

ANNEE 2020 THESE : 2020 – TOU 3 – 4100

DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX HYDROGELS SUPRAMOLECULAIRES COMME SUPPORTS DE CULTURE DES CELLULES DU SYSTEME NERVEUX

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

PETERS Salomé
Née le 13/04/1994 à HAYANGE (57)

Directrice de thèse : Mme Isabelle RAYMOND-LETRON

JURY

PRESIDENT :
M. Olivier ABBO

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
Mme Isabelle RAYMOND-LETRON
M. Fabrice CONCHOU

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRES INVITEES :
Mme Juliette FITREMANN
Mme Isabelle LOUBINOX
Mme Carla CIRILLO

Chercheur CNRS, IMRCP, TOULOUSE
Docteure, Inserm, ToNIC, TOULOUSE
CRCN INSERM, ToNIC, TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directeur: Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie –Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomiepathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAÎTRES DE CONFÉRENCES (HORS CLASSE)

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

MAÎTRES DE CONFÉRENCES (CLASSE NORMALE)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie-Bactériologie-Pathologie infectieuse*
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie – Analgésie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LHERMIE Guillaume**, *Economie de la santé animale*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- M. **DIDIMOIMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophthalmologie*
Mme **ROMANOS Lola**, *Pathologie des ruminants*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*
M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

Remerciements :

M. Olivier ABBO

PUPH en chirurgie pédiatrique, CHU de Toulouse

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,

Hommages respectueux.

Mme. Isabelle RAYMOND LETRON

Pr. En histologie – anatomie pathologique vétérinaire, ENVT

Qui m'a fait l'honneur de diriger cette thèse,

Mes très sincères salutations respectueuses.

M. Fabrice CONCHOU

MC en imagerie médicale, ENVT

Qui m'a fait l'honneur de participer à cette soutenance,

Mes très sincères salutations respectueuses.

Mme. Juliette FITREMANN

Chercheur CNRS, IMRCP, Toulouse

Qui m'a chapeauté durant tous ces mois de travail, qui m'a fait découvrir le milieu de la recherche mais qui est aussi devenue une véritable amie et une confidente au fils de ces mois,

Mes salutations et mes remerciements très sincères.

Mme. Isabelle LOUBINOUX

Dr Inserm, ToNIC, Toulouse

Qui m'a fait l'honneur de m'accepter sur ce projet,

Mes salutations et mes remerciements très sincères.

Mme. Carla CIRILLO

CRCN Inserm, ToNIC, Toulouse

Qui m'a fait l'honneur d'assister à cette soutenance,

Mes salutations et mes remerciements très sincères.

A ma famille :

A maman poule, qui m'a soutenue, encouragée, qui m'a supporté durant toutes ces années d'étude lors de mes crises de nerfs et qui a toujours été là lorsque j'en avais besoin. Merci d'être ma maman.

A mon papa, à nos conversations durant des heures à refaire le monde et à parler de nos passions communes, à ton calme olympien qui sait être là lorsqu'il le faut. Je suis fier de toi mon papa.

A parrain et tata, qui m'ont toujours soutenue de loin, qui m'ont toujours écoutée et qui ont toujours su être là. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

A Oma, ma Oma, qui a toujours été présente et m'a toujours poussée au plus haut. Merci Oma.

A mamie, qui a su m'écouter quand j'en avais besoin. Merci.

A papi, même si tu n'es plus là pour assister à tout cela, je sais que tu soutiendras toujours mes choix et que tu aurais été très fier. Merci papi.

A la famille KOEHLER, avec lesquels j'ai passé les meilleurs nouvelles années à thème, à découvrir de nouveaux groupes et à mes cousines avec lesquelles j'ai grandi. Merci à vous quatre.

A mes petits compagnons, qui me suivent dans mes périples depuis quelques années, quelques mois ou quelques semaines, qui savent être là et qui savent m'éduquer, à Tesla, à Rorschach et à Maiden.

A toutes ces petites bêtes qui ont supporté mes palpations et mes envies de câlins depuis ma naissance, à Venise, à Anisette, à Juliette, à Zora, à Snowboard, à Nina, à Maryline (mon petit soutien pendant la prépa), à Nikita, à Barackine, à Bistouri, à Laurelle, à Harry ...

Et à toutes ces personnes qui ont compté, qui comptent et qui compteront pour moi :

A papi Pierrot et mamie Poupette, mes grands parents de cœur, qui ont été là pour m'apprendre les bases de tout.

A la famille KRAU, qui a toujours été là et m'a toujours encouragé depuis des années. Merci de faire partie de la famille.

A la famille FARRUGIA, qui bien plus que des employeurs, sont devenus des confidents et de véritables amis. Je suis ravie que la vie nous ait fait nous rencontrer.

A Thierry et Sandrine, qui m'ont permis de passer les plus belles vacances depuis bien longtemps. J'espère pouvoir venir chez vous tous les ans pour continuer à passer de vrais moments de complicité, mon tonton et ma tata d'adoption.

A Anne-Sophie, de me faire confiance et de me prendre sous ton aile. Je suis certaine que nous ferons un magnifique travail ensemble et pour tout te dire, j'ai déjà hâte.

A toutes ces personnes qui ont su être là pour moi lorsque c'était le moment, à Laura, à Vincent, à Angélique, à Livia, à Léa, à Marie, à Lisa, à Amélie, à Fabien, à Lucie, à Pierre, à Xavier, à Cédric, à Sacha ...

Table des matières :

Introduction :	20
Chapitre 1 : Etude bibliographique	22
I - Importance de la médecine régénérative aujourd’hui	22
1 - Génie tissulaire et culture de cellules pluripotentes : deux branches prometteuses de la médecine	22
a. Enjeux de la médecine régénérative	22
b. Aujourd’hui nous sommes au carrefour entre génie tissulaire et culture cellulaire	22
c. Une utilisation du génie tissulaire dans la recherche	24
2 - Place de la médecine régénérative aujourd’hui	24
a. Une technique qui a déjà fait ses preuves : l’utilisation de peaux artificielles	24
b. Cependant, les greffes synthétiques n’égalisent pas encore le gold standard qu’est l’autogreffe.....	25
c. Des recherches en vue d’améliorer la technique	25
3 - Médecine régénérative et traitement des maladies neurologiques	26
a. Importance des maladies du système nerveux par rapport aux autres défaillances du corps.....	26
b. Des maladies neurologiques de plus en plus fréquentes et handicapantes	28
(i) La maladie d’Alzheimer	29
(ii) La maladie de Parkinson	30
(iii) Les Accidents Vasculaire Cérébraux ou AVC	31
(iv) Les lésions du système nerveux central.....	34
c. Avancée de la recherche en médecine régénérative pour traiter ces maladies et réparer ces lésions.....	35
II - Description du système nerveux	40
1 - Anatomie du système nerveux central	41
2 - Composition cellulaire du système nerveux central	41
a. Les cellules gliales	42

b.	Les neurones	42
3 -	Phénomène inflammatoire et formation de la cicatrice gliale	43
III -	Importance de la matrice extracellulaire dans la stabilité des cellules du système nerveux central	45
1 -	Molécules de structuration de la matrice extracellulaire neurale	48
a.	Molécule assurant la structuration de la matrice extra cellulaire neurale ..	48
b.	Molécules assurant la résistance aux forces de compression.....	49
(i)	L'acide hyaluronique.....	49
(ii)	Les protéoglycanes	49
c.	Molécule assurant l'élasticité de la matrice extracellulaire	49
2 -	Molécules assurant les liaisons	50
a.	Molécules de liaisons entre différents constituants de la matrice extracellulaire	50
(i)	Les tenascines	50
(ii)	Le perlecan	50
b.	Molécules de liaisons entre matrice extracellulaire et cellules	50
(i)	Fibronectine	50
(ii)	Laminine.....	51
3 -	Le réseau péri neuronal, une variation locale importante de la matrice extracellulaire du système nerveux	52
4 -	Variation de la matrice extracellulaire au sein de l'organisme.....	53
IV -	Biomatériaux actuellement utilisés en ingénierie tissulaire.....	56
1 -	Les supports les plus utilisés en culture cellulaire	56
a.	Diversité des supports	56
b.	Composition des supports	58
c.	Structures possibles des supports	59
2 -	Les supports les plus utilisés pour la culture cellulaire des cellules nerveuses	66
a.	Diversité des supports utilisés pour la culture cellulaire des cellules nerveuses.....	66
b.	Critère de choix de ces différents supports	69
3 -	Modifications possibles	73
a.	Electrospinning et Wet spinning	73
b.	Amélioration des supports de culture cellulaire par l'ajout de molécules .	75

(i)	Coating	75
(ii)	Support contenant des molécules d'adhésion cellulaire.....	76
(iii)	Support contenant des facteurs de croissance	79
	c. Rainures.....	80
V -	Les hydrogels auto-assemblés de N-alkyl-D-galactonamides	85
1 -	Structure du composé	86
	a. Conditions de formation du composé et importance d'obtenir un refroidissement lent	86
	b. Le Gal-C7, un composé sélectionné	87
2 -	Propriétés mécaniques	87
3 -	Capacités de culture cellulaire	88
	a. Viabilité cellulaire après culture sur ces supports	88
	b. Pénétration 3D des cellules lors de leur culture.....	88
	c. Culture de cellules souches neuronales humaines et différenciation cellulaire	89
4 -	Mises en forme possibles de ce support	91
	a. Technique du « wet spinning » appliqué au Gal-C7	91
	b. Conditions de formation du gel du « wet spinning »	92
	c. Possibilité de culture cellulaire sur le filament formé.....	94
	Conclusion de la partie bibliographique :.....	96
	Chapitre 2 : Etude expérimentale.....	98
I -	Amélioration des caractéristiques physiques des gels formés par refroidissement grâce à l'ajout de protéines	98
1 -	Protocole expérimental	98
	a. Formation des gels	98
	b. Mesures en compression	100
2 -	Mesures.....	101
3 -	Interprétations.....	102
(i)	Effet du décollement des parois de l'échantillon dans son puit	102
(ii)	Effet de la protéine P1 sur le gel de Gal C7	103

(iii)	Effets de la protéine P2 sur le gel de Gal C7.....	105
4 -	Discussion.....	108
II -	Wet-spinning de deux nouveaux gélifiants G2 et G3	110
1 -	Protocole expérimental	110
2 -	Mesures et traitements des données.....	113
a.	Wet-spinning de filaments de gélifiant G3	113
(i)	Diagramme de phases du wet-spinning du gélifiant G3.....	113
(ii)	Suivi des filaments formés par wet-spinning sur le court terme	116
(iii)	Observation par microscopie électronique à balayage des filaments fraîchement formés par wet-spinning.....	120
b.	Wet-spinning du gélifiant G2.....	124
(i)	Diagramme de phases du wet-spinning du gélifiant G2.....	124
(ii)	Suivi des filaments formés par wet-spinning sur le court terme	126
3 -	Interprétations	129
III -	« Impression 3D » de Gal-C7.....	129
1 -	Etude préliminaire	130
2 -	Protocole expérimental	133
3 -	Résultats.....	134
4 -	Interprétations	138
	Conclusion de l'étude expérimentale :	139
	Bibliographie :	143

Liste des annexes :

Annexe 1 : Mots clefs et critères de choix utilisés pour comptabiliser le nombre d'articles évoquant les différents supports utilisés en culture cellulaire

Annexe 2 : Mots clefs et critères de choix utilisés pour comptabiliser le nombre d'articles évoquant les différents supports utilisés en culture cellulaire neuronale

Liste des figures :

Figure 1 : Procédé utilisé en médecine régénérative mêlant génie tissulaire et culture cellulaire ¹⁰⁵	23
Figure 2 : Nombre de patients et de chirurgies par services aux Etats Unis en 1991 ⁴⁹	27
Figure 3 : Nombre de greffes d'organes réalisées dans le monde en 2018	28
Figure 4 : Nombre de greffes d'organes réalisées en France en 2018	28
Figure 5 : Mécanismes d'excitotoxicité ²³	32
Figure 6 : Organisation du système nerveux ⁹²	40
Figure 7 : Organisation des cellules au sein du SNC ⁹²	41
Figure 8 : Schéma bilan du fonctionnement des différentes cellules actrices de la cicatrice gliale ²	45
Figure 9 : Structure de la matrice extracellulaire d'encéphale ⁴⁴	46
Figure 10 : Microscopie de différents supports de culture formés à partir de gel de soie infusé avec de la matrice extracellulaire de cerveau adulte, fœtale ou de collagène ⁹⁸	46
Figure 11 : Importance du remodelage de la matrice extra cellulaire dans le maintien du caractère souche des cellules souches neuronales ⁵⁹	47
Figure 12 : Structure du collagène ⁶⁸	48
Figure 13 : Structure de la fibronectine ⁶⁸	51
Figure 14 : Structure de la laminine ⁶⁸	51
Figure 15 : Composition des réseaux péri neuronaux ¹⁰³	52
Figure 16 : Résultats des recherches sur les différents composants utilisés en culture cellulaire au cours de ces 5 dernières années avec comme mots clefs : « scaffold », « cell culture », « nom du composé » et en y retirant de la recherches les « reviews » sur le site Web of Science. Les modalités de recherche sont disponibles dans l'annexes 1.	57
Figure 17 : Pourcentage d'utilisation des différents types de support en culture cellulaire.....	58
Figure 18 : Formes possibles des différents supports utilisées en culture cellulaire avec : A) les hydrogels contenus dans leur phase aqueuse, B) les supports solides et poreux et C) les fibres ⁶⁹	60
Figure 19 : Répartition en pourcentage des supports utilisés dans les articles traitant de culture cellulaire de neurones.....	68
Figure 20 : Schéma d'un montage permettant l' « electrospinning » ⁹⁵	74

Figure 21 : Microscopie électronique à balayage de fibres d'acide poly lactique obtenues par « electrospinning » ⁴¹	75
Figure 22 : Microscopie électronique à balayage de fibres d'acide polyglycolique seules, « coatées » à l'aide de polylysine ou de laminine ⁴⁷	76
Figure 23 : Microscopie confocale de supports utilisés en culture cellulaire ⁹⁸	77
Figure 24 : Prolifération cellulaire après culture de cellules souches neurales humaines, immunomarkée par la recherche de la molécule Ki67 ⁷	77
Figure 25 : Différentiation des cellules souches humaines en neurones et en astrocytes après culture de celles-ci sur différents supports ⁷	78
Figure 26 : Croissance des neurites après 24h de culture de neurones sur les gels étudiés observée en microscopie confocale ³	79
Figure 27 : Longueur des neurites en μm en fonction du facteur de croissance utilisé ³	79
Figure 28 : Immunohistochimie réalisée sur les cellules présentant la molécule Tuj-1 en rouge et DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) en bleu ⁷⁶	80
Figure 29 : Pourcentage des cellules différenciées évalué suite à l'immunohistochimie de Tuj-1 et DAPI ⁷⁶	81
Figure 30 : Support de PDMS utilisé durant cette étude observé au microscope électronique à balayage ⁸	81
Figure 31 : Densité cellulaire après 7 jours de culture de cellules souches neuronales humaines. Tests réalisés en quadriplate (B1, B2, B3, B4) avec 75 000 cellules/cm ² ⁸	82
Figure 32 : Différenciation neuronale immunomarkée après 7 jours de culture de cellules souches neurales humaines. Tests réalisés en quadriplate (B1, B2, B3, B4) avec 75 000 cellules/cm ² ⁸	83
Figure 33 : Nombre de neurites présentés par les neurones différenciés lors de la culture cellulaire sur les différents supports étudiés ⁸	84
Figure 34 : Visualisation polaire des neurones différenciés en fonction du support étudié ⁸ ...	84
Figure 35 : Réaction de synthèse du Gal-C7 ¹⁸	86
Figure 36 : Microscopie optique du gel formé à partir du Gal-C7 ¹⁸	87
Figure 37 : Microscopie confocale d'un gel formé à partir du Gal-C7 et avec 90 minutes de refroidissement après 5 jours culture de cellules GFP-Neuro2A ¹⁸	89
Figure 38 : Microscopie réflective d'un gel formé à partir du Gal-C7 avec 90 minutes de refroidissement après 7 jours de culture de cellules souches neuronales humaines ¹⁸	90

Figure 39 : Microscopie réflective d'un gel formé à partir du Gal-C7 avec 90 minutes de refroidissement après 7 jours de culture de cellules souches neuronales humaines testé avec différents marqueurs : ¹⁸	90
Figure 40 : Schéma théorique de l'assemblage possible des molécules de Gal-C7 ¹⁷	91
Figure 41 : Schéma et photos de la technique du « wet spinning » appliqué au Gal-C7 ¹⁷	92
Figure 42 : Résultats du test de la formation du gel de Gal-C7 lors de technique du « wet spinning » ¹⁷	93
Figure 43 : Culture de cellules de la lignée « Neuro2A » sur le filament de Gal-C7 formé par « wet spinning » après 3 jours de culture ¹⁷	94
Figure 44 : Schéma de dilution des solutions contenant les protéines P1 et P2.....	99
Figure 45 : Tableau récapitulatif des concentrations testées pour les deux protéines.....	100
Figure 46 : Schéma de la mesure réalisée avec le rhéomètre Anton Paar.....	100
Figure 47 : Effet du décollement des parois d'un échantillon comparé à un échantillon témoin dont les parois sont collées lors d'un test en compression de 0,01 mm/s	102
Figure 48 : Effet de la concentration en protéine P1 sur les gels de Gal C7 avec des échantillons dont les parois sont collées lors d'un test en compression de 0,01 mm/s avec :	104
Figure 49 : Effet de la concentration en protéine P2 sur les gels de Gal C7 avec des échantillons dont les parois sont décollées lors d'un test en compression de 0,01 mm/s avec :	105
Figure 50 : Effet de la concentration en protéine P2 sur les gels de Gal C7 avec des échantillons dont les parois sont collées lors d'un test en compression de 0,01 mm/s avec :	106
Figure 51 : Test en compression de 5 mm/s sur des gels de Gal C7	109
Figure 52 : Structure supposée du gel de Gal C7 lors d'un test en compression.....	110
Figure 53 : Schéma de l'expérience de wet-spinning	111
Figure 54 : Diagramme de phases lors du wet-spinning du gélifiant G3 en fonction de sa concentration dans la solution initiale et de la vitesse d'extrusion avec :.....	115
Figure 55 : Observation d'un amas de gélifiant G3 sec de concentration massique de 1% formé à 50 µl/min.....	118
Figure 56 : Observation d'un amas de gélifiant G3 sec de concentration massique de 1% formé à 100 µl/min.....	118
Figure 57 : Observation d'un filament de gélifiant G3 sec de concentration massique de 3% formé à 50 µl/min.....	119
Figure 58 : Observation d'un filament de gélifiant G3 humide de concentration massique de 3% formé à 100 µl/min.....	119

Figure 59 : Préparation des échantillons sur le plot d'échantillonnage.....	120
Figure 60 : Observation d'un filament de géifiant G3 de concentration 2% extrudé à 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ au MEB.....	121
Figure 61 : Observation d'un filament de géifiant G3 de concentration 2% extrudé à 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ au MEB.....	122
Figure 62 : Observation d'un filament de géifiant G3 de concentration 3% extrudé à 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ au MEB.....	123
Figure 63 : Observation de la même d'un filament de géifiant G3 de concentration 3% extrudé à 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ au MEB et à plus fort grossissement	123
Figure 64 : Observation de filaments de Gal-C7 de concentration égale à 5% formés par wet spinning à différentes vitesses d'extrusion ¹⁶	124
Figure 65 : Diagramme de phases lors du wet-spinning du géifiant G2 en fonction de sa concentration dans la solution initiale et de la vitesse d'extrusion avec :.....	125
Figure 66 : Observation d'un filament de géifiant G2 de concentration massique de 5% formé à 50 $\mu\text{l}/\text{min}$, humide, après formation	127
Figure 67 : Observation d'un filament de géifiant G2 de concentration massique de 4% formé à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, suite à 24h de séchage après formation	127
Figure 68 : Observation d'un filament de géifiant G2 de concentration massique de 4% formé à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, humide, 24h après formation	128
Figure 69 : Observation d'un filament de géifiant G2 de concentration massique de 4% formé à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, humide, 48h après formation	128
Figure 70 : Exemple de modélisation sur Google Sketchup Pro 2020.....	130
Figure 71 : Schéma du montage d'impression 3D ¹⁷	131
Figure 72 : Photographie de l'imprimante 3D avec ses différents axes de travail.....	131
Figure 73 : Diagramme d'adhésion du modèle 3D en fonction de plusieurs paramètres, pour le géifiant Gal-C7 à 2,5% massique ¹⁶	133
Figure 74 : Diagramme de phases de la figure réalisée en 3D printing à l'aide d'une aiguille de 22G dont le diamètre interne est égal à 0,406 mm en fonction de la vitesse de la tête d'impression en mm/s sur l'axe des abscisses et de la vitesse d'extrusion sur le pousse seringue en $\mu\text{l}/\text{min}$ sur l'axe des ordonnées.	135
Figure 75 : Diagramme de phases de la figure réalisée en 3D printing à l'aide d'une aiguille de 30G dont le diamètre interne est égal à 0,140 mm en fonction de la vitesse de la tête d'impression en mm/s sur l'axe des abscisses et de la vitesse d'extrusion sur le pousse seringue en $\mu\text{l}/\text{min}$ sur l'axe des ordonnées.	136

Figure 76 : Photographie de la figure en 2 couches réalisée avec une vitesse d'impression de 4 mm/s, une vitesse d'extrusion de 20 μ l/min et une aiguille de 30G 137

Figure 77 : Photographie de la figure en 2 couches réalisée avec une vitesse d'impression de 4 mm/s, une vitesse d'extrusion de 15 μ l/min et une aiguille de 22G 137

Liste des tables :

Tableau 1 : Importance des facteurs de risques liés à la survenue d'un AVC et évolution entre 1990 et 2013 ³²	33
Tableau 2 : Cellules utilisées en médecine régénérative neuronale ^{27,34,36}	39
Tableau 3 : Composition du cartilage articulaire ⁶⁵	53
Tableau 4 : Composition du tendon ⁶⁵	54
Tableau 5 : Composition du muscle squelettique ⁶⁵	54
Tableau 6: Composition en collagène et en glycosaminoglycanes (sGAG) en µg/mg de matière sèche (MS) dans le cerveau, la moelle épinière et la vessie ⁶⁶	55
Tableau 7 : Composition des noyaux pulpeux et fibreux en pourcentage de matière sèche (MS) ⁷¹	55
Tableau 8 : Supports de culture cellulaire principalement utilisés et classés en trois familles	58
Tableau 9 : Microscopie électronique à balayage, ou à transmission pour les peptides auto-assemblés, de différents supports utilisés en culture cellulaire ^{11,21,40,51,52,54,56,57,61,62,77,96,100,106,110}	64
Tableau 10 : Microscopie confocale de différentes matrices extra cellulaires commerciales ⁹⁸	64
Tableau 11 : Caractéristiques, avantages et inconvénients des trois structures des supports de culture cellulaire possibles	65
Tableau 12 : Nombre d'articles traitant de culture cellulaire de neurones.....	67
Tableau 13 : Critères de choix dans l'utilisation des différents composés comme support de cultures cellulaires neuronales.....	73
Tableau 14 : Description des différentes surfaces utilisées pour la culture cellulaire	82
Tableau 15 : Equation des courbes des échantillon testés en suivant une modélisation affine	103
Tableau 16 : Equation des courbes des échantillon testés en suivant une modélisation affine	104
Tableau 17 : Equation des courbes des échantillon testés en suivant une modélisation affine	106
Tableau 18 : Equation des courbes des échantillon testés en suivant une modélisation affine	107

Tableau 19 : Tableau récapitulatif des concentrations et vitesses d'extrusion testées en wet spinning pour les deux gélifiants.....	113
Tableau 20 : Image des différents états de gel rencontrés lors du wet-spinning du gélifiant G3	114
Tableau 21 : Masse théorique de gélifiant extrudé lors du wet-spinning après séchage du filament de gel.....	117

Introduction :

La médecine régénérative représente aujourd'hui un domaine en plein essor. Ce secteur allie deux secteurs de la recherche importants actuellement. Tout d'abord l'ingénierie tissulaire qui permet la création de structures ou « scaffold » en anglais toujours plus complexes et mimant la matrice extracellulaire. Mais aussi le domaine de la culture de cellules pluripotentes capables de se multiplier, de croître mais aussi de se différencier sur ces nouvelles matrices. La médecine régénérative possède aujourd'hui plusieurs objectifs. Le premier est de pouvoir soigner le vivant non pas par simple réduction des dégâts sur un organe mais par remplacement total de celui-ci. Actuellement adopté en ce qui concerne le remplacement cutané, la régénération cellulaire n'égale pas encore certains « gold standard » comme la réalisation d'autogreffes. Ce domaine peut aussi être allié de la recherche car l'usage d'organes de synthèse permettrait une utilisation toujours plus réduite de modèles animaux mais aussi des tests toujours plus précis allant même jusqu'à l'échelle individuelle. Aujourd'hui, la population vieillissante et avec un mode de vie toujours plus moderne, permettant l'augmentation de facteurs de risques de maladies neurodégénératives, justifie une recherche en médecine régénérative neuronale et notamment en ce qui concerne le système nerveux central.

