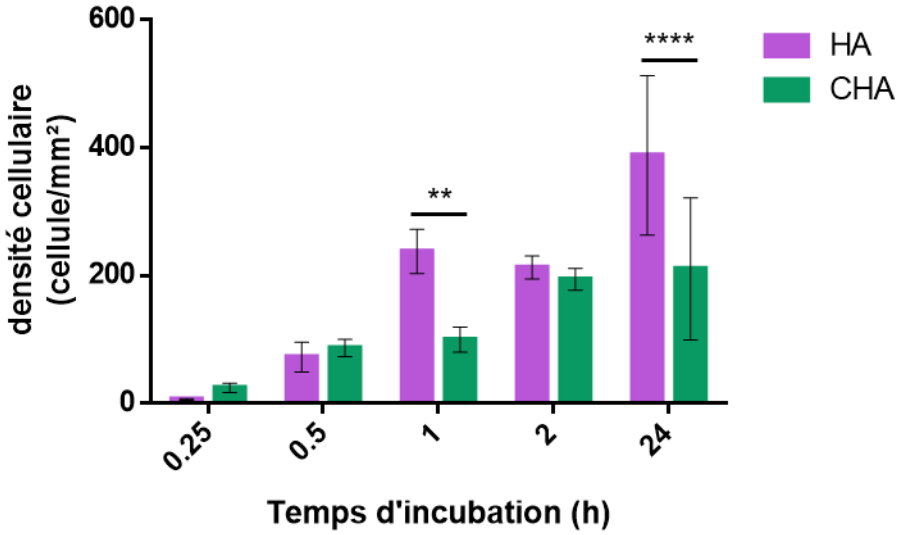


*Figure 52 : Evolution de la densité cellulaire au cours du temps des cellules MC3T3-E1 cultivées sur des pastilles de HA ou de CHA. Les valeurs correspondent à la moyenne calculée pour n=5 images, les barres d'erreur représentent l'écart-type mesuré. Les étoiles correspondent aux résultats de tests ANOVA à 2 facteurs avec p ≤ 0,01 ** et p ≤ 0,0001 ****.*

Tableau 8 : Résultats du test ANOVA à 2 facteurs effectué pour comparer la différence de densité cellulaire entre HA et CHA au cours du temps.

HA - CHA	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF	Significance
0,25	6,0	24,5	-18,5	35,2	5	5	0,52	40	ns
0,5	72,6	86,9	-14,3	35,2	5	5	0,41	40	ns
1	237,9	99,8	138,1	35,2	5	5	3,93	40	**
2	212,8	194,3	18,5	35,2	5	5	0,53	40	ns
24	388,2	210,6	177,6	35,2	5	5	5,05	40	****

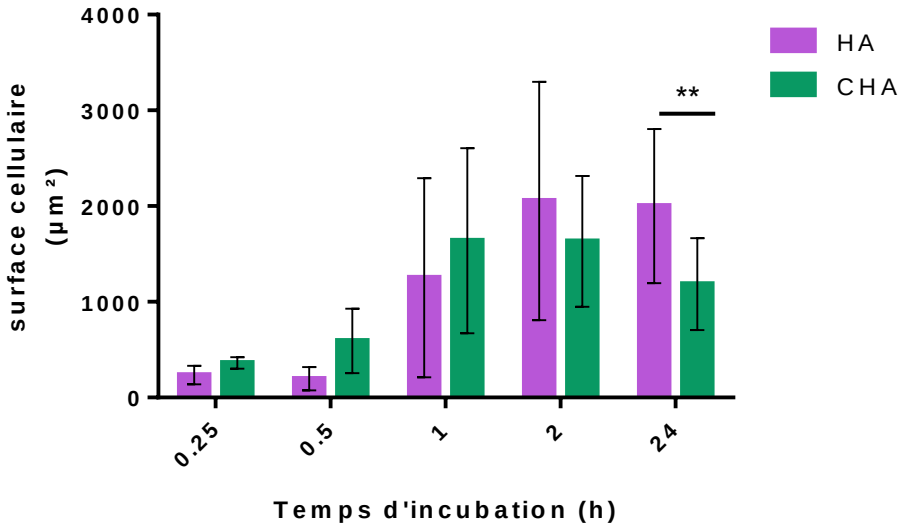


*Figure 53 : Evolution au cours du temps de l'étalement des cellules MC3T3-E1 cultivées sur des pastilles de HA ou de CHA. Les valeurs correspondent à la moyenne calculée pour n=20 cellules, les barres d'erreur représentent l'écart-type mesuré, test ANOVA à 2 facteurs avec p ≤ 0,01 **.*

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Tableau 9 : Résultats du test ANOVA à 2 facteurs effectué pour comparer l'étalement des cellules MC3T3-E1 sur les pastilles de HA ou de CHA au cours du temps.

HA - CHA	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF	Significance
0,25	235	362,3	-127,2	224,9	20	20	0,57	190	ns
0,5	196,4	591,4	-395	224,9	20	20	1,76	190	ns
1	1252	1639	-387,1	224,9	20	20	1,72	190	ns
2	2054	1632	421,4	224,9	20	20	1,87	190	ns
24	2001	1186	815,3	224,9	20	20	3,63	190	**

L'analyse par microscopie a permis de mettre en évidence un comportement différent des cellules MC3T3-E1 différent vis-à-vis du HA et du CHA. Le ratio des sites d'ancrages, l'étalement cellulaire et la densité cellulaire à 24h suggèrent que le HA est un meilleur substrat pour cette lignée cellulaire. Afin de compléter l'étude morphologique, une étude de minéralisation a été menée pour évaluer l'impact fonctionnel de la carbonatation.

1.3 Interface cellule biomatériau

L'interface cellule-biomatériau a été analysée par MEB en vide partiel sur les mêmes échantillons. La configuration de l'échantillon par rapport au faisceau est telle que décrite dans le chapitre 3 section 2.2 p60. Pour le temps 24h, l'effet de charge étant trop important pour une inclinaison totale à 85°, les images ont été acquise à 65° pour les deux biomatériaux. Les images ont été obtenues en collectant les électrons secondaires à une pression de 80 Pa, pour une tension d'accélération de 10 kV, un courant de sonde de 52 pA et une vitesse de balayage de 3 µs. La Figure 54 : Images MEB de l'interface entre les MC3T3-E1 et le HA (colonne de gauche) ou le CHA (colonne de droite) à différents temps d'incubation : 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 2 heures et 24 heures.Figure 54 représente un panel d'images représentatives de la cinétique d'adhésion des cellules sur les biomatériaux. On constate que les cellules MC3T3-E1 ont un comportement différent sur les deux biomatériaux : sur le HA, la cellule est sphérique à 15 minutes puis s'aplatit au cours du temps, alors que sur le CHA, dès 15 minutes d'incubation, la cellule semble déjà adhérer avec une faible évolution de l'épaisseur et de l'étalement cellulaire jusqu'à 1h d'incubation. Seul un petit nombre de cellules peut être analysé en microscopie électronique, ce qui peut soulever des questions sur leur représentativité. Cependant, on pourra noter que ces images sont cohérentes avec les résultats obtenus pour l'analyse des sites d'ancrage (voir Figure 50).

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

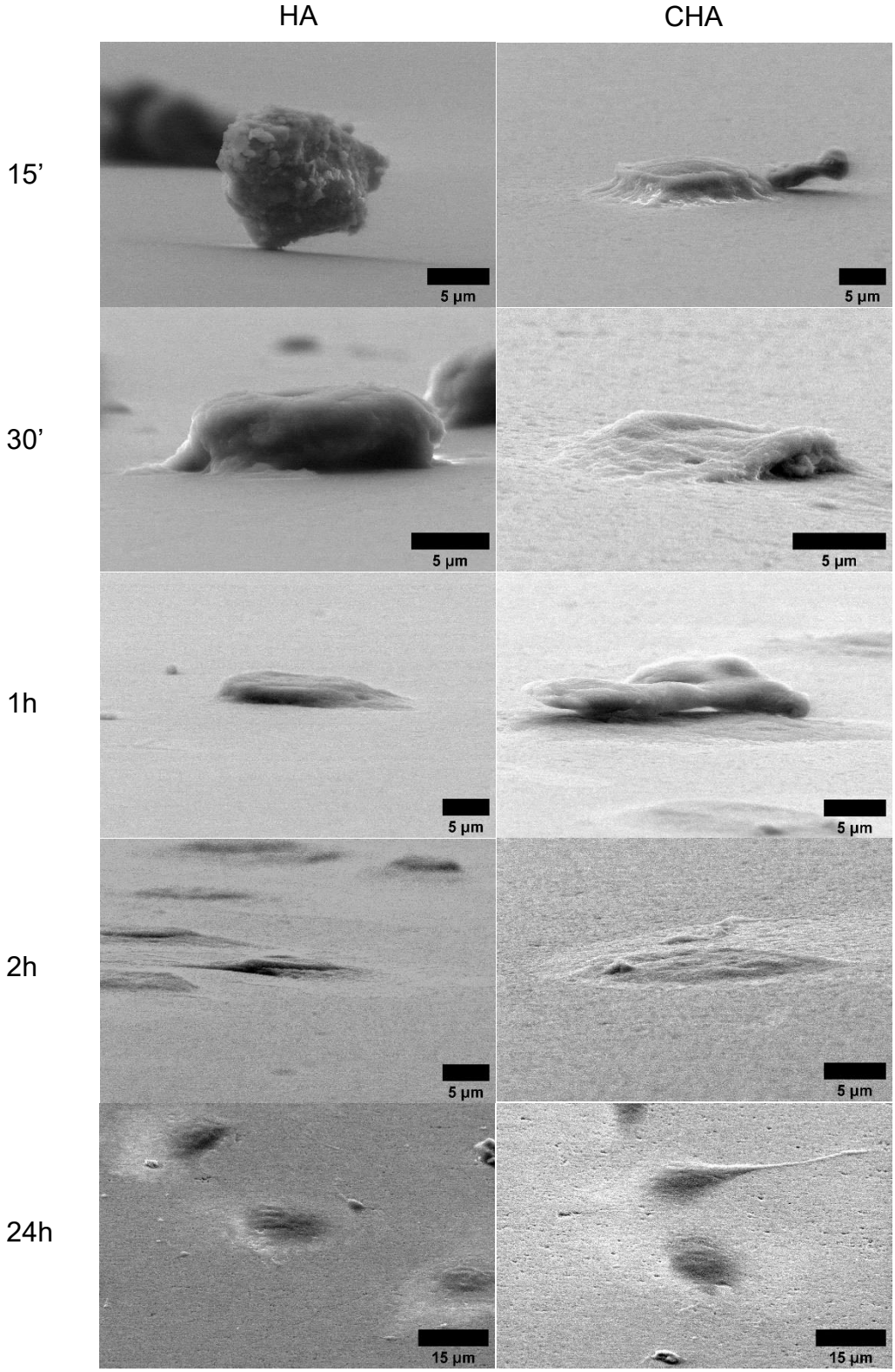


Figure 54 : Images MEB de l’interface entre les MC3T3-E1 et le HA (colonne de gauche) ou le CHA (colonne de droite) à différents temps d’incubation : 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 2 heures et 24 heures.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

2 Etude de la minéralisation

Nous avons étudié précédemment l'influence du biomatériau sur la cinétique d'adhésion des cellules et sur leurs sites d'ancrage. Cependant, dans le cas des biomatériaux développés comme substituts osseux, les interactions peuvent également se traduire par une différence au niveau de la minéralisation des cellules. L'apport de la microscopie électronique à balayage à ce niveau est exploré ici en complément d'une étude biologique des marqueurs de la minéralisation.

Les cellules MC3T3-E1 sont une lignée cellulaire pouvant se différencier en ostéoblaste. La différenciation est induite par ajout de d'acide ascorbique et de β-glycérophosphate dans le milieu de culture. Elle conduit à des ostéoblastes précoces dans un premier temps, puis ces derniers maturent en ostéoblastes tardifs. La différenciation peut être mise en évidence par la présence de facteurs de transcription tels que Runt-related transcription factor-2 (Runx2). Runx2 régule de nombreux gènes ostéoblastiques en augmentant notamment l'expression de gènes de protéines favorisant la production d'une matrice osseuse. On peut citer le collagène de type 1 (Col1), l'ostéopontine (OPN), l'ostéocalcine (OCN) et la sialoprotéine osseuse (BSP). On distingue deux phases séquentielles après différenciation en ostéoblastes. Une première phase correspond à la production de MEC par les ostéoblastes précoces. Dans la seconde phase, la MEC est minéralisée par les ostéoblastes tardifs [98]. La MEC minéralisée est le précurseur de la matrice osseuse qui est subdivisée en une phase organique et une phase minérale [99]. La phase organique est constituée à 90% de Col1 et à environ 10% de protéines non collagéniques. La phase minérale est quant à elle constituée principalement de phosphore et de calcium polysubstitués, le plus souvent agrégés sous forme de cristaux d'HA ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) et de substituts carbonatés [100]. La Figure 55 résume les marqueurs analysés pour l'étude de la minéralisation et les stades de l'ostéogenèse où ils sont exprimés. Dans cette partie du chapitre, nous proposons d'étudier la différenciation et la minéralisation en mesurant le niveau d'expression des ARN messagers (ARNm) de Runx2, Col1a, OPN, OCN, BSP. L'HPRT est un des nombreux gènes dit de « ménage », c'est-à-dire qu'il s'agit d'un gène exprimé dans tous les types cellulaires par sa nécessité à la survie de la cellule. De plus son niveau d'expression est constant, ainsi il permet de normaliser le niveau d'expression des gènes d'intérêt. La dexaméthasone (Dex) est un glucocorticoïde synthétique utilisé principalement pour ses effets anti-inflammatoires. La littérature a rapporté la capacité de la dexaméthasone à induire la minéralisation d'ostéoblastes en culture [101], elle a donc été utilisée comme contrôle positif de minéralisation.

Dans ce chapitre, nous avons par conséquent étudié l'impact du biomatériau sur la capacité des cellules MC3T3-E1 à minéraliser la MEC en évaluant les niveaux d'expression

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

des gènes mais également en analysant la composition de la MEC par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDX) sur des échantillons préparés en parallèle.

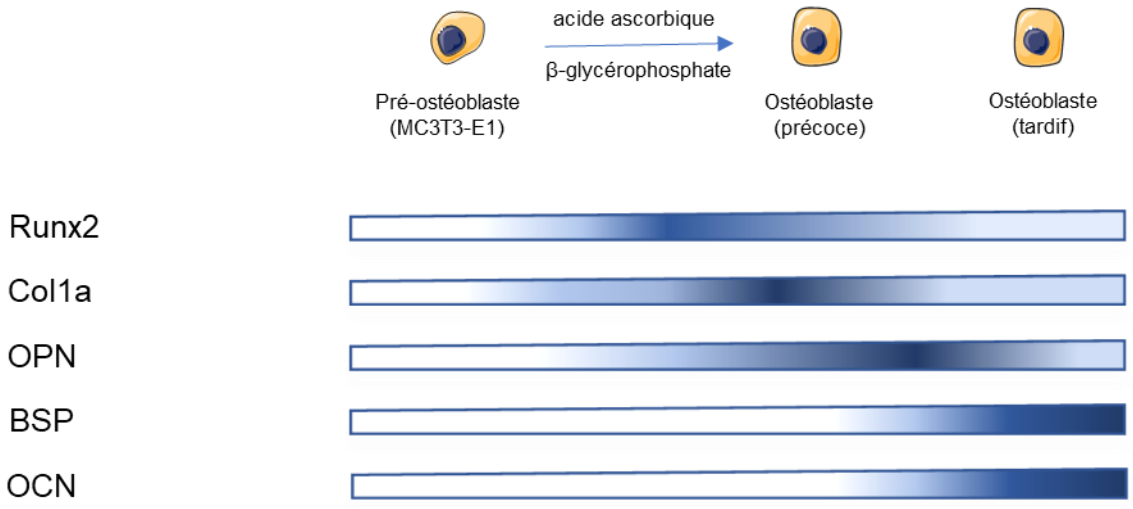


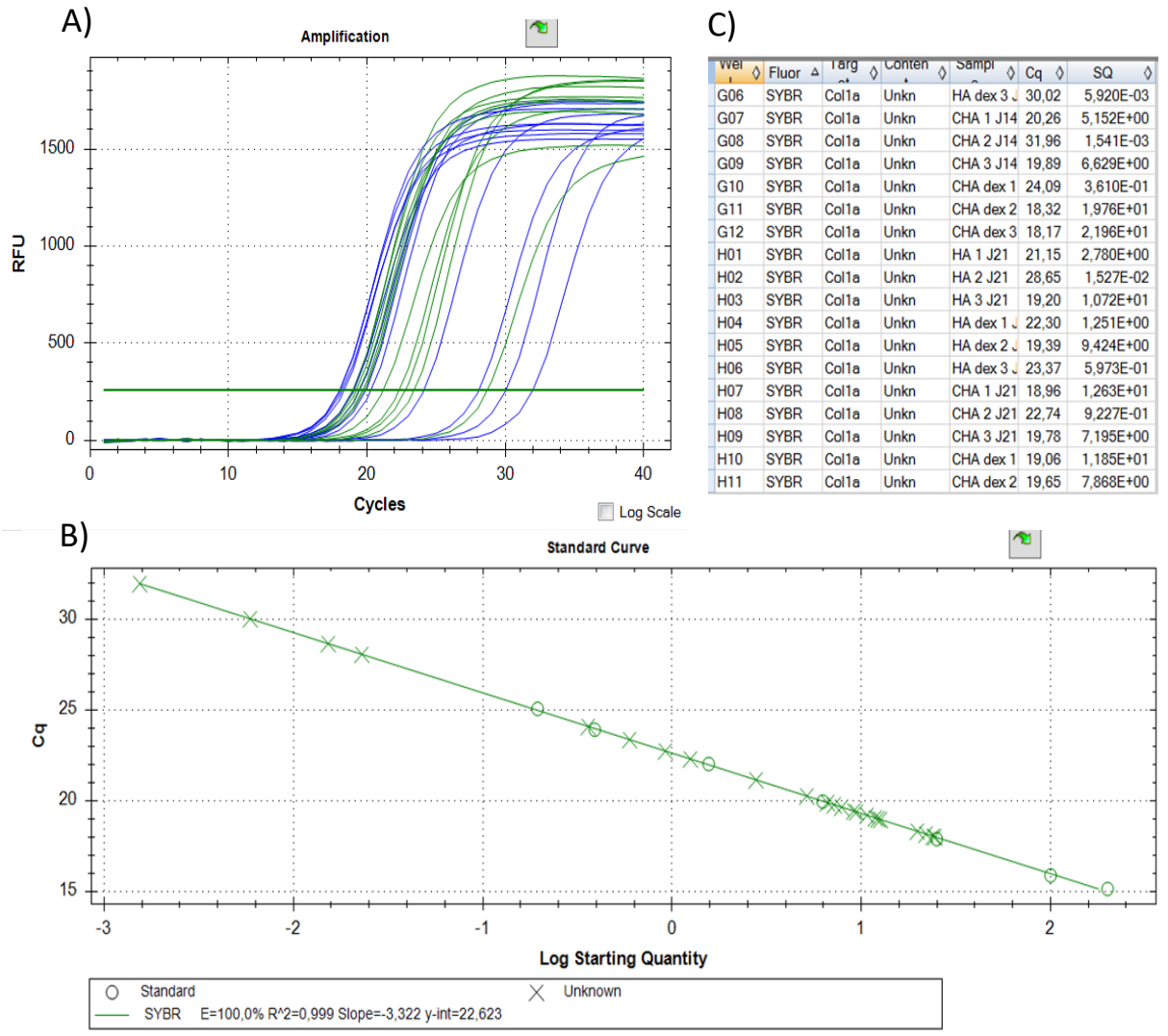
Figure 55 : Marqueurs ostéogéniques exprimés au cours des différentes phases. La différenciation ostéoblastique est caractérisée par l'expression de Runx2. La production de la matrice extracellulaire par les ostéoblastes précoces est mise en évidence par l'expression de Col1 et OPN. La maturation, c'est-à-dire la minéralisation de la matrice extracellulaire par les ostéoblastes tardifs, est marquée par l'expression de BSP et OCN. Le niveau d'expression est représenté par l'intensité du bleu. Schéma adapté de [98].

2.1 Etude de la minéralisation par évaluation de l'expression génique des marqueurs

Les marqueurs de maturation des cellules MC3T3-E1 et de minéralisation ont été mesurés aux jours 14 et 21 après induction de la différenciation ostéoblastique. Les cellules ont été cultivées en triplicat sur les pastilles de HA, de CHA ou directement dans le puits de la plaque de culture. Les cellules cultivées directement sur la plaque de culture permettent de tracer une courbe d'étalonnage pour analyser le niveau d'expression des ARNm d'intérêt. La différenciation ostéoblastique a été induite par ajout de 50 µM d'acide ascorbique et de 10 mM de β-glycérophosphate au milieu de culture, en présence ou absence de 100 nM de dexaméthasone. Aux différents temps d'incubation, les cellules ont été lysées, puis l'ARN total a été extrait et dosé. Les ARN messagers (ARNm) des marqueurs de différenciation et de maturation ont été amplifiés par PCR et analysés. Un exemple de données obtenues par PCR pour Col1a est représenté en Figure 56. La valeur de fluorescence augmente avec les cycles de polymérisation et dépasse très rapidement une valeur seuil de fluorescence où l'amplification de l'ARNm est détectable, ici 250 RFU (trait vert sur la Figure 56A). Le nombre de cycles correspondant à l'intersection entre la courbe et la fluorescence seuil représente le cycle de quantification (Cq). Les Cq déterminés

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

et la concentration d'ARN déterminé lors du dosage permettent de tracer la droite d'étalonnage de la Figure 56B et ainsi d'extrapoler une quantité d'ARNm d'intérêt initiale, Figure 56C. Le niveau d'expression des ARNm d'intérêt est ensuite normalisé par le niveau d'expression de l'HPRT ; les résultats sont présentés en Figure 57.