Cependant, bien que les différentes cellules neuronales soient définies et connues au sein du système nerveux central, c'est la matrice extra cellulaire qui semble parfois mise de côté. En effet, elle a longtemps été définie comme un simple « support » du vivant mais on lui reconnaît aujourd'hui des caractéristiques physiques ou chimiques qui influent sur l'activité cellulaire. La matrice extra cellulaire n'est donc plus une sorte de bain où viennent se mélanger différentes molécules comme des protéines ou des sucres par affinité mais elle est une véritable structure hétérogène, plus ou moins rigide et évolutive en interaction avec ses hôtes, les cellules. De plus en plus d'études tentent alors d'en percer les mystères et il semblerait que la rigidité de cette matrice influe sur la croissance cellulaire mais surtout sur la différenciation des cellules nouvellement formées. De plus, d'autres théories se penchent sur les capacités d'évolution de la matrice extracellulaire.

La matrice extra cellulaire semble donc être un facteur crucial en médecine régénérative. C'est pourquoi de plus en plus de chercheurs tentent de la mimer lorsqu'ils formulent de nouveaux « scaffold ». Certains préfèrent utiliser des composés synthétiques moins chers et plus façonnables comme l'acide polylactique, le polydiméthylsiloxane ... Tandis que d'autres

utilisent des composés naturels déjà présents dans la matrice extracellulaire animale ou végétale comme le collagène, l'acide hyaluronique, la cellulose ... Cependant, la biocompatibilité de ces matériaux doit être améliorée par l'utilisation de molécules d'adhésion, de facteurs de croissance ou encore par la technique de « coating » qui vise à recouvrir le matériau d'une molécule d'adhésion cellulaire. Enfin, différentes techniques comme le « wet-spinning » ou encore l'« electrospinning » visent à améliorer la maniabilité de ces matériaux dans le but de construire des structures plus ou moins complexes.

Certains gélifiants moléculaires saccharidiques semblent être des candidats idéaux en ingénierie tissulaire. En effet, ils possèdent l'avantage de pouvoir être synthétisés rapidement et avec une rentabilité importante et semblent peu toxiques. De plus, certaines études leur confèrent une propriété mécanique intéressante puisqu'ils possèdent une résistance mécanique similaire à celle du cerveau. Enfin, lorsque la biocompatibilité est testée, on remarque qu'une multiplication et une différenciation cellulaires sont non seulement possibles mais qu'elles sont « pénétrantes » au sein de la structure. Cela signifie que la culture cellulaire est possible en trois dimensions et non pas en deux dimensions comme dans beaucoup d'études. Ces matériaux semblent aussi façonnables par certaines techniques comme le wet-spinning, ce qui laisse apparaître de nombreuses capacités de modélisation via impression 3D.

Dans ce travail nous étudierons tout d'abord les caractéristiques de la matrice extra cellulaire du système nerveux central afin de la mimer au mieux. Puis, nous réaliserons une étude sur trois gélifiants moléculaires saccharidiques élaborés par l'équipe de Juliette FITREMANN, chimiste au laboratoire IMRCP, UMR 5623 CNRS-UPS. Nous évaluerons dans un premier temps la résistance en compression d'un de ces gélifiants auquel sont ajoutées l'une puis l'autre de deux protéines différentes. Dans un second temps, nous étudierons les fenêtres d'action idéales permettant la réalisation d'un filament de deux nouveaux gélifiants lors de la technique du wet-spinning. Nous caractériserons aussi ces filaments sur le court terme grâce à la microscopie optique mais aussi à la microscopie électronique à balayage. Enfin, nous caractériserons les conditions optimales qui permettent la formation de figures modélisées en 3D et réalisées à l'aide d'un prototype d'imprimante 3D.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

I - Importance de la médecine régénérative aujourd'hui

1 - Génie tissulaire et culture de cellules pluripotentes : deux branches prometteuses de la médecine

a. Enjeux de la médecine régénérative

Le génie tissulaire constitue d'après certains auteurs une nouvelle ère de la médecine⁹¹ qui consiste à remplacer un tissu ou un organe lésé ou défaillant par un autre, synthétique ou naturel, totalement fonctionnel ou qui pourra lui rendre sa fonctionnalité⁷⁹. En effet, la perte ou la défaillance d'un organe ou d'un tissu constitue le problème le plus fréquent, le plus dévastateur mais aussi le plus coûteux en santé humaine⁴⁹. Le génie tissulaire comporte trois enjeux majeurs dans ce sens. Tout d'abord, il permet de restaurer, de remplacer mais pourrait aussi améliorer la fonction d'organes ou de tissus. En outre, il rend possible la diminution du risque de rejet de greffe par la création de matériaux formés en laboratoire à partir des cellules du receveur. Enfin, il permet aussi de pallier le manque de donneurs grâce à la fabrication de tissus in vitro⁹¹. En effet, plus de 60 ans après la prodigieuse greffe de rein réalisé par Joseph Murray, prix Nobel de physiologie et de médecine en 1990, cette technique reste limitée par le manque de donneurs et une liste de receveurs toujours plus longue. Rien qu'aux Etats Unis, cette liste s'allonge d'une personne toutes les 15 minutes¹ et chaque jour près de 22 personnes décèdent faute de trouver un donneur⁹¹. En France, la loi Caillavet du 22 décembre 1976 précise que toute personne est donneur d'organes. C'est la loi du 22 janvier 2016 qui en précise les modalités de refus et la possibilité de refus partiel, c'est-à-dire que certains organes ne soient pas prélevés.

b. Aujourd'hui nous sommes au carrefour entre génie tissulaire et culture cellulaire

Plus que de réparer la simple mécanique du tissu vivant, le génie tissulaire est aujourd'hui un domaine pluridisciplinaire dans lequel biologie et chimie se côtoient afin de permettre à des biomatériaux de supporter non seulement la croissance cellulaire mais aussi l'administration locale d'un traitement. En effet, il est important de garder en tête que nous sommes

aujourd'hui à un carrefour où le génie tissulaire se mêle à la culture de cellules pluripotentes, c'est-à-dire capables de se multiplier mais surtout de se différencier en n'importe quelle cellule de l'organisme. Ces deux disciplines ont d'ailleurs connu des évolutions concomitantes. En 1960, MC CULLOCH et TILL confirment l'existence de cellules souches hématopoïétiques⁶³. Ils décrivent des cellules capables de se multiplier lorsqu'elles sont transfusées dans un autre animal et suggèrent que cette capacité n'est pas possible pour des cellules différenciées. Parallèlement, en 1966, le génie tissulaire s'intéresse à l'élaboration de peaux artificielles afin de soigner les brûlés⁷⁹. C'est en 1981 que BURKE décrit l'utilisation d'une peau artificielle dans le traitement des grands brûlés¹⁴. Cette même année, des cellules pluripotentes sont isolées à partir de blastocystes de souris par EVANS et KAUFMAN³⁰. C'est en 1993 que des greffes osseuses réalisées à partir de pro-ostéons sont présentées⁷⁹. Enfin en 2006, TAKAHASHI et YAMANAKA réussissent à engendrer des cellules souches pluripotentes à partir de fibroblastes¹⁰¹. Il semble donc évident de mêler aujourd'hui ces deux expertises afin de créer un biomatériau servant dans un premier temps de support au vivant puis évoluant avec les cellules afin de régénérer un tissu lésé.

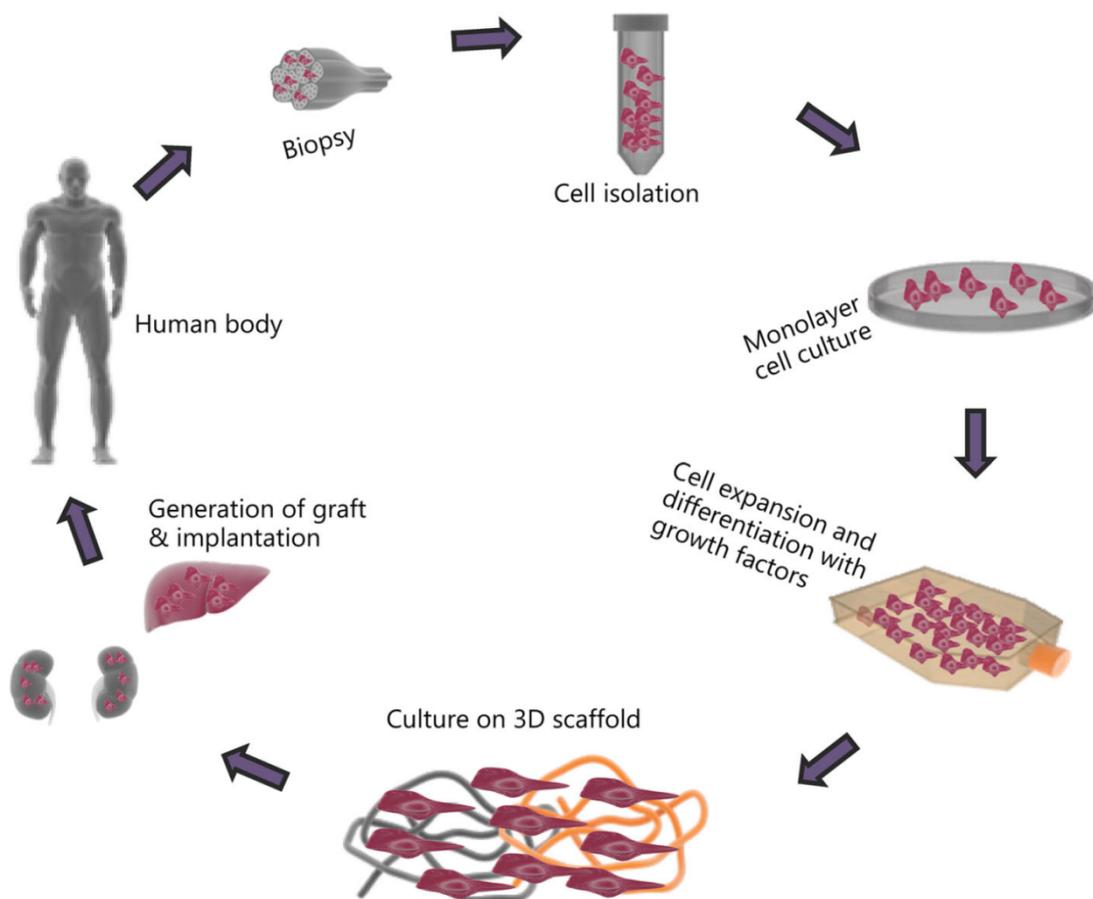


Figure 1 : Procédé utilisé en médecine régénérative mêlant génie tissulaire et culture cellulaire¹⁰⁵

c. Une utilisation du génie tissulaire dans la recherche

Cependant, le génie tissulaire participe aussi au développement d'autres branches de la médecine, comme celle de la recherche. La création de tissus synthétiques a tout d'abord un enjeu éthique en limitant le nombre d'animaux utilisés lors d'une expérience en répondant à la règle des 3Rs : Reduce (Réduire), Refine (Affiner), et Replace (Remplacer).

De plus, l'utilisation de tissus humains permettrait des prédictions plus proches de la réalité sur l'efficacité d'un traitement que lorsqu'il est testé sur des animaux. En effet, outre la différence de taille entre un animal comme une souris et un homme, ces deux êtres vivants appartiennent à des espèces différentes avec des physiologies différentes, ce qui peut entraîner des variations dans le mode ou la rapidité d'action d'un traitement. Par exemple, 92% des traitements dont les tests sur les animaux sont concluants n'obtiennent pas la validation de l'agence américaine de l'alimentation et des médicaments (FDA : Food and Drug Administration) car ils sont soit inefficaces, soit dangereux chez l'Homme. La moitié des 8% restant présente des effets néfastes, passés alors inaperçus lors de tests sur les animaux⁸⁵.

De la même manière, in vitro, il est montré que les tests sur culture cellulaires en 3D sont plus pertinents que ceux in réalisés en culture cellulaire 2D⁴⁵.

Enfin, en plus de pouvoir réduire le coût et le temps de ces expériences, le génie tissulaire permettrait d'avoir des résultats personnalisés en fonction du patient à traiter. Il serait alors possible de synthétiser un tissu à partir des cellules de ce patient qui ne sera alors pas utilisé comme greffe, mais comme organe témoin de la réaction de ce dernier au traitement.

2 - Place de la médecine régénérative aujourd'hui

a. Une technique qui a déjà fait ses preuves : l'utilisation de peaux artificielles

Conçues pour soigner les brûlés, près de 1,5 million aux Etats-Unis dont 5 000 à 12 000 décès par an, les peaux artificielles sont les organes synthétiques les plus utilisés et leur efficacité est actuellement démontrée⁸⁸. Lorsque plus de 60% de la surface cutanée est à remplacer, la douleur parfois insupportable, les contractures cutanées et les problèmes de cicatrisation comme des changements de pigmentation rendent difficile la réalisation d'autogreffes. Toutefois, un tissu de remplacement est obligatoire afin d'éviter les infections pouvant

évoluer en sepsis et provoquer la mort du patient. Ces peaux synthétiques sont alors de deux types : soit elles jouent le rôle de matrice permettant la régénération cutanée, soit elles jouent un rôle de remplacement de la peau originelle.

b. Cependant, les greffes synthétiques n'égalisent pas encore le gold standard qu'est l'autogreffe

L'utilisation de greffes synthétiques fait encore débat dans de nombreux domaines où ces tissus ne parviennent pas à égaler les autogreffes, encore considérées comme « gold-standard ». Dans le cas de la chirurgie reconstructrice de lésions du ligament croisé antérieur par exemple, l'évolution à court et moyen termes de ces deux greffes semblent similaires. Pourtant, sur le long terme, les patients soignés à l'aide de greffes synthétiques constatent une plus grande laxité de leur genou et une diminution de leur fonctionnalité, objectivée grâce au questionnaire IKDC (International Knee Documentation Committee), par rapport à ceux ayant subi une autogreffe³⁹.

c. Des recherches en vue d'améliorer la technique

Enfin, trois domaines du génie tissulaire sont sujets de recherches actuellement : la formation de biomatériaux par impression 3D, la création de vésicules actives et la culture cellulaire en 3D⁷⁵.

En effet, l'impression 3D de biomatériaux permettrait de fournir un échafaudage sur lequel différents types cellulaires pourraient évoluer recréant des organes ou des tissus entiers. Il faut cependant garder à l'esprit que pour l'instant seuls de simples organes comme de la peau n'ont pu être constitués de nos jours. En effet, un organe reste un objet complexe possédant une hétérogénéité à l'échelle cellulaire tout comme à l'échelle macroscopique. Les matériaux se prêtant le mieux à l'impression 3D sont les hydrogels polymères naturels ou synthétiques. La tenue de l'hydrogel est assurée soit par une réticulation chimique, c'est-à-dire, par des liaisons covalentes, soit physique, c'est-à-dire, par le jeu d'interactions faibles. Cette réticulation aboutit à un hydrogel moins stable lorsqu'elle est physique et donne lieu à un composé plus stable lorsqu'elle est chimique. Mais dans ce dernier cas, la difficulté est de réticuler l'hydrogel sans qu'il réagisse avec les molécules biologiques (protéines notamment), ce qui induirait de la toxicité. Une autre façon de générer des architectures en 3D bien définies, souvent alignées, est d'utiliser la formation de fibres par électrospinning.

L'utilisation du génie tissulaire afin de créer des micro-vésicules et des exosomes paraît aussi prometteuse lorsque l'on sait que ces derniers participent à véhiculer divers signaux intercellulaires comme ceux impliqués dans la formation de cancer métastasés, la régulation de la réponse immunitaire, la communication entre cellules souches ... Le but est ici de pouvoir améliorer le processus de cicatrisation en utilisant ces différents signaux.

Finalement, les biomatériaux formés doivent aussi permettre une culture cellulaire en trois dimensions et non seulement en deux dimensions comme ce que l'on peut voir dans une boîte de Pétri. Ceci permettrait alors une réelle évolution d'un tissu de remplacement et pas seulement la création d'un revêtement.

3 - Médecine régénérative et traitement des maladies neurologiques

a. Importance des maladies du système nerveux par rapport aux autres défaillances du corps

La médecine régénérative est une discipline dont on peut espérer à terme qu'elle puisse remplacer des organes ou des tissus lésés et son potentiel est grandissant¹⁵. Cependant, lorsque l'on regarde le nombre de patients et de chirurgies moyennes en 1991 aux Etats Unis en fonction des différents services, on peut remarquer que les défaillances du système nerveux engendrent, a priori, peu de patients et de chirurgies comparé à la défaillance d'autres systèmes.

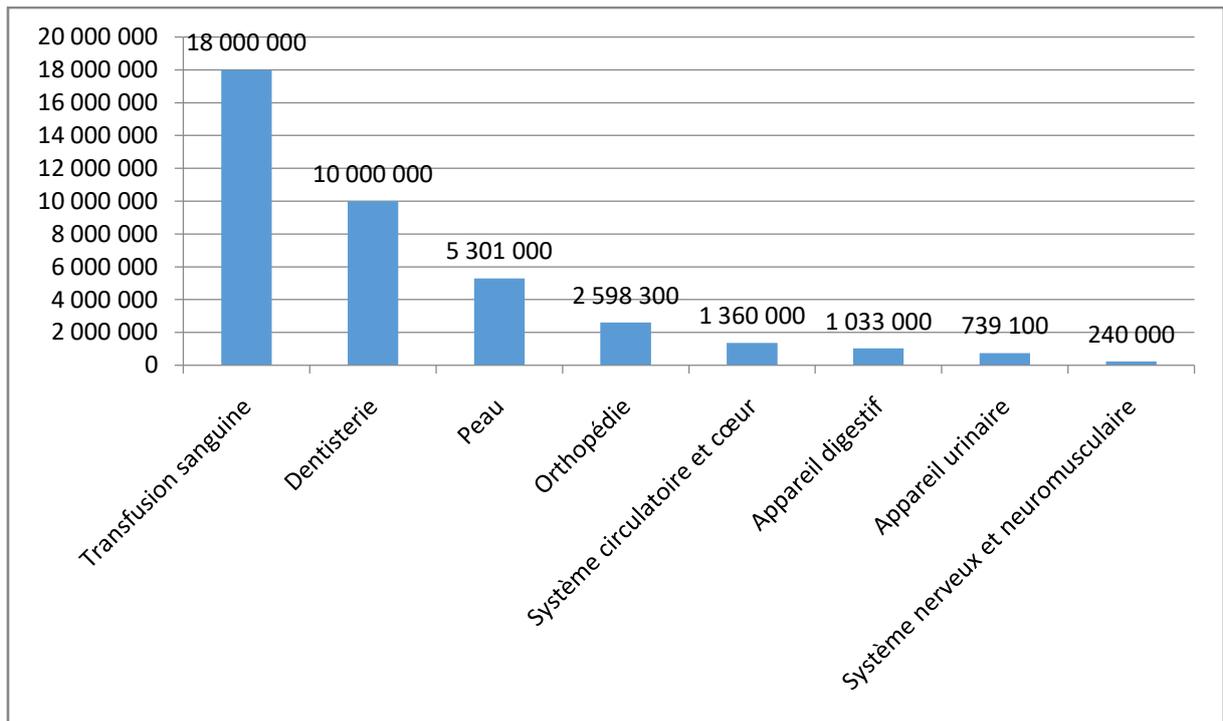


Figure 2 : Nombre de patients et de chirurgies par services aux Etats Unis en 1991⁴⁹.

Population totale = 253 500 000.

De plus, d'après le site Global Observatory on Donation and Transplantation dont les données sont tirées des rapports de l'OMS notamment, les greffes d'organes les plus fréquentes réalisées aussi bien dans le monde qu'en France sont celles des reins, du foie ou encore du cœur.

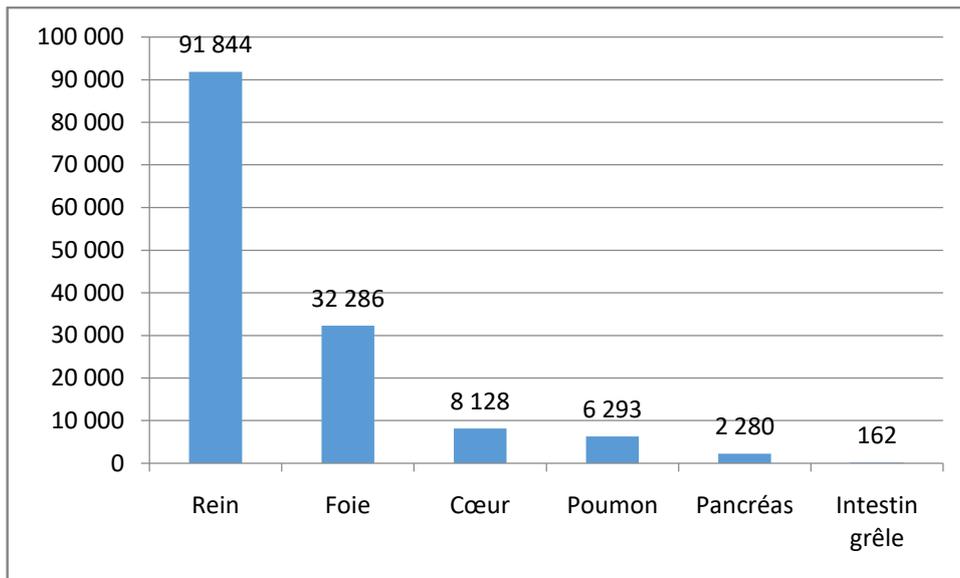


Figure 3 : Nombre de greffes d'organes réalisées dans le monde en 2018

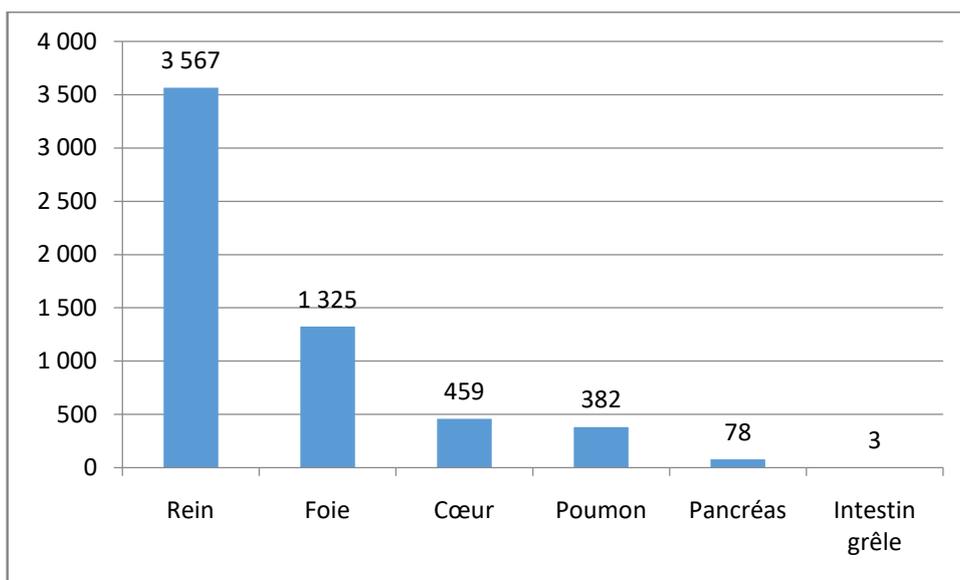


Figure 4 : Nombre de greffes d'organes réalisées en France en 2018

b. Des maladies neurologiques de plus en plus fréquentes et handicapantes

Néanmoins, une population mondiale vieillissante se confronte à de plus en plus de maladies affectant le système nerveux et dont le coût reste important. D'autres maladies connaissent une évolution croissante au sein de la population par le biais de changements de son mode de vie. Enfin, certaines lésions du système nerveux sont importantes par les handicaps conséquents qu'elles génèrent.

(i) La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer touche près de 900 000 personnes en France d'après l'INSERM. Il s'agit de la maladie neurologique la plus fréquente. Le budget est de presque 10 milliard d'euros pour la gestion médicale et médico-sociale des patients atteints d'Alzheimer en France d'après l'association France Alzheimer.

La maladie d'Alzheimer est la maladie la plus importante impliquée dans les causes de démence. La démence se définit, d'après « National Institute on Aging », comme une perte des capacités cognitives comme la réflexion, la mémoire ou encore la capacité à raisonner mais aussi comportementales qui interfèrent dans la vie et les activités quotidiennes de la personne atteinte. Toutefois, il est important de garder à l'esprit que la démence est souvent causée par un ensemble de plusieurs maladies et non par la seule maladie d'Alzheimer⁷³. Elle se traduit généralement par des troubles de la mémoire et des fonctions exécutives ainsi qu'une perte de repères temporels et spatiaux.

Les deux lésions qui caractérisent la maladie d'Alzheimer sont des dépôts d'amyloïdes β généralement extracellulaires et la présence de neurofibrilles de protéines Tau hyperphosphorylée intracellulaires qui, tous deux, participent à la diminution de près de 45% de la communication inter-neuronale⁷⁸. Les mécanismes pathologiques de cette maladie ne sont pas encore totalement connus. La formation de ces plaques d'amyloïdes serait favorisée par la présence de gènes dominants codant pour plusieurs protéines : la protéine précurseur d'amyloïde ou les présénilines 1 et 2. Ces plaques d'amyloïdes seraient liées à une diminution du métabolisme glucidique⁸² ce qui favoriserait l'apparition de radicaux libres intracellulaires. Ces radicaux entraînent ensuite le dysfonctionnement de la mitochondrie neuronale qui libère des cytochromes C provoquant alors l'apoptose de la cellule²³. De plus, le dépôt d'amyloïdes β extracellulaires favoriserait aussi la formation de pores dans la membrane neuronale perturbant alors l'homéostasie cellulaire et donc le fonctionnement synaptique⁸². La protéine Tau, quant à elle, est une protéine associée aux microtubules. Elle participe donc au fonctionnement du cytosquelette neuronal mais aussi au différents processus de signalisation intercellulaire⁷³. Lorsque cette protéine est hyperphosphorylée, elle se dissocie des microtubules ce qui entrave leur bonne action. Les fibrilles de cette protéine déséquilibreraient aussi l'homéostasie cellulaire en influant sur la pompe Na^+/K^+ ATPase⁹³.

L'âge serait le facteur de risque le plus important dans le survenue de cette maladie. En effet, le risque d'en être atteint double tous les 5 ans après 65 ans et, passé 85 ans, il y a 50% de chances de souffrir de cette maladie⁷³.

Les traitements actuels de la maladie d'Alzheimer ne soignent pas l'affection mais visent plutôt à améliorer la neurotransmission. Le donépézil, la vivastigmine et la galantamine sont des inhibiteurs de la cholinestérase utilisés en cas de démence. La mémantine est, elle, utilisée comme un antagoniste non compétitif de la N-méthyl-D-aspartate et un agoniste à la dopamine. Elle est plutôt utilisée lorsque le patient présente des symptômes sévères à modérés avec des troubles de l'attention ou de la vigilance¹⁰⁷.

(ii) La maladie de Parkinson

La deuxième maladie neurologique la plus fréquente est la maladie de Parkinson qui touche entre 100 000 et 120 000 personnes en France d'après l'INSERM.

Cette maladie est caractérisée par des symptômes à la fois moteurs mais aussi non moteurs. Parmi ceux-ci, on trouve des tremblements, de la rigidité, de la bradykinésie, c'est-à-dire un ralentissement des mouvements volontaires, et une posture avec le dos voussé. Cependant, on trouve d'autres symptômes comportementaux comme de l'anxiété et de la dépression, cognitifs comme de la démence et enfin des troubles du système autonome comme une hypotension orthostatique, c'est-à-dire une chute de la pression artérielle lors du passage de la position couchée à la position debout et de l'hyperhidrose, à savoir une sudation excessive⁹.

Les noyaux gris centraux constituent un ensemble de noyaux : le noyau caudé, le noyau lenticulaire, la substance noire et le noyau sous-thalamique qui interagissent les uns avec les autres dans deux voies : la voie indirecte et la voie directe, toutes deux modulées par la dopamine. Ce circuit intervient dans beaucoup de phénomènes, notamment dans celui de la régulation des mouvements. La première vise à inhiber un mouvement qui serait initié dans le cortex tandis que la seconde permettrait sa mise en place. La maladie de Parkinson se caractérise par une perte des cellules dopaminergiques de la substance noire au niveau de ces noyaux gris centraux. Ceci induit donc une diminution de la production de dopamine⁵⁸ expliquant alors les symptômes de la maladie. Les corps de Lewy sont aussi une caractéristique de cette pathologie. Ces corps sont des inclusions intra cytoplasmiques constitués de neurofilament et de protéine : l'alpha-synucléine⁵⁸. Leur rôle dans la maladie de

Parkinson reste toutefois encore inconnu. On ne sait pas s'ils ont une visée neuroprotectrice ou si, au contraire, peuvent causer certains symptômes.

L'âge semble être le facteur prédominant dans l'apparition de la maladie de Parkinson. Toutefois, des études épidémiologiques ont démontré qu'il s'agit d'une maladie multifactorielle avec des facteurs de risques environnementaux et génétiques qui peuvent augmenter ou diminuer le risque d'apparition de cette maladie⁴².

La principale molécule utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson est la levodopa dont l'usage semble efficace²². Elle est associée à d'autres molécules dans le but d'éviter les effets secondaires dopaminergiques périphériques sur le système cardiovasculaire, digestif ... En effet, cette molécule empêche la formation de dopamine à partir de la levodopa mais ne passe pas la barrière hémato-encéphalique. Ce qui permet un effet dopaminergique seulement central. D'autres molécules peuvent aussi être utilisées comme des agonistes à la dopamine ou des inhibiteurs d'enzymes de métabolisation de la dopamine⁶⁰.

(iii) Les Accidents Vasculaire Cérébraux ou AVC

D'après la Fondation pour la Recherche sur les AVC, il y a près de 140 000 nouveaux AVC par an en France, soit un AVC toutes les 4 minutes. Près de 1 personne sur 6 en est victime et il constitue aussi la première cause de décès chez la femme est la troisième chez l'homme, provoquant ainsi la mort de près de 40 000 personnes par an.

Un accident vasculaire cérébral se définit comme « un infarctus au niveau du système nerveux central conduisant à la mort de cellules rétinienne, cérébrales ou médullaires par ischémie » et objectivé, soit par la mise en évidence de lésions ischémiques dans le système vasculaire évidentes de par la pathologie qu'elles entraînent ou par imagerie, soit par une clinique évidente avec des symptômes persistants plus de 24h ou jusqu'à la mort de la personne atteinte⁸⁶. C'est donc le manque d'apports en oxygène et en nutriments comme le glucose qui est la cause de cette mort cellulaire. Dans les minutes suivant la survenue de l'AVC, ce manque induit des phénomènes d'excitotoxicité, à l'origine de l'œdème cérébral et de dommages cellulaires, ainsi que des dépolarisations péri-infarctus qui peuvent participer à l'élargissement de celui-ci. Ensuite, c'est un phénomène inflammatoire qui prend le relais, modulé par des cellules du système vasculaire comme les neutrophiles, les macrophages ou encore les monocytes mais aussi par des cellules résidentes du cerveau comme la microglie.

Enfin, plusieurs jours après la survenue de l'AVC, celui-ci entraîne des phénomènes de nécrose, lorsque l'occlusion est importante, ou d'apoptose lorsqu'elle est modérée.^{23,55}

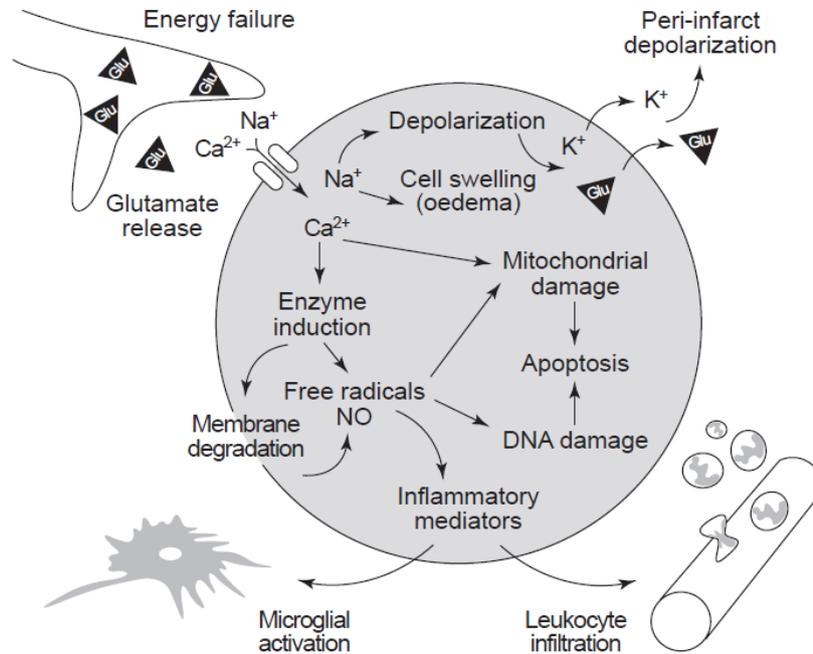


Figure 5 : Mécanismes d'excitotoxicité²³

On distingue alors 2 types d'accidents vasculaires cérébraux. Les premiers sont les AVC ischémiques et représentent 87% des AVC. Ils résultent de la présence d'un caillot sanguin qui obstrue une artère cérébrale. Les AVC hémorragiques représentent, eux, 13% des AVC. Ils résultent de la rupture d'un vaisseau, ce qui provoque un saignement dans le parenchyme encéphalique ou les ventricules dans 77% des cas d'AVC hémorragiques ou dans l'espace sous arachnoïdien dans 23% de ces AVC¹⁰. Les symptômes de l'AVC sont principalement des maux de têtes, des vomissements et un état de conscience diminué qui peut se traduire par des déséquilibres, des difficultés à s'exprimer, des étourdissements ... Enfin, le nombre d'AVC dans le monde semble augmenter au fil des années du fait d'augmentation des facteurs de risques environnementaux, comportementaux ou encore métaboliques³².

Rang d'importance	Facteurs	Evolution entre 1990 et 2013
1	Pression systolique élevée	++
2	Ration alimentaire pauvre en fruits	+
3	Indice de masse corporel (IMC) élevée	++
4	Ration alimentaire riche en sodium	++
5	Tabagisme	++
6	Ration alimentaire pauvre en légumes	++
7	Pollution à particules ambiantes dont le diamètre est supérieur à 2,5 µm	++
8	Pollution de l'air dans les foyers suite à l'utilisation de combustibles solides	-
9	Ration alimentaire pauvre en céréales complètes	+
10	Glycémie à jeun élevée	++
11	Peu d'activités physiques	++
12	Faible taux de filtration glomérulaire	++
13	Consommation d'alcool	++
14	Exposition au plomb	+
15	Cholestérolémie élevée	++
16	Tabagisme passif	-
17	Ration alimentaire riche en boisson sucrée	++

Tableau 1 : Importance des facteurs de risques liés à la survenue d'un AVC et évolution entre 1990 et 2013³²

(Avec ++ = augmentation importante de la fréquence, + = augmentation faible de la fréquence, - = diminution de la fréquence)

D'après Denis LEBIHAN dans la diffusion « Le cerveau de l'intérieur » de l'émission « Révolutions Médicales » du 13 novembre 2012 sur la radio France Culture, l'alimentation riche en graisses dans les pays occidentaux favoriserait l'apparition de plaques d'athérome et donc d'AVC ischémiques dans la population. Parallèlement, l'alimentation pauvre en graisses des pays asiatiques conduirait à l'apparition d'AVC hémorragiques, les artères du cerveau devenant fragiles car « manquant de lubrification ».

Le traitement médical des AVC ischémiques consiste en l'administration de facteurs thrombolytiques comme des activateurs du plasminogène⁸⁹. Ce traitement doit être administré rapidement après l'AVC mais toujours après réalisation d'imagerie médicale afin de vérifier la nature ischémique et non hémorragique de la lésion. Ce traitement comporte néanmoins un risque non négligeable de voir apparaître des lésions hémorragiques. Le traitement chirurgical consiste en la réalisation de thrombectomies mécaniques à l'aide d'un cathéter. Le matériel est alors inséré par l'artère fémorale et est guidé à l'aide d'une caméra jusqu'à la zone lésée. Cependant, entre 7 et 14% des patients ayant subi cette opération souffrent de complications comme la perforation de vaisseaux, des hémorragies, des embolies possibles ou encore une casse du matériel de thrombectomie⁸⁰. Pour les AVC hémorragiques, un traitement à base

d'antihrombiques est possibles comme par exemple la warfarine⁷² tout comme un traitement de coiling endovasculaire ou de clipping chirurgical mais doit régulièrement être suivi par imagerie médicale⁶⁷ afin de prévenir la survenue de lésions hémorragiques.

(iv) Les lésions du système nerveux central

Les lésions du système nerveux central sont essentiellement d'origine traumatique. Des accidents de transports, des chutes, des lésions causées par la pratique d'un sport ou encore la violence peuvent en être les causes¹⁰⁹.

Dans les deux cas, que ce soient des lésions du cerveau ou de la moelle épinière, le traumatisme est à l'origine d'une ischémie hémorragique. Le mécanisme pathologique est alors semblable à celui étudié pour l'Accident Vasculaire Cérébral^{64,109}. Près de 70% des patients atteints par les lésions de la moelle épinière souffrent de complications qui touchent tous les systèmes et peuvent alors présenter des pathologies cardiovasculaires, pulmonaires, neurologiques, gastro-intestinales, hématologiques, génitales ou encore urinaires²⁹. Ces lésions sont aussi importantes et peuvent paralyser le patient à l'image de Christopher Reeve, acteur connu pour avoir joué Superman dans les années 80 et devenu tétraplégique après une chute de cheval en 1995. Enfin, la gestion de la douleur, qu'elle soit musculo-squelettique, viscérale ou neuropathique se révèle être un challenge important dans le traitement de ces lésions⁹⁴.

Le traitement médical est avant tout un traitement d'urgence visant à rétablir une oxygénation suffisante au patient et limiter l'inflammation locale à l'aide de corticoïdes. L'usage de molécules neuroprotectrices et neurorégénératives est aussi possible et semble prometteur. Enfin, une chirurgie à visée décompressive peut être réalisée¹⁰⁹.

Pour finir, certaines études semblent démontrer une augmentation du risque d'être atteint par des maladies neurodégénératives suite à une lésion du système nerveux central⁶⁴.

c. Avancée de la recherche en médecine régénérative pour traiter ces maladies et réparer ces lésions

Il existe quatre types de cellules souches étudiées actuellement en médecine régénérative du système nerveux : les cellules souches embryonnaires, les cellules souches inductibles pluripotentes, les cellules souches neurales et enfin les cellules souches mésenchymateuses. Toutes possèdent une origine et donc des caractéristiques différentes qui en font des cellules de choix dans le traitement de différentes affections neurologiques.

Dans le tableau ci-dessous, ces différentes cellules ont tout d'abord été extraites puis cultivées in vitro. La différenciation de celles-ci a alors été vérifiée par immunohistochimie ou par PCR. Enfin, lorsqu'elles étaient jugées aptes à être utilisées, ces cellules ont été déposées dans des zones de lésions induites dans des modèles animaux et les résultats ont été analysés, notamment en terme d'effet sur les symptômes des maladies modélisées.