Well	Fluor	Targ	Conten	Sampl	Cq	SQ
G06	SYBR	Col1a	Unkn	HA dex 3 J	30,02	5,920E-03
G07	SYBR	Col1a	Unkn	CHA 1 J14	20,26	5,152E+00
G08	SYBR	Col1a	Unkn	CHA 2 J14	31,96	1,541E-03
G09	SYBR	Col1a	Unkn	CHA 3 J14	19,89	6,629E+00
G10	SYBR	Col1a	Unkn	CHA dex 1	24,09	3,610E-01
G11	SYBR	Col1a	Unkn	CHA dex 2	18,32	1,976E+01
G12	SYBR	Col1a	Unkn	CHA dex 3	18,17	2,196E+01
H01	SYBR	Col1a	Unkn	HA 1 J21	21,15	2,780E+00
H02	SYBR	Col1a	Unkn	HA 2 J21	28,65	1,527E-02
H03	SYBR	Col1a	Unkn	HA 3 J21	19,20	1,072E+01
H04	SYBR	Col1a	Unkn	HA dex 1 J	22,30	1,251E+00
H05	SYBR	Col1a	Unkn	HA dex 2 J	19,39	9,424E+00
H06	SYBR	Col1a	Unkn	HA dex 3 J	23,37	5,973E-01
H07	SYBR	Col1a	Unkn	CHA 1 J21	18,96	1,263E+01
H08	SYBR	Col1a	Unkn	CHA 2 J21	22,74	9,227E-01
H09	SYBR	Col1a	Unkn	CHA 3 J21	19,78	7,195E+00
H10	SYBR	Col1a	Unkn	CHA dex 1	19,06	1,185E+01
H11	SYBR	Col1a	Unkn	CHA dex 2	19,65	7,868E+00

Figure 56 : Exemple de données générées par PCR pour l'évaluation du niveau d'expression du gène Col1a pour l'ensemble des échantillons. A) Evolution de la fluorescence au cours des cycles de polymérisation. B) Courbe d'étalonnage obtenu à partir du graphique représenté en A). C) Quantification de l'ARNm des différents échantillons à partir de B).

A 14 jours d'incubation après induction, comme le montre la Figure 57A, les niveaux d'expression de Runx2 et OCN sont significativement supérieurs pour les cellules cultivées sur HA comparé aux cellules cultivées sur CHA. Pour Col1a et OPN, la tendance est la même que pour Runx2. Le niveau d'expression de la BSP est quasi nul en absence de dexaméthasone pour les deux biomatériaux. En présence de dexaméthasone, la tendance s'inverse en faveur de CHA avec une augmentation allant jusqu'à 1,5 fois le niveau d'expression des ARNm d'intérêt, à l'exception d'OCN. La Figure 57B présente les résultats

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

obtenus pour 21 jours d'incubation après induction. Le niveau d'expression des marqueurs ne diffère pas entre HA et CHA en absence de dexaméthasone. A J21, l'expression de Col1a a diminué de manière non significative par rapport à J14. Le niveau d'expression d'OCN est augmenté par rapport à J14 pour les cellules cultivées sur HA et CHA en absence de dexaméthasone. Tout comme à J14, le niveau d'expression de la BSP est quasi nul en absence de dexaméthasone pour les deux biomatériaux.

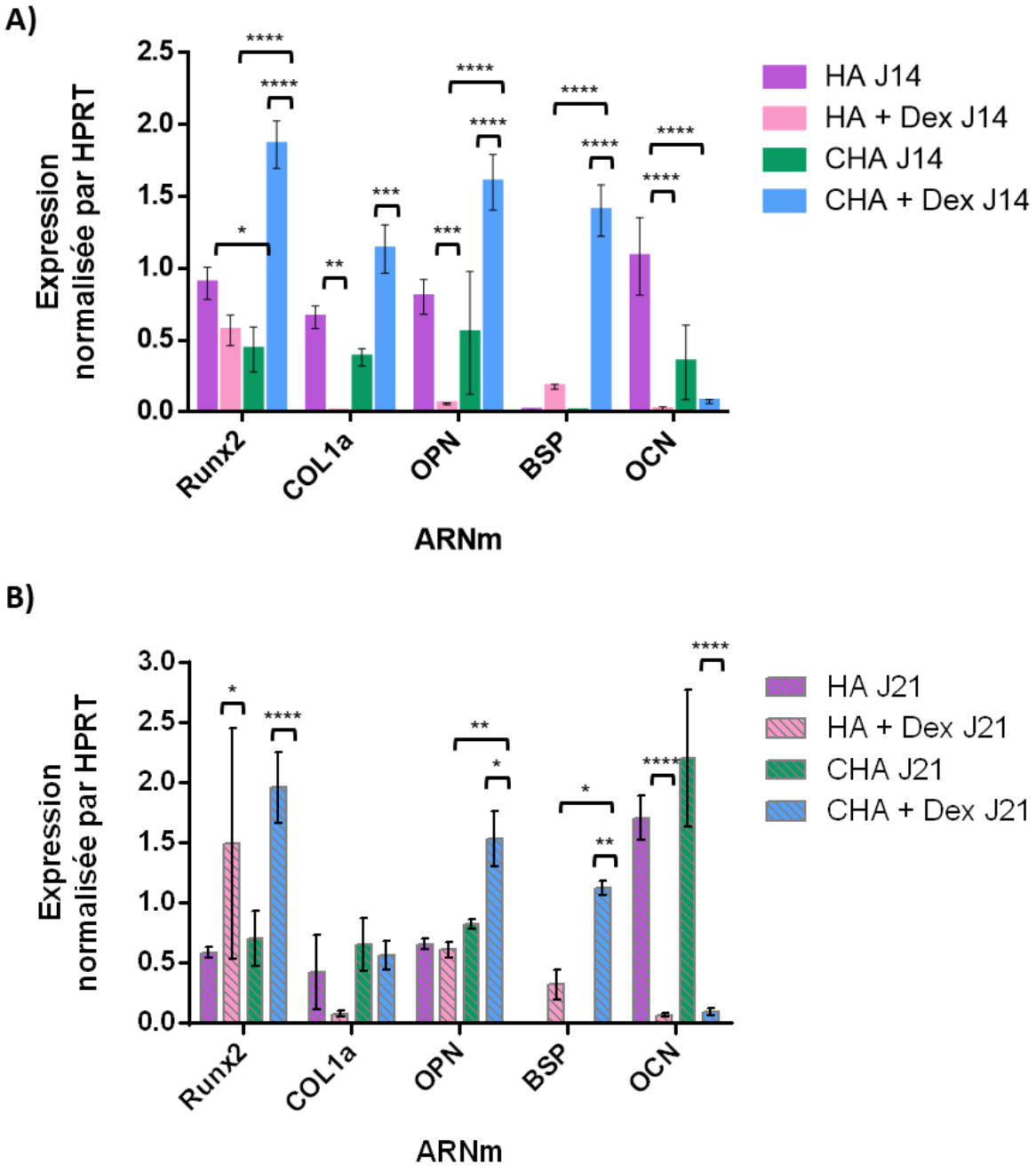


*Figure 57 : Niveau d'expression des différents marqueurs de différenciation et de minéralisation des cellules MC3T3-E1 cultivées sur des pastilles de HA ou de CHA pendant 14 et 21 jours. Les valeurs représentent la moyenne, n=3 sauf pour HA Dex J14 et J21 n=2, les barres d'erreurs correspondent à l'écart type. Une comparaison multiple a été effectuée avec le test de Tukey avec p ≤ 0,05 *, p ≤ 0,01 **, p ≤ 0,001 *** et p ≤ 0,0001 ****.*

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Ces résultats montrent qu'à 14 jours, les marqueurs de différenciation Runx2, Col1a et OPN sont exprimés dans les cellules cultivées sur HA et CHA, et que le niveau d'expression de ces marqueurs est plus important pour les pastilles de HA. Le niveau d'expression de l'OCN suggère un début de minéralisation plus important pour les pastilles de HA. A 21 jours d'incubation, le niveau d'expression de l'OCN a augmenté pour les deux biomatériaux, mais elle est plus importante pour le CHA. Le niveau d'expression de BSP est très faible, une incubation plus longue est donc à envisager afin de pouvoir obtenir une maturation ostéoblastique complète. Toutefois une première limite vient du fait que plus la durée d'incubation est longue, plus les risques de contaminations sont élevés. Un autre point limitant de cette expérience est la faible quantité d'ARN dosée. Pour augmenter la quantité d'ARN extraite, il faudrait répéter idéalement l'expérience avec un plus grand nombre de pastilles pour regrouper les échantillons, ou alors travailler avec des pastilles avec une surface plus importante. Des études précédentes montrent en effet une minéralisation de la matrice à 28 jours d'incubation [96] en présence de milieu non-ostéogénique. Même s'il serait intéressant de l'étudier, notre analyse est cohérente avec ces résultats. Par ailleurs, notre étude semble montrer que la minéralisation est plus lente avec le CHA.

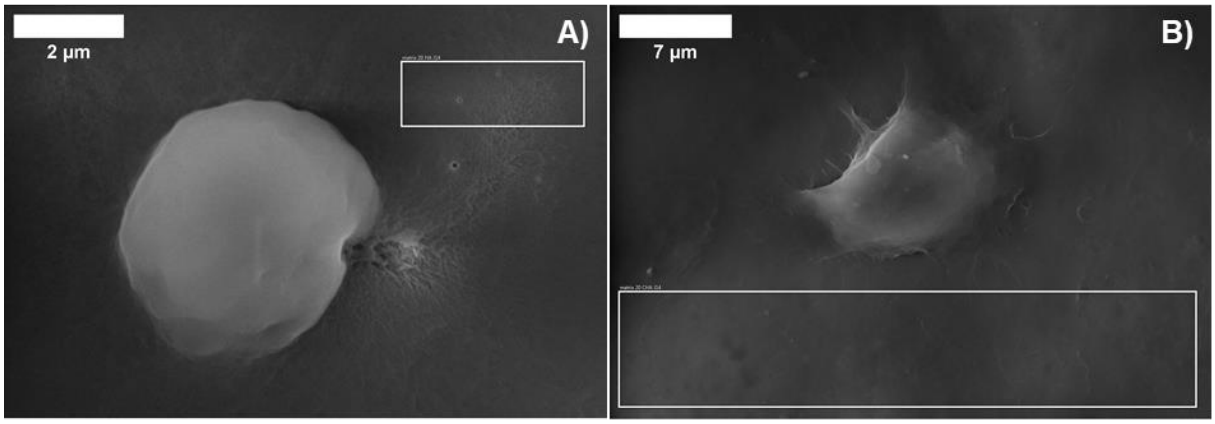
2.2 Détermination de la composition chimique de la MEC par EDX

La minéralisation de la MEC peut être explorée par différentes méthodes. La méthode plus connue est la coloration au rouge d'alizarine S. Elle consiste à « colorer » le calcium présent dans la matrice minéralisée. Cependant, les biomatériaux étudiés contiennent du calcium, ce qui rend cette méthode non adaptée. Une autre approche est la réflectance totale atténuée par microscopie infrarouge à transformée de Fourier. Cette technique peut être difficile à mettre en œuvre car le contact entre la pointe diamant du microscope et l'échantillon peut être complexe. La microscopie électronique analytique (MEB-EDX) peut être une alternative. Nous avons donc décidé de tester cette technique pour évaluer la composition de la MEC. Les échantillons ont été préparés dans les mêmes conditions et en parallèle de l'expérience précédente. A l'issue des 14 et 21 jours d'incubation, les échantillons ont été fixés et déshydratés. Les pastilles ont été conservées au sec jusqu'à l'acquisition des spectres par MEB-EDX. Les spectres EDX ont été obtenus sur les différents échantillons sous un vide partiel de 80 Pa, avec une tension d'accélération de 10 kV et une taille de sonde de 2,5, une gamme d'énergie de 20 keV, un temps de mise en forme de 4 µs et un temps de pose de 10 µs. Trois sites ont été analysés par échantillon pour estimer la minéralisation de la MEC.

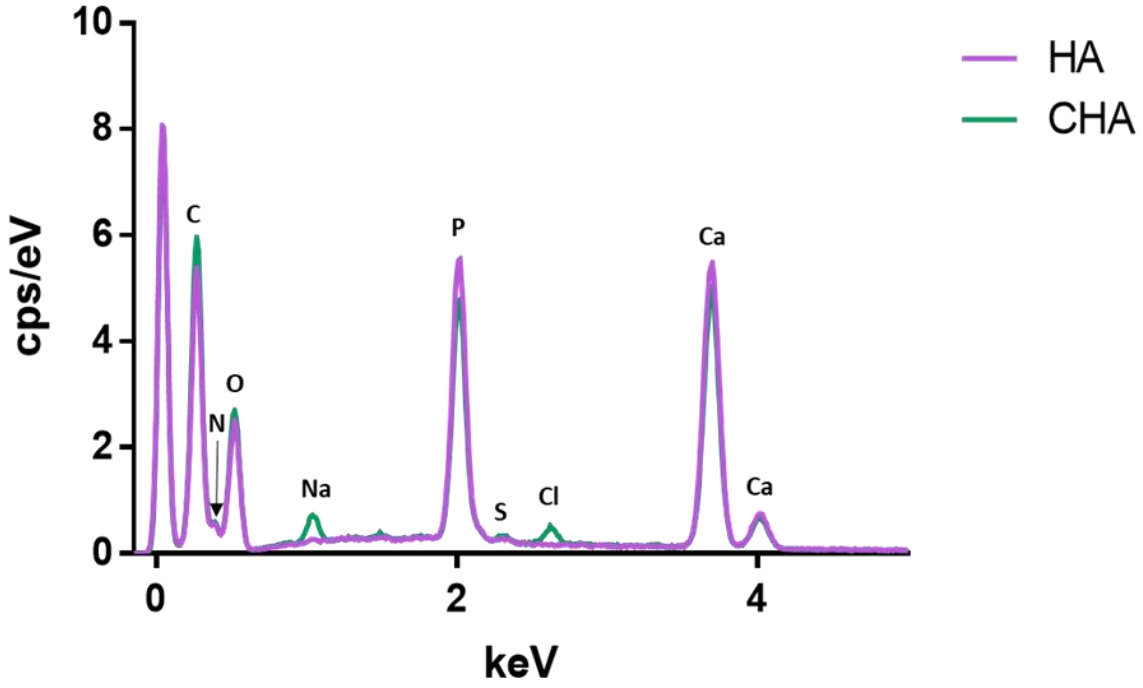
Un exemple d'analyse est présenté Figure 58, avec les images MEB correspondantes (Figure 58A et B). Les spectres révèlent la présence de carbone (C), d'azote (N), d'oxygène (O), de phosphore (P), de soufre (S) et de calcium (Ca), voir Figure 58C. L'hydrogène est

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

en revanche trop léger pour être détecté. Pour le CHA, le spectre présenté révèle la présence de Na et de Cl. Ces éléments chimiques entrent dans la composition du tampon phosphate. Il est très probable qu'il s'agisse de résidus de tampon, c'est pourquoi nous avons omis le Na et le Cl dans la mesure de la composition de la MEC. La composition chimique en pourcentage atomique est reportée dans le tableau de la Figure 58D. La composition chimique mesurée pour les deux biomatériaux est similaire.



C)



D)

	C	N	O	S	P	Ca
HA	50,9	11,1	23,3	0,1	5,6	8,9
CHA	51,6	11,6	24,2	0,2	4,7	7,7

Figure 58 : Exemple d'analyse MEB-EDX effectuée sur des cultures de 14 jours post-induction de cellules MC3T3-E1 sur des pastilles de HA et CHA. Images MEB des sites analysés sur les pastilles de HA A) et de CHA B). Les rectangles représentent les zones de MEC où sont effectuées les mesures. B) Spectres obtenus pour les images A) et B). C) Tableau de la composition chimique de la MEC en pourcentage atomique.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

L'ensemble des résultats est présenté en Figure 59. Seuls les éléments chimiques de la phase minérale, à savoir C, O, Ca et P, figurent sur les graphiques. Le C, l'O et le P sont des éléments également présents dans la phase organique de la MEC. Le C étant l'élément dominant, la diminution de la proportion de ce dernier en faveur du calcium peut être un bon indicateur de minéralisation. Des pastilles de HA et de CHA nues, c'est-à-dire n'ayant pas été en culture avec des cellules, ont été utilisées comme contrôle.

Les spectres obtenus pour la pastille de HA de contrôle montrent un pic pour le C, or le C n'entre pas dans la composition du HA. Il est donc attribué à une contamination lors de l'analyse, ce qui est courant en MEB. De plus, on note que la proportion de C présente dans le CHA est équivalente à la proportion de C présente dans la pastille de HA contrôle (Figure 59), ce résultat est surprenant puisque le CHA est obtenu après carbonatation de HA. La proportion d'O et de Ca est plus importante pour les pastilles nues comparées aux pastilles en culture. Ceci correspond bien à l'augmentation de C. L'analyse suggère donc qu'une couche riche en C et pauvre en O et Ca s'est formée en surface (par rapport à HA et CHA).

A 14 jours d'incubation post-induction, la proportion des différents éléments chimiques dans la MEC est similaire entre les pastilles de HA et de CHA, voir Figure 59A. En revanche, en présence de dexaméthasone la proportion de C diminue alors que celle de Ca augmente pour les deux biomatériaux et ces modifications sont statistiquement significatives. A 21 jours d'incubation post-induction, le taux de Ca est significativement plus élevé pour le CHA par rapport au HA, et le taux de C est plus important pour le HA (Figure 59B). On peut toutefois noter que le taux de Ca était aux alentours de 20% pour les deux biomatériaux à 14 jours contre 10% à 21 jours. La proportion de de C a augmenté entre les deux temps d'incubation, ce qui suggère que les cellules ont continué de produire de la matrice entre 14 et 21 jours d'incubation. Si on considère les résultats à 21 jours et le niveau d'expression de la BSP qui était quasi nul, on peut supposer que la maturation des ostéoblastes n'est pas terminée. La proportion plus élevée en Ca à 14 jours d'incubation pourrait s'expliquer par une faible épaisseur de la MEC, permettant au faisceau d'électrons d'atteindre la surface du biomatériau et ainsi fausser les résultats. L'interaction des électrons d'un faisceau à 30 kV en mode haut vide avec un matériel de faible numéro atomique tel que le carbone peut être simulée avec des méthodes Monte Carlo. On trouve alors que la profondeur du volume d'interaction est aux alentours de 10 µm [85]. L'épaisseur de la MEC est justement estimée aux alentours de 10 µm pour une culture de cellules NNRASMC de deux semaines dans du milieu complémenté en acide ascorbique [102]. Si l'on considère qu'une tension de 20 keV a été appliqué en vide partiel et que l'épaisseur de la MEC est de 10 µm, la probabilité que les électrons atteignent la surface du biomatériau est faible. Pour vérifier cette hypothèse dans de futures expériences, on pourrait diminuer la tension d'accélération des électrons pour réduire la taille du volume

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

d'interaction et limiter la contribution du biomatériau sous-jacent. On pourrait également inclure une condition expérimentale contrôle qui consisterait à cultiver des cellules NIH-3T3 sur des pastilles dans les mêmes conditions que les MC3T3-E1, les NIH-3T3 ne se différenciant pas.

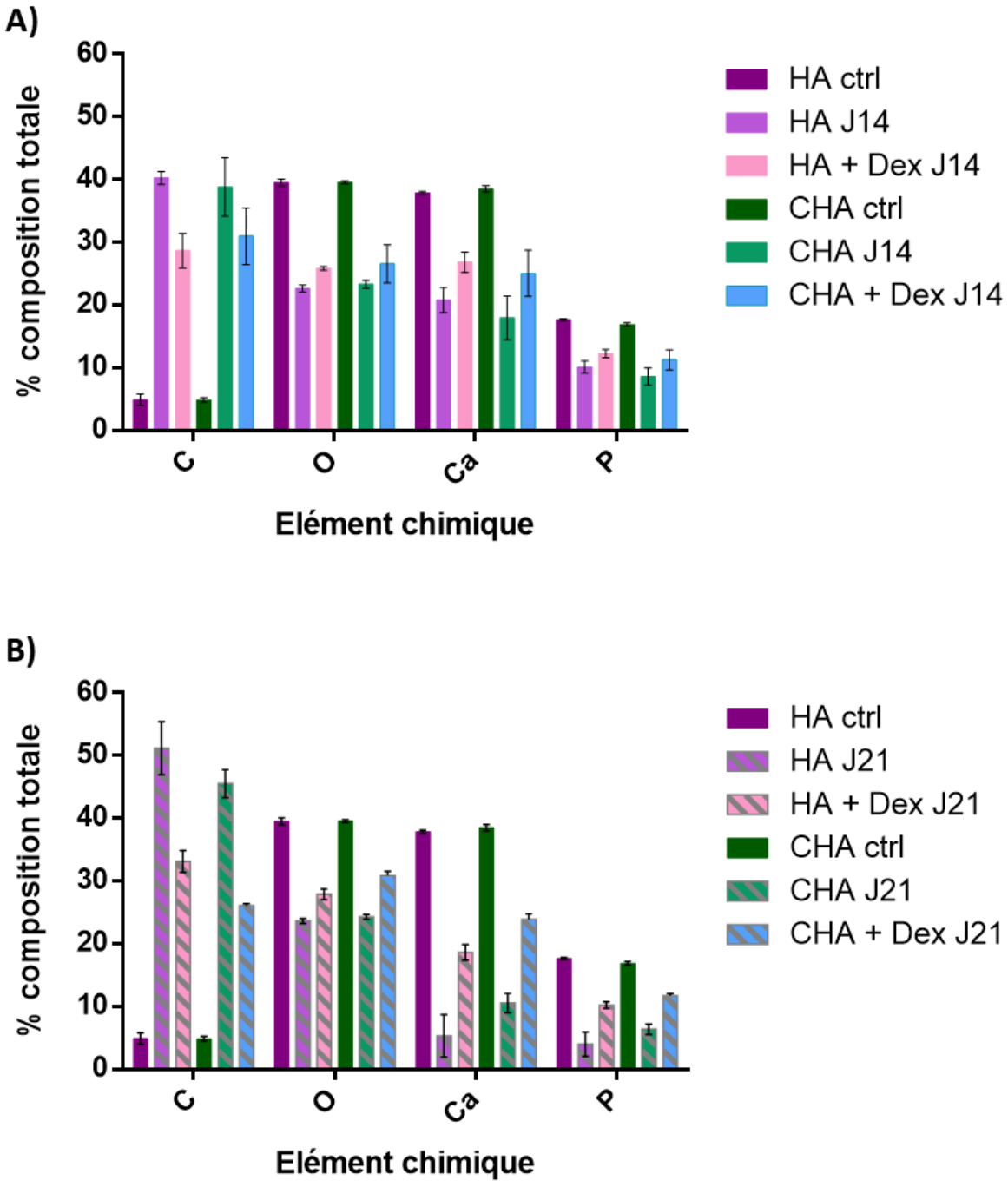


*Figure 59 : Mesure de la composition chimique de la MEC à 14 jours A) et à 21 jours B) d'incubation des cellules MC3T3-E1 avec du milieu ostéogénique. Des pastilles nues de HA et CHA sont représentées comme contrôle. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 sites et les barres d'erreurs représentent les écarts types. Une comparaison multiple a été effectuée avec le test de Tukey avec p ≤ 0,05 *, p ≤ 0,01 **. Seule la comparaison entre HA et CHA en culture est présentée.*

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons comparé l'adhésion des cellules MC3T3-E1 sur des pastilles de HA ou CHA grâce à la méthodologie développée dans le chapitre précédent. Cette étude a permis de mettre en évidence un comportement différent des cellules vis-à-vis de ces deux biomatériaux. En effet, les zones de contact de la cellule sur le CHA sont plus importantes à 15 minutes. La tendance s'inverse en faveur du HA à 30 minutes et 1 heure d'incubation. Dès 2 heures d'incubation l'écart s'efface et ces résultats sont confirmés par l'imagerie de l'interface cellule-biomatériau. A 24h d'incubation, les cellules sont plus étalées et sont plus nombreuses sur le HA.