Nom	Caractéristiques	Effets sur les symptômes	Avantages	Inconvénients
<p>Cellules souches embryonnaires</p> <p>= issues de la masse cellulaire interne d'un embryon préimplantatoire au stade blastocyste</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Expansion illimitée in vitro - Différenciation en cellules spécifiques à la lignée neuronale sous des conditions de culture spécifiques in vitro 	<ul style="list-style-type: none"> - Amélioration des fonctions motrices et sensorielles - Amélioration de la mémoire spatiale - Fonctions cognitives restaurées 	<ul style="list-style-type: none"> - Différenciation possible en neurones dopaminergiques, cholinergiques, GABAnergiques - Réparations structurales - Rétablissement fonctionnel - Réduction de la taille de l'infarctus 	<ul style="list-style-type: none"> - Malignité possible / Croissance cellulaire non contrôlée - Formation de tératomes in vitro et après implantation
<p>Cellules différenciées issues de cellules souches embryonnaires</p>		<ul style="list-style-type: none"> - Amélioration comportementale 	<ul style="list-style-type: none"> - Réduction de la taille de l'infarctus - Différenciation des cellules transplantées en neurones 	<ul style="list-style-type: none"> - Formation de tératomes possible
<p>Cellules souches induites pluripotentes</p> <p>= reprogrammées à partir de cellules somatiques avec des facteurs définis</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Morphologie et propriétés de croissance similaires aux cellules souches embryonnaires - Formées à partir de nombreux types de cellules - Capacités de prolifération 	<ul style="list-style-type: none"> - Amélioration comportementale - Amélioration des fonctions motrices et sensorielles - Amélioration des fonctions 	<ul style="list-style-type: none"> - Réduction du volume total de l'infarctus - Atténuation de l'inflammation - Migration dans la zone lésée du cerveau - Cellules matures 	<ul style="list-style-type: none"> - Réaction immunitaire et rejets possibles - Formation de tératomes après transplantation - Possèdent les mêmes propriétés neuropathologiques que

	<p>importantes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Différenciation possible 	<p>neurologiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Amélioration de la mémoire spatiale 	<ul style="list-style-type: none"> - Capables de participer au réseau synaptique - Différenciation spécifique possible en fonction des facteurs de croissance utilisés (neurones dopaminergiques, cholinergiques) - Réduction de l'inflammation - Permet la production à partir de cellules souches pluripotentes autologues 	<p>les cellules autologues souches</p>
<p>Cellules souches neurales endogènes</p> <p>= localisées dans le gyrus denté de l'hippocampe, la zone sous ventriculaire ou le bulbe olfactif</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Régulation de l'inflammation 		<ul style="list-style-type: none"> - Prolifération possible - Production de facteurs neurotrophiques (BDNF et VEGF) - Production de complexes proangiogéniques - Sécrétion de facteurs favorisant la plasticité synaptique 	<ul style="list-style-type: none"> - Nombre de neurones différenciés très faible in vitro

<p>Cellules souches neurales exogènes</p> <p>= obtenues à partir de cellules souches embryonnaires, de cellules souches inductibles pluripotentes, de la moelle osseuse, de cellules souches mésenchymateuses dérivées de tissus adipeux, de cellules souches neuronales embryonnaires et du système nerveux fœtal ou adulte</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Capacités prolifératives intéressantes in vitro - Différenciation possible en astrocytes, oligodendrocytes et en neurones si induites grâce à des facteurs 	<ul style="list-style-type: none"> - Amélioration de la récupération neurologique - Amélioration de la mémoire spatiale - Amélioration de l'apprentissage - Amélioration des fonctions cognitives 	<ul style="list-style-type: none"> - Sécrétion de cytokines agissant sur la neuroprotection et diminuant l'inflammation - Absence de tumeurs - Absence de rejets - Réduction de la taille de l'infarctus - Neurogenèse favorisée - Synaptogenèse favorisée - Réduction des marqueurs de la maladie d'Alzheimer 	<ul style="list-style-type: none"> - Capacités de différenciation et d'expansion limités lors de cultures in vitro - Nombre de cellules gliales non neuronales formées important
<p>Cellules souches mésenchymateuses</p> <p>= population non hématopoïétique de la moelle osseuse</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Isolées à partir de nombreux tissus des Mammifères - Autorenewement possible 	<ul style="list-style-type: none"> - Amélioration des fonctions cognitives - Amélioration des fonctions locomotrices - Amélioration de la mémoire spatiale - Amélioration de l'apprentissage 	<ul style="list-style-type: none"> - Migration vers la zone de la lésion à partir de voies intraveineuses, par transplantation cérébrale ou par injection intracrânienne - Absence de rejets - Rétablissement fonctionnel - Différenciation en neurones et en cellules 	<ul style="list-style-type: none"> - Faibles taux de cellules et de cellules différenciées lors de la vérification - Peut infiltrer plusieurs organes si administrés par voie veineuses

			<p>gliales</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sécrétion de facteurs trophiques améliorant les capacités de réparation et atténuant l'inflammation - Neurogenèse favorisée - Synaptogenèse favorisée - Stimulation de la différenciation - Mort cellulaires lors de la maladie d'Alzheimer diminuée - Réduction des marqueurs de la maladie d'Alzheimer 	
--	--	--	--	--

Tableau 2 : Cellules utilisées en médecine régénérative neuronale^{27,34,36}

II - Description du système nerveux

Le système nerveux est subdivisé en 2 parties : le système nerveux central et le système nerveux périphérique composé des voies afférentes, du latin *affere* (apporter) et des voies efférentes du latin *efferer* (porter hors). Les voies afférentes informent donc le système nerveux central sur le milieu extérieur tandis que instructions sont émises via les voies efférentes jusqu'aux organes effecteurs, aux muscles et aux glandes.

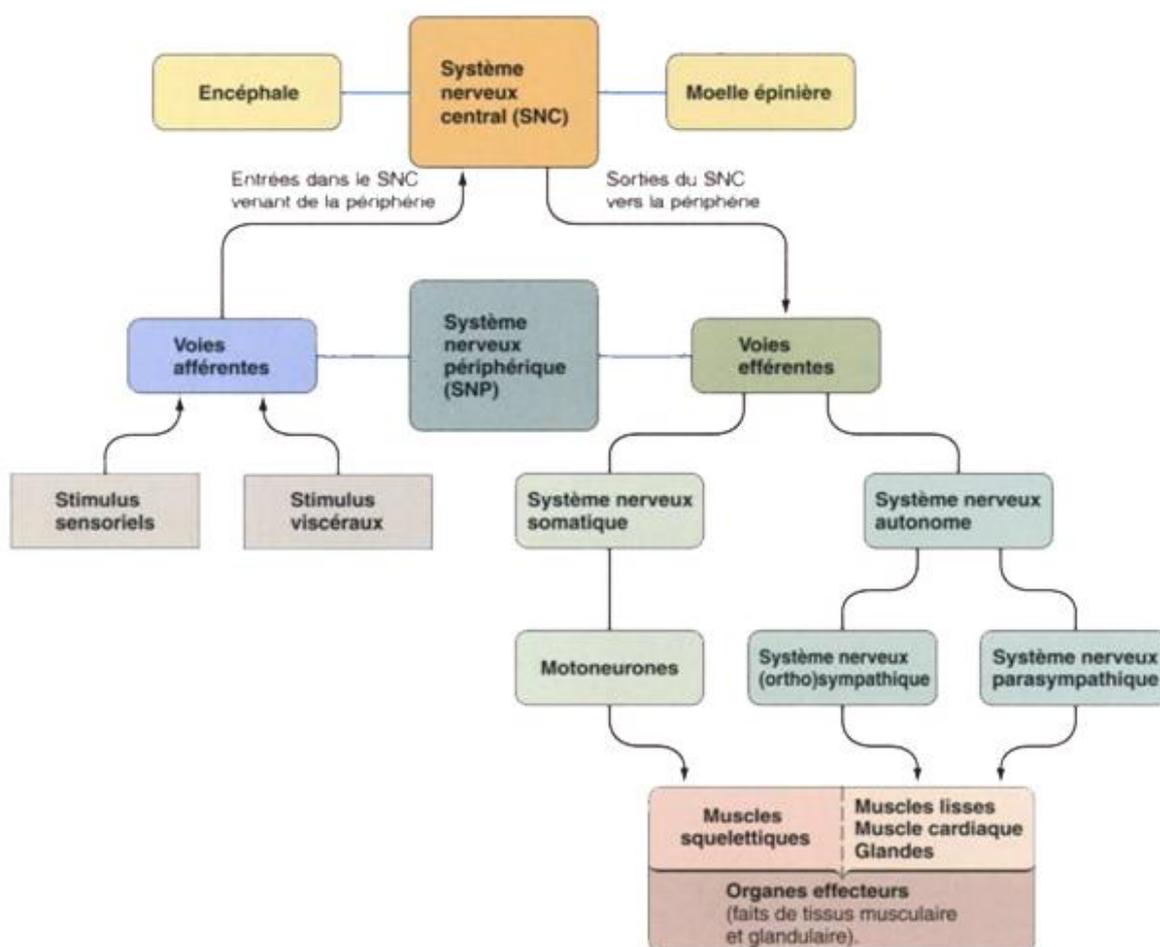


Figure 6 : Organisation du système nerveux⁹²

1 - Anatomie du système nerveux central

Le système nerveux central est composé de l'encéphale, lui-même divisé en cerveau, cervelet et en tronc cérébral, et de la moelle épinière. Ces structures sont protégées par les méninges : la pie-mère étant la couche la plus interne, l'arachnoïde étant la couche intermédiaire et la dure-mère étant la couche la plus externe. Le tout est ensuite entouré des os du crâne et des vertèbres. L'encéphale est composé de la substance grise en périphérie et de la substance blanche en son centre, tandis que la moelle épinière est composée de la substance grise en son centre et de la substance blanche en périphérie.

Ces deux substances visibles macroscopiquement correspondent à des réalités cellulaires : la substance grise contient les corps cellulaires de diverses cellules du SNC alors que la substance blanche renferme les fibres nerveuses et les axones de ces dernières.

2 - Composition cellulaire du système nerveux central

90% des cellules du SNC sont des cellules gliales tandis que seulement 10% de celles-ci sont des neurones.

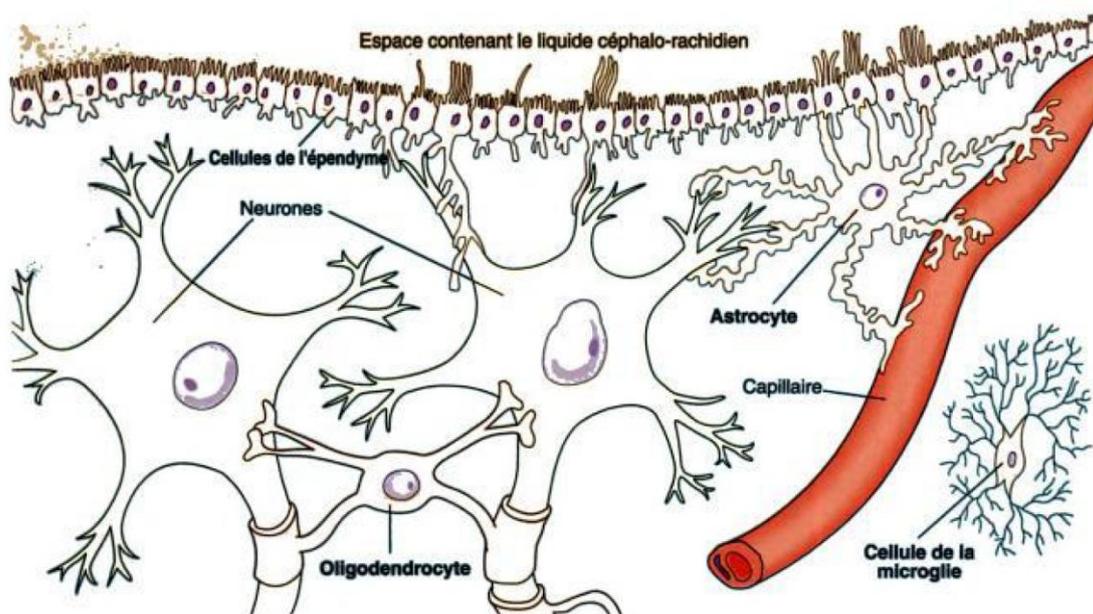


Figure 7 : Organisation des cellules au sein du SNC⁹²

a. Les cellules gliales

Les cellules gliales peuvent être de 4 types : les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules épendymaires et les cellules de la microglie.

Les astrocytes jouent un rôle dans le bon fonctionnement des neurones. En effet, ils maintiennent leur organisation spatiale mais servent aussi de tuteur lors de leur développement. Ils induisent des modifications anatomiques et fonctionnelles des capillaires, jouent un rôle dans la réparation des lésions cérébrales et dans la formation de cicatrices neurales. Ils ont aussi la capacité de capturer le glutamate, un neurotransmetteur exciteur, et l'acide gammaaminobutyrique (GABA), un neurotransmetteur inhibiteur, ce qui permet l'interruption de leur effet. Enfin, ils participent au maintien de la concentration des ions présents dans le liquide extracellulaire en éliminant l'excès d'ions K^{+92} .

Les oligodendrocytes forment la gaine de myéline autour des axones des neurones dans le SNC. Lors de vie fœtale, ils permettent aussi la structuration du SNC en sécrétant des facteurs inhibiteurs de la croissance nerveuse. C'est d'ailleurs ce phénomène qui expliquerait que les fibres nerveuses du SNC ne se régèrent pas donnant ainsi lieu à des séquelles définitives comme la paralysie⁹².

Les cellules épendymaires tapissent les cavités remplies de liquide cébrospinal du SNC. Il s'agit des ventricules cérébraux de l'encéphale et du canal épendymaire de la moelle épinière. Ces cellules participent à la formation de ce liquide mais auraient aussi un rôle dans la neurogenèse ou dans la formation de cellules gliales⁹².

Enfin, les cellules de la microglie ont un rôle immunitaire car elles sont des phagocytes du système nerveux central. Cependant, elles jouent aussi un rôle dans l'organisation synaptique, la régulation de l'excitabilité neuronale et en tant que support trophiques des neurones². Elles arrivent par voie sanguine et peuvent donc traverser la barrière hémato-encéphalique. Lorsqu'elles sont activées, ces cellules peuvent aussi libérer des substances visant à détruire le pathogène.

b. Les neurones

Les neurones permettent la transmission du message nerveux qu'il soit électrique au sein d'un neurone ou chimique entre deux neurones. Il existe 3 types de neurones : les neurones

sensitifs qui transmettent l'information via les voies afférentes, les neurones moteurs qui transmettent l'information jusqu'aux organes effecteurs et enfin les interneurons qui établissent des liaisons entre les voies afférente et efférente. Ces trois familles se subdivisent ensuite en des centaines de type de neurones différents⁹².

On expliquait autrefois que le nombre de neurones était défini lors de la naissance d'un individu et qu'aucune neurogenèse n'était possible⁵⁰. Il faut attendre les travaux de ALTMAN en 1962 démontrant qu'une prolifération neuronale est possible dans une région de l'encéphale chez le rat⁵ confirmés par KAPLAN en 1979 qui trouve des cellules équivalentes dans l'encéphale de singe. C'est en 1999 que GOULD indique la présence de neurogenèse dans l'encéphale des primates de la famille des *Cercopithecidae*³³.

Les neurones sont issus de cellules souches neurales. Celles-ci peuvent alors se multiplier en se divisant soit en deux cellules souches, soit en deux cellules précurseurs de neurone qui se différencieront, soit en l'une de chaque. Ces cellules souches peuvent alors s'auto renouveler. Les neurones nouvellement formés peuvent ensuite migrer vers leur destination, guidés par des signaux chimiques et dirigés grâce aux fibres des cellules gliales radiales⁶. Ils possèdent la durée de vie la plus longue des cellules de l'organisme. Toutefois, certaines maladies neurologiques sont expliquées par leur mort prématurée.

3 - Phénomène inflammatoire et formation de la cicatrice gliale

La formation de la cicatrice gliale a lieu dans de nombreuses pathologies du système nerveux central, aussi bien dans le cas de certaines maladies neurodégénératives comme les scléroses ou dans les lésions de ce système. Elle est souvent pointée du doigt comme un phénomène néfaste empêchant la régénération du tissu lésé. Cependant, de plus en plus de chercheurs s'accordent aujourd'hui pour dire qu'elle joue un rôle crucial dans la préservation de ce tissu et dans l'atténuation du processus inflammatoire². Cette cicatrice est formée par deux régions distinctes. Tout d'abord, on trouve le centre de la lésion qui contient de nombreux fibroblastes, des pericytes, c'est à dire des cellules de l'endothélium capillaire, des cellules épendymaires et des macrophages de la microglie. On y trouve aussi des protéines et des protéoglycanes de la matrice extra cellulaire qui inhibent la croissance axonale et la différenciation des oligodendrocytes phénomène précurseur à la remyélinisation. Ce centre de la lésion est entouré par de nombreuses cellules réactives : des astrocytes, des cellules gliales

NG2 et des cellules de la microglie activée qui forment alors une barrière entre le tissu sain et le tissu lésé.²

Les astrocytes activés sont identifiables car ils sont hypertrophiés. Les astrocytes dits « A1 » sont capables de sécréter des neurotoxines induisant la mort des neurones et des oligodendrocytes tandis que les astrocytes dits « A2 » peuvent exprimer divers facteurs neurotrophiques ou transférer des mitochondries aux neurones lésés. Cette balance entre effets fastes et néfastes est régie par des signaux de la microglie. De plus, ces astrocytes peuvent donner lieu à des cellules souches neurales capables de se différencier en neurones.²

Les cellules gliales NG2 sont aussi hypertrophiées. Leur prolifération et leur migration vers le tissu lésé est rendu possible par des facteurs de croissance fibroblastiques et des facteurs de croissance issus des plaquettes. Ce sont des cellules précurseurs à beaucoup de cellules du système nerveux central comme les cellules de Schwann pour le système nerveux périphérique, ou encore les oligodendrocytes pour le système nerveux central. Elles permettent non seulement la formation mais aussi la résolution de la cicatrice gliale.²

Les cellules de la microglie, dans une cicatrice gliale, passent à l'état activé. On distingue alors deux types de cellules. Tout d'abord les cellules dites « M1 » qui sont pro-inflammatoires et qui participent à la prolifération de cellules précurseurs aux oligodendrocytes. Les cellules dites « M2 » ont plutôt un rôle anti-inflammatoire et participent à la différenciation des oligodendrocytes.²

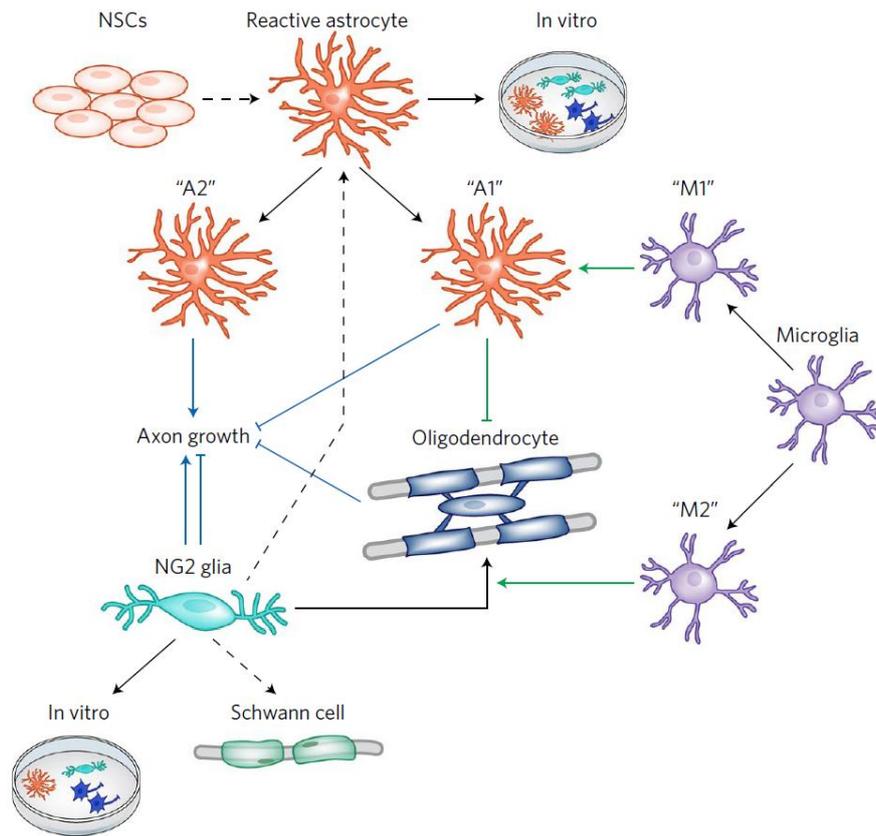


Figure 8 : Schéma bilan du fonctionnement des différentes cellules actrices de la cicatrice gliale²

III - Importance de la matrice extracellulaire dans la stabilité des cellules du système nerveux central

La matrice extracellulaire du système nerveux central est constituée de l'espace extracellulaire de ce même système auquel s'ajoutent des composés synthétisés par ses différentes cellules¹⁰⁸. Elle forme ainsi un filet de macromolécules pour lequel le nom de Matrisome a été proposé. Certaines de ces molécules comme des protéines ou des polysaccharides constituent cette matrice mais elle sert aussi de bain où plusieurs petites molécules comme des facteurs de croissance ou encore des vitamines influent sur les cellules.

Il est intéressant de noter que la composition de la matrice extra cellulaire du système nerveux central peut varier en fonction de sa localisation. On distingue notamment la lame basale, qui assure l'interface entre astrocytes et vaisseaux sanguins, la matrice interstitielle neuronale qui constitue le parenchyme entre les cellules et la zone péri neuronale, autour des neurones.

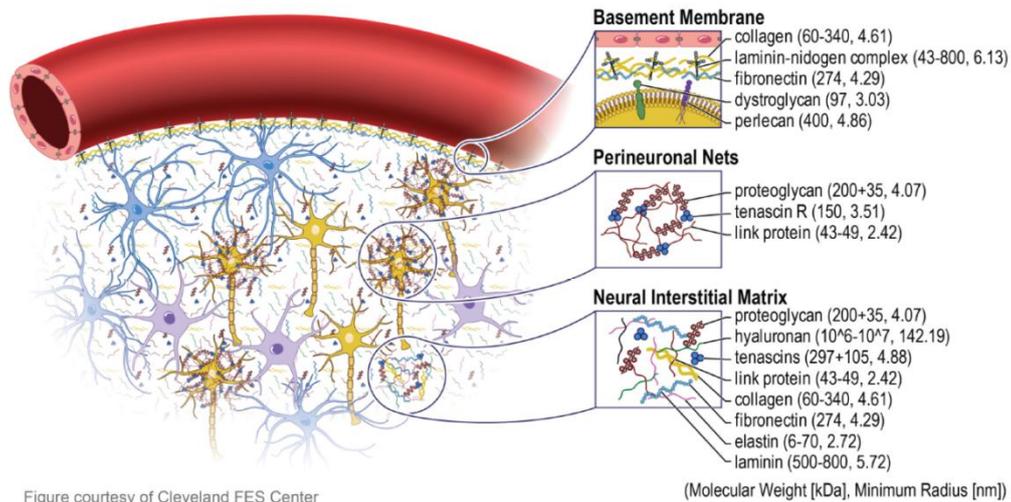


Figure 9 : Structure de la matrice extracellulaire d'encéphale⁴⁴

La matrice extracellulaire forme un réseau plus ou moins dense sur lequel adhèrent différentes cellules du système nerveux central. Sur la figure suivante, il est possible de remarquer l'évolution de cette matrice très dense pour un cerveau fœtal mais avec une densité plus faible pour un cerveau adulte.

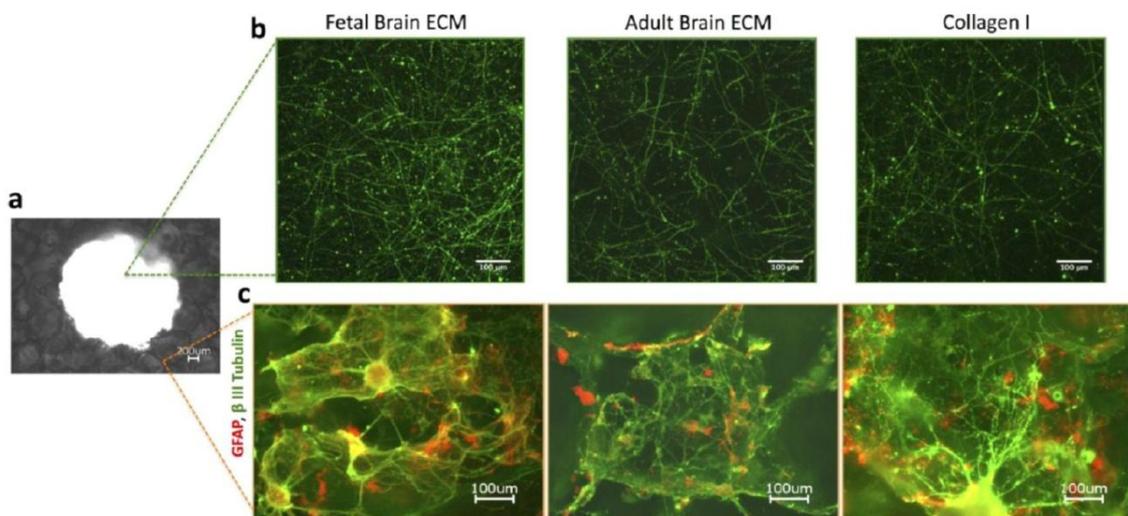


Figure 10 : Microscopie de différents supports de culture formés à partir de gel de soie infusé avec de la matrice extracellulaire de cerveau adulte, fœtale ou de collagène⁹⁸

- Vue microscopique d'un cylindre de support de culture cellulaire
- Croissance cellulaire après 18 jours de culture de neurones corticaux primaires de rats sur différents supports marqués par immunofluorescence
- Croissance cellulaire après 18 jours de culture de neurones corticaux primaires de rats sur différents supports marqués par immunofluorescence

Marquage de GFAP en rouge pour les astrocytes

Marquage de β III Tubuline en vert pour les neurones

Cette matrice extracellulaire ne soutient pas seulement le circuit neuronal mais participe aussi à la modulation de l'activité et de la plasticité neuronales. Outre son activité de structuration de l'espace intercellulaire, elle permet aussi de transduire la communication inter cellulaire⁴⁸.

Il a été démontré qu'en plus des facteurs biochimiques, certains facteurs biophysiques peuvent influencer sur les capacités des cellules somatiques à retrouver un état pluripotent. Parmi les facteurs cités, on peut retenir le relief de la surface d'adhésion où s'attachent ces cellules²⁵. De plus, la rigidité de la matrice extra cellulaire influe sur les cellules souches qui y adhèrent. Une étude a d'ailleurs démontré que l'augmentation de rigidité de cette matrice est corrélée à une diminution de l'attachement des cellules bien que les capacités d'expansion de celles-ci ne semblent pas modifiées⁴.

Certaines études réalisées en 2008 suggèrent que la rigidité du milieu extra cellulaire influe sur la capacité de multiplication des cellules souches neurales, possible avec un module élastique de 100 à 10 000 Pa mais optimisée lorsque ce module élastique est de 100 Pa. De même, lorsque les conditions de différenciation sont rendues possibles, il a été prouvé que plus ce milieu est mou, plus ces cellules souches donnent lieu à des neurones tandis qu'elles se différencient en astrocytes lorsque le milieu se rigidifie⁸⁷. Cependant, d'autres études plus récentes infirment ces hypothèses et ont démontré que c'est la possibilité de dégradation de ce milieu qui influe sur le maintien du caractère souche des cellules c'est à dire, leurs capacités de multiplication et de différenciation, en facilitant les contacts inter cellulaires⁵⁹. En effet, ces contacts permis par les cadhérines modulent la signalisation via les β -caténines qui serait à l'origine du maintien de ces capacités.

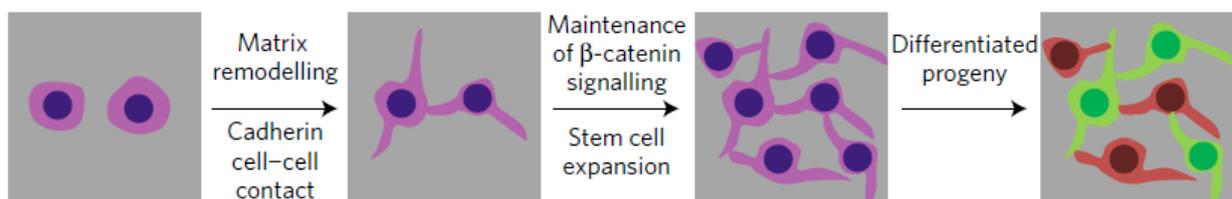


Figure 11 : Importance du remodelage de la matrice extra cellulaire dans le maintien du caractère souche des cellules souches neuronales⁵⁹

1 - Molécules de structuration de la matrice extracellulaire neurale

Dans ce groupe, trois sous groupes peuvent être déterminés. Le premier constitue les protéines qui assurent le squelette de la matrice extracellulaire, à la manière d'un échafaudage. Il s'agit essentiellement du collagène. Le second groupe assure la résistance de cette matrice aux forces de compression par appel d'eau comme l'acide hyaluronique ou encore les protéoglycanes. Enfin, le troisième sous groupe permet l'élasticité de cette matrice par l'intégration d'élastine.

a. Molécule assurant la structuration de la matrice extra cellulaire neurale

Le collagène est une protéine fibreuse. Il s'agit de la protéine la plus représentée dans les matrices extra cellulaires animales. Lorsque l'on regarde la figure 9, on remarque que cette protéine est absente dans le réseau péri-neuronal, c'est-à-dire autour des neurones. Le rôle principal de cette molécule est de lier les cellules entre elles permettant ainsi une intégrité structurale de la matrice extra cellulaire. Initialement produit sous la forme de procollagène par les cellules, il est rendu fonctionnel par des protéases. Le collagène est classé en fonction de son type, jusqu'à 28. Dans le système nerveux, on trouve du collagène de type I, III, qui sont fibrillaires, et IV, qui est non fibrillaire.

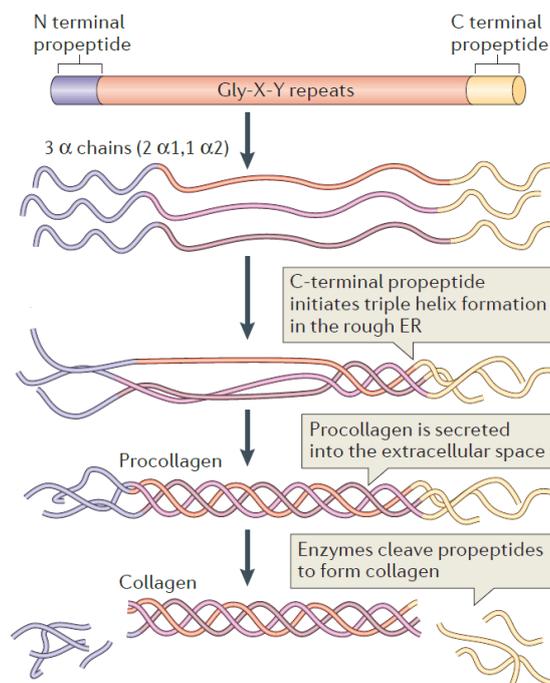


Figure 12 : Structure du collagène⁶⁸

b. Molécules assurant la résistance aux forces de compression

Toutes les molécules présentées dans cette partie font partie de la famille des glycosaminoglycane. C'est d'ailleurs cette partie commune qui leur confère la capacité de rétention d'eau si importante pour la matrice extracellulaire.

(i) L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique constitue le polysaccharide le plus fréquent des matrices extracellulaires animales. On le trouve en abondance dans des tissus comme le cartilage articulaire, la peau mais aussi dans les tissus du système nerveux central. Il existe deux formes d'acides hyaluroniques : ceux à bas poids moléculaire (< 25 kDa) et ceux à haut poids moléculaire (> 400 kDa). L'acide hyaluronique de haut poids moléculaire joue un rôle structural dans la matrice extracellulaire en permettant sa résistance aux forces de compression via l'apport d'eau¹⁰⁸. De plus, il semblerait que cet acide hyaluronique réduit l'apparition de cicatrice suite à une lésion de la moelle épinière en réduisant l'activation et la prolifération des astrocytes⁴³. Cet acide hyaluronique aurait aussi un effet anti-inflammatoire tandis que l'acide hyaluronique de bas poids moléculaire aurait un effet pro-inflammatoire¹⁹. En effet, il induirait l'activation des astrocytes.

(ii) Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des glycoprotéines particulières. En effet, ils sont constitués d'une partie protéique liée à un glycosaminoglycane. De ce fait, ils sont chargés négativement ce qui assure un appel d'eau. De plus, ils agissent sur la prolifération, la différenciation cellulaire ainsi que l'expression de divers gènes⁷⁴. En effet, leur action sur les cellules résiderait dans la modulation des gradients de protéines et des signaux de transduction.

c. Molécule assurant l'élasticité de la matrice extracellulaire

L'élastine contenue dans la matrice extracellulaire confère de l'élasticité aux tissus correspondants. Elle est très abondante dans des tissus comme les artères, les poumons ou encore la vessie. Cette petite protéine formée de proline, glycine et lysine, forme un réseau réticulé, capable de revenir à sa structure originelle lorsque la traction exercée est stoppée. Elle assure ainsi l'intégrité structurale de la matrice extracellulaire face aux extensions et déformations réversibles⁶⁸.

2 - Molécules assurant les liaisons

Ces molécules assurent deux types de liaisons : les liaisons entre les différents constituants de la matrice extracellulaire qui permettent de solidifier le fond et les liaisons entre cellules et matrice extracellulaire qui permettent de structurer la forme

a. Molécules de liaisons entre différents constituants de la matrice extracellulaire

(i) Les tenascines

Les tenascines constituent une famille de 5 protéines. Il s'agit de glycoprotéines qui permettent la liaison avec d'autres molécules de la matrice extracellulaire comme d'autres tenascine, des protéoglycanes ou encore la fibronectine.

(ii) Le perlecan

Le perlecan est une protéine spécifique de la membrane basale essentiellement synthétisé dans l'endothélium vasculaire ou dans les muscles lisses puis déposé dans la matrice extracellulaire. Cette origine explique donc sa localisation dans la lame basale de matrice extracellulaire neurale. Cette protéine permet la liaison avec de nombreuses molécules de la matrice extracellulaire mais assure la fonction de la barrière endothéliale.

b. Molécules de liaisons entre matrice extracellulaire et cellules

(i) Fibronectine

La fibronectine est un dimère de haut poids moléculaire de 230 à 270 kDa considérée par beaucoup d'auteurs comme le maître de l'organisation de la matrice extra cellulaire. En effet, elle se lie aux cellules via les intégrines mais aussi aux autres protéines de la matrice extra cellulaire, permettant ainsi d'unir contenu et contenant. Elle joue notamment un rôle dans l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire⁹⁰.

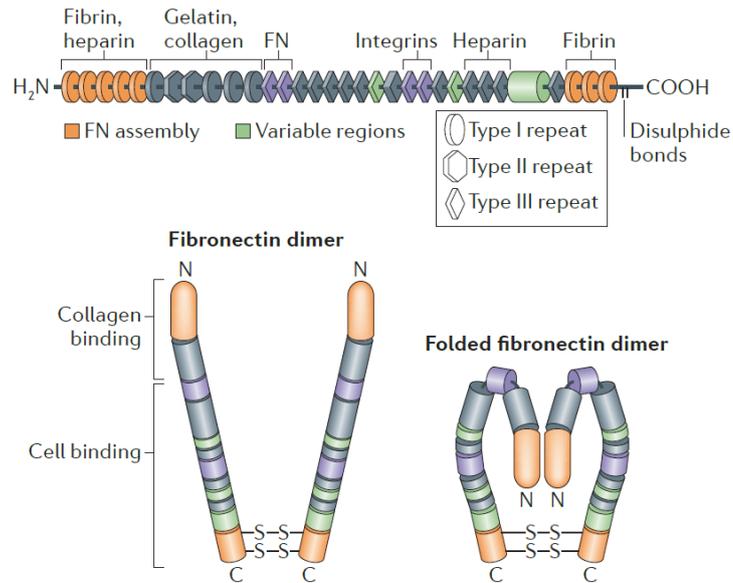


Figure 13 : Structure de la fibronectine⁶⁸

(ii) Laminine

La laminine est une protéine formée de 3 chaînes α , β et γ qui s'entremêlent, lui conférant ainsi un haut poids moléculaire de 500 à 800 kDa. Elle est l'un des constituants majeurs de la lame basale, mais, tout comme la fibronectine, peut se lier aux cellules, augmentant ainsi leur adhésion et renforçant ainsi la structure de la matrice extra cellulaire. En augmentant cette adhésion cellulaire, la laminine participe aussi au maintien de leur phénotype¹⁰⁴.

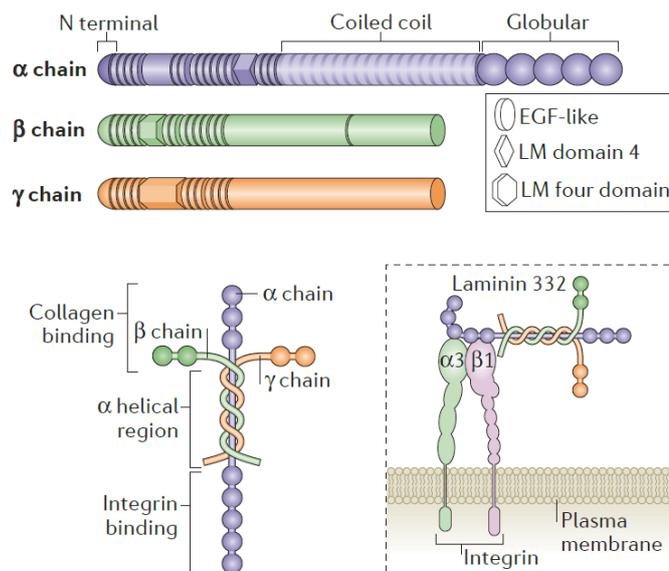


Figure 14 : Structure de la laminine⁶⁸

3 - Le réseau péri neuronal, une variation locale importante de la matrice extracellulaire du système nerveux

Le réseau péri neuronal est une modification de la matrice extra cellulaire du système nerveux localisée autour des neurones. En effet, il s'agit d'une zone comprenant des chaînes d'acide hyaluronique liées à des protéoglycanes et des glycosaminoglycanes en interaction avec d'autres protéoglycanes. Il est importante de souligner l'absence de protéines fibreuses comme le collagène, la fibronectine ou encore la laminine dans le réseau péri neuronal. Cette zone est aussi très dynamique grâce de nombreuses metalloprotéases.

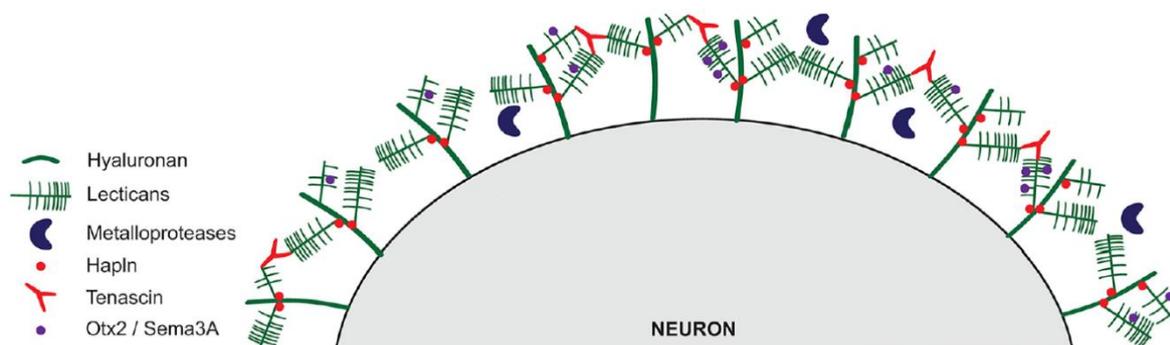


Figure 15 : Composition des réseaux péri neuronaux¹⁰³

Ces réseaux participent en grande partie dans la transmission synaptique. Tout d'abord, leur capacité à contenir des charges négatives permet un gradient ionique de part et d'autre de la membrane encore plus important, ce qui accroît le potentiel d'excitabilité du neurone. Ils peuvent aussi jouer le rôle de réservoir en ions positifs. De plus, ils permettent une protection physique supplémentaire du neurone, notamment contre les feuillets d'amyloïdes β visibles dans la maladie d'Alzheimer. De surcroît, ces réseaux influeraient sur l'environnement autour des neurones et joueraient donc un rôle sur la plasticité synaptique. Enfin, ils seraient acteurs dans de nombreuses voies de signalisation au sein du neurone.

Cette importance du réseau péri neuronal dans la transmission synaptique en fait donc une cible de choix dans le traitement de nombreuses maladies comme la maladie d'Alzheimer ou la schizophrénie par exemple¹⁰³.

4 - Variation de la matrice extracellulaire au sein de l'organisme

Comparer la composition de la matrice extra cellulaire de différents organes semble être une tâche compliquée.

Premièrement, la composition de l'os est caractéristique d'un organe jouant le rôle de charpente du corps. En effet, il contient entre 50 et 70% de minéraux, 5 à 10% d'eau et moins de 3% de lipides. La matrice extra cellulaire « organique » semble, elle, composée de 85 à 90% de collagène et de 10 à 15% de protéines autres que le collagène²⁰.

Lorsque l'on compare, cette fois-ci la composition du muscle, du cartilage articulaire et du tendon, on remarque que le cartilage articulaire possède la part la plus importante en protéoglycanes. Ceci permet donc un appel d'eau important permettant à celui-ci de jouer son rôle d'amortisseur entre les différents os. De même, la composition en collagène du tendon est importante, ce qui lui permet de jouer un rôle de « câble résistant » entre le muscle et les os. Enfin, le muscle, véritable organe de mise en mouvement de la charpente osseuse, est riche en réserves d'énergie représentées par le glycogène⁶⁵.

Component	Amount (ug/mg articular cartilage)	±
Collagen 1	23.0	2.6
Collagen 2	82.1	9.2
Collagen 3	29.6	3.3
Collagen 5	6.57	0.73
Collagen 6	32.8	3.7
Collagen 9	3.28	0.37
Collagen 11	6.57	0.73
Collagen 12	3.28	0.37
Total Collagens	187	21
Fibronectin	26.3	2.9
COMP	9.9	1.1
Other Proteins	92	10
Total	315	35
Water	650	
Aggrecan	49.8	5.6
Other Proteoglycans	70	
Total Proteoglycans	120	46
Total	1085	82

Tableau 3 : Composition du cartilage articulaire⁶⁵

Component	Amount ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tendon)	\pm
Collagen 1	103	38
Collagen 3	17.8	6.6
Collagen 6	19.8	7.3
Other Collagens	8.9	3.3
Total Collagens	149	77
COMP	12.4	4.6
CILP1	10.5	3.9
Other Proteins	12.3	4.5
Total Proteins	184	90
Decorin	13.4	4.9
Lumican	5.9	2.2
Biglycan	5.2	1.9
Total Proteoglycans	24.5	9.0
Water	625	
Other (elastic matrix)	92	
Total	926	99

Tableau 4 : Composition du tendon⁶⁵

Component	Amount ($\mu\text{g}/\text{mg}$ skeletal muscle)	\pm
Collagen 1	32.6	6.0
Collagen 3	26.6	4.9
Other Collagens	20.6	3.8
Total Collagens	80	15
Versican	12.0	2.2
Elastin	11.1	2.1
Fibronectin	9.9	1.8
Total Proteins	113	21
Water	750	20
Lipid	40	
Glycogen	10	
Total	913	41

Tableau 5 : Composition du muscle squelettique⁶⁵

Le cerveau étant un organe riche en eau, il semble logique que celui-ci soit riche en glycosaminoglycane. La vessie, quant à elle, étant un organe qui doit supporter des forces de tractions importantes, celle-ci est riche en collagène. Enfin, tout comme la vessie, la moelle épinière est un organe qui se doit d'être résistant dans la colonne vertébrale qui subit de

nombreux mouvements et contrairement au cerveau qui est enfermé dans la boîte crânienne. Cette résistance aux forces peut alors expliquer sa composition importante en collagène.⁶⁶

Organes	Collagène (µg/mg de MS)	sGAG (µg/mg de MS)
Cerveau	537,5 ± 26,9	5,1 ± 1,4
Moelle épinière	703,2 ± 47,3	1,3 ± 0,9
Vessie	702,5 ± 113,5	4,4 ± 0,4

Tableau 6: Composition en collagène et en glycosaminoglycanes (sGAG) en µg/mg de matière sèche (MS) dans le cerveau, la moelle épinière et la vessie⁶⁶

Enfin, lorsque l'on compare la composition du noyau pulpeux, au centre des disques intervertébraux et du noyau fibreux en périphérie de ces disques, on remarque que le noyau pulpeux est plus riche en protéoglycanes et donc en eau ce qui assure un rôle d'amortisseur entre les vertèbres. A l'inverse, le noyau fibreux contient plus de collagène ce qui assure une résistance aux forces multiples qui s'appliquent entre les vertèbres⁷¹.

Composition (% de MS)	Noyau pulpeux	Noyau fibreux
Protéoglycanes	35 - 65%	20%
Collagène	5 - 20%	50 - 70%
Autres protéines	restes	2%
Eau	70 - 90%	65 - 70%

Tableau 7 : Composition des noyaux pulpeux et fibreux en pourcentage de matière sèche (MS)⁷¹

Il est cependant utile de préciser que ces données restent encore incomplètes en ce qui concerne les réelles proportions des différents constituants de la matrice extra cellulaire. En effet, la présence d'acide hyaluronique, par exemple, est connue dans de nombreux tissus comme le cartilage articulaire³⁵, le cerveau¹³ ou encore la moelle épinière¹² mais sa quantité précise au sein de ces derniers restent encore inconnue. De plus, les études citées

précédemment se sont basées sur la concentration de molécules spécifiques de la matrice extracellulaire. Il est donc difficile de connaître la composition exacte de ces matrices puisque certaines molécules n'y sont tout simplement pas recherchées.