Outre les interactions physiques, les interactions fonctionnelles entre cellules et biomatériaux ont été explorées à travers l'étude de minéralisation menée. Cette étude a mis en évidence la différenciation des cellules MC3T3-E1 en ostéoblastes 14 jours après culture dans du milieu ostéogénique, avec un niveau d'expression plus élevé d'ARNm de Runx2 et OCN pour le HA. A 21 jours d'incubation, la minéralisation de la MEC n'est pas clairement détectable même si le taux de Ca est plus important pour la MEC des cellules cultivées sur du CHA. Il existe d'autres méthodes permettant d'évaluer la différenciation ostéoblastique tels que la mesure de l'activité de la phosphatase alcaline. On peut également détecter les protéines d'intérêts par western-blot ou marquage immunofluorescent. La minéralisation de la MEC pourrait être envisager après extraction de la MEC du biomatériau.

Cette étude préliminaire a permis de déterminer les points à améliorer pour étudier l'interaction cellule-biomatériau. L'étude des sites d'ancrage est un bon indicateur, mais l'étude pourrait être renforcée en exploitant le marquage du cytosquelette pour mettre en évidence davantage de différence phénotypique entre les deux biomatériaux. Une étude du volume 3D de la cellule par microscopie confocale permettrait d'apporter des informations complémentaires. L'analyse morphologique 2D par MEB par simple mesure de la surface n'est pas suffisant pour mettre en évidence les différences morphologiques observées, la circularité de la zone d'intérêt dessinée peut être un paramètre de distinction morphologique. Sur l'aspect biologie moléculaire, l'expérience peut être répétée avec un nombre de pastilles plus important et en incluant un contrôle avec une lignée cellulaire ne minéralisant pas la matrice tels que les cellules NIH-3T3.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Chapitre 5 : Faisabilité de l'étude de cellules vivantes en ESEM

Pour étudier les cellules vivantes en MEBE ou en mode STEM-liquide sans avoir recours à une chambre microfluidique ou une encapsulation, les limites sont nombreuses. On peut notamment citer le vide partiel et la basse température qui doivent permettre de maintenir les cellules intactes et hydratées. La basse température n'est en effet pas optimale pour la survie des cellules, et le faisceau électronique endommage la membrane des cellules et crée des radicaux libres toxiques pour la cellule [103], [104].

Dans ce chapitre, on s'intéresse à évaluer l'influence de certains de ces paramètres afin de prédire s'il sera possible dans l'avenir d'observer des cellules vivantes en microscopie électronique. Pour répondre à cette question nous avons évalué la viabilité des cellules à basse température. Nous avons également étudié différents milieux, (tels que le PBS, l'HBSS et l'HEPES) étant donné que la nature du milieu peut générer des radicaux libres de différentes natures et/ou en différentes quantités. Enfin, nous avons évalué l'intérêt d'ajouter un antioxydant pour protéger les cellules des radicaux libres qui se forment [3] [4]. L'ajout d'oxyde de graphène a également été envisagé pour encapsuler les cellules. Il a en effet été montré dans la littérature que l'encapsulation permettait de conserver l'hydratation des cellules mais également de limiter les dommages causés par le faisceau électronique [106]. Une encapsulation des cellules biologiques par du graphène est également une piste dans le but de protéger l'utilisateur de risques biologiques liés à l'utilisation des cellules biologiques. Enfin, une étude d'optimisation des paramètres d'acquisition et de traitement d'images a été menée en mode haut vide sur des cellules fixées cultivées sur du titane ou de la zircone, afin de déterminer dans quelle mesure la dose d'électrons pouvait être réduite sans perdre d'information dans l'image.

1 Etude du milieu et de la température sur la viabilité cellulaire

1.1 Effet de la température et du tampon : comptage cellulaire (NIH-3T3)

Afin d'évaluer l'effet de la température et du milieu environnant sur la viabilité des cellules au cours du temps, un premier test basé sur le comptage manuel des cellules

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

vivantes et mortes a été mis en place. Le comptage manuel est un test nécessitant peu de moyens et est facile à réaliser. Il permet d'évaluer à partir de quelle durée d'incubation à basse température et ou dans un milieu spécifique les cellules commencent à mourir. Pour ce faire, les cellules sont diluées dans du bleu de trypan, un colorant bleu pénétrant uniquement dans les cellules mortes. Le comptage se fait à l'aide d'une cellule de comptage quadrillée. Le comptage manuel étant une opération chronophage, chaque condition a été testée une seule fois (n=1) sur une seule des deux lignées de cellules (NIH-3T3).

Concrètement, 75 000 cellules NIH-3T3 ont été ensemencées dans chacune des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre, puis cultivées pendant 48h à 37°C en présence de 5 % de CO_2 en environnement humide. A l'issue de cette période de culture, dans laquelle les cellules se sont multipliées, l'effet du milieu est évalué en remplaçant le milieu de culture par du tampon PBS. En outre, une partie des boîtes de Pétri est transférée au réfrigérateur (+4°C) afin d'évaluer l'effet de la température. Des boîtes de Pétri maintenues dans des conditions de culture standard, à savoir avec du milieu de culture et à 37°C en présence de 5 % de CO_2, servent de contrôle. L'effet du milieu et de la température sur la viabilité cellulaire est mesuré à différent temps d'incubation après modification des conditions de culture : 0, 1h, 2h et 6h. Pour pouvoir compter les cellules, ces dernières ont été décollées en fin de période d'incubation grâce à la trypsine. Pour le temps d'incubation de 1 h, les cellules ont été comptées après centrifugation. Voyant que le nombre de cellules était nettement inférieur au nombre initial de cellules (temps 0), les comptages suivants ont été effectués directement après ajout du milieu de culture.

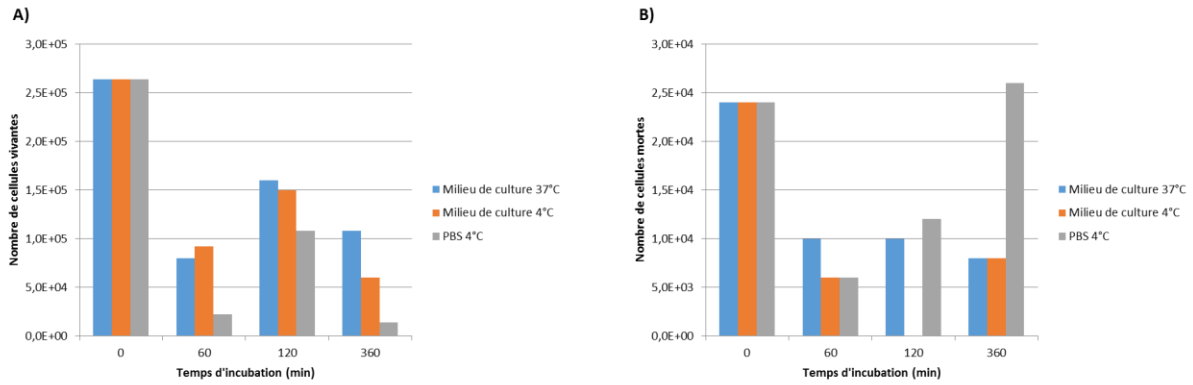


Figure 60 : Etude du milieu et de la température d'incubation sur la viabilité des cellules NIH-3T3 au cours du temps. 75000 cellules NIH-3T3 ont été cultivées en boîte de Pétri de 35 mm de diamètre pendant 48h à 37°C, 5% CO2. Le milieu de culture a été soit rafraîchi soit remplacé par du PBS. Les boîtes de Pétri contenant le PBS et une partie des boîtes de Pétri contenant du milieu de culture ont été transférées à 4°C. Le comptage au bleu de trypan des cellules vivantes (A) et mortes (B) a été effectué à 0, 1h 2h et 6h d'incubation.

Le nombre de cellules vivantes est donné en Figure 60A en fonction du temps d'incubation après changement de milieu et transfert à +4°C d'une partie des boîtes de Pétri. Il varie de manière non monotone au cours du temps même pour la condition contrôle (bleu). Cette variation du nombre de cellules peut être expliquée par un défaut de collecte

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

de la totalité des cellules lors des différentes étapes. En effet, une pellicule de milieu persistait au fond des boîtes de Pétri et il était possible d'y observer des cellules au microscope optique. Le nombre de cellules mortes semble être plus important au temps 0, comme le montre la Figure 60B, ce qui n'est pas non plus attendu.

La seule tendance claire concerne le nombre de cellules mortes en présence de PBS à +4°C (gris), qui augmente en fonction du temps. Cependant, nous avons vu que les différentes étapes pour effectuer le comptage sont chronophages et induisent un biais sur le nombre de cellules collectées. Cette méthode n'est donc pas suffisamment fiable pour mettre en évidence la qualité de la culture. Une méthode permettant de mesure la viabilité sans devoir collecter les cellules et permettant d'augmenter le nombre d'échantillons *n* de chaque condition testée serait plus adaptée. Une alternative est de mesurer l'ATP présent par luminescence pour évaluer l'état de la culture de manière plus qualitative. La mesure de l'ATP est une technique très répandue pour évaluer la viabilité cellulaire et dont la révélation ne nécessite pas d'incubation longue à 37°C.

1.2 Effet de la température et du milieu : mesure de l'ATP (NIH-3T3 et MG-63)

L'impact des conditions d'incubation sur l'état de la cellule est cette fois-ci déterminé en évaluant le statut énergétique de la culture cellulaire en mesurant l'ATP. La quantité d'ATP est proportionnelle au nombre de cellules et à leurs activités cataboliques. La mesure de l'ATP se fait grâce à une enzyme qui consomme l'ATP et génère de la lumière, ainsi la luminescence mesurée est proportionnelle à la quantité d'ATP présent. Le test de mesure d'ATP a été conçu pour traiter un grand nombre de conditions simultanément. Cette méthode présente néanmoins l'inconvénient de devoir lyser les cellules pour libérer l'ATP présent. Il était donc possible d'évaluer l'effet de la température et du milieu environnant sur les deux lignées de cellules NIH-3T3 et MG-63 en triplicat.

Les cellules NIH-3T3 et MG-63 ont été mises en culture dans des plaques 96-puits avec un ensemencement de 10 000 cellules/puits. Après 48h de culture à 37°C en présence de 5 % de CO_2, pour chacune des lignées, le milieu de certains puits a été remplacé par du PBS, et la moitié des plaques a été transférée dans un réfrigérateur à +4°C pour une durée de 30, 60, 120 et 180 minutes.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

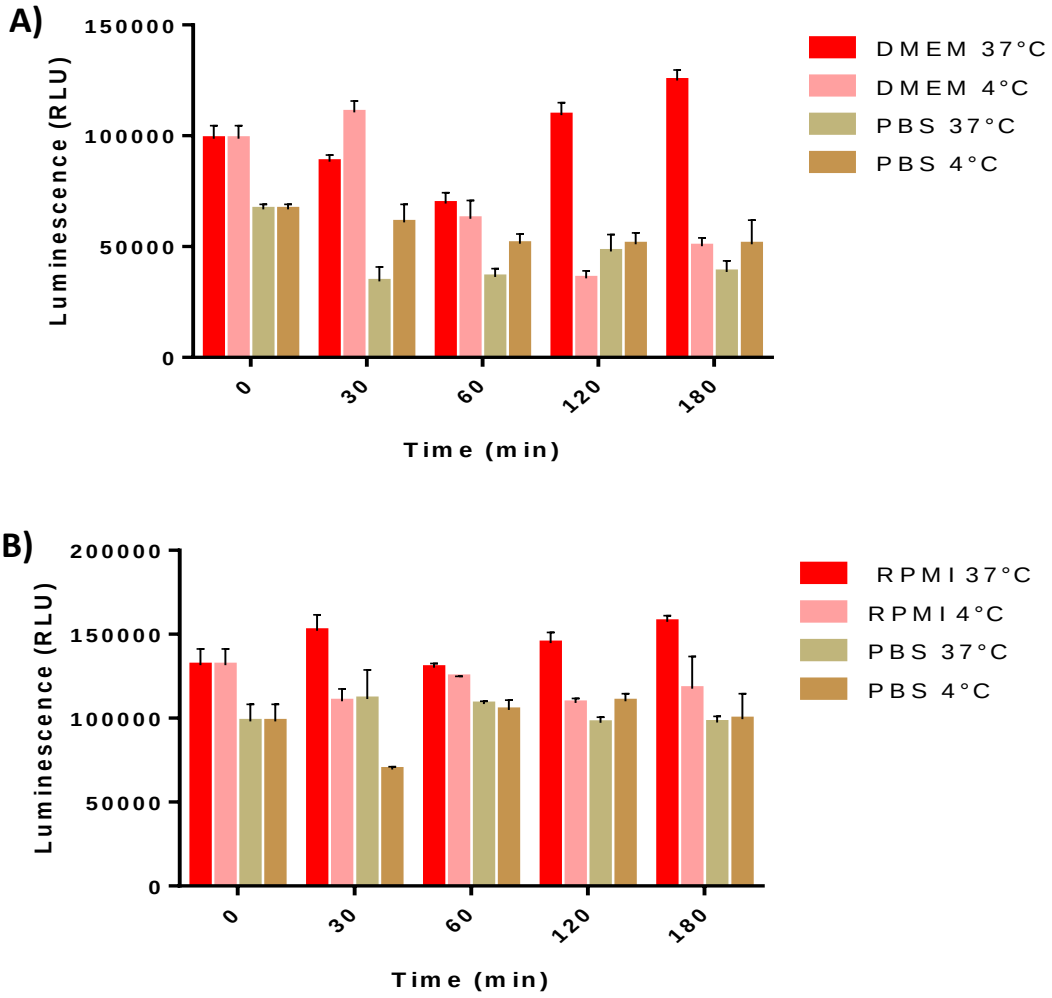


Figure 61 : Etude de l'effet des conditions de culture sur les cellules NIH-3T3 (A) et MG-63 (B) par mesure de luminescence. Les cellules NIH-3T3 (A) et MG-63 (B) ont été ensemencées en plaques 96-puits avec une densité de 10 000 cellules/puit et cultivées pendant 48 h à 37°C en présence de 5 % de CO_2. Le milieu de culture a été rafraichi ou remplacé par du PBS, puis les plaques ont été incubées soit à 37°C avec 5 % de CO_2, soit à +4°C. La luminescence a été mesurée à différents temps : 30, 60, 120 et 180 minutes.

Les MG-63 sont plus grandes que les NIH-3T3 et présentent par conséquent un niveau basal d'ATP plus important. Cela se manifeste par une luminescence globalement plus importante pour les cellules MG-63 par rapport aux NIH-3T3, quelles que soient les conditions de culture, voir Figure 61. Le niveau d'ATP dans les MG-63 est plus stable et constant au cours du temps quelle que soit la condition, excepté pour la condition avec du PBS à +4°C pour le temps 30 minutes, cf Figure 61B. Les NIH-3T3 présentent un niveau d'ATP plus faible en présence de PBS voir Figure 61A. De plus le niveau d'ATP est également plus faible à +4°C. Cette lignée est donc sensible à la fois au tampon et à la fois à la température, mais cette différence n'est statistiquement pas significative. Les cellules NIH-3T3 étant sensibles au PBS, nous avons décidé d'évaluer l'impact de deux autres tampons utilisés couramment en culture cellulaire : l'HBSS et de l'HEPES.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

La question de la sensibilité de la méthode s'est posée, à savoir quel est le délai entre le début de la mort cellulaire et le moment où l'ATP n'est plus détectable. Le suivi de l'évolution de l'état de la culture au cours du temps serait plus relevant sur un même échantillon et ne requérant pas la lyse des cellules. La mesure de l'impédance électrique au cours du temps est une bonne alternative.

1.3 Effet de la température et du tampon : mesure du changement d'impédance électrique (NIH-3T3 et MG-63)

La mesure de l'impédance électrique est une technique non-invasive permettant un suivi de la prolifération en temps réel. Les plaques de culture sont couvertes à 80% d'électrodes en or, interdigitées. Lorsque les puits ne contiennent que du milieu de culture le courant passe sans résistance entre les électrodes, la résistance au passage du courant est très faible. En proliférant, les cellules recouvrent de plus en plus les électrodes en or et freinent le passage du courant. L'appareil mesure l'impédance qui est la dérivée de la résistance du passage du courant entre les électrodes, causée par la présence de cellules, L'impédance est proportionnelle à la surface des électrodes couvertes par les cellules présentes dans le puit. Elle est exprimée sous forme de valeur arbitraire nommée en « indice cellulaire ». La surface occupée par les cellules dépend de deux paramètres : le nombre et la taille des cellules. Comme il est attendu que les mesures soient réalisées sur des cellules en prolifération, on peut considérer sans faire une grosse erreur que la taille des cellules est constante. Le changement d'impédance dépend donc principalement du nombre de cellules. Une augmentation du nombre de cellules se traduit par une augmentation de l'indice cellulaire. A l'inverse, la mort cellulaire ou le détachement des cellules des électrodes (ce qui est une prémisse de la mort cellulaire) se traduit par une diminution de l'indice cellulaire. Pour être totalement exhaustif, la force d'adhésion des cellules sur les électrodes modifie également l'indice cellulaire, mais cette force d'adhésion est une constante pour chaque lignée cellulaire. Il faut cependant garder à l'esprit qu'un traitement chimique pourrait modifier la force d'adhésion des cellules.

Nous nous sommes intéressés à l'impact de l'incubation des cellules à 4°C dans de l'HBSS ou de l'HEPES en présence de concentrations croissantes d'un antioxydant : le N-acétylcystéine (NAC). Cette expérience a été menée grâce à une collaboration avec le laboratoire CarMen.

Les cellules NIH-3T3 et MG-63 sont ensemencées avec une densité de 2500 cellules/puit dans une plaque 96-puits et incubées pendant 24 h à 37°C avec 5 % de CO_2. Le milieu de culture est ensuite remplacé par du tampon HEPES ou HBSS contenant

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

éventuellement 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM ou 10 mM de NAC puis la plaque est placée 5 h au réfrigérateur à +4°C. Les effets de la température et du milieu sont évalués en suivant le changement d'impédance électrique de la culture pendant 50 h une fois la plaque replacée dans l'incubateur. Au cours du suivi, le milieu des différentes conditions est remplacé par du milieu de culture puis l'impédance électrique est suivie pendant 110 h supplémentaires.

Les cellules NIH-3T3 prolifèrent plus vite que les cellules MG-63, voir Figure 62 et Figure 63. Le transfert de la plaque au réfrigérateur induit pour les deux lignées cellulaires une chute de l'indice cellulaire sauf pour l'HBSS en présence 10 et 5 mM de NAC, voir Figure 62 et Figure 63. L'HBSS en présence des plus fortes concentrations de NAC ralentit la chute de l'indice cellulaire après le retour de la plaque dans l'incubateur. De plus comme le montrent les Figure 62 et Figure 63, le milieu de culture seul permet une reprise plus importante de la prolifération cellulaire en comparaison avec le milieu de culture contenant du NAC.