IV - Biomatériaux actuellement utilisés en ingénierie tissulaire

1 - Les supports les plus utilisés en culture cellulaire

a. Diversité des supports

Pour cette partie, une analyse bibliométrique a été réalisée afin de comptabiliser le nombre de publications décrivant l'utilisation de différents supports de culture cellulaire. Pour chacune des recherches, des mot-clefs communs ont été utilisés comme « scaffold » et « cell culture ». Ces mot-clefs permettent notamment de sélectionner les cultures cellulaires de type 3D mais pas celles en 2D ainsi que les cultures sur sphéroïdes et organoïdes, c'est-à-dire sans support.

Lorsque l'on regarde le nombre de publications décrivant les supports de culture cellulaire 3D sur les 5 dernières années (au total, on a compté 6411 publications), on remarque une très grande diversité de ces supports utilisés.

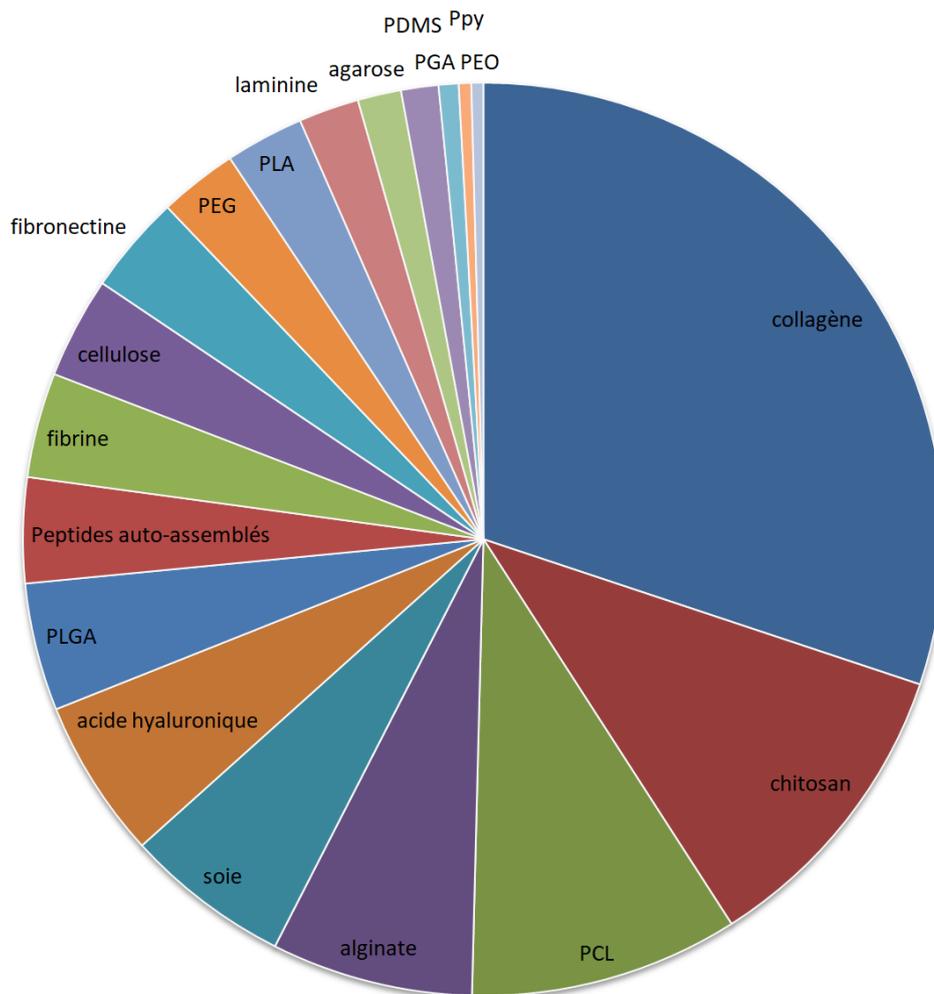


Figure 16 : Résultats des recherches sur les différents composants utilisés en culture cellulaire au cours de ces 5 dernières années avec comme mots clefs : « scaffold », « cell culture », « nom du composé » et en y retirant de la recherches les « reviews » sur le site Web of Science. Les modalités de recherche sont disponibles dans l'annexes 1.

Avec comme abréviation :

PEG : Poly Ethylène Glycol

PLA : Poly Lactic Acid

PGA : Poly Glycolic Acid

PLGA : Poly Lactic – Co – Glycolic Acid

PCL : Poly CaproLactone

Ppy : Polypyrrole

PDMS : PolyDiMethylSiloxane

b. Composition des supports

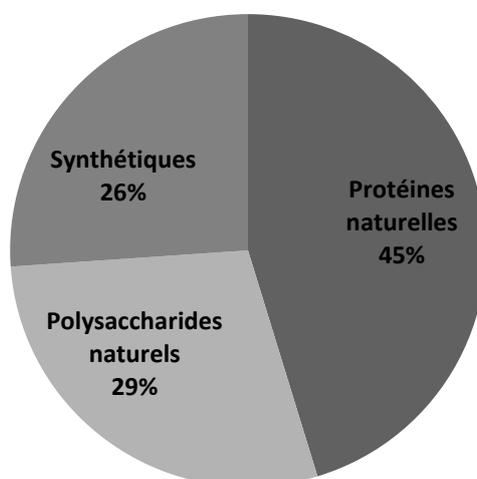


Figure 17 : Pourcentage d'utilisation des différents types de support en culture cellulaire

Ces différents composants principalement utilisés peuvent se classer en trois familles :

Les protéines naturelles	Les polysaccharides naturels	Les composés synthétiques
<ul style="list-style-type: none"> - Collagène - Fibrine - Fibronectine - Laminine - Soie 	<ul style="list-style-type: none"> - Acide Hyaluronique - Agarose - Alginate - Chitosane - Cellulose 	<ul style="list-style-type: none"> - Poly Ethylène Glycol - Acide polylactique - Acide polyglycolique - Acide polylactique-co-glycolique - PolycaproLactone - Polypyrrole - PolyDiMethylSiloxane - Peptides auto assemblés

Tableau 8 : Supports de culture cellulaire principalement utilisés et classés en trois familles

Certains des composés naturels ont l'avantage d'utiliser des molécules spécifiques de la matrice extra cellulaire. Toutefois, il existe une très grande variabilité parmi ces molécules en fonction de leur origine et en fonction des lots. De plus, ils peuvent être la cause de réactions immunitaires. Les composés synthétiques ont, eux, l'avantage de pouvoir être formés dans des conditions physiques et chimiques totalement contrôlables. Ils sont alors complètement personnalisables. Ils ont aussi l'avantage d'être plus inertes que leur homologues naturels mais restent toutefois biodégradables et laissent donc une place à l'évolution cellulaire.⁶⁹

c. Structures possibles des supports

Ces supports visant à obtenir une répartition en volume des cellules (et non seulement sur une surface de fond de puit de culture) peuvent se présenter sous différentes formes : il peut s'agir d'un support constitué d'un matériau plus ou moins rigide parsemé de pores. Ce matériau peut avoir une structure continue ou être un assemblage de billes, de fragments ou de fibres. La taille des structures (parties rigides et porosités) peuvent avoir des tailles allant de l'échelle micrométrique à millimétrique. La migration des cellules peut se faire grâce aux pores de la structure. Ces supports sont typiquement fabriqués par moulage, polymérisation en présence de porogènes, impression 3D ou pour les supports fibreux, par électrospinning. L'autre forme principale correspond aux hydrogels, qui sont constitués par un réseau enchevêtré ou réticulé de macromolécules souvent de taille nanométrique, gonflés par du milieu physiologique. Le taux de phase aqueuse peut être très élevé, typiquement jusqu'à 99%, ce qui correspond à un taux de matière sèche de 1%.

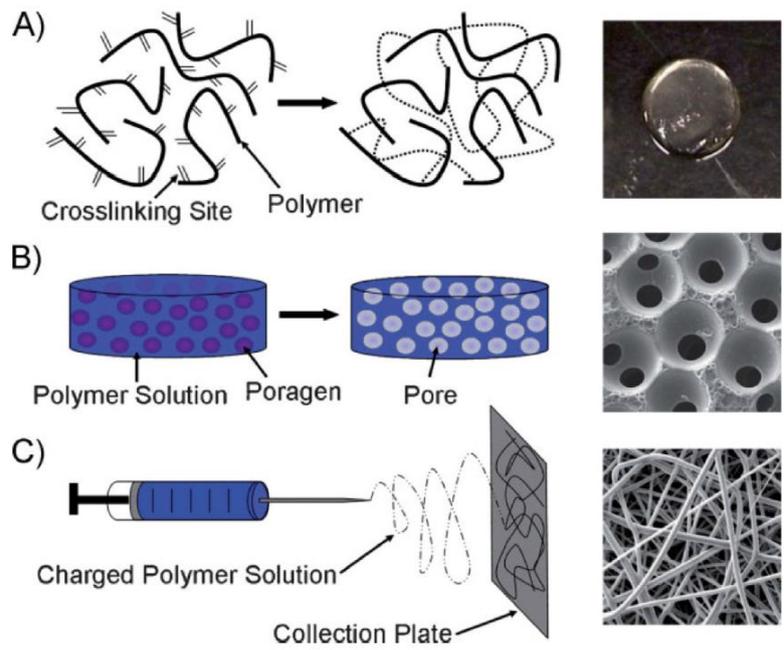
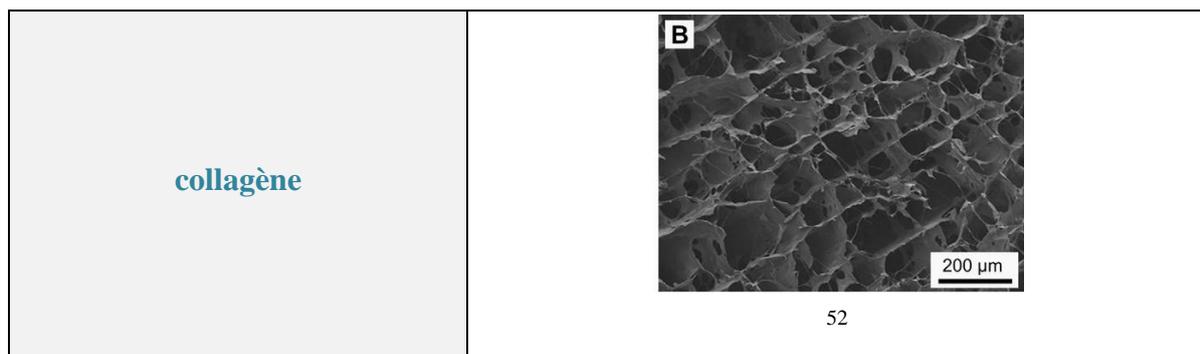
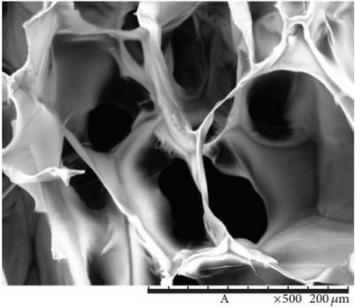
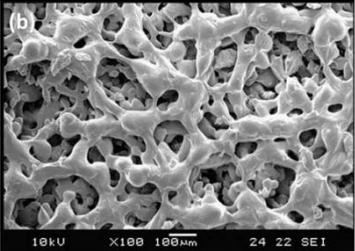
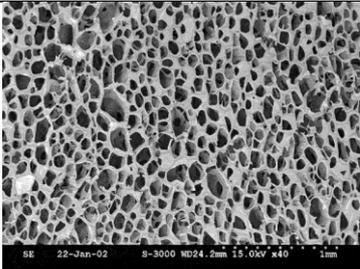
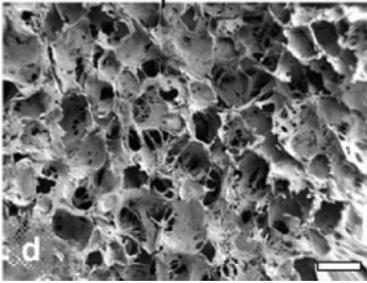
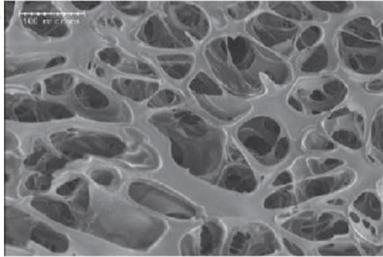
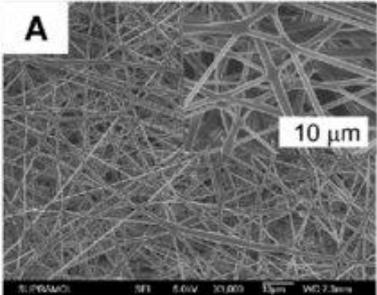
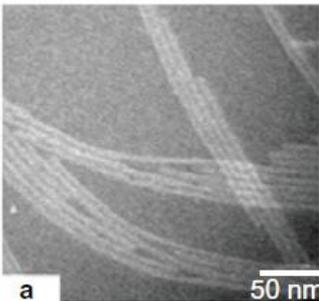
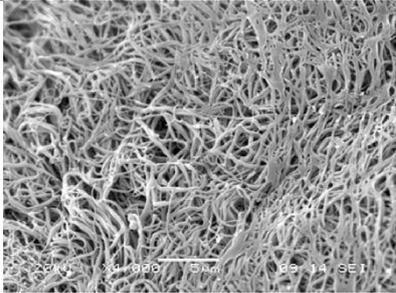
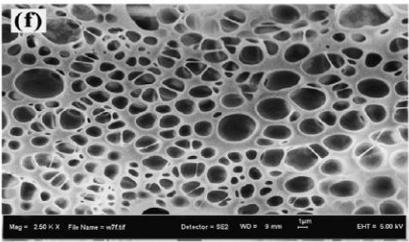
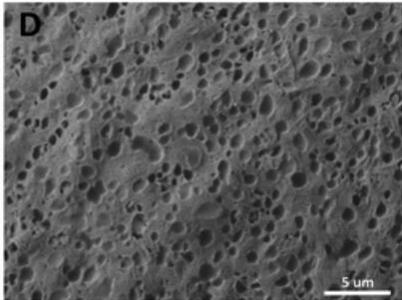


Figure 18 : Formes possibles des différents supports utilisées en culture cellulaire avec : A) les hydrogels contenus dans leur phase aqueuse, B) les supports solides et poreux et C) les fibres⁶⁹

On peut se poser la question de comparer la structure de ces supports à l'échelle microscopique, car c'est à cette échelle que la cellule entre en interaction avec le support. Ils vont présenter aussi de très grandes différences en termes de rigidité à l'échelle microscopique, celle qui est ressentie par les cellules. Les images de ces différents supports mettent en évidence cette diversité de structure (la porosité illustrée par ces images n'est pas totalement significative, car les techniques de microscopie électronique employées, en général la cryo-SEM, tendent à repousser les réseaux de "matière molle", réseaux de polymères sous forme d'alvéoles caractéristiques de cette technique. On peut évaluer néanmoins la différence de densité des structures, la morphologie et la dimension des fibres lorsqu'elle existent).



<p>chitosan</p>	 <p>100</p>
<p>PCL</p>	 <p>110</p>
<p>alginate</p>	 <p>54</p>
<p>soie</p>	 <p>Scale bar = 300 μm</p> <p>61</p>
<p>acide hyaluronique</p>	 <p>21</p>

<p>PLGA</p>	 <p>40</p>
<p>Peptides auto-assemblés</p>	 <p>57</p>
<p>fibrine</p>	 <p>56</p>
<p>cellulose</p>	 <p>96</p>
<p>PEG</p>	 <p>106</p>

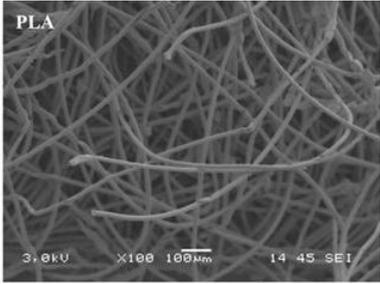
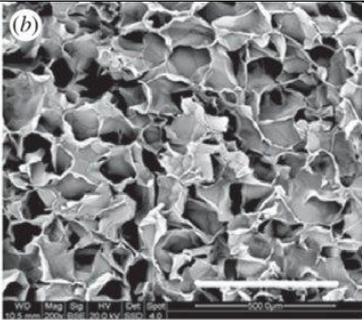
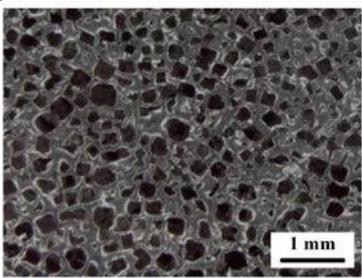
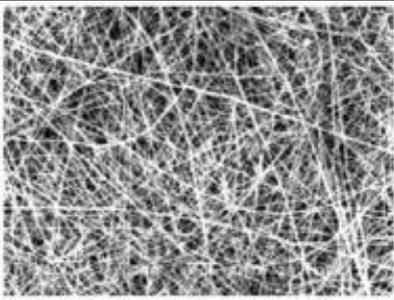
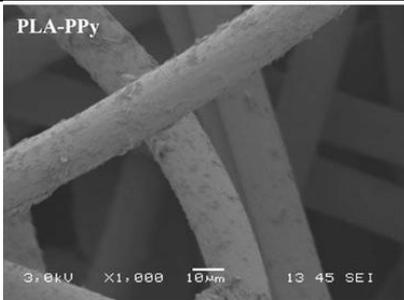
<p style="text-align: center;">PLA</p>	 <p style="text-align: center;">77</p>
<p style="text-align: center;">agarose</p>	 <p style="text-align: center;">11</p>
<p style="text-align: center;">PDMS</p>	 <p style="text-align: center;">51</p>
<p style="text-align: center;">PGA</p>	 <p style="text-align: center;">62</p>
<p style="text-align: center;">Ppy</p>	 <p style="text-align: center;">77</p>

Tableau 9 : Microscopie électronique à balayage, ou à transmission pour les peptides auto-assemblés, de différents supports utilisés en culture cellulaire^{11,21,40,51,52,54,56,57,61,62,77,96,100,106,110}

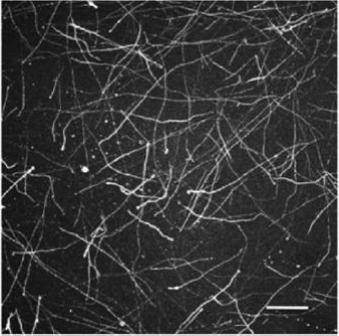
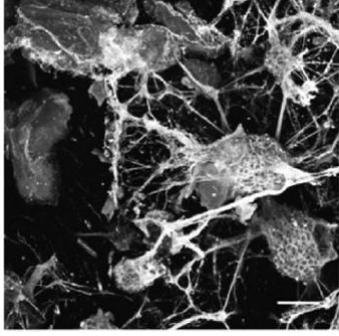
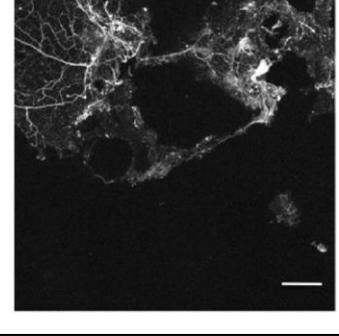
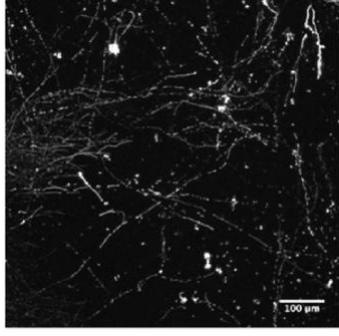
<p style="text-align: center;">Matrigel</p>	
<p style="text-align: center;">Puramatrix</p>	
<p style="text-align: center;">Hydromatrix</p>	
<p style="text-align: center;">Hystem C</p>	

Tableau 10 : Microscopie confocale de différentes matrices extra cellulaires commerciales⁹⁸

Echelle de taille : 100μm

Ces structures différentes possèdent des caractéristiques qui leur sont propres et peuvent alors être plus ou moins adaptées à la culture cellulaire.

Structure du support	Caractéristiques	Avantages	Inconvénients
Hydrogels (polymères)	<ul style="list-style-type: none"> - Support mous - Très hydratés 	<ul style="list-style-type: none"> - Peuvent souvent être injectés - Perméable aux de nutriments, facteurs, parfois aux cellules ... 	<ul style="list-style-type: none"> - Doivent rester hydratés - Si trop réticulés, peuvent nuire à la migration cellulaire
Solides poreux		<ul style="list-style-type: none"> - Peut être créé ans des conditions contrôlées et reproductibles (variation de la taille des pores - Peut être moulé - Inerte et avec une stabilité au long terme 	<ul style="list-style-type: none"> - Opaques donc difficile à suivre - Propriétés mécaniques peu similaire aux tissus vivants
Fibres	<ul style="list-style-type: none"> - Techniques de fabrications multiples et différentes (électrospinning, auto assemblage ...) 	<ul style="list-style-type: none"> - Peut mimer les fibres de collagène - Effet de guidage directionnel - Conditions de fabrication variables et contrôlables 	<ul style="list-style-type: none"> - Souvent du PLA, PLGA, PCL qui entraînent des réactions inflammatoires localisées - Fibres de rigidités variées avec des propriétés mécaniques peu similaires aux tissus vivants

Tableau 11 : Caractéristiques, avantages et inconvénients des trois structures des supports de culture cellulaire possibles

De plus en plus de recherches se portent sur l'association entre ces différents supports dans le but d'améliorer leurs caractéristiques physiques mais aussi les possibilités de culture cellulaires qu'ils offrent. Par exemple, certaines molécules comme la fibronectine ou la laminine, ne sont généralement pas utilisées seules mais plutôt en association avec d'autres dans le but d'améliorer la survie et la croissance cellulaires sur ces derniers. En effet, elles apportent à des supports peu propices à l'adhésion cellulaire des motifs qui favorisent cette adhésion

Enfin, les chercheurs travaillent sur différentes possibilités de modification des ces supports de manière à les former à notre guise comme de la pâte à modeler. Ces divers processus seront décrits par la suite.

2 - Les supports les plus utilisés pour la culture cellulaire des cellules nerveuses

a. Diversité des supports utilisés pour la culture cellulaire des cellules nerveuses

Ces mêmes supports sont utilisés en culture cellulaire de neurones, sans prendre en compte spécifiquement la différence importante décrite précédemment concernant la composition particulière du réseau péri neuronal dans la composition duquel n'entre ni le collagène, ni la fibronectine. Lorsque l'on regarde le nombre d'articles évoquant les cultures cellulaires de neurones sur le site Web of Science, on obtient le tableau suivant : (Les modalités de cette recherche seront présentées dans l'annexe 2)

Composant	Nombre d'articles
Collagène	135
Matrigel	40
Acide hyaluronique	37
Alginate	36
Chitosane	35
Laminine	31
Polycaprolactone	25
Soie	23
Acide polylactique	17
Peptide auto-assemblés	16
Polyéthylène	15
Acide polylactique-co-glycolique	13
Agarose	12
Cellulose	11
Fibrine	10
Fibronectine	8
Puramatrix	5
Polydiméthylsiloxane	3
Polypyrrole	2
Acide polyglycolique	1
Total	475

Tableau 12 : Nombre d'articles traitant de culture cellulaire de neurones

En violet les composés synthétiques, en orange les protéines naturelles, en brun les polysaccharides naturels et en noir les matrices extra cellulaires commerciales

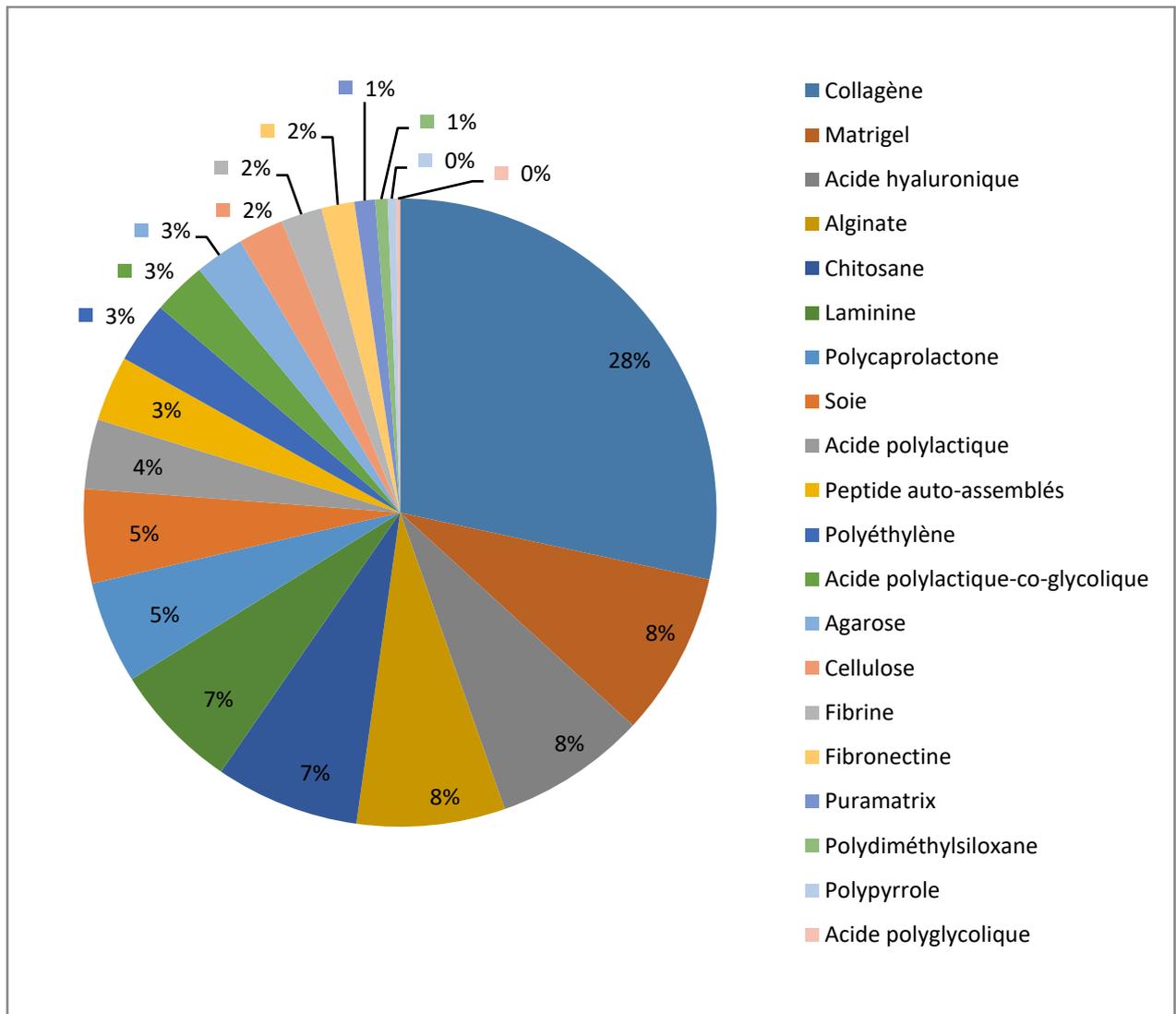


Figure 19 : Répartition en pourcentage des supports utilisés dans les articles traitant de culture cellulaire de neurones

On remarque que la grande majorité des cultures cellulaires de neurones sont réalisées avec des gels de collagène. On trouve ensuite un grand nombre de composants naturels comme l'acide hyaluronique, l'alginate ou encore le chitosane. La laminine et la fibronectine ne sont pas utilisées pour former des gels « purs ». En effet, leur utilisation a pour but d'améliorer la culture cellulaire parfois difficile sur certains composés comme les composés synthétiques. Enfin, l'utilisation de matrices extra cellulaire comme le Matrigel se justifie par le fait que cette matrice est une des rares matrices permettant la croissance véritablement en 3D des cellules (elle est permissive aux cellules) et que sa composition très riche en facteurs de croissance stimule les cellules (il est probable que le nombre de publications soit sous-estimé dans le cas du Matrigel car il entre dans les pratiques classiques de culture 3D et peut ne pas

avoir été mentionné spécifiquement dans le titre). Ces supports ne sont alors utilisés qu'en comparaison avec un support testé ou lorsque le support même n'est pas le sujet de l'expérience.

b. Critère de choix de ces différents supports

Nom	Critères de choix	Inconvénients
Protéines naturelles		
Collagène ²⁴	<ul style="list-style-type: none"> • Hydrogels • Issu de nombreuses sources • Peu immunogène • Poreux • Perméable • Biocompatible • Biodégradable • Peu cher • Version recombinante • Approuvé FDA ou EU 	
Fibrine ⁹⁹	<ul style="list-style-type: none"> • Propriétés structurales (élasticité et rigidité), chimiques et biologiques modifiables, degré de polymérisation • Propriétés de dégradation modifiables 	<ul style="list-style-type: none"> • Rigide • Peu poreux • Peu perméable aux cellules
Fibronectine ¹⁰²	<ul style="list-style-type: none"> • Améliore la signalisation intercellulaire • Permet une meilleure distribution des cellules • Permet une meilleure adhésion cellulaire • Améliore la survie cellulaire sur le 	<ul style="list-style-type: none"> • Cher • Jamais en utilisation seule

	<p>long terme</p> <ul style="list-style-type: none"> • Chargée positivement et permet donc l'adhésion cellulaire 	
Laminine ¹⁰²	<ul style="list-style-type: none"> • Améliore la signalisation intercellulaire • Permet une meilleure distribution des cellules • Permet une meilleure adhésion cellulaire • Améliore la survie cellulaire sur le long terme 	<ul style="list-style-type: none"> • Jamais en utilisation seule • Impossible en gel, seulement utilisée pour du « coating »
Soie ⁵³	<ul style="list-style-type: none"> • Grande surface d'adhésion cellulaire • Supporte l'adhésion cellulaire, la différenciation et la signalisation intercellulaire • Peut être combiné à d'autres matériaux • Peut être cher 	<ul style="list-style-type: none"> • Potentiellement immunogène
Polysaccharides naturels		
Acide hyaluronique ²¹	<ul style="list-style-type: none"> • Formation d'hydrogels par réticulation chimique • Degré de crosslinking variable (dégradabilité) • Biorésorbable • Réduction de la formation d'une cicatrice • Approuvé FDA et EU de longue date 	<ul style="list-style-type: none"> • Faible adhésion cellulaire • Difficulté de réticulation non toxique et efficace
Agarose	<ul style="list-style-type: none"> • Hydrogels • Biocompatible • Peu coûteux à produire 	<ul style="list-style-type: none"> • Faible adhésion cellulaire • Préparation à chaud

	<ul style="list-style-type: none"> • Obtenu facilement 	
Alginate ³¹	<ul style="list-style-type: none"> • Hydrogels • Propriétés mécaniques modifiables (calcium) • Facile à créer et à automatiser • Peu dégradabile in vivo • Propriétés structurales modifiables (microfluides, tubes, billes ...) (mises en forme variées) 	<ul style="list-style-type: none"> • Faible adhésion cellulaire • Non dégradabile par les cellules animales
Chitosane ⁸⁴	<ul style="list-style-type: none"> • Poreux • Biodégradable • Biocompatible, cytocompatible • Non toxique • Non immunogène • Très abondant (le plus abondant polysaccharide sur Terre) • Nombreuses charges positives 	<ul style="list-style-type: none"> • Peu dégradabile par les cellules animales • Nombreuses charges positives
Cellulose ^{26,38}	<ul style="list-style-type: none"> • Propriétés physiques, mécaniques et chimiques modifiables • Facilement trouvable • Peu couteux • Biocompatible • Très abondant • Peu immunogène 	<ul style="list-style-type: none"> • Difficile à mettre en forme • Peu soluble • Mauvaise adhésion cellulaire • Peu dégradabile par les cellules animales
Synthétiques		
Poly éthylène Glycol Diacrylate	<ul style="list-style-type: none"> • Hydrogels par réticulation chimique et photochimique • Caractère furtif vis-à-vis des cellules • Réduit la réponse inflammatoire • Favorise l'angiogenèse • Capacité de rétentions de molécules 	<ul style="list-style-type: none"> • Rigide • Non dégradabile • Peu fonctionnalisable

	<p>pour une diffusion plus longue</p> <ul style="list-style-type: none"> • Biocompatible 	
Acide poly lactique ⁸³	<ul style="list-style-type: none"> • Peu couteux • Propriétés modifiables • Filage par electrospining • Approuvé FDA et EU de longue date 	<ul style="list-style-type: none"> • Inflammation possible lié au relargage d'acide lactique • Fibres rigides
Acide poly glycolique ⁴⁶	<ul style="list-style-type: none"> • Propriétés modifiables • Approuvé FDA et EU de longue date 	<ul style="list-style-type: none"> • Fibres rigides
Poly caprolactone ²⁸	<ul style="list-style-type: none"> • Biocompatible • Biodégradable • Peu couteux • Propriétés modifiables • Obtention facile • Filage par electrospining 	<ul style="list-style-type: none"> • Fibres rigides
Poly pyrrole ³⁷	<ul style="list-style-type: none"> • Capacité de conductivité 	<ul style="list-style-type: none"> • Utilisé en « coating »
Poly diméthyl siloxane ⁷⁰	<ul style="list-style-type: none"> • Rigidité modifiable avec le degré en PDMS • Flexible, mou • Pas hydrolysable • Approuvé FDA et EU de longue date 	<ul style="list-style-type: none"> • Peu utilisé seul • Hydrophobe et hydrophilie difficile à obtenir • Non dégradable • Non poreux et non perméables aux cellules (sauf si architecture 3D)
Peptide auto-assemblés ⁸¹	<ul style="list-style-type: none"> • Hydrogels à faible concentration • Peuvent se lier à d'autres molécules (facteurs de croissance) • Interactions possibles avec les cellules • Peut être monté en structure 3D 	<ul style="list-style-type: none"> • Cher • Pas synthétisables sans expertise en synthèse peptidique automatisée • Rapidement dégradés

	<ul style="list-style-type: none"> • Très mous • Biodégradable • Non toxique • Alignement des fibres nanométriques possibles dans certains cas • Commercialisés 	par les cellules
--	--	------------------

Tableau 13 : Critères de choix dans l'utilisation des différents composés comme support de cultures cellulaires neuronales

On constate, pour tous les composés d'origine naturelle, que le principal inconvénient est le manque de reproductibilité des lots. En effet, leurs propriétés dépendent de la source du lot, de son traitement ...

Cependant, on remarque que les principaux critères de choix dans l'utilisation de ces composés sont leur disponibilité et leur coût de fabrication. Les autres critères possibles et non négligeables dans le choix des ces composés sont ensuite la biodégradabilité, la non toxicité et le caractère non immunogène du composé et de ses produits de décomposition ainsi que les capacités de maîtrise de son processus de fabrication comme la modification de ses propriétés, la capacité de fabrication à grande échelle ...

3 - Modifications possibles

a. Electrospinning et Wet spinning

L'« electrospinning » consiste à utiliser des forces électrostatiques afin de générer des fibres de polymères⁹⁵.

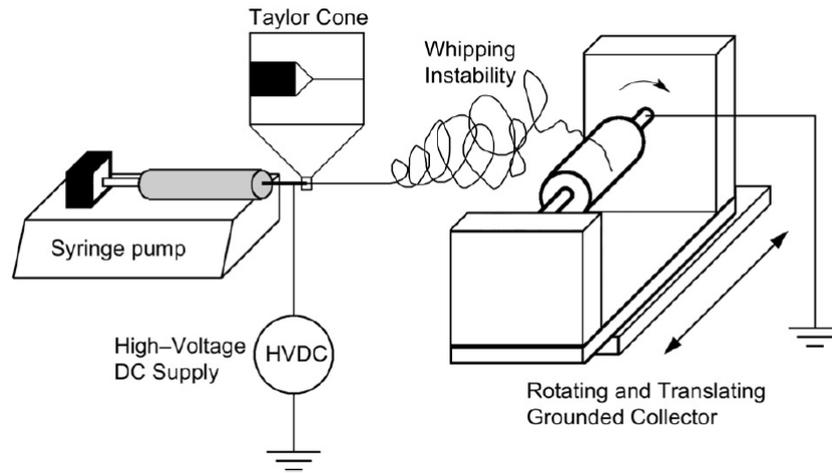


Figure 20 : Schéma d'un montage permettant l'« electrospinning »⁹⁵

Dans ce procédé, un composé est mis en suspension dans un solvant très volatile. Le jet de liquide est alors chargé lors de la sortie de l'aiguille tandis que la borne de réception est reliée à une masse. Ainsi, le liquide est comme « attiré » vers le socle de réception grâce aux forces électrostatiques. De la même manière, lorsque ce liquide est chargé, des forces répulsives entre des molécules de même charge et attractives si les charges sont opposées ont lieu. Ceci permet une lutte contre la tension de surface à la base de la goutte en formation et donc l'obtention d'un cône de Taylor. Il est important de noter qu'une évaporation du solvant a alors lieu lors de la sortie de cette goutte au niveau de l'aiguille. Enfin, si les charges sont suffisantes, la cohésion entre les molécules de composé permet la formation d'un filament continu.

Ce procédé permet de former des fibres de composés et de les organiser en filet. Le but étant de contrôler la formation de biomatériaux compatibles.

Ci-dessous, il est possible d'observer des fibres d'acide polylactique obtenues par « electrospinning ».

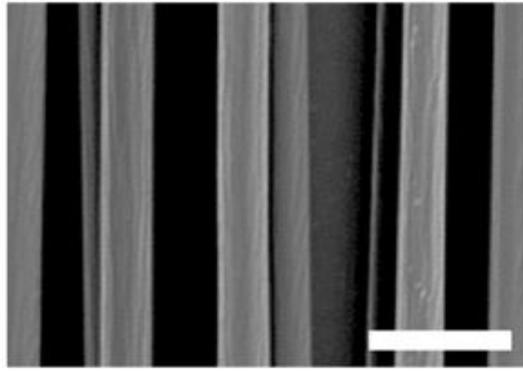


Figure 21 : Microscopie électronique à balayage de fibres d'acide poly lactique obtenues par « electrospinning »⁴¹

Echelle de taille : 5 μm

Un procédé similaire nommé le « wet spinning » est aussi utilisé en ingénierie tissulaire. Il consiste en la formation de fibres mais cette fois-ci dans l'eau. Ce procédé sera expliqué plus tard lors de son utilisation pour la molécule gélifiante N-heptyl-D-galactonamide (Gal-C7).

b. Amélioration des supports de culture cellulaire par l'ajout de molécules

(i) Coating

Les composés synthétiques présentent de grands avantages comme une fabrication contrôlée, reproductible, facile et peu chère. Toutefois, ils sont souvent peu favorables à la croissance cellulaire par rapport aux composés naturels, car les cellules y adhèrent peu. C'est également le cas de certains polymères naturels tels que les polysaccharides non chargés. L'une des premières modifications de ces composés consiste alors à utiliser le « coating », c'est-à-dire un revêtement formé à partir d'un composé qui favorise l'adhésion cellulaire.

Dans cet exemple, des fibres d'acide poly glycolique ont été « coatées » avec de la polylysine. On peut notamment constater que les cellules adhèrent peu à ces fibres (figure 22, gauche). En effet, celles-ci peuvent être neutres ou chargées négativement ce qui, par effet répulsif empêche une bonne adhésion des cellules dont la membrane est chargée négativement. Toutefois, l'ajout de polylysine permet une meilleure « accroche » des cellules car cette molécule est chargée positivement (figure 22, centre). Lorsque l'on réalise un « coating » des fibres avec de la laminine, on constate que l'adhésion cellulaire a lieu (figure 22, droite). En

effet, cette molécule, comme la fibronectine, contient la séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD) reconnue par les intégrines des membranes cellulaires, qui initie le phénomène d'adhésion cellulaire.

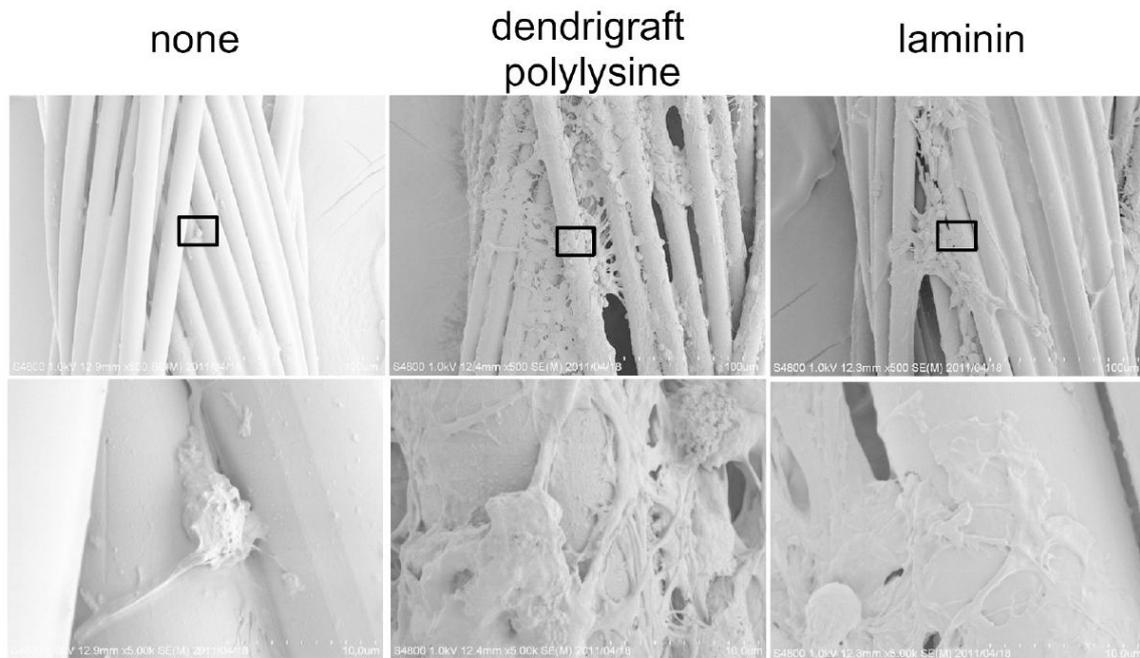


Figure 22 : Microscopie électronique à balayage de fibres d'acide polyglycolique seules, « coatées » à l'aide de polylysine ou de laminine⁴⁷

Le poly pyrrole ayant des capacités de conducteur, des études se penchent sur son utilisation en « coating »⁹⁷. En utilisant des fibres de caprolactone formées par « electrospinning » et « coatées » avec du polypyrrole, on remarque que les performances en terme de croissance cellulaire de neurones sont similaires à une autogreffe du fait de cette conductivité.

(ii) Support contenant des molécules d'adhésion cellulaire

Enfin, pour améliorer l'adhésion, la survie et la différenciation cellulaire sur ces différents supports, l'utilisation de molécules naturelles permettant l'adhésion cellulaire est aussi possible. Ces molécules présentes dans la matrice extra cellulaire animale sont la laminine et la fibronectine.

La figure ci-dessous est une microscopie confocale d'un support de culture cellulaire à base de collagène (figure 23, gauche) auquel on a ajouté soit de la fibronectine (figure 23, centre)

soit de la laminine (figure 23, droite). On constate toutefois que la densité entre les fibres n'est pas modifiée par l'ajout de ces molécules.

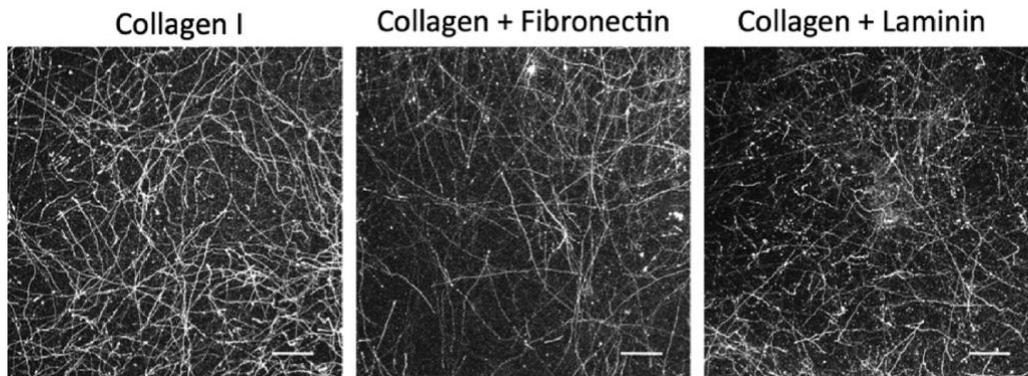


Figure 23 : Microscopie confocale de supports utilisés en culture cellulaire⁹⁸

Echelle de taille 100 μ

Dans l'exemple qui suit, la croissance cellulaire de cellules souches neurales humaines sur trois supports différents ont été comparés. Le premier contient seulement de la fibrine formée à partir de 5mg/ml de fibrinogène et 2 U/ml de thrombine. Le second contient de la fibrine formée à partir de 5mg/ml de fibrinogène et 2 U/ml de thrombine et de l'acide hyaluronique à 1 mg/ml. Le dernier contient de la fibrine formée à partir de 5mg/ml de fibrinogène et 2 U/ml de thrombine, de l'acide hyaluronique à 1 mg/ml mais aussi de la laminine à la dose de 100 μ g/ml.