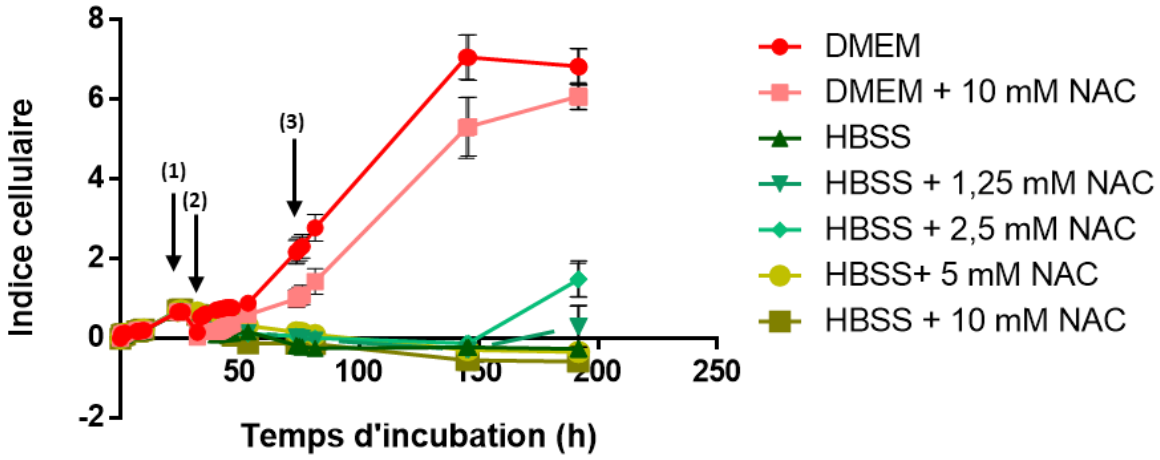


Figure 62 : Effet de la température et de l'HBSS en présence de concentrations croissantes en NAC sur la prolifération des cellules NIH-3T3. (1) Remplacement du milieu de culture par les différents milieux d'incubation à +4°C et incubation 5h à +4°C. (2) Retour à l'incubateur à 37°C, 5% CO_2. (3) Remplacement des différents milieux par du milieu de culture et incubation à 37°C, 5% CO_2.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

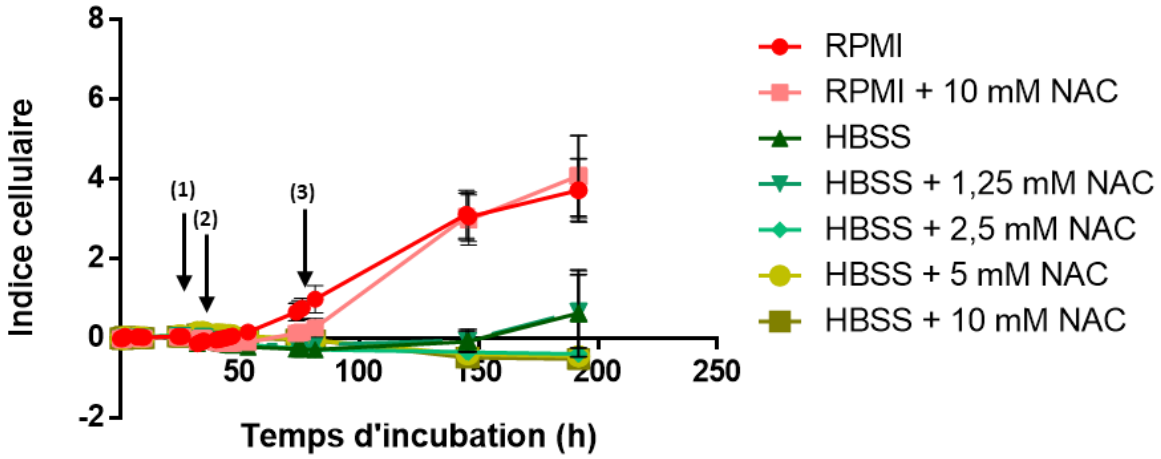


Figure 63 : : Effet de la température et de l'HBSS en présence de concentrations croissantes en NAC sur la prolifération des cellules MG-63. (1) Remplacement du milieu de culture par les différents milieux d'incubation à +4°C et incubation 5h à +4°C. (2) Retour à l'incubateur à 37°C, 5% CO_2. (3) Remplacement des différents milieux par du milieu de culture et incubation à 37°C, 5% CO_2.

On note sur les Figure 64 et Figure 65 un bond de l'indice cellulaire pour les deux lignées cellulaire suite au passage au réfrigérateur pour les conditions avec de l'HEPES. Une fois replacée dans l'incubateur l'indice cellulaire diminue légèrement au cours du temps, et ceci pour les deux lignées de cellules. Ce bond d'indice cellulaire est probablement un artefact lié à la nature du tampon. En effet, l'HEPES est un tampon zwitterionique qui pourrait perturber l'échange d'électrons dans le système et ainsi fausser l'impédance mesurée [107].

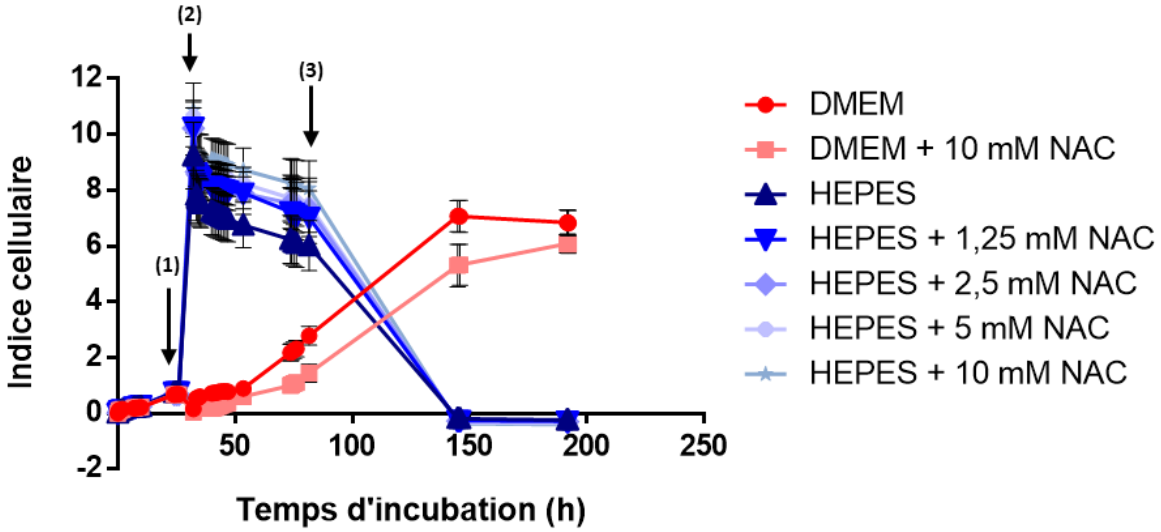


Figure 64 : Effet de la température et de l'HEPES en présence de concentrations croissantes en NAC sur la prolifération des cellules NIH-3T3. (1) Remplacement du milieu de culture par les différents milieux d'incubation à +4°C et incubation 5h à +4°C. (2) Retour à l'incubateur à 37°C, 5% CO_2. (3) Remplacement des différents milieux par du milieu de culture et incubation à 37°C, 5% CO_2.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

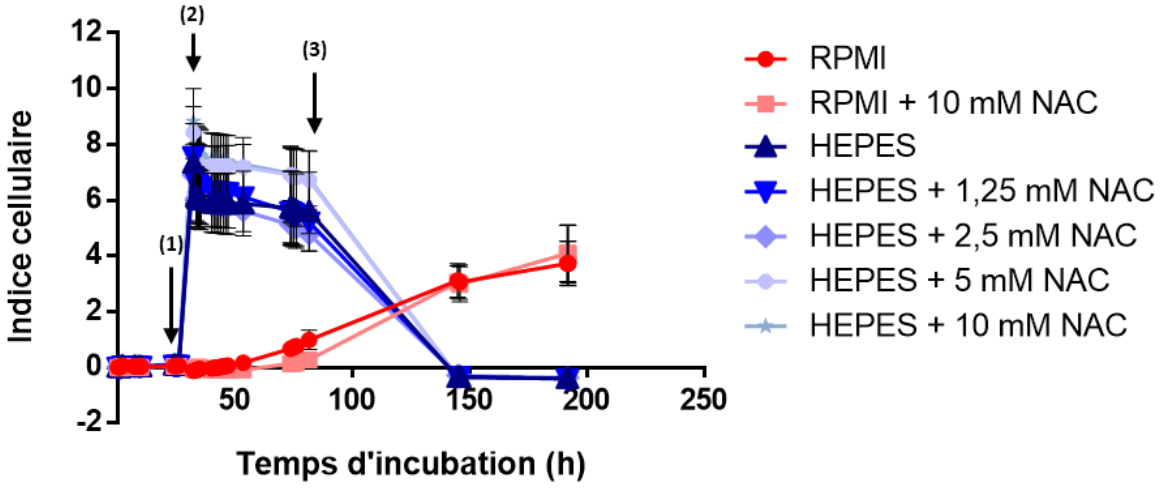


Figure 65 : : Effet de la température et de l'HEPES en présence de concentrations croissantes en NAC sur la prolifération des cellules MG-63. (1) Remplacement du milieu de culture par les différents milieux d'incubation à +4°C et incubation 5h à +4°C. (2) Retour à l'incubateur à 37°C, 5% CO_2. (3) Remplacement des différents milieux par du milieu de culture et incubation à 37°C, 5% CO_2.

En résumé de cette partie, la mesure de l'impédance cellulaire permet de suivre la prolifération cellulaire en temps réel dans les conditions standards de culture. Il est difficile de dire avec certitude si l'impédance mesurée reflète réellement la prolifération cellulaire comme le montre les conditions en présence d'HEPES. En effet, les conditions en présence d'HEPES sont les seules conditions présentant une augmentation de l'indice cellulaire et de manière très importante. De plus, lorsque l'HEPES est remplacé par du milieu de culture l'indice cellulaire chute brutalement, voir Figure 64 et Figure 65. De plus cette méthode donne une indication sur la prolifération cellulaire, qui est un long processus. Cependant, notre objectif est de déterminer le tampon permettant aux cellules de survivre aux conditions d'une session de microscopie électronique à basse température (+4°C). A ce stade, l'évaluation de la survie/mortalité des cellules suite à une incubation à +4°C semble plus pertinent. Il paraît donc intéressant d'adapter le test live & dead utilisé en microscopie confocale à une utilisation en plaque 96-puits.

1.4 Mesure de la viabilité et mortalité cellulaire par fluorescence : méthode live & dead

La technique live & dead est une méthode fluorimétrique utilisée en microscopie confocale pour marquer les cellules vivantes et mortes. En effet, les cellules sont incubées avec un réactif contenant de la calcéine-AM et de l'iodure de propidium (IP). La calcéine-AM est un colorant qui diffuse dans la cellule, elle est non fluorescente et est hydrolysée

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

en calcéine fluorescente par les cellules vivantes. L'IP est une marque fluorescente qui se lie à l'ADN, il pénètre uniquement dans les cellules mortes qui ont perdu l'intégrité membranaire.

1.4.1 Test préliminaire 1 : faisabilité

Afin de déterminer s'il est possible d'utiliser la calcéine-AM et l'IP pour évaluer l'effet du milieu et de la température, 4000 cellules NIH-3T3/puits ont été ensemencées dans des plaques 96-puits pendant 48h. Puis les cellules ont été incubées à +4°C pendant 6 h dans du milieu de culture ou de l'HBSS ou de l'HEPES en présence de 0 mM, 2,5 mM, 5 mM et 10 mM de NAC. Les milieux respectifs sont ensuite remplacés par le réactif contenant 5 µM de calcéine-AM et 5 µM d'IP, la fluorescence est mesurée à l'issue de 10 minutes à température ambiante.

Les cellules NIH-3T3 incubées à +4°C pendant 6h en présence d'HBSS présentent une activité enzymatique plus élevée que les cellules cultivées dans d'autres milieux pour les concentrations en NAC de 0 à 5 mM sans effet dose (Figure 66A). La concentration de 10 mM qu'on retrouve dans la littérature ne semble pas présenter de bénéfices par rapport à la condition sans NAC (Figure 66 A). Le marquage des noyaux montre en revanche une diminution de cellules mortes proportionnelle à la concentration en NAC pour une incubation dans de l'HBSS ou de l'HEPES (Figure 66 B). Les cellules incubées dans le milieu de culture présentent une mortalité moins importante que les cellules incubées avec de l'HBSS ou de l'HEPES (Figure 66 B). La présence de NAC dans le milieu de culture n'a donc pas d'effet bénéfique/protecteur.

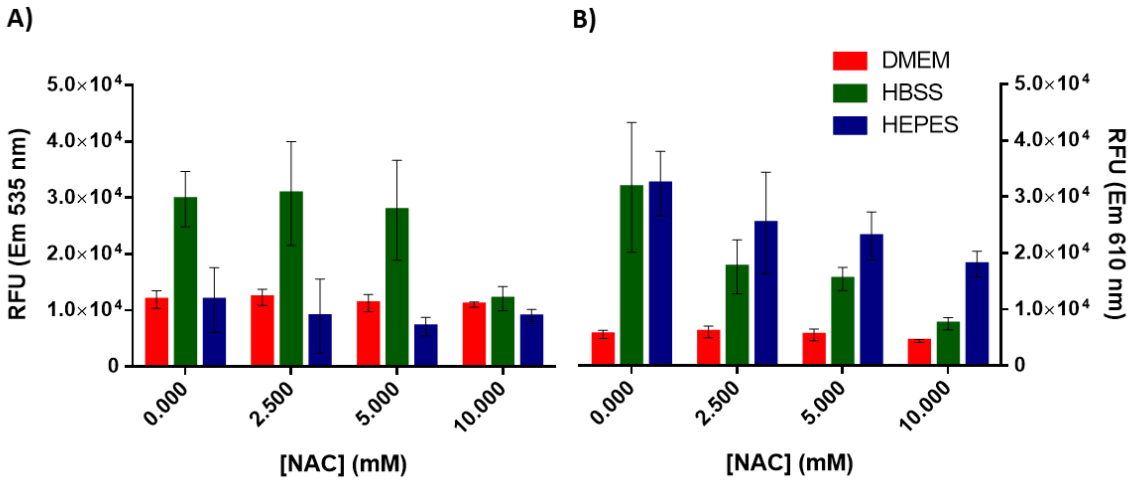


*Figure 66 : Etude de l'effet de l'incubation dans différents milieux en présence de concentrations croissantes en NAC à **+4°C** pendant 6h sur la viabilité des NIH-3T3. La viabilité a été évaluée par la capacité des cellules à hydrolyser la calcéine-AM A) et par le marquage des noyaux à l'IP des cellules mortes B)*

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Ce test met en évidence l'avantage d'évaluer à la fois l'activité de la cellule et la mortalité des cellules. En effet une baisse d'activité enzymatique est révélatrice d'un ralentissement du métabolisme, alors que le marquage est révélateur de la « toxicité » des conditions d'incubation des cellules et permet ainsi de mettre en évidence la protection du NAC vis-à-vis des conditions hostiles d'incubation (milieu différent du milieu de culture).

1.4.2 Test préliminaire 2 : sensibilité du test

Une expérience préliminaire supplémentaire a été menée d'une part pour déterminer si ce test était également applicable aux cellules MG-63, et d'autre part pour savoir si le test est sensible au point de distinguer une variation d'activité enzymatique en fonction de la température d'incubation des cellules.

Brièvement, les cellules NIH-3T3 et MG-63 ont été cultivées en plaques 96-puits pendant 48h à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO_2. Puis, les milieux de culture ont été remplacés par du nouveau milieu de culture, de l'HBSS ou de l'HEPES en présence de concentrations croissantes de NAC de 0 à 10 mM. Une moitié des plaques a été incubée à +4°C tandis que l'autre moitié a été incubée à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO_2 pendant 5h.

Les cellules NIH-3T3 incubées à 37°C avec le milieu de culture en absence et en présence de 5 ou 10 mM de NAC présentent une activité enzymatique comparable (Figure 67A). Dans ces mêmes conditions, le signal obtenu pour les cellules mortes est négligeable (Figure 67B). Lorsque les cellules sont incubées à +4°C l'activité enzymatique est légèrement réduite et la mortalité cellulaire augmente très légèrement (Figure 67D). Les cellules NIH-3T3 incubées en présence d'HBSS seul présentent une activité enzymatique similaire aux cellules incubées avec du milieu de culture (Figure 67 A et C), en revanche la concentration la plus élevée de NAC semble être cytotoxique (Figure 67 B et D). L'HEPES ne semble pas être un tampon approprié à la culture des NIH-3T3, en effet on observe un signal uniquement pour les cellules mortes.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

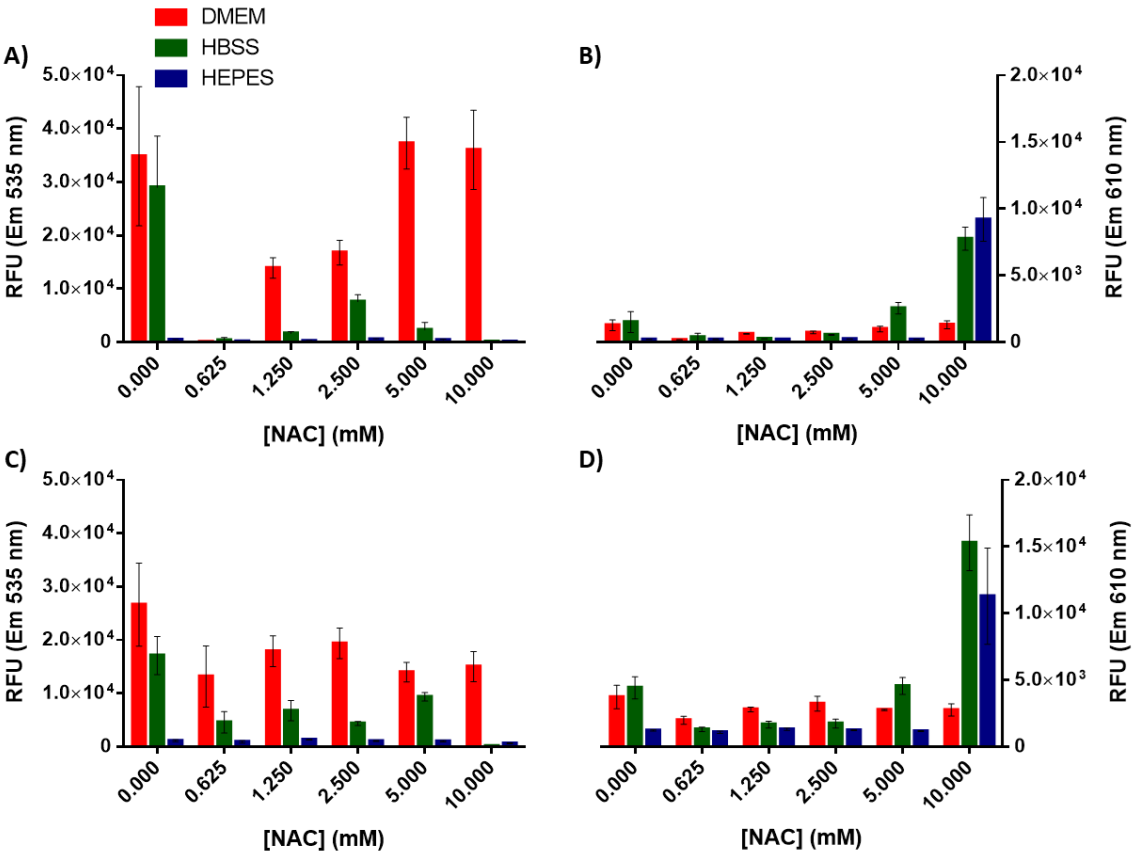


Figure 67 : Etude de l'effet de l'incubation dans différents milieux en présence de concentrations croissantes en NAC à 37°C A) & B) et à +4°C C) & D) pendant 5h sur la viabilité des NIH-3T3. La viabilité a été évaluée par la capacité des cellules à hydrolyser la calcéine-AM A) et C) et par le marquage à l'IP des noyaux des cellules mortes B) et D)

Les cellules MG-63 incubées à 37°C avec le milieu de culture en absence et en présence de NAC présentent une activité comparable : dans ces mêmes conditions, le signal obtenu pour les cellules mortes est négligeable. Lorsque les cellules sont incubées à +4°C, le signal obtenu pour l'hydrolyse de la calcéine-AM est plus important et la mortalité cellulaire augmente très légèrement. Les cellules MG-63 incubées en présence d'HBSS seul présentent une activité enzymatique similaire aux cellules incubées avec du milieu de culture. En revanche, les concentrations de 5 et 10 mM de NAC semblent être cytotoxiques. Le signal obtenu pour incubation avec de l'HEPES est plus important à +4°C, la concentration de 10 mM de NAC semble être cytotoxique.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

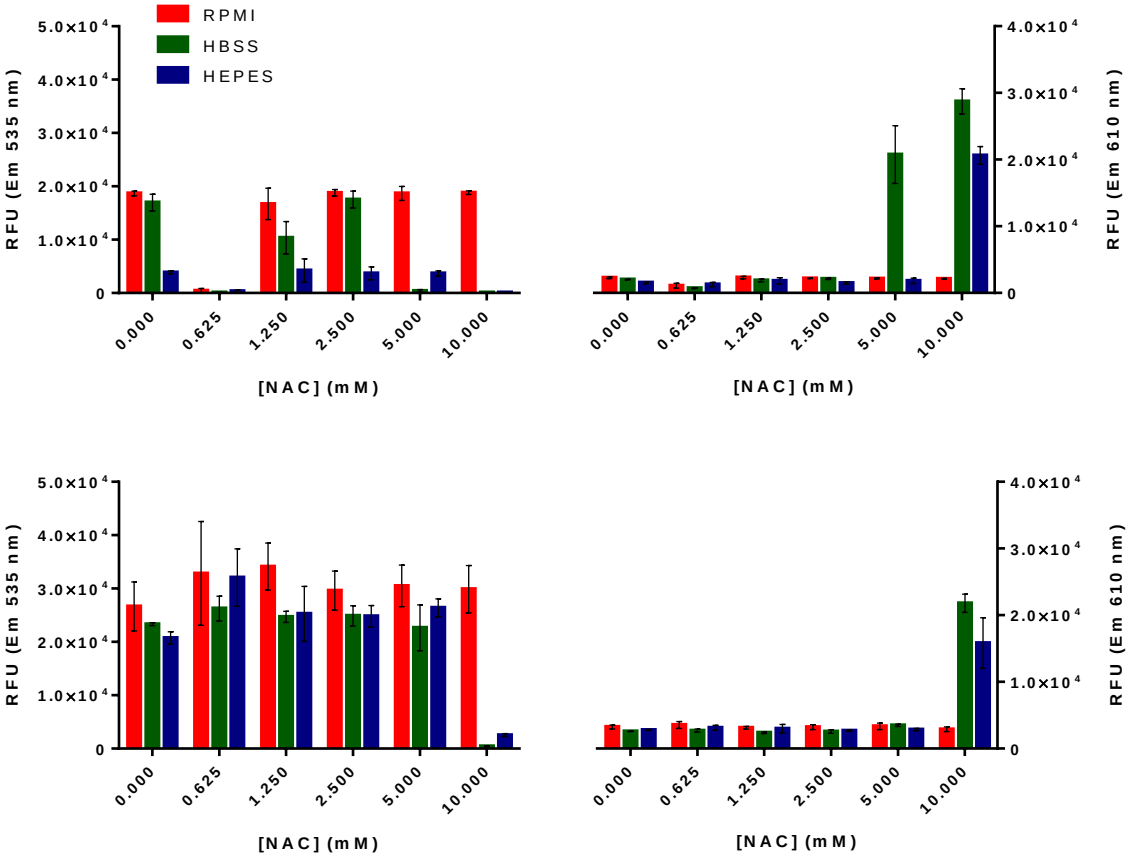


Figure 68 : Etude de l'effet de l'incubation dans différents milieux en présence de concentrations croissantes en NAC à 37°C A) & B) et à +4°C C) & D) pendant 5h sur la viabilité des MG-63. La viabilité a été évaluée par la capacité des cellules à hydrolyser la calcéine AM A) et C) et par le marquage des noyaux à l'iodure de propidium des cellules mortes B) et D).

Les résultats obtenus pour cette expérience semblent incohérents, rendant difficile leur interprétation. En effet, les conditions en présence de 0,625 mM de NAC ne présentent de signal ni pour l'hydrolyse de la calcéine-AM ni pour le marquage IP. L'absence de signal suggère la perte de cellules au cours de l'expérimentation. Les résultats présentés tenant compte uniquement des valeurs de fluorescence, l'analyse sera plus juste en rapportant la fluorescence à la concentration en protéines de chaque condition. La dose de 10 mM de NAC semble être cytotoxique contrairement à ce que rapporte la littérature [88]. Lors de l'ajout de la solution stock dans le milieu de culture, ce dernier a viré légèrement à l'orange indiquant une acidification du milieu de culture. Des mesures de pH ont été effectuées sur une solution de NAC 10 mM dans l'HBSS ou l'HEPES, et effectivement celui-ci était acide. L'acidification du milieu pourrait être la raison de la cytotoxicité observée en présence la plus forte concentration de NAC.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Ainsi dans l'étude suivante, la préparation de la solution stock de NAC a été modifiée de sorte à conserver un pH neutre des tampons après ajout du NAC à une concentration finale de 10 mM.

1.4.3 Etude de l'effet du milieu et de la température d'incubation sur les cellules au cours du temps

Grâce aux résultats des tests préliminaires, les conditions expérimentales ont pu être optimisées de manière à évaluer les effets du milieu et de la température d'incubation sur la viabilité cellulaire au cours du temps. En particulier, le pH a pu être ajusté aux plus fortes concentrations de NAC.

Les cellules NIH-3T3 et MG-63 ont été cultivées en plaques 96-puits pendant 48h à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO_2. Puis, les milieux de culture ont été remplacés par du nouveau milieu de culture, de l'HBSS ou de l'HEPES en présence de 10 mM de NAC. Une moitié des plaques a été incubée à +4°C tandis que l'autre moitié a été incubée à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO_2 pendant 90, 180, 270 et 360 minutes.

On note que pour les cellules NIH-3T3 incubées à 37°C avec le milieu de culture avec ou sans NAC, l'hydrolyse de la calcéine-AM est plus faible pour les temps 90, 180 et 270 minutes par rapport au temps 0 et quasi nul à 360 minutes (Figure 69A). La baisse de l'activité enzymatique suggère une baisse de viabilité cellulaire. Cependant on n'observe pas d'augmentation du marquage IP, donc de mort cellulaire, plus importante que pour le temps 0 (Figure 69B). L'hydrolyse de la calcéine-AM augmente au cours du temps lorsque les cellules sont incubées avec le tampon HBSS en présence ou absence de NAC 10 mM (Figure 69A), avec une mortalité cellulaire faible et stable au cours du temps (Figure 69B). En revanche, lorsque les cellules sont incubées avec du tampon HEPES en présence ou non de NAC 10 mM, l'activité enzymatique est quasi nulle (Figure 69Figure 69A), on note une augmentation du marquage IP au cours du temps. Pour une incubation supérieure à 270 minutes à +4°C, le marquage IP en présence de NAC 10 mM est inférieur à celui de la condition sans NAC. La présence de NAC 10 mM semble donc avoir un léger effet bénéfique pour la condition avec l'HEPES (voir Figure 69B).

L'incubation à +4°C des cellules NIH-3T3 avec les différents milieux pendant 90 minutes montre une baisse d'activité enzymatique accompagnée d'une augmentation de mortalité cellulaire (Figure 69C et D). L'hydrolyse de la calcéine-AM est plus faible à +4°C qu'à 37°C (Figure 69A et C). L'incubation dans l'HBSS +/- NAC 10 mM préserve une activité

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

enzymatique stable au cours du temps (Figure 69C). L'incubation des cellules avec l'HEPES +/- NAC 10 mM donnent des résultats similaires à ceux obtenus pour une incubation à 37°C, cependant à 4°C le bénéfice de la présence de 10 mM de NAC est mis en évidence un marquage IP plus faible aux temps 270 et 360 minutes (Figure 69D).

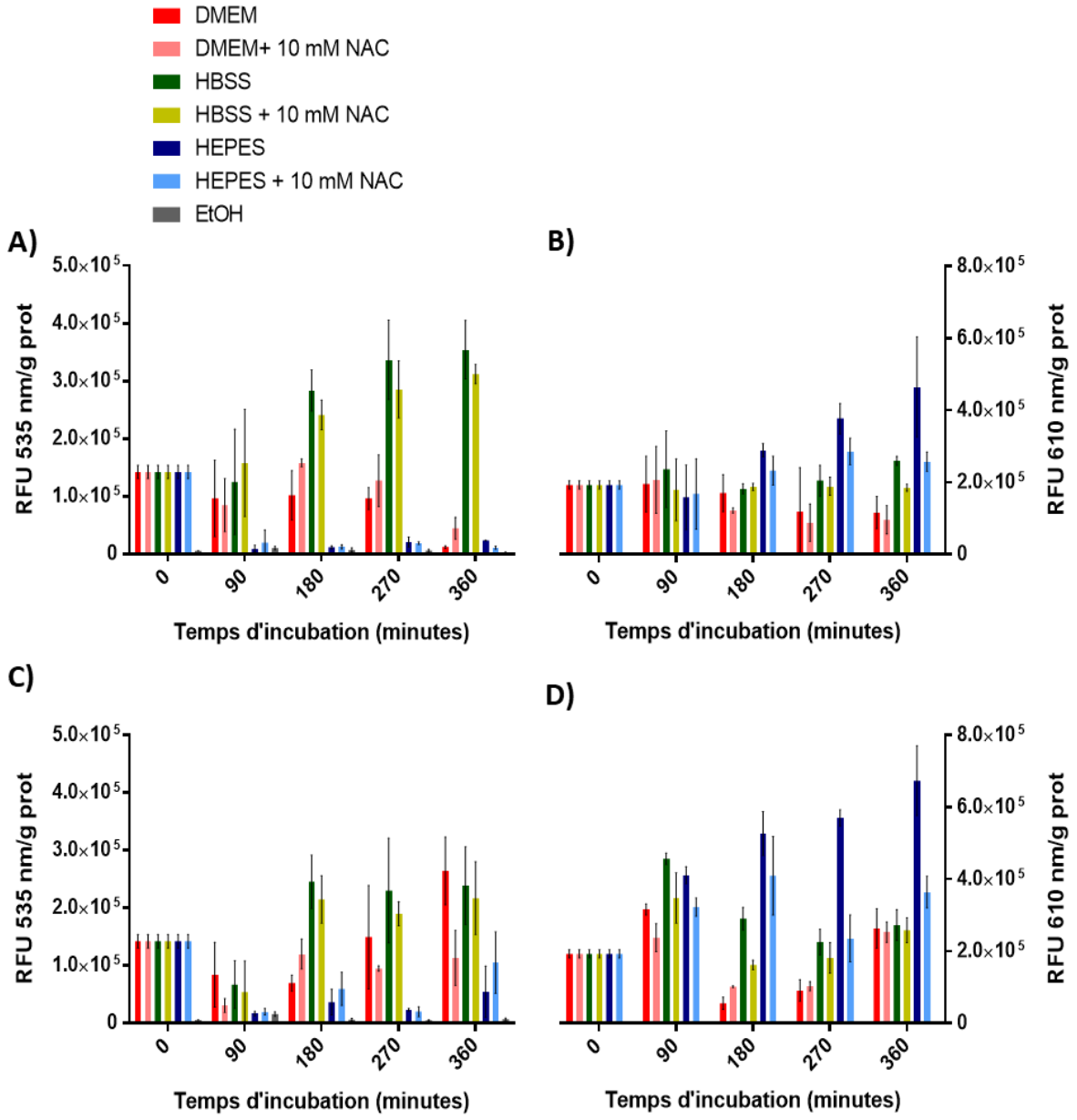


Figure 69 : Etude de l'effet de l'incubation dans différent milieu en présence de 10 mM de NAC à 37°C A) & B) et à +4°C C) & D) au cours du temps sur la viabilité des NIH-3T3. La viabilité a été évaluée par la capacité des cellules à hydrolyser la calcéine-AM A) et C) et la mort cellulaire est évaluée par le marquage des noyaux à l'IP des cellules mortes B) et D)

Les cellules MG-63 incubées à 37°C avec du milieu de culture ou de l'HBSS présente une activité enzymatique qui augmente au cours du temps et ceci en présence ou absence de NAC 10 mM (Figure 70A). Pour ces mêmes milieux, le marquage IP a tendance à diminuer au cours du temps (Figure 70B). L'incubation avec l'HEPES +/- NAC 10 mM révèle

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

une baisse de l'activité enzymatique (Figure 70A), le marquage IP confirme l'augmentation de cellules mortes avec un effet bénéfique de NAC 10 mM pour les durées d'incubation supérieures à 180 minutes (Figure 70B).

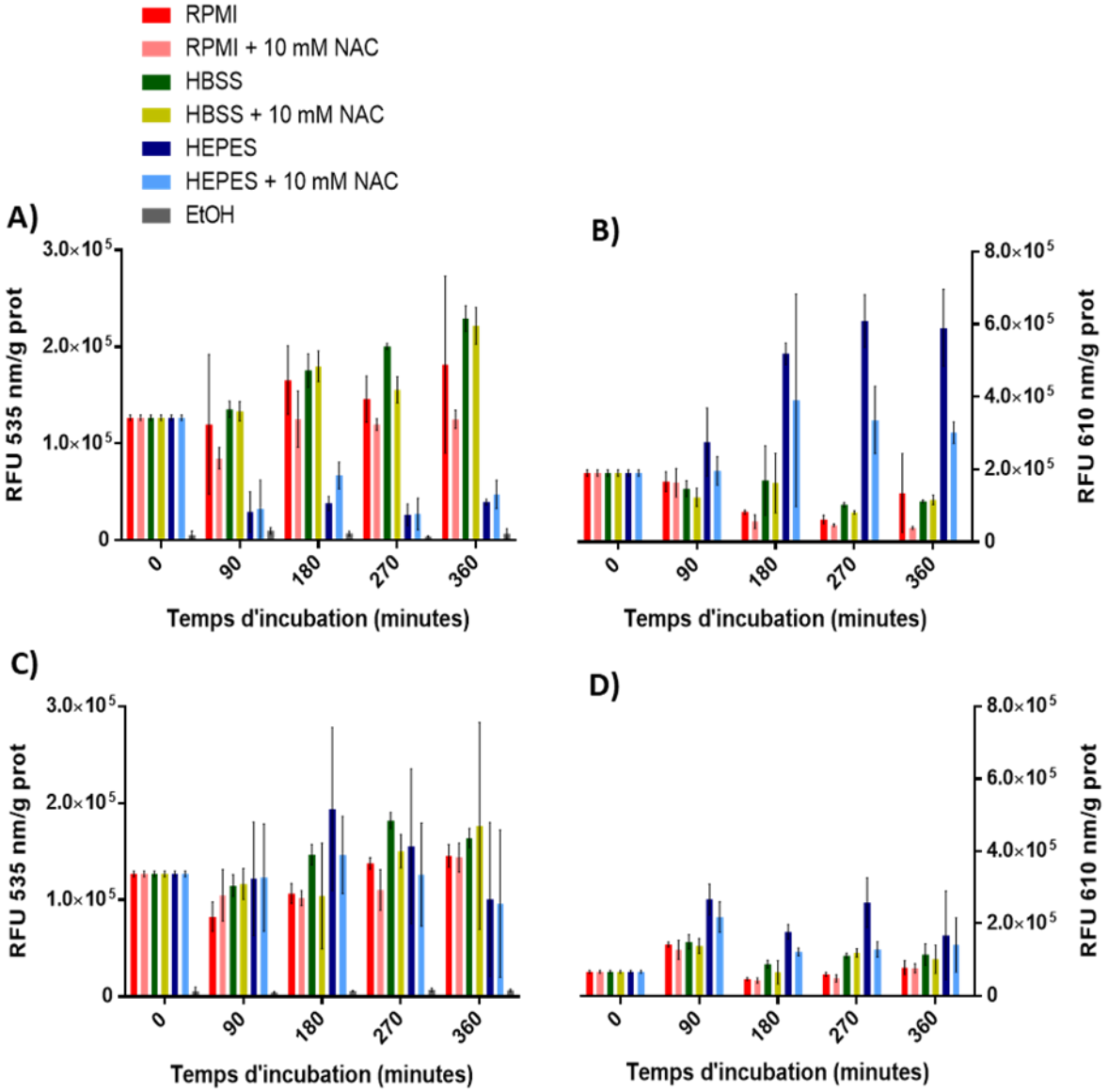


Figure 70 : Etude de l'effet de l'incubation dans différent milieu en présence de 10 mM de NAC à 37°C A) & B) et à +4°C C) & D) au cours du temps sur la viabilité des MG-63. La viabilité a été évaluée par la capacité des cellules à hydrolyser la calcéine-AM A) et C) et la mort cellulaire est évaluée par le marquage des noyaux à l'IP des cellules mortes B) et D)

Lors de l'incubation à +4°C, l'activité enzymatique reste stable avec une tendance à l'augmentation au cours du temps, quelque soit le milieu d'incubation (Figure 70C). Le marquage IP montre une augmentation de la mortalité au temps 90 minutes pour tous les milieux d'incubation. Les temps d'incubation suivants présentent une baisse de marquage puis une stabilisation pour le milieu de culture et l'HBSS en présence ou en absence de de

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

NAC 10 mM. Le marquage IP est plus important pour une incubation avec de l'HEPES seul. Encore une fois, la présence de NAC 10 mM semble être bénéfique pour des durées d'incubation plus longues (Figure 70D).

Pour déterminer le milieu adéquat à l'observation des cellules à l'état naturel par miscorscopie électronique environnementale, il était important de pouvoir évaluer à la fois l'activité et la mortalité cellulaire en cela la technique live&dead était intéressante. La mesure de l'hydrolyse de la calcéine-AM et de la mortalité cellulaire ont permis de mettre en évidence que l'HBSS est un bon substitut au milieu de culture pour une incubation à +4°C aussi bien pour les cellules NIH-3T3 que les MG-63. Le bénéfice du NAC 10 mM a été mis en évidence grâce à l'HEPES qui, utilisé seul, ne permet pas de maintenir les cellules en vie et d'assurer une croissance cellulaire.

2 Encapsulation des cellules avec de l'oxyde de graphène

Afin de limiter l'évaporation d'eau et d'encapsuler les cellules, l'utilisation de nanoparticules (NPs) d'oxyde de graphène (OG) a été envisagée. Dans un premier temps, nous avons évalué la toxicité de ces NPs sur les cellules 3T3-L1, qui est la lignée de cellules couramment utilisée au laboratoire CarMeN. Puis dans un second temps, nous avons déterminé le volume minimum de milieu requis pour maintenir les cellules en bon état. Ces analyses ont été menées en même temps que celles sur l'influence du milieu de culture et de la température.

2.1 Evaluation de la toxicité des NPs d'OG

Nous avons évalué la toxicité des NPs d'OG en suivant la prolifération des cellules 3T3-L1, par mesure de l'impédance électrique décrite dans la section 1.3. p. 98. Les cellules ont été cultivées en plaque 96-puits, muni de microélectrodes, pendant 54 h à 37 °C en atmosphère humide et en présence de 5% de CO_2. Puis, les NPs d'OG ont été ajoutés à des concentrations allant de 0 à 400 µg/mL. Au bout de 24 h d'incubation avec les NPs d'OG, ces dernières ont été retirées et remplacées par du milieu de culture ; cette étape est appelée « washout » sur la Figure 71. L'impédance est mesurée pendant 20 h supplémentaires.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

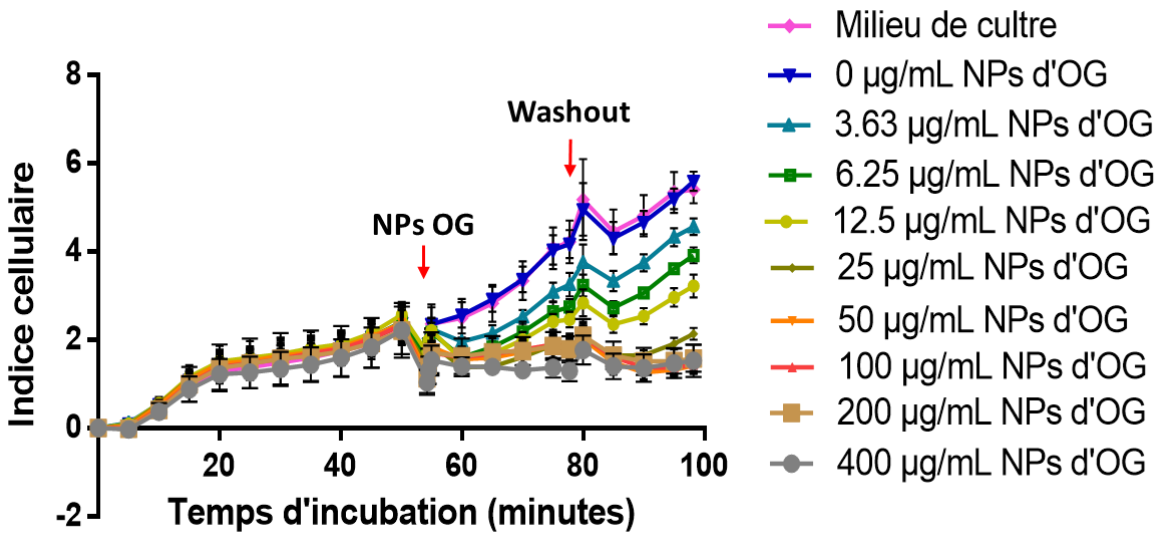


Figure 71 : Suivi de l'impédance des cellules 3T3-L1 au cours du temps avant et après ajout de différentes concentrations de NPs d'OG.

L'indice cellulaire est calculé à partir de l'impédance électrique qui reflète la prolifération cellulaire. Les NPs d'OG inhibent la prolifération de manière dose-dépendante : le « Delta Indice cellulaire » présenté en Figure 72 indique la capacité des cellules à proliférer après ajout des NPs d'OG. On voit que le « Delta Indice cellulaire » diminue lorsque la concentration en NPs d'OG augmente. Lorsque les NPs sont éliminées, la prolifération cellulaire reprend pour les conditions ayant une concentration en NPs d'OG inférieure ou égale à 25 µg/mL. La prolifération cellulaire reste acceptable pour les concentrations en NPs de 3,63 et 6,25 µg/mL (Figure 73).

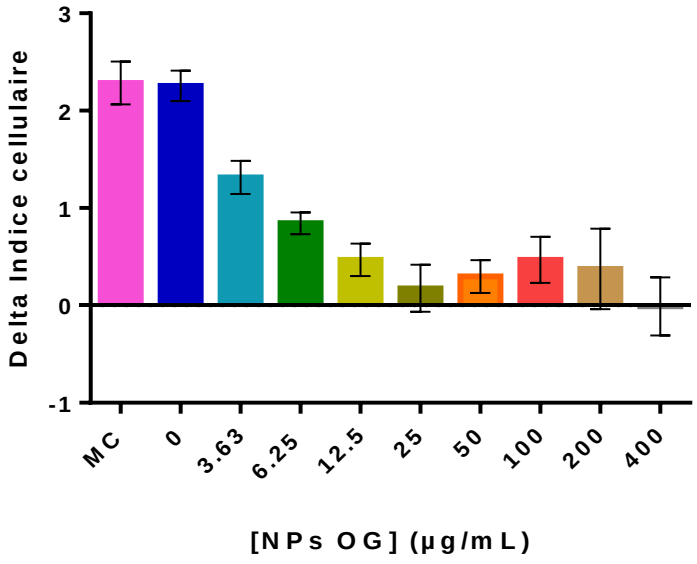


Figure 72 : Evaluation de l'effet de la concentration de NPs d'OG sur la prolifération des cellules 3T3-L1. Le « delta indice cellulaire » a été calculé en soustrayant la valeur d'indice cellulaire après ajout des NPs d'OG à la valeur d'indice cellulaire à la fin de l'incubation avec les NPs d'OG (CI_{t78h} – CI_{t54h}).

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

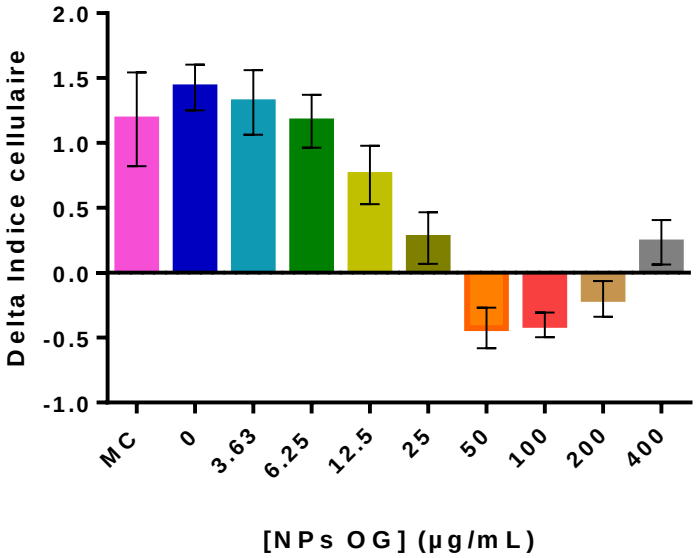


Figure 73 : Evaluation de la reprise de prolifération après enlèvement des NPs d'OG. Le delta indice cellulaire a été calculé en soustrayant la valeur d'indice cellulaire en fin d'incubation avec les NPs d'OG à la valeur d'indice cellulaire en fin d'expérience (CI_{t98h} – CI_{t78h}).

Cette expérience a mis en évidence une toxicité des NPs d'oxyde de graphène (OG) pour des concentrations supérieures à 12,5 µg/mL. La prolifération cellulaire reprend pour les concentrations inférieures ou égales à 25 µg/mL et pour la plus forte concentration. Les études suivantes seront donc menées à 6,25 µg /mL afin d'avoir une quantité suffisante de NPs pour former un film au-dessus des cellules, ce qui devra néanmoins être confirmé par microscopie.

2.2 Détermination du volume minimum requis pour maintenir l'hydratation des cellules par Cytation (3T3-L1)

Le but de cette expérience est de déterminer l'épaisseur de liquide minimum requis pour maintenir les cellules hydratées et en bon état en vue de la réalisation d'observation par microscopie électronique environnementale, sans encapsulation par de l'oxyde de graphène. Pour ce faire, nous avons suivi en temps réel des cellules incubées dans le Cytation ; un appareil permettant de contrôler le niveau de CO_2 et la température ainsi que de faire de l'imagerie optique de cellules vivantes.

Les cellules 3T3-L1 ont été cultivées dans une plaque 96-puits pendant 24h. Puis le milieu de culture a été remplacé par différents volumes de milieu de culture ou du milieu de culture contenant 6,25 µg/mL ou 3,1 µg/mL de NPs d'OG. Les volumes testés sont : 0,

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

10, 20, 30, 40 et 100 µL. La plaque a été placée dans le Cytation à température ambiante en présence de 5 % CO_2 pendant 5 h, une image a été acquise toutes les 30 minutes.

Cette expérience montre que le volume minimum requis pour maintenir les cellules en culture est de 30 µL, cependant avec 40 µL la qualité de la culture est meilleure pour des plaques 96-puits (Figure 74). L'état des cellules est meilleur en présence de 3,1 µg/mL de NPs d'OG que 6,25 µg/mL (Figure 75). Le volume minimum requis dépend de la géométrie et de la mouillabilité du support sur lequel les cellules sont cultivées.

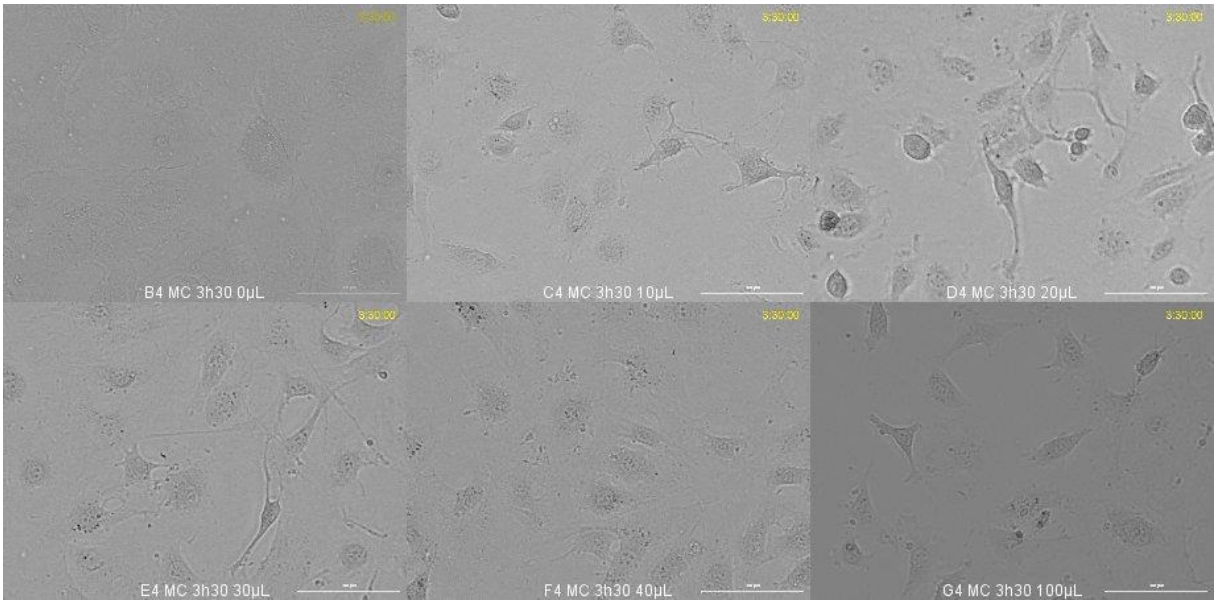


Figure 74 : Images numériques prise à 3h30 d'incubation de cellules 3T3-L1 avec différents volumes de milieu de culture, barre d'échelle de 100 µm.

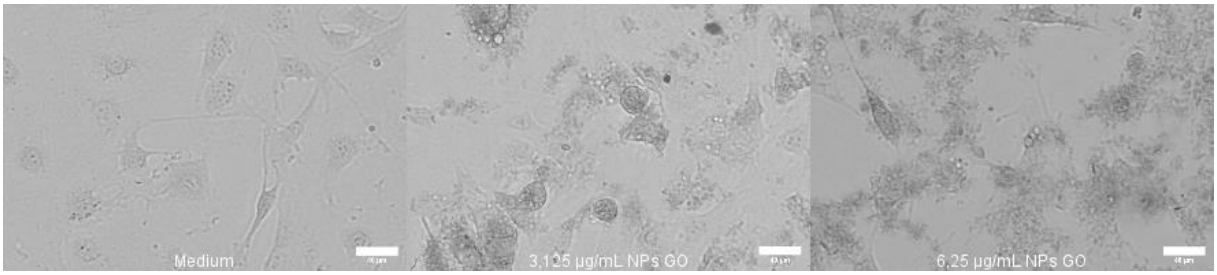


Figure 75 : Montage des images acquises à 4h d'incubation avec 30 µL de milieu, 3,1 µg/mL ou 6,25 µg/mL de NPs d'OG.

Cette expérience montre que les NPs d'OG ne s'organisent pas en film sur les cellules. On observe en revanche des dépôts de NPs sur les cellules (Figure 75). Il parait plus pertinent de construire le film de graphène en amont tel que décrit par Dahmke et al. [108], puis de venir « pécher » le film de graphène avec les cellules cultivées sur un support adéquat. Dahmke et al. rapportent néanmoins la formation de plis avec cette technique. De plus, la question de l'épaisseur de liquide entre le film de graphène et la surface de la cellule reste en suspens et laisse l'exploration ouverte.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

3 Paramètres d'acquisition et dose d'électrons

La qualité des images tout comme la dose d'électrons reçue par l'échantillon dépendent directement des paramètres d'acquisition. Il est donc important de déterminer en amont les bons paramètres d'acquisition pour avoir le juste compromis entre une image de suffisamment bonne qualité et une dose d'électrons supportable par l'échantillon étudié.

Les paramètres d'acquisition pouvant être ajustés sont le temps de balayage de l'image (t) ; le grossissement et la résolution (la taille du pixel (d)) ; la taille de la sonde, l'ouverture du diaphragme et la tension d'accélération (le courant de sonde (I)) [104]. La relation entre ces paramètres et la dose d'électrons en e-/nm² est explicitée par l'équation suivante, dans laquelle *e* est la charge d'un électron ($e = 1.602\ 10^{-19} C$) : $q = \frac{I.t}{e.d^2}$ (1)

On peut également écrire le calcul de la dose d'électrons de la manière suivante pour incorporer davantage de paramètres influençant la dose d'électrons dans la formule : $q = \frac{I.t.G.np}{e.SPF}$ où *q* est la dose d'électrons, I est le courant, *t* le temps d'acquisition de l'image, *G* le grossissement, *np* le nombre de pixels, *e* la charge d'un électron et *SPF* la surface plein format.

La tolérance maximale de dose d'électrons des échantillons biologiques non-fixés en cryo-TEM est située aux alentours de 10^3 e-/nm², alors que les échantillons chimiquement fixés peuvent tolérer jusqu'à 10^5 e-/nm² [94]. L'objectif étant d'étudier des échantillons biologiques dans leur état naturel, c'est-à-dire non fixés, la dose maximale acceptable est fixée à 10^3 e-/nm². Les paramètres d'acquisition et le nombre d'images seront adaptés en fonction des besoins de la question posée (Figure 76). Pour cela, il est nécessaire d'obtenir des images d'assez bonne qualité et exploitables aux paramètres choisis. Nous avons donc décidé de quantifier la qualité des images après traitement des images.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

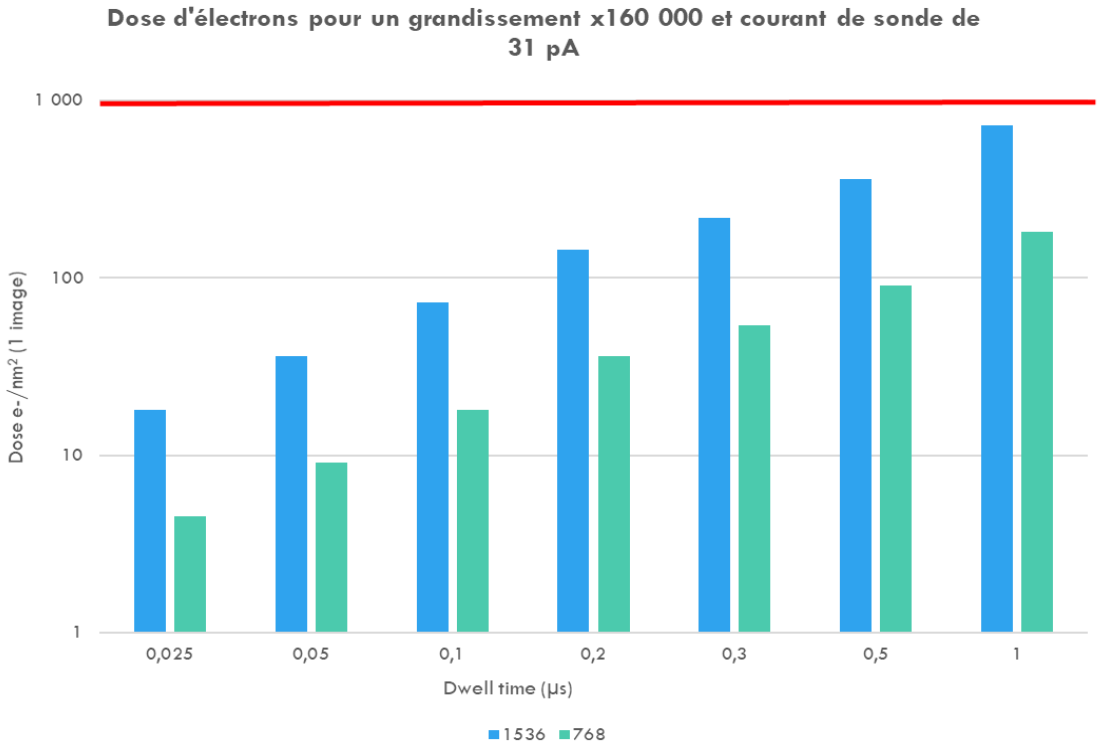


Figure 76 : Dose d'électrons en fonction de la vitesse de balayage et de la taille de l'image pour un grossissement de 160 000 et un courant de sonde de 31 pA

Pour corréler les paramètres d'acquisition et la qualité des images, nous avons fait une série d'acquisition d'images sur des cellules fixées à un grossissement de 160 000, avec un courant de sonde de 31 pA, en faisant varier la vitesse de balayage et la taille du pixel (Figure 77 et Tableau 10). A partir de cette série d'images, nous avons essayé de quantifier la qualité des images en en calculant le rapport signal-sur-bruit (SNR) tel que décrit par Piat *et al.* [109] et en calculant le rapport contraste-sur-bruit (CNR) tel que décrit par Timischl [110] :

$$SNR = 20\,log10\,\frac{variance\ (f)}{variance\ (n)} \quad (2)$$

$$CNR = \frac{|\mu 1 - \mu 2|}{\sqrt{(\sigma 1^2 + \sigma 2^2)}} \quad (3)$$

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

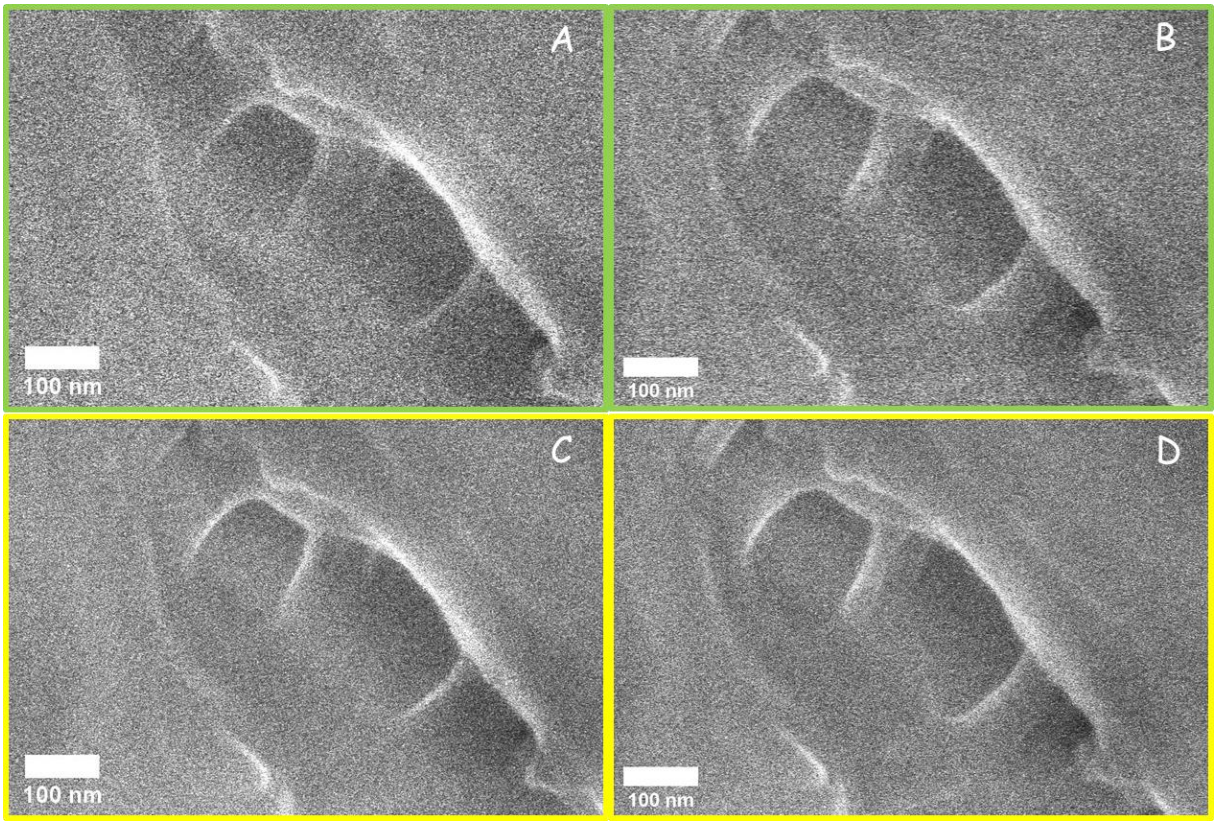


Figure 77 : Images MEB haut vide d'une zone d'accroche entre une cellule et son support obtenues avec un grossissement de 160 000 et un courant de sonde de 31 pA après avoir appliqué un filtre moyen. Dose de 18 e-/nm² pour une image avec 768 pixels en x et une vitesse de balayage de 0,1 µs (A) ou 1536 pixels en x et une vitesse de balayage de 0,025 µs (B). Dose d'électrons de 36 e-/nm² pour une image avec 768 pixels en x et une vitesse de balayage de 0,2 µs (C) ou 1536 pixels en x et une vitesse de balayage de 0,05 µs (D).

Tableau 10 : Récapitulatif des paramètres d'acquisition des images MEB, de la dose d'électrons correspondante et évaluation de la qualité des images

Image n°	Nbr px en x	Dwell time (tps/px) (µs)	Temps d'acquisition (µs)	Dose d'e- pour 1 image (e-/nm²)	Qualité image	SNR	CNR
A	768	0,1	76,8	18	- -	0,08	0,19
C		0,2	153,6	36	-	0,10	0,69
B	1536	0,025	38,4	18	+	0,10	1,53
D		0,05	76,8	36	++	0,07	0,70

Les scores reportés dans le Tableau 10 (de -- à ++) ont été attribués de manière qualitative en fonction des détails qu'on arrive à distinguer d'une image à l'autre. Il s'agit d'une méthode de scorification manipulateur-dépendant et chronophage. On remarque que la qualité des images est corrélée à la vitesse de balayage et à la taille de pixel de manière cohérente. De plus, pour une dose équivalente il est préférable d'avoir une vitesse de balayage rapide pour une taille de pixel plus petite (Figure 77 et Tableau 10). Cependant, on note que les ratios CNR et SNR ne sont pas représentatifs de la qualité des images.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Des échanges lors d'une collaboration avec le Dr Sounkalo Dembélé, du laboratoire FEMTO-ST à Besançon, nous a conduit à recourir à la variance normalisée (Equation 4). Il s'agit d'une valeur utilisée pour évaluer la netteté d'une image :

$$Vnor = \frac{\delta^2}{\mu} \qquad (4)$$

Afin de vérifier la possibilité de quantifier la qualité à l'aide de la variance normalisée, une série d'images a été acquise en faisant varier le grossissement (800, 1600, 3000, 6000, 12000, 24000 et 50000), la résolution (1536x1024 et 768x512), le spot size (2,5 et 3) et la vitesse de balayage d'un pixel (5, 3, 1, 0,5, 0,05 et 0,025 µs), donnant lieu à 168 images. Pour chacune des images, la dose d'électrons et la variance normalisée ont été calculées. Un score de 1 à 7 a été attribué en aveugle par 3 personnes pour estimer la qualité des images (7 étant l'image de meilleure qualité). Le schéma des résultats sont similaires pour les différents groupes de paramètres. Seuls les résultats obtenus pour un grossissement à 800, une taille de sonde de 3 et une résolution de 1536x1024 à différents temps d'acquisition sont représentés sur la Figure 78. Les résultats obtenus suggèrent que la variance normalisée est inversement proportionnelle à la qualité des images. De plus on note que la courbe subit une inflexion avant d'atteindre un plateau. On peut considérer qu'à partir de ce point d'inflexion, les images présentent une qualité suffisante pour être exploitée. Si on se base sur le point d'inflexion de la courbe de la variance normalisée en fonction de la dose d'électrons, plus le grossissement est élevé plus la dose d'électrons requise pour une image exploitable est élevée (Tableau 11).

Cependant, il n'est pas possible de fixer une valeur de variance normalisée comme seuil de qualité étant donné que cette dernière dépend également du niveau de contraste et brillance (Figure 79) et qu'en fonction du grossissement et du contenu de l'image la valeur de la variance normalisée change.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

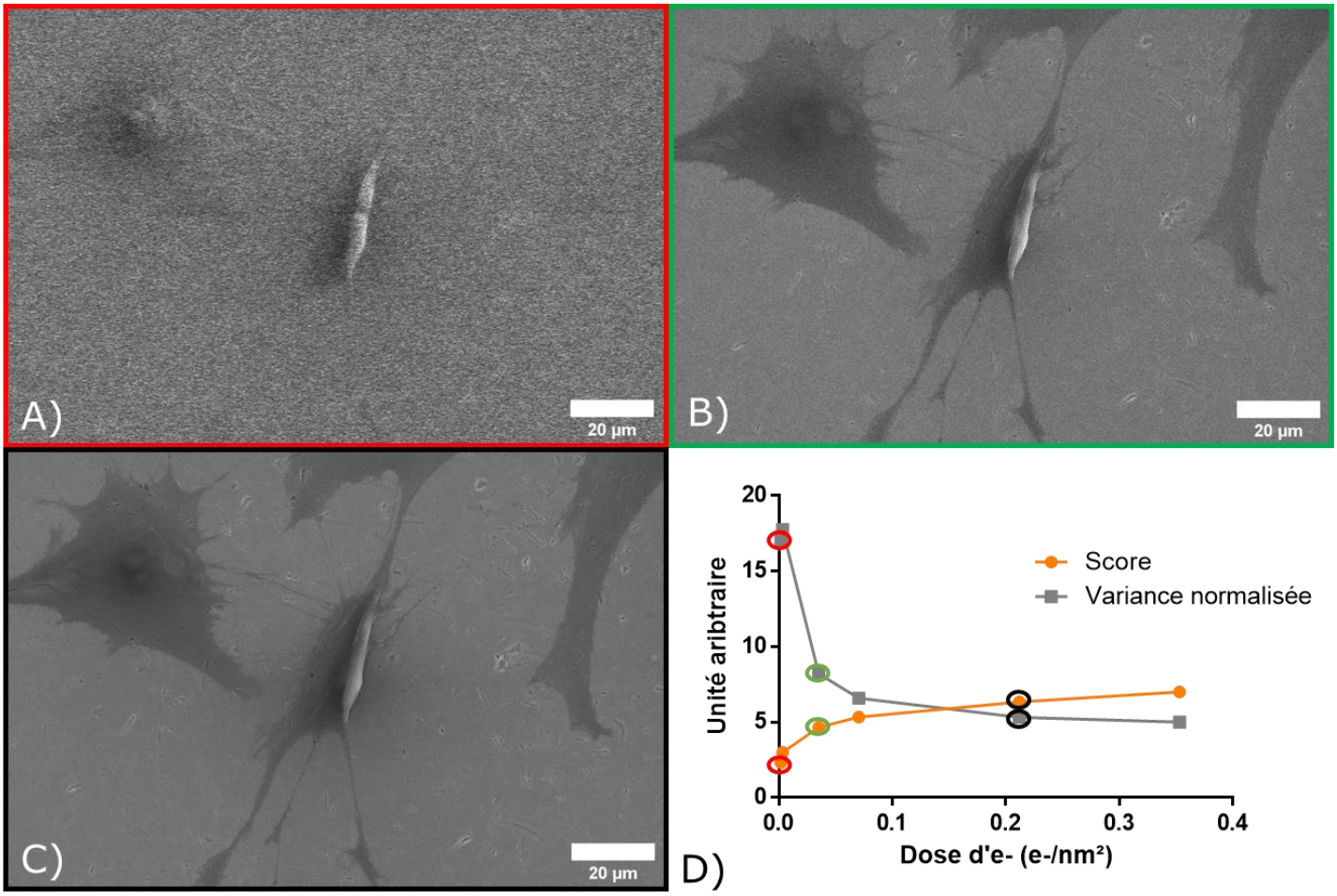


Figure 78 : Images MEB haut vide obtenues à un grossissement de 800, une taille de sonde de 3, une résolution de 1536x1024 et une vitesse de balayage par pixel de 25 ns (A), 500 ns (B) et 3 µs (C). Evaluation de la qualité des images par la variance normalisée ou la scorification en fonction de la dose d'électrons des images MEB (D). Les images en A), B) et C) sont indiquées sur le graphe à l'aide d'un code couleur (rouge, vert, noir, respectivement).

Tableau 11 : Dose d'électrons correspondant au point d'inflexion de la courbe de variance normalisée en fonction de la dose d'électrons pour un grossissement donné.

Grossissement	800	1600	3 000	6 000	12 000	24 000
Dose d'électrons (e-/nm²)	0,0353	0,140	0,492	1,97	7,89	31,5

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

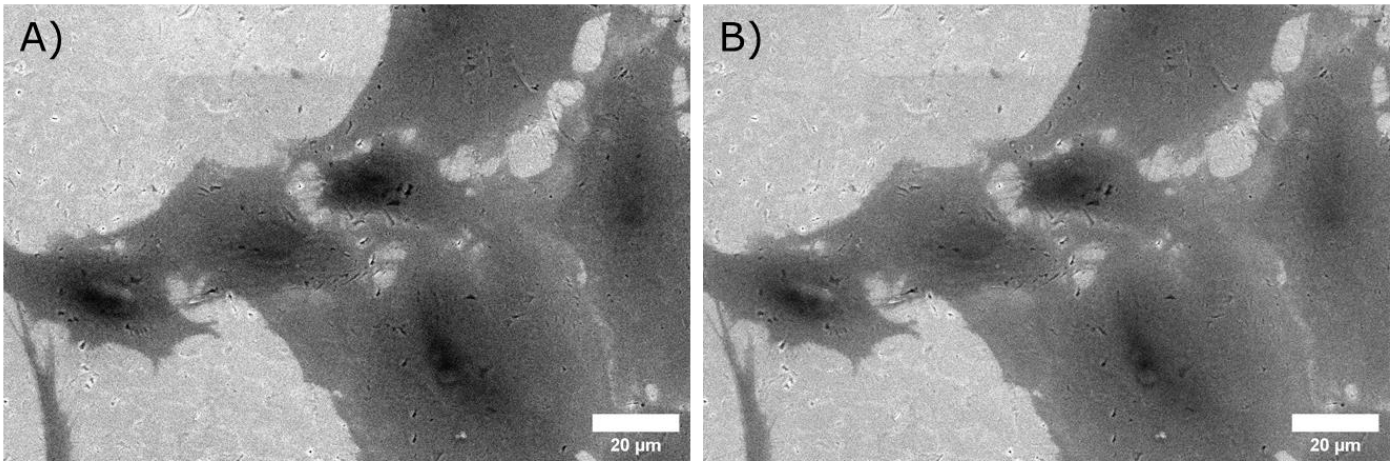


Figure 79 : Images MEB acquises à un grossissement de 800, une taille de sonde de 3, une résolution de 1536x1024, un temps de balayage par pixel de 2,60 µs. La variance normalisée est de 26 pour un contraste de 73 et une brillance de 39 (A) et la variance normalisée est de 18 pour un contraste de 72 et une brillance de 40 (B).

Pour conclure cette partie, la dose d'électrons est conditionnée par 6 paramètres d'acquisitions modulables : le temps d'acquisition, le grossissement, la résolution, la tension d'accélération, l'ouverture du diaphragme et la taille de la sonde. Nous avons essayé d'évaluer la qualité des images de manière quantitative avec différentes méthodes. Il s'est avéré que la variance normalisée est le meilleur indicateur de la qualité des images. Cependant, il n'est pas possible de fixer une valeur seuil applicable quels que soient les paramètres d'acquisition. Il apparaît qu'il est préférable de travailler à haute résolution avec une vitesse de balayage plus élevée. Il a néanmoins été mis en évidence que la dose minimale d'électrons requis pour une image de qualité augmente avec le grossissement (Tableau 10). Certains paramètres tels que le grossissement et la tension d'accélération peuvent être fixés en amont en fonction de la nature de l'échantillon et de la taille de l'information que l'on souhaite obtenir. La vitesse de balayage reste le paramètre le plus simple à varier pour moduler la dose d'électrons. En effet, le changement des autres paramètres nécessite la vérification des réglages de l'alignement et de l'astigmatisme.

4 Conclusion

L'objectif de ce chapitre était de déterminer si les cellules pouvaient rester en vie dans les conditions de température de l'ESEM. Pour cela nous avons effectué une étude de viabilité des cellules à +4°C dans différents milieux tels que l'HBSS et l'HEPES +/- NAC au cours du temps. Cette étude a mis en évidence que le milieu le plus adéquat est l'HBSS et ceci pour les deux lignées de cellules testées. Dans les conditions de l'expérience, la

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

présence de NAC n'apportait aucun bénéfice à la survie des cellules. Cependant l'utilisation de NAC peut présenter un intérêt car le faisceau d'électrons génère des espèce réactives à l'oxygène (ROS). Ces résultats ne font en outre état que de la capacité de la cellule à hydrolyser la Calcéine-AM. L'intégrité morphologique de la cellule n'a pas pu être répertoriée. Donald et al. ont montré que les cellules 3T3 incubées avec la calcéine-AM pendant 22 minutes à +3°C et à une pression de 5 Torr (HR 88%) sont capables d'hydrolyser la calcéine-AM mais la morphologie des cellules est altérée, suggérant un état physiologique dégradé [85]. Ces résultats mettent en évidence des dommages liés aux conditions de pression outre les dommages liés au faisceau d'électrons. C'est pourquoi l'encapsulation des cellules ou leur isolement dans une chambre liquide seraient pertinents. Elgrabli et al. ont publié le développement d'un portoir pouvant accueillir la chambre liquide avec circulation du milieu [88]. Ce type de chambre liquide permettrait d'une part d'apporter les nutriments nécessaires à la survie des cellules d'autre l'évacuation des composées toxiques tels que les ROS générés par le faisceau d'électrons. Il serait pertinent de recouvrir avec un film de graphène, pour ses propriétés protectrices [111], la face de la chambre du côté incident du faisceau d'électrons. L'emploi de chambre liquide permettrait également de pallier la nécessité de travailler à +4°C qui n'est pas une température physiologique donc favorable à la réalisation de l'ensemble des processus qui ont lieu dans la cellule. Il restera cependant la question de l'épaisseur de liquide à la surface de la cellule, qui dégradera la résolution spatiale. De manière alternative, les cellules peuvent être positionnées du côté incident au faisceau d'électrons. Cependant dans ce cas, la résolution sera affectée par l'épaisseur de la membrane – nécessairement plus épaisse que le graphène - sur laquelle les cellules sont cultivées.

Nous avons également essayé de déterminer un seuil de qualité d'image exploitable de sorte à régler les paramètres d'acquisition des images et de minimiser au possible la dose d'électrons reçue par l'échantillon. Nous avons montré que la variance normalisée est un bon indicateur mais qu'il ne permet de fixer un seuil de qualité. Pour aller plus loin, il faudrait probablement constituer un abaque de la résolution des images avec les différentes combinaisons de paramètres possibles en fonction de la dose d'électrons. De plus, il faudrait également évaluer l'impact d'algorithmes de débruitage basés sur l'intelligence artificielle, qui pourraient permettre d'exploiter des images de moins bonne qualité.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Conclusion

Les objectifs de ce travail de thèse étaient multiples : 1) le développement d'une procédure pour analyser les sites d'ancrage de la cellule sur le biomatériau par microscopie confocale. 2) L'analyse morphologique 2D et 3D de cellules cultivées sur un biomatériau par MEB. 3) L'exploration des différents modes d'imagerie MEBE pour analyser la morphologie des cellules hydratées pour de leur état naturel. 4) l'évaluation de la compatibilité entre les conditions expérimentales de l'imagerie MEBE et le maintien de l'état natif des cellules.

L'analyse de l'adhésion des cellules sur le biomatériau a été effectué par microscopie confocale. Différents points de temps d'incubation des cellules sur le biomatériau ont été étudiés. La vinculine impliquée dans les points focaux d'adhésion a été marquée de manière fluorescente pour quantifier les sites d'ancrage de la cellule sur le biomatériau. Des images en Z-stack ont été acquises avec un microscope confocal. Une procédure de traitement des images et de quantification des zones de contacts entre la cellule et le biomatériau ont été développée en utilisant le logiciel Fiji.

La morphologie cellulaire a été étudiée en 2D par MEB sur les mêmes échantillons que pour l'études des sites d'ancrage. Malheureusement il était difficile de retrouver la même cellule entre les deux microscopes. Le traitement des images et la procédure d'analyse de la morphologie ont été proposés. L'aire des cellules a été exploitée pour comparer la morphologie cellulaire entre les différents temps d'incubation et entre biomatériaux. Un test de visualisation de l'interface de manière non destructrice a été mis en place. Ces images d'interface ont confirmé les résultats obtenus pour la quantification des sites d'ancrage.

La méthodologie mis en place a été appliquée à l'étude de l'interaction pré-ostéoblaste/hydroxyapatite dans un contexte de régénération osseuse. Les résultats obtenus pour la quantification de l'adhésion cellulaire a été concluante, tout comme la visualisation de l'interface entre la cellule et le biomatériau. L'analyse morphologique en analysant l'aire de la cellule n'est cependant pas suffisante pour discriminer les différences entre biomatériaux.

Bien que le maintien de l'hydratation des cellules soit possible en MEBE, le MEBE ne semble pas adapté pour l'étude de la morphologie cellulaire. Une perte de résolution est mise en évidence liée à la présence de vapeur d'eau ; les contours des cellules restent visibles, mais les informations surfaciques sont perdues. Le MEBT-liquide présentant une

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

meilleure résolution que le MEBE, la possibilité d'étudier des cellules entière et hydratée par MEBT-liquide a été explorée. Le MBTE-liquide en mode BF et DF a permis de reconstruire un modèle 3D d'une cellule de 3 µm d'épaisseur. Les deux modes, BF et DF, sont prometteurs pour l'analyse d'échantillons biologiques hydratés.

Enfin, la possibilité de travailler en microscopie électronique sur des cellules dans un état proche de leur état natif, c'est-à-dire non fixées et non encapsulées, a été évaluée. La contrainte de travailler à basse température pour maintenir l'hydratation de l'échantillon a été évaluée sur des cellules hors microscope. Les effets de la température et du milieu environnant sur la viabilité cellulaire ont été explorés. La viabilité de différentes lignées cellulaires a été mesurée par plusieurs techniques pour déterminer l'impact d'une incubation allant jusqu'à 6h à +4°C. Ces tests ont révélé que l'HBSS est une bonne alternative au milieu de culture. L'effet protecteur de l'antioxydant, le NAC, a été observé pour la condition avec l'HEPES pour des incubations supérieures à 3h.

La dose d'électrons est également une limite non négligeable pour l'étude de cellules biologiques natives par microscopie électronique. On s'est intéressé à la manière d'évaluer en amont les paramètres qui permettraient de réduire la dose d'électrons tout en obtenant des images exploitables. Différentes combinaisons des paramètres d'acquisition ont été testés. Nous avons tenté de faire une corrélation entre ces paramètres et la qualité des images. La qualité des images a été évaluée par plusieurs méthodes : la scorification par des expérimentateurs, le calcul du SNR, CNR ou de la variance normalisée. La variance normalisée s'est avérée être le meilleur indicateur de qualité. Une corrélation quantitative n'a pas pu être obtenue, cependant il est apparu qu'il est préférable de travailler à haute résolution avec une vitesse de balayage plus élevée. De plus, il a été mis en évidence que la dose minimale d'électrons requis pour une image de qualité augmente avec le grossissement. Les paramètres tels que la tension d'accélération, le grossissement ou la vitesse de balayage peuvent être fixés en amont en fonction de la nature de l'échantillon.

Cette thèse a été menée dans un contexte pluridisciplinaire à l'interface entre la biologie et la physique. Outre l'aspect technique, les principaux challenges ont été de se comprendre mutuellement et l'appréhension de la différence d'approche entre la recherche appliquée et fondamentale. Ayant travaillé une dizaine d'années dans l'industrie du médicament, j'étais très formatée à l'application de techniques déjà existantes pour répondre à une problématique de mécanisme d'action moléculaire. Ce travail de thèse a été au contraire très exploratoire, ce qui a demandé un grand effort de compréhension et d'adaptation.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Perspectives

Un grand nombre de perspectives peuvent être proposées à la suite de ce travail.

Tout d'abord, des dépouillements complémentaires pourraient être effectués sur les données existantes. En premier lieu, l'adhésion cellulaire a été évaluée uniquement en quantifiant les zones de contact entre la cellule et le biomatériau. La localisation des points focaux d'adhésion peut également constituer un indicateur. L'actine ayant été marquée, il serait donc intéressant d'élargir l'analyse de l'adhésion cellulaire à l'organisation du cytosquelette d'actine. De plus, en exploitant les Z-stack acquis, une analyse 3D par microscopie confocale est envisageable pour évaluer l'adhésion contractile et le contrôle de la forme 3D de la cellule tel que décrit par Burnette *et al.* [112].

En deuxième lieu, l'analyse morphologique des cellules en 2D par MEB a été effectuée en mesurant l'aire de la cellule. L'aire de la cellule ne tient pas compte du fait que la cellule soit circulaire ou ait une forme dendritique. Inclure la circularité de la zone d'intérêt dessinée permettrait d'évaluer la forme de la cellule, ce qui pourrait également être intéressant pour l'étude des couples cellules-biomatériaux.

Au niveau des techniques et procédures développées, l'analyse de la morphologie en 3D sur rotation de 360° autour de la cellule par MEB est pertinente pour étudier la morphologie des cellules cultivées sur un biomatériau. Cependant, les volumes reconstruits par les logiciels Meshroom et Pollen 3D étaient imparfaits. Cette approche nécessite par conséquent de progresser dans la compréhension du logiciel Meshroom et de continuer à développer le logiciel Pollen 3D.

En 3D, l'imagerie MEBT-liquide est également une technique prometteuse pour analyser les cellules hydratées. Dans cette étude, les cellules étudiées n'ont subi aucune préparation pour améliorer le contraste. De ce fait, seul le contour des cellules a pu être mis en évidence en 3D. Pour étudier la répartition de certaines protéines d'intérêt ou l'ultrastructure cellulaire, on peut envisager un marquage cellulaire à l'aide de quantum dots. L'avantage de l'utilisation des quantum dots est la compatibilité avec à la fois la microscopie confocale et la microscopie électronique.

Enfin, nous avons évalué si des cellules dans un état proche de leur état natif pouvaient être étudiées en microscopie électronique. L'étude d'échantillons hydratés par MEBE nécessite d'opérer à basse température pour contrôler l'humidité. Le recours à des

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

chambre liquide semble être la meilleure alternative pour permettre à la fois de travailler à une température acceptable pour les cellules, pour contrôler l'épaisseur de milieu/tampon à la surface de la cellule mais également de les protéger de la faible pression dans les conditions d'imagerie.

La dose d'électrons reçue par l'échantillon étant un paramètre crucial pour l'étude de cellules y compris fixées, nous avons essayé de déterminer le meilleur compromis entre le réglage des différents paramètres d'acquisition et la qualité des images obtenues. Nous avons pour cela utilisé des traitements d'image relativement classiques, comme l'application d'un filtre moyen. L'utilisation ou le développement de filtres ou d'algorithmes de débruitage, éventuellement basés sur l'intelligence artificielle, pourrait permettre d' exploiter des images très bruitées et donc de réduire encore plus la dose électronique nécessaire pour acquérir une image exploitable.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

Bibliographie

[1] "Treatise of Implant Dentistry: The Italian Tribute to Modern Implantology - PubMed." https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28125196/ (accessed Feb. 19, 2022).

[2] D. Zindani, K. Kumar, and J. Paulo Davim, *Metallic biomaterials-A review*. Elsevier Ltd., 2019. doi: 10.1016/B978-0-08-102174-3.00004-8.

[3] "Polytetrafluoroethylene," *Meyler's Side Eff. Drugs*, pp. 872–873, Jan. 2016, doi: 10.1016/B978-0-444-53717-1.01318-4.

[4] S. Vanni, S. Marenco, M. Calò, and B. Battiston, "Resection arthroplasty after failure of a radial head prosthesis: a case report," *Case Reports Plast. Surg. Hand Surg.*, vol. 3, no. 1, pp. 28–31, Jan. 2016, doi: 10.3109/23320885.2016.1167607.

[5] A. J. Festas, A. Ramos, and J. P. Davim, "Medical devices biomaterials – A review," *Proc. Inst. Mech. Eng. Part L J. Mater. Des. Appl.*, vol. 234, no. 1, pp. 218–228, Oct. 2020, doi: 10.1177/1464420719882458.

[6] "Prothèses mammaires PIP : chronologie d'un scandale." https://www.lemonde.fr/societe/article/2012/01/18/les-grandes-dates-du-scandale-des-implants-pip_1625045_3224.html (accessed Feb. 17, 2022).

[7] S. Kargozar, S. Ramakrishna, and M. Mozafari, "Chemistry of biomaterials: future prospects," *Curr. Opin. Biomed. Eng.*, vol. 10, pp. 181–190, 2019, doi: 10.1016/j.cobme.2019.07.003.

[8] Q. Chen and G. A. Thouas, "Metallic implant biomaterials," *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 87, pp. 1–57, 2015, doi: 10.1016/j.mser.2014.10.001.

[9] G. Manivasagam, D. Dhinasekaran, and A. Rajamanickam, "Biomedical Implants: Corrosion and its Prevention - A Review," *Recent Patents Corros. Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 40–54, 2010, doi: 10.2174/1877610801002010040.

[10] M. Saini, "Implant biomaterials: A comprehensive review," *World J. Clin. Cases*, vol. 3, no. 1, p. 52, 2015, doi: 10.12998/wjcc.v3.i1.52.

[11] A. Kolk *et al.*, "Current trends and future perspectives of bone substitute materials - From space holders to innovative biomaterials," *J. Cranio-Maxillofacial Surg.*, vol. 40, no. 8, pp. 706–718, 2012, doi: 10.1016/j.jcms.2012.01.002.

[12] A. Tathe, M. Ghodke, and A. P. Nikalje, "A brief review: Biomaterials and their apllication," *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 2, no. SUPPL. 4, pp. 19–23, 2010.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

[13] L. Griveau *et al.*, "Design and characterization of an in vivo injectable hydrogel with effervescently generated porosity for regenerative medicine applications," *Acta Biomater.*, no. xxxx, 2021, doi: 10.1016/j.actbio.2021.11.036.

[14] A. Sáenz, E. Rivera, W. Brostow, and V. Castaño, "Ceramic biomaterials: an introductory overview," *J. Mater. Educ.*, vol. 21, no. 5/6, pp. 267–276, 1999.

[15] I. N. Dahmke *et al.*, "Graphene Liquid Enclosure for Single-Molecule Analysis of Membrane Proteins in Whole Cells Using Electron Microscopy," *ACS Nano*, vol. 11, no. 11, pp. 11108–11117, 2017, doi: 10.1021/acsnano.7b05258.

[16] L. Juignet, "Effets de la macro-architecture du substrat sur l ' activité et la différenciation des ostéoblastes To cite this version : HAL Id : tel-01810064 Laura Juignet," 2018.

[17] K. S. Katti, "Biomaterials in total joint replacement," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 39, no. 3, pp. 133–142, Dec. 2004, doi: 10.1016/J.COLSURFB.2003.12.002.

[18] W. Cao and L. L. Hench, "Bioactive materials," *Ceram. Int.*, vol. 22, no. 6, pp. 493–507, Jan. 1996, doi: 10.1016/0272-8842(95)00126-3.

[19] M. Bernard, E. Jubeli, M. D. Pungente, and N. Yagoubi, "Biocompatibility of polymer-based biomaterials and medical devices-regulations,: In vitro screening and risk-management," *Biomater. Sci.*, vol. 6, no. 8, pp. 2025–2053, 2018, doi: 10.1039/c8bm00518d.

[20] T. Yeung *et al.*, "Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion," *Cell Motil. Cytoskeleton*, vol. 60, no. 1, pp. 24–34, 2005, doi: 10.1002/cm.20041.

[21] C. A. Mullen, T. J. Vaughan, M. C. Voisin, M. A. Brennan, P. Layrolle, and L. M. McNamara, "Cell morphology and focal adhesion location alters internal cell stress," *J. R. Soc. Interface*, vol. 11, no. 101, 2014, doi: 10.1098/rsif.2014.0885.

[22] R. Rahier-Corticchiato, "Caractérisation biochimique des phospholipases D et de leurs domaines fonctionnels : nouvelle méthode de mesure de l'activité phospholipase D," 2016. [Online]. Available: https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01515321

[23] *Biologie cellulaire*, vol. 132, no. 1. 1981. doi: 10.1016/s0769-2617(81)80062-7.

[24] "Organites cellulaire." https://biofaculte.blogspot.com/2015/03/organites-cellule-animale-vegetale.html

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

[25] W. Alberts, Johnoson, Lewis, Morgan, Raff, Roberts, "Le Cytosquelette," in *Biologie moléculaire de la cellule*, 6th ed., 2017, pp. 889–960.

[26] B. Yue, "Biology of the Extracellular Matrix: An Overview," *J. Glaucoma*, vol. 23, no. 8, p. S20, Dec. 2014, doi: 10.1097/IJG.0000000000000108.

[27] K. C. Holmes, D. Popp, W. Gebhard, and W. Kabsch, "Atomic model of the actin filament," *Nature*, vol. 347, no. 6288. pp. 44–49, 1990. doi: 10.1038/347044a0.

[28] B. Bugyi and M. F. Carlier, "Control of actin filament treadmilling in cell motility," *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 39, no. 1, pp. 449–470, 2010, doi: 10.1146/annurev-biophys-051309-103849.

[29] A. Nürnberg, T. Kitzing, and R. Grosse, "Nucleating actin for invasion," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 3, pp. 117–187, 2011, doi: 10.1038/nrc3003.

[30] L. Blanchoin, R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes, and J. Plastino, "Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility," *Physiol. Rev.*, vol. 94, no. 1, pp. 235–263, 2014, doi: 10.1152/physrev.00018.2013.

[31] S. Nicholson-Dykstra, H. N. Higgs, and E. S. Harris, "Actin dynamics: Growth from dendritic branches," *Curr. Biol.*, vol. 15, no. 9, pp. 346–357, 2005, doi: 10.1016/j.cub.2005.04.029.

[32] Eton & Lepore, *A Nucleator Arms Race: Cellular Control of Actin Assembly*, vol. 23, no. 1. 2008. doi: 10.1038/nrm2867.A.

[33] K. Rottner, B. Behrendt, J. V. Small, and J. Wehland, "VASP dynamics during lamellipodia protrusion," vol. 1, no. September, pp. 321–322, 1999.

[34] P. K. Mattila and P. Lappalainen, "Filopodia: Molecular architecture and cellular functions," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 6, pp. 446–454, 2008, doi: 10.1038/nrm2406.

[35] C. Wu, "Focal Adhesion: A Focal Point in Current Cell Biology and Molecular Medicine," *Cell Adh. Migr.*, vol. 1, no. 1, pp. 13–18, 2007, doi: 10.4161/cam.1.1.4081.

[36] P. Tsimbouri, "Adult Stem Cell Responses to Nanostimuli," *J. Funct. Biomater.*, vol. 6, no. 3, pp. 598–622, 2015, doi: 10.3390/jfb6030598.

[37] L. R. Anderson, T. W. Owens, and M. J. Naylor, "Structural and mechanical functions of integrins," *Biophys. Rev.*, vol. 6, no. 2, pp. 203–213, 2014, doi: 10.1007/s12551-013-0124-0.

[38] M. Bachmann, S. Kukkurainen, V. P. Hytönen, and B. Wehrle-Haller, "Cell adhesion

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

by integrins," *Physiol. Rev.*, vol. 99, no. 4, pp. 1655–1699, 2019, doi: 10.1152/physrev.00036.2018.

[39] I. D. Campbell and M. J. Humphries, "Integrin structure, activation, and interactions," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 3, pp. 1–14, 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a004994.

[40] C. Lawson and D. D. Schlaepfer, "Integrin adhesions: Who's on first? What's on second?: Connections between FAK and talin," *Cell Adhes. Migr.*, vol. 6, no. 4, pp. 302–306, 2012, doi: 10.4161/cam.20488.

[41] J. D. Humphries, P. Wang, C. Streuli, B. Geiger, M. J. Humphries, and C. Ballestrem, "Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin," *J. Cell Biol.*, 2007, doi: 10.1083/jcb.200703036.

[42] N. S. Fedarko, M. Moerike, R. Brenner, P. G. Robey, and U. Vetter, "Extracellular matrix formation by osteoblasts from patients with osteogenesis imperfecta," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 7, no. 8, pp. 921–930, 1992, doi: 10.1002/jbmr.5650070809.

[43] T. J. Voegele *et al.*, "The effect of different isolation techniques on human osteoblast-like cell growth," *Anticancer Res.*, vol. 20, no. 5B, pp. 3575–3582, 2000, Accessed: Jan. 31, 2022. [Online]. Available: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11131665/

[44] M. E. Martínez *et al.*, "Influence of skeletal site of origin and donor age on osteoblastic cell growth and differentiation," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 64, no. 4, pp. 280–286, 1999, doi: 10.1007/s002239900619.

[45] B. Ecarot-charrier, F. H. Glorieux, M. V. A. N. D. E. R. Rest, and G. Pereira, "Osteoblasts Isolated from Mouse Calvaria Initiate Matrix Mineralization in Culture Collagen Synthesis Collagens synthesized by osteoblasts during a 24-h incuba-," *J. Cell Biol.*, vol. 96, pp. 639–643, 1983.

[46] "HeLa cells (1951) | British Society for Immunology." https://www.immunology.org/hela-cells-1951 (accessed Feb. 01, 2022).

[47] H. J. Hausser and R. E. Brenner, "Phenotypic instability of Saos-2 cells in long-term culture," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 333, no. 1, pp. 216–222, Jul. 2005, doi: 10.1016/J.BBRC.2005.05.097.

[48] M. Lotfi, M. Nejib, and M. Naceur, "Cell Adhesion to Biomaterials: Concept of Biocompatibility," *Adv. Biomater. Sci. Biomed. Appl.*, 2013, doi: 10.5772/53542.

[49] M. Prager-Khoutorsky *et al.*, "Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing," *Nat. Cell Biol. 2011 1312*, vol. 13, no. 12, pp. 1457–1465, Nov. 2011, doi: 10.1038/ncb2370.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

[50] M. F. A. Cutiongco, B. S. Jensen, P. M. Reynolds, and N. Gadegaard, "Predicting gene expression using morphological cell responses to nanotopography," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–13, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15114-1.

[51] L. Pieuchot *et al.*, "Curvotaxis directs cell migration through cell-scale curvature landscapes," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, 2018, doi: 10.1038/s41467-018-06494-6.

[52] J. L. Bays and K. A. DeMali, "Vinculin in cell–cell and cell–matrix adhesions," *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017. doi: 10.1007/s00018-017-2511-3.

[53] V. Vogel and M. Sheetz, "Local force and geometry sensing regulate cell functions," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. 4, pp. 265–275, 2006, doi: 10.1038/nrm1890.

[54] H. Hirata, H. Tatsumi, C. T. Lim, and M. Sokabe, "Force-dependent vinculin binding to talin in live cells: A crucial step in anchoring the actin cytoskeleton to focal adhesions," *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 306, no. 6, 2014, doi: 10.1152/ajpcell.00122.2013.

[55] S. E. Noriega and A. Subramanian, "Consequences of Neutralization on the Proliferation and Cytoskeletal Organization of Chondrocytes on Chitosan-Based Matrices," *Int. J. Carbohydr. Chem.*, vol. 2011, no. March, pp. 1–13, 2011, doi: 10.1155/2011/809743.

[56] P. A. Ramires, A. Giuffrida, and E. Milella, "Three-dimensional reconstruction of confocal laser microscopy images to study the behaviour of osteoblastic cells grown on biomaterials," *Biomaterials*, vol. 23, no. 2, pp. 397–406, 2002, doi: 10.1016/S0142-9612(01)00118-1.

[57] F. A. Shah, "50 years of scanning electron microscopy of bone — a comprehensive overview of the important discoveries made and insights gained into bone material properties in health , disease , and taphonomy," no. March, pp. 1–15, 2019, doi: 10.1038/s41413-019-0053-z.

[58] K. J. McKinlay, C. A. Scotchford, D. M. Grant, J. M. Oliver, J. R. King, and P. D. Brown, "Scanning electron microscopy of biomaterials," *Inst. Phys. Conf. Ser.*, vol. 179, no. November, pp. 87–90, 2004.

[59] J. W. Taraska, "A primer on resolving the nanoscale structure of the plasma membrane with light and electron microscopy," *J. Gen. Physiol.*, vol. 151, no. 8, pp. 974–985, 2019, doi: 10.1085/jgp.201812227.

[60] S. Lück, "Three-dimensional analysis of intermediate filament networks using SEM tomography," *J. micros*, vol. 239, no. June 2009, pp. 1–16, 2010, doi:

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

10.1111/j.1365-2818.2009.03348.x.

[61] I. Solomonov, D. Talmi-Frank, Y. Milstein, S. Addadi, A. Aloshin, and I. Sagi, "Introduction of correlative light and airSEM™ microscopy imaging for tissue research under ambient conditions," *Sci. Rep.*, vol. 4, pp. 1–7, 2014, doi: 10.1038/srep05987.

[62] N. Liv *et al.*, "Simultaneous Correlative Scanning Electron and High-NA Fluorescence Microscopy," *PLoS One*, vol. 8, no. 2, p. e55707, Feb. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0055707.

[63] A. M. Donald, "The use of environmental scanning electron microscopy for imaging wet and insulating materials," pp. 511–516, 2003.

[64] "Diagramme de phase de l'eau." https://media4.obspm.fr/public/ressources_lu/pages_planetologie-habitabilite/html_images/envimage7.html (accessed Jul. 12, 2022).

[65] A. Bogner, G. Thollet, D. Basset, P. H. Jouneau, and C. Gauthier, "Wet STEM: A new development in environmental SEM for imaging nano-objects included in a liquid phase," *Ultramicroscopy*, vol. 104, no. 3–4, pp. 290–301, 2005, doi: 10.1016/j.ultramic.2005.05.005.

[66] a Bogner, "Le mode d'imagerie wet-STEM : développement, optimisation et compréhension Application aux mini-émulsions et latex," 2006.

[67] K. Masenelli-Varlot *et al.*, "Wet-STEM tomography: Principles, potentialities and limitations," *Microsc. Microanal.*, vol. 20, no. 2, pp. 366–375, 2014, doi: 10.1017/S1431927614000105.

[68] X. Jiao, L. Roiban, G. Foray, and K. Masenelli-Varlot, "Electron tomography on latex particles suspended in water using environmental scanning electron microscopy," *Micron*, vol. 117, no. July 2018, pp. 60–67, 2019, doi: 10.1016/j.micron.2018.11.007.

[69] D. B. Peckys and N. de Jonge, "Visualizing Gold Nanoparticle Uptake in Live Cells with Liquid," *Nano Lett.*, vol. 11, pp. 1733–1738, 2011, doi: dx.doi.org/10.1021/nl200285.

[70] E. Kennedy, E. M. Nelson, T. Tanaka, J. Damiano, and G. Timp, "Live Bacterial Physiology Visualized with 5 nm Resolution Using Scanning Transmission Electron Microscopy," *ACS Nano*, vol. 10, no. 2, pp. 2669–2677, 2016, doi: 10.1021/acsnano.5b07697.

[71] M. Isaacson, D. Johnson, and A. V. Crewe, "Electron beam excitation and damage

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

of biological molecules: Its implications for specimen damage in electron microscopy," *Radiat. Res.*, vol. 55, no. 2, pp. 205–224, 1973, doi: 10.2307/3573678.

[72] A. Sroka-Bartnicka, L. Borkowski, G. Ginalska, A. Ślósarczyk, and S. G. Kazarian, "Structural transformation of synthetic hydroxyapatite under simulated in vivo conditions studied with ATR-FTIR spectroscopic imaging," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 171, pp. 155–161, 2017, doi: 10.1016/j.saa.2016.07.051.

[73] J. Kim *et al.*, "Charged nanomatrices as efficient platforms for modulating cell adhesion and shape," *Tissue Eng. - Part C Methods*, vol. 18, no. 12, pp. 913–923, 2012, doi: 10.1089/ten.tec.2011.0731.

[74] X. Zhang *et al.*, "Cellular responses of aniline oligomers: A preliminary study," *Toxicol. Res. (Camb).*, vol. 1, no. 3, pp. 201–205, 2012, doi: 10.1039/c2tx20035j.

[75] C. Leibiger, N. Kosyakova, H. Mkrtchyan, M. Glei, V. Trifonov, and T. Liehr, "First Molecular Cytogenetic High Resolution Characterization of the NIH 3T3 Cell Line by Murine Multicolor Banding," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 61, no. 4, p. 306, 2013, doi: 10.1369/0022155413476868.

[76] L. D. Quarles, D. A. Yohay, L. W. Lever, R. Caton, and R. J. Wenstrup, "Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 7, no. 6, pp. 683–692, Jun. 1992, doi: 10.1002/JBMR.5650070613.

[77] H. Heremans, A. Billiau, J. J. Cassiman, J. C. Mulier, and P. De Somer, "In Vitro Cultivation of Human Tumor Tissues II. Morphological and Virological Characterization of Three Cell Lines," *Oncology*, vol. 35, no. 6, pp. 246–252, 1978, doi: 10.1159/000225298.

[78] S. Zhang *et al.*, "Biological behavior of osteoblast-like cells on titania and zirconia films deposited by cathodic arc deposition," *Biointerphases*, vol. 7, no. 1–4, pp. 1–10, 2012, doi: 10.1007/s13758-012-0060-8.

[79] M. D. Pierschbacher, S. Dedhar, E. Ruoslahti, S. Argraves, and S. Suzuki, "An adhesion variant of the MG-63 osteosarcoma cell line displays an osteoblast-like phenotype," *Ciba Found. Symp.*, vol. 136, pp. 131–141, 1988, doi: 10.1002/9780470513637.CH9.

[80] E. M. Czekanska, M. J. Stoddart, R. G. Richards, and J. S. Hayes, "In search of an osteoblast cell model for in vitro research," *Eur. Cells Mater.*, vol. 24, pp. 1–17, 2012, doi: 10.22203/eCM.v024a01.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

[81] M. Bigerelle and K. Anselme, "A kinetic approach to osteoblast adhesion on biomaterial surface," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 75A, no. 3, pp. 530–540, Dec. 2005, doi: 10.1002/JBM.A.30473.

[82] S. J. Wright and D. J. Wright, "Chapter 1 Introduction to confocal microscopy," *Methods Cell Biol.*, vol. 70, pp. 1–85, 2002.

[83] C. Y. Yang, L. Y. Huang, T. L. Shen, and J. Andrew Yeh, "Cell adhesion, morphology and biochemistry on nanotopographic oxidized silicon surfaces," *Eur. Cells Mater.*, vol. 20, no. 1, pp. 415–430, 2010, doi: 10.22203/eCM.v020a34.

[84] L. C. Gontard, R. Schierholz, S. Yu, J. Cintas, and R. E. Dunin-Borkowski, "Photogrammetry of the three-dimensional shape and texture of a nanoscale particle using scanning electron microscopy and free software," *Ultramicroscopy*, vol. 169, pp. 80–88, Oct. 2016, doi: 10.1016/J.ULTRAMIC.2016.07.006.

[85] S. E. Kirk, J. N. Skepper, and A. M. Donald, "Application of environmental scanning electron microscopy to determine biological surface structure," *J. Microsc.*, vol. 233, no. 2, pp. 205–224, 2009, doi: 10.1111/j.1365-2818.2009.03111.x.

[86] L. S. Paek, J. O. Tétreault-Paquin, S. St-Jacques, M. Nelea, and M. A. Danino, "Is environmental scanning electron microscopy a pertinent tool for the analysis of periprostethic breast capsules?," *Ann. Chir. Plast. Esthet.*, vol. 58, no. 3, pp. 201–207, 2013, doi: 10.1016/j.anplas.2012.11.001.

[87] J. Xiao, G. Foray, and K. Masenelli-Varlot, "Analysis of liquid suspensions using scanning electron microscopy in transmission: estimation of the water film thickness using Monte–Carlo simulations," *J. Microsc.*, vol. 269, no. 2, pp. 151–160, 2018, doi: 10.1111/jmi.12619.

[88] D. Elgrabli *et al.*, "Carbon Nanotube Degradation in Macrophages: Live Nanoscale Monitoring and Understanding of Biological Pathway," *ACS Nano*, vol. 9, no. 10, pp. 10113–10124, 2015, doi: 10.1021/acsnano.5b03708.

[89] X. Juan, "Development of electron tomography on liquid suspensions using Environmental Scanning Electron Microscopy," 2017.

[90] "ETomo Tutorial." https://bio3d.colorado.edu/imod/doc/etomoTutorial.html (accessed May 23, 2021).

[91] D. N. Mastronarde and S. R. Held, "Automated tilt series alignment and tomographic reconstruction in IMOD," *Journal of Structural Biology*, vol. 197, no. 2. pp. 102–113, 2017. doi: 10.1016/j.jsb.2016.07.011.

[92] C. Messaoudii, T. Boudier, C. Oscar, S. Sorzano, and S. Marco, "TomoJ : tomography

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

software for three-dimensional reconstruction in transmission electron microscopy," vol. 9, pp. 1–9, 2007, doi: 10.1186/1471-2105-8-288.

[93] M. van Heel and G. Harauz, "Exact filters for general geometry three dimensional reconstruction," *Optik*, vol. 78, no. 4. pp. 146–156, 1986. [Online]. Available: http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=7856923

[94] D. B. Peckys, E. MacÍas-Sánchez, and N. De Jonge, "Liquid phase electron microscopy of biological specimens," *MRS Bull.*, vol. 45, no. 9, pp. 754–760, 2020, doi: 10.1557/mrs.2020.225.

[95] A. Paré *et al.*, "Tailored Three-Dimensionally Printed Triply Periodic Calcium Phosphate Implants: A Preclinical Study for Craniofacial Bone Repair," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 6, no. 1, pp. 553–563, 2020, doi: 10.1021/acsbiomaterials.9b01241.

[96] "MOY17 - Carbo-Silicated HA bioceramics enhance the hBMSCs osteogenic potentiel in vitro.pdf."

[97] S. Oh, N. Oh, M. Appleford, and J. L. Ong, "Bioceramics for Tissue Engineering Applications â€" A Review," *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, vol. 2, no. 2, pp. 49–56, 2006, doi: 10.3844/ajbbsp.2006.49.56.

[98] P. Marie, "Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste," vol. 17, 2001.

[99] G. Bouët, "Impact de l ' extinction génique de la sialoprotéine osseuse (BSP) sur la différenciation des ostéoblastes et l ' ostéogenèse in vitro : développement et validation d ' un bioréacteur pour la culture ostéoblastique en trois Guénaëlle Bouët To cite this ," 2014.

[100] R. Legros, N. Balmain, and G. Bonel, "Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 41, no. 3, pp. 137–144, 1987, doi: 10.1007/BF02563793.

[101] Y. Mikami, K. Omoteyama, S. Kato, and M. Takagi, "Inductive effects of dexamethasone on the mineralization and the osteoblastic gene expressions in mature osteoblast-like ROS17/2.8 cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 362, no. 2, pp. 368–373, 2007, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.192.

[102] L. D. Black, P. G. Allen, S. M. Morris, P. J. Stone, and B. Suki, "Mechanical and failure properties of extracellular matrix sheets as a function of structural protein composition," *Biophys. J.*, vol. 94, no. 5, pp. 1916–1929, 2008, doi: 10.1529/biophysj.107.107144.

[103] R. F. Egerton, P. Li, and M. Malac, "Radiation damage in the TEM and SEM," *Micron*, vol. 35, no. 6, pp. 399–409, 2004, doi: 10.1016/j.micron.2004.02.003.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

[104] J. Hermannsdörfer, V. Tinnemann, D. B. Peckys, and N. De Jonge, "The Effect of Electron Beam Irradiation in Environmental Scanning Transmission Electron Microscopy of Whole Cells in Liquid," *Microsc. Microanal.*, vol. 22, no. 3, pp. 656–665, 2016, doi: 10.1017/S1431927616000763.

[105] J. Icha, M. Weber, J. C. Waters, and C. Norden, "Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it," *BioEssays*, vol. 39, no. 8, pp. 1–15, 2017, doi: 10.1002/bies.201700003.

[106] A. P. Alivisatos, "The Use of Graphene and Its Derivatives for Liquid-Phase Transmission Electron Microscopy of Radiation-Sensitive Specimens," 2016, doi: 10.1021/acs.nanolett.6b04383.

[107] A. V. Khandelwal, A. Singh, N. Pal, R. Kumar, G. Goel, and S. Gupta, "AC Conductivity Measurements of Ultradilute Colloidal Suspensions in HEPES Buffer," *Langmuir*, vol. 35, no. 45, pp. 14725–14733, 2019, doi: 10.1021/acs.langmuir.9b01464.

[108] I. N. Dahmke *et al.*, "Graphene Liquid Enclosure for Single-Molecule Analysis of Membrane Proteins in Whole Cells Using Electron Microscopy," *ACS Nano*, vol. 11, no. 11, pp. 11108–11117, 2017, doi: 10.1021/acsnano.7b05258.

[109] N. Marturi *et al.*, "Microscopes using Signal-to-Noise Ratio . To cite this version : HAL Id : hal-00719444 Performance Evaluation of Scanning Electron Microscopes using Signal-to-Noise Ratio," 2012.

[110] F. Timischl, "The contrast-to-noise ratio for image quality evaluation in scanning electron microscopy," *Scanning*, vol. 37, no. 1, pp. 54–62, 2015, doi: 10.1002/sca.21179.

[111] R. Zan, Q. M. Ramasse, R. Jalil, T. Georgiou, U. Bangert, and K. S. Novoselov, "Control of Radiation Damage in MoS2 by Graphene Encapsulation," pp. 1–17.

[112] D. T. Burnette *et al.*, "A contractile and counterbalancing adhesion system controls the 3D shape of crawling cells," *J. Cell Biol.*, vol. 205, no. 1, pp. 83–96, 2014, doi: 10.1083/jcb.201311104.

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés

FOLIO ADMINISTRATIF

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON OPEREE AU SEIN DE L'INSA LYON

NOM : BEKEL DATE de SOUTENANCE : 13/04/2022

Prénoms : Akkiz

TITRE : Etude multi-échelle de l'interaction cellule-biomatériau par microscopies confocale et environnementale

NATURE : Doctorat Numéro d'ordre : 2022LYSEI033

Ecole doctorale : Ecole doctorale Matériaux de Lyon

Spécialité : Matériaux

RESUME :
Le succès du développement de nouveaux implants repose sur une meilleure compréhension des interactions entre les cellules et les biomatériaux. L'adhésion cellulaire sur le biomatériau est une étape clé pour prédire le devenir d'un implant dans le corps humain. L'adhésion cellulaire est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la migration et la différenciation. Des études récentes ont montré que le substrat sur lequel les cellules sont cultivées peut conduire à différentes morphologies cellulaires. Ce travail de thèse a consisté à mettre en place une méthode d'étude de l'adhésion cellulaire en quantifiant les sites d'ancrage de la cellule sur le biomatériau par microscopie confocale. L'étude morphologique a quant à elle été réalisé par microscopie électronique à balayage (MEB). L'analyse morphologique est principalement réalisée en 2D en utilisant la MEB sous vide poussé (MEBHV), ce qui nécessite notamment la déshydratation cellulaire. Nous avons dans un premier temps essayé de développer une méthode d'analyse 3D de la cellule sur le biomatériau par MEBHV. Puis, nous avons développé une méthode d'analyse 3D pour étudier des cellules entières proches de leur état natif. Pour ce faire, nous avons utilisé un porte écantillon de tomographie conçu au préalable au laboratoire pour étudier en 3D des suspensions aqueuses. Ce porte échantillon spécifique permet les analyses en collectant les électrons transmis ou diffusés à travers l'échantillon. Un tel développement ouvre la voie à l'analyse 3D de cellules intactes dans des environnements imitant leur environnement natif.

MOTS-CLÉS : Biomatériaux, cellules, microscopie confocale, microscopie électronique à balayage environnementale en mode transmission, tomographie

Laboratoire (s) de recherche : MATEIS – CNRS UMR5510 – INSA de Lyon

Directeurs de thèse : MASENELLI-VARLOT Karine, ROIBAN Lucian

Président de jury :
Composition du jury :

PODOR Renaud	ROUSSEAU Marthe
MARCO Sergio	GAILLARD Claire
COMBES Christèle	ROIBAN Lucian
GREMILLARD Laurent	MASENELLI-VARLOT Karine

Cette thèse est accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2022LYSEI033/these.pdf
© [A. Bekel], [2022], INSA Lyon, tous droits réservés