Cette fois-ci, on constate que la prolifération cellulaire, immunomarkuée par la recherche de la molécule Ki67, n'est pas significativement différente pour ces trois supports.

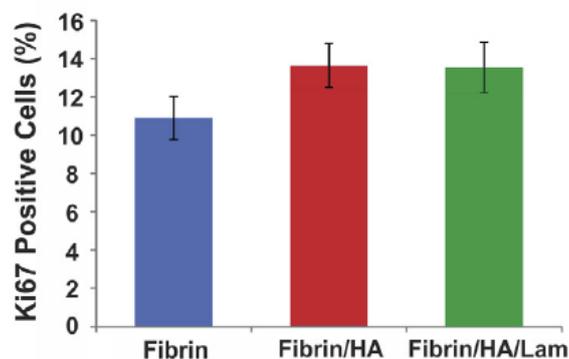


Figure 24 : Prolifération cellulaire après culture de cellules souches neurales humaines, immunomarkuée par la recherche de la molécule Ki67⁷

Toutefois, lorsque l'on compare cette fois-ci la différenciation des cellules souches neurales humaines en neurones et en astrocytes et non pas seulement la prolifération, on remarque que la différenciation en neurones est beaucoup plus importante sur le support contenant de la laminine (Figure 25).

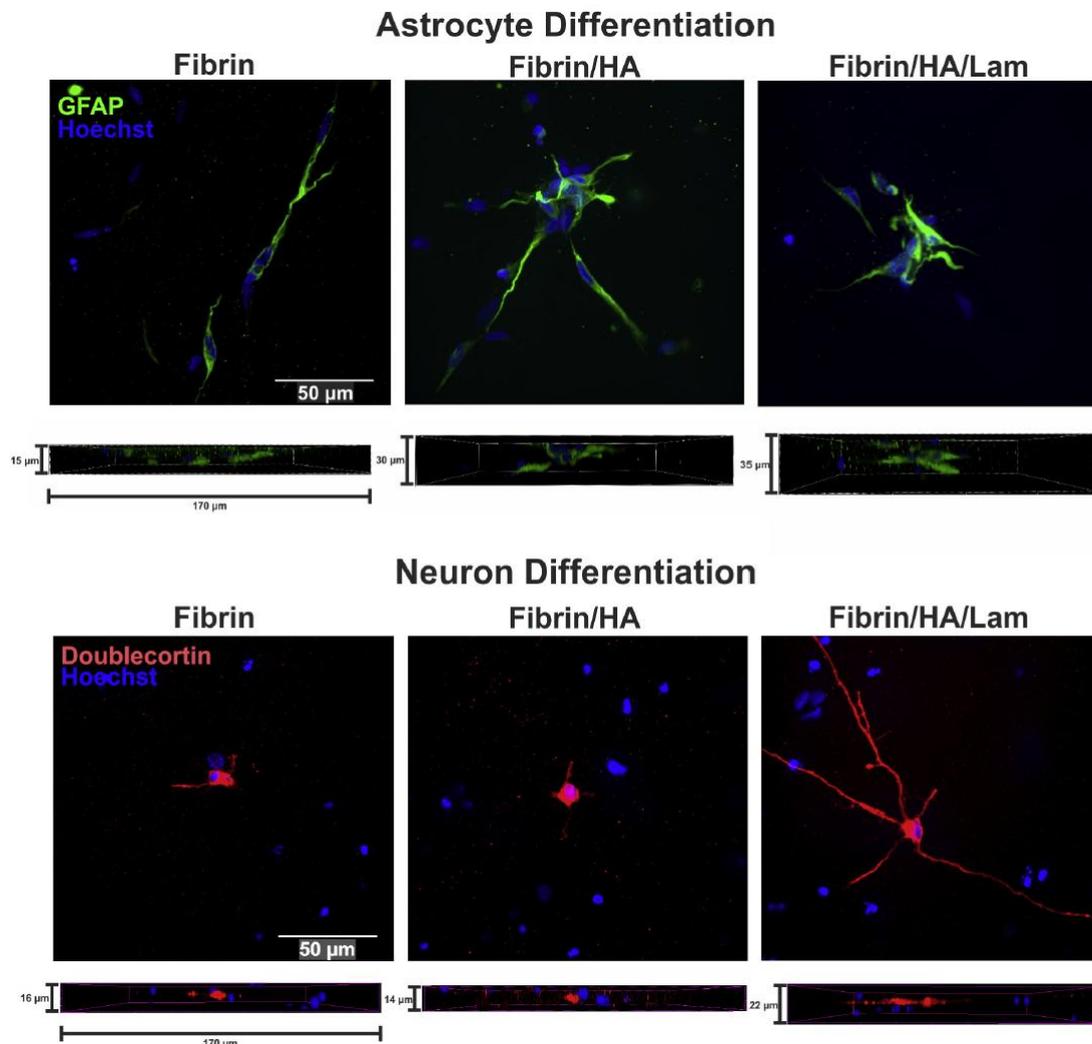


Figure 25 : Différenciation des cellules souches humaines en neurones et en astrocytes après culture de celles-ci sur différents supports⁷

Avec GFAP (glial fibrillary acidic protein), un marqueur des astrocytes,

Doublecortin, un marqueur des neurones

Et **Hoechst**, un marqueur de l'ADN cellulaire

(iii) Support contenant des facteurs de croissance

Certaines études se penchent, elles, sur l'utilisation de facteurs de croissance neuronaux afin d'améliorer la croissance cellulaire. Dans cet exemple, un gel de collagène est complété avec divers facteurs de croissance du NGF (nerve growth factor) à la dose de 10ng/ml ou du BDNF (brain-derived neurotrophic factor) à la dose de 200 ng/ml. Des neurones ont été cultivés sur ces différents gels et c'est la croissance des neurites qui est alors étudiée.

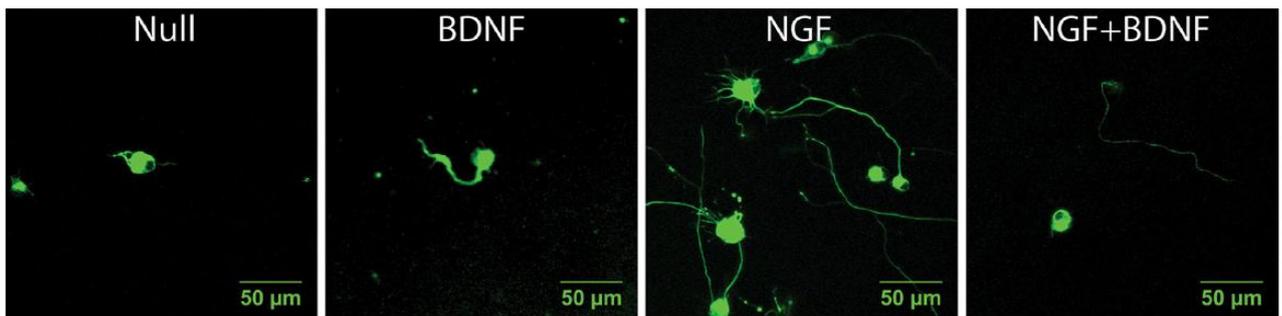


Figure 26 : Croissance des neurites après 24h de culture de neurones sur les gels étudiés observée en microscopie confocale³

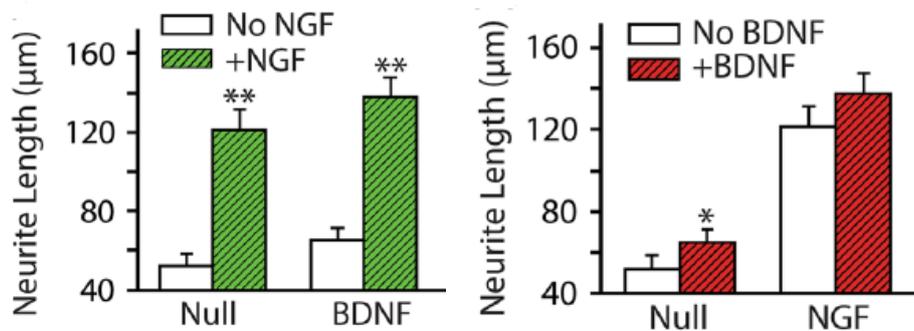


Figure 27 : Longueur des neurites en μm en fonction du facteur de croissance utilisé³

On constate que la longueur des neurites obtenue est significativement différente en présence du facteur de croissance NGF qu'en présence ou en l'absence du facteur de croissance BDNF. Toutefois, comme observé sur les images microscopiques précédentes, l'ajout de BDNF permet une longueur des neurite significativement plus importante que lorsqu'elle est comparée à une situation où aucun facteur de croissance n'est utilisé. En effet, En présence de NGF, le BDNF semble ne pas avoir d'effets.

c. Rainures

Toujours dans le but d'améliorer l'adhésion cellulaire et donc la biocompatibilité des composés synthétiques, certains scientifiques se sont penchés sur l'augmentation de la rugosité de la surface des supports. En effet, il est possible d'améliorer ainsi l'adhésion mécanique des cellules sur ces supports.

Lorsque l'on réalise une culture cellulaire à partir de cellules souches neurales de souris sur des surfaces lisses ou rainurées, on constate une prolifération cellulaire plus importante sur les surfaces rainurées que sur les surfaces lisses. Cette prolifération peut être mise en évidence par immunohistochimie : un premier marqueur Tuj-1 indique les neurones en rouge tandis qu'un second marqueur, DAPI marque le noyau cellulaire en bleu, signe d'une viabilité cellulaire.

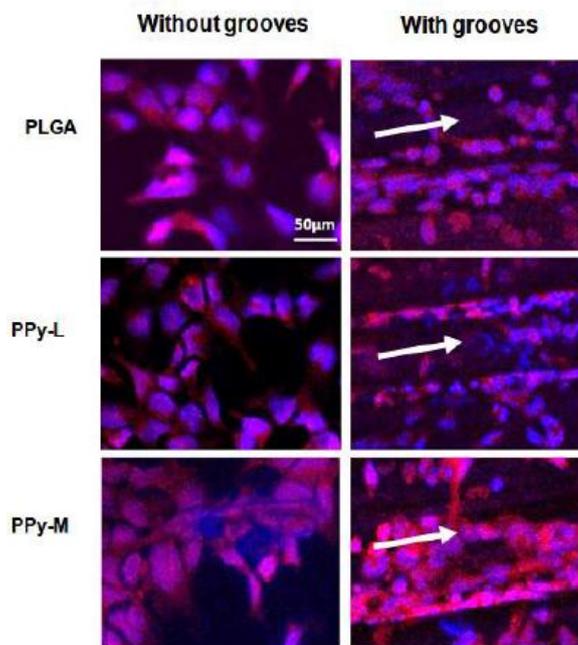


Figure 28 : Immunohistochimie réalisée sur les cellules présentant la molécule Tuj-1 en rouge et DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) en bleu⁷⁶

Les supports de culture utilisés sont les suivants :

PLGA = Acide Poly Lactique-co-Glycolique

PPy-L : PLGA avec un « coating » de poly pyrrole de 104.3 ± 62.5 nm d'épaisseur

PPy-M : PLGA avec un « coating » de poly pyrrole de 195.0 ± 57.1 nm d'épaisseur

Lorsque l'on regarde le pourcentage de cellules différenciées en neurones après culture, on remarque aussi que celui-ci est significativement plus important lorsque les supports sont

rainurés. Ainsi, améliorer la rugosité à la surface de ces supports permet d'améliorer l'adhésion mécanique et l'évolution cellulaire favorable.

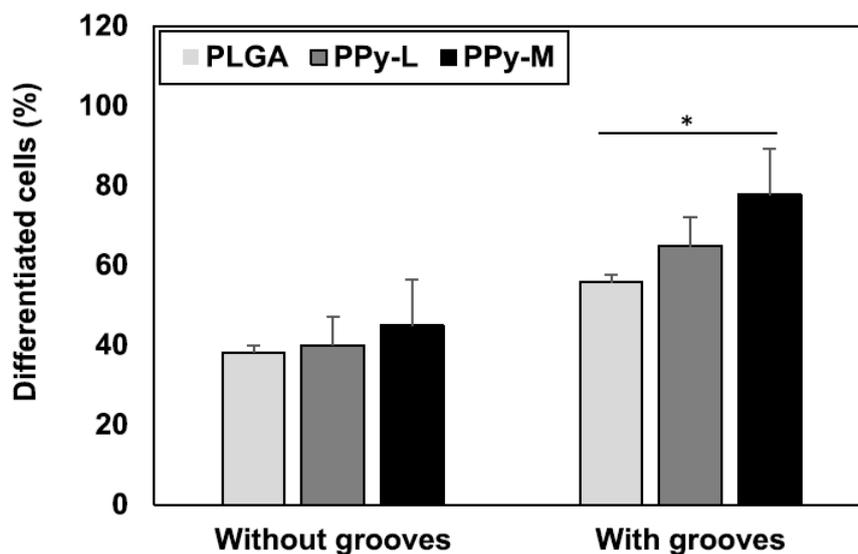


Figure 29 : Pourcentage des cellules différenciées évalué suite à l'immunohistochimie de Tuj-1 et DAPI⁷⁶

Les supports de culture utilisés sont les suivants :

PLGA = Acide Poly Lactique-co-Glycolique

Ppy-L : PLGA avec un « coating » de poly pyrrole de 104.3 ± 62.5 nm d'épaisseur

Ppy-M : PLGA avec un « coating » de poly pyrrole de 195.0 ± 57.1 nm d'épaisseur

Dans une étude similaire, il a été remarqué que la multiplication cellulaire était similaire quelque soit les dimensions des rainures. Toutefois, c'est le taux de différenciation cellulaire qui est significativement différent. La surface et les rainures ont été précisément modulées, en ce qui concerne l'écartement entre les rainures (largeur des « grooves ») et la surface des terrasses.

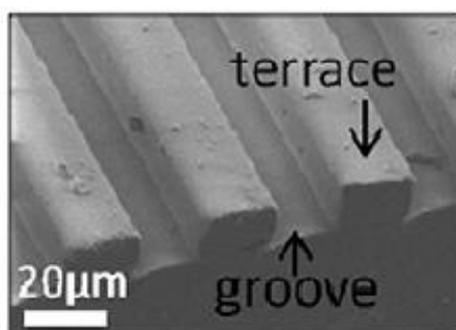


Figure 30 : Support de PDMS utilisé durant cette étude observé au microscope électronique à balayage⁸

Ainsi, cinq supports sont créés :

Largeur des rainures en μm	Largeur des pics en μm	Schéma du support
5	5	5 μm -5 μm 
10	10	10 μm -10 μm 
20	20	20 μm -20 μm 
60	10	10 μm -60 μm 
Control : support plat		Ctrl 

Tableau 14 : Description des différentes surfaces utilisées pour la culture cellulaire

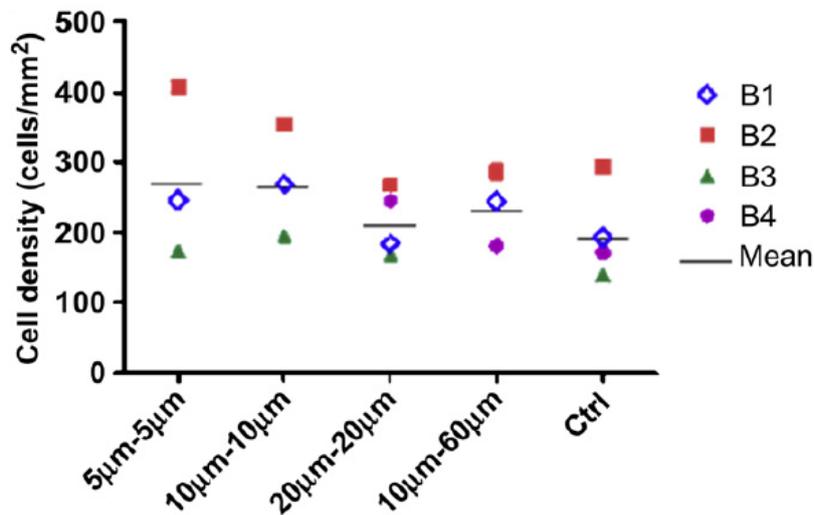


Figure 31 : Densité cellulaire après 7 jours de culture de cellules souches neuronales humaines. Tests réalisés en quadriplate (B1, B2, B3, B4) avec 75 000 cellules/cm² ⁸

Afin d'étudier la différenciation cellulaire, un immunomarquage a été réalisé vérifiant les cellules exprimant Tuj-1, un marqueur neuronal.

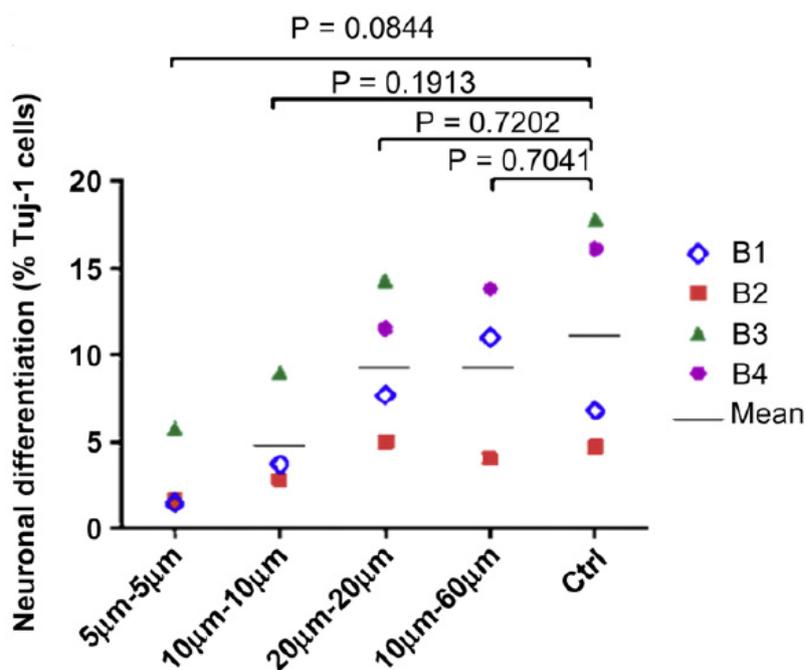


Figure 32 : Différenciation neuronale immunomarquée après 7 jours de culture de cellules souches neurales humaines. Tests réalisés en quadriplate (B1, B2, B3, B4) avec 75 000 cellules/cm² ⁸

On constate que la différence entre les rainures n'influe pas sur la densité cellulaire. Toutefois, le ratio de cellules différenciées pour le support 5µm-5µm est de 3%, tandis qu'il est respectivement de 5,2%, 10% et 10% pour les supports 10µm-10µm, 20µm-20µm et 10µm-60µm. Ce ratio est de 11,4% pour le support lisse. Ainsi, la présence de rainures ainsi que l'écartement entre celles-ci semble être corrélé à une diminution de la différenciation des cellules souches neurales en neurones.

La forme des neurones différenciés et donc le nombre de neurites, c'est-à-dire le prolongement des corps cellulaires des neurones est évalué.

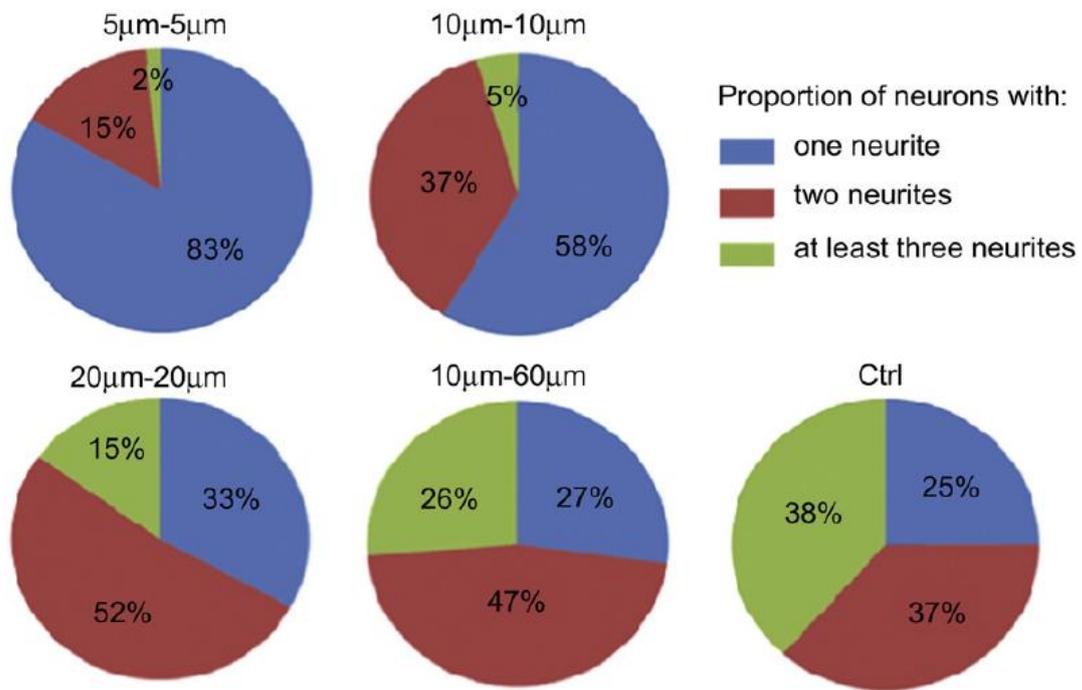


Figure 33 : Nombre de neurites présentés par les neurones différenciés lors de la culture cellulaire sur les différents supports étudiés⁸

Enfin, une forme moyenne de ces différents neurones différenciés a aussi pu être définie en fonction du support utilisé.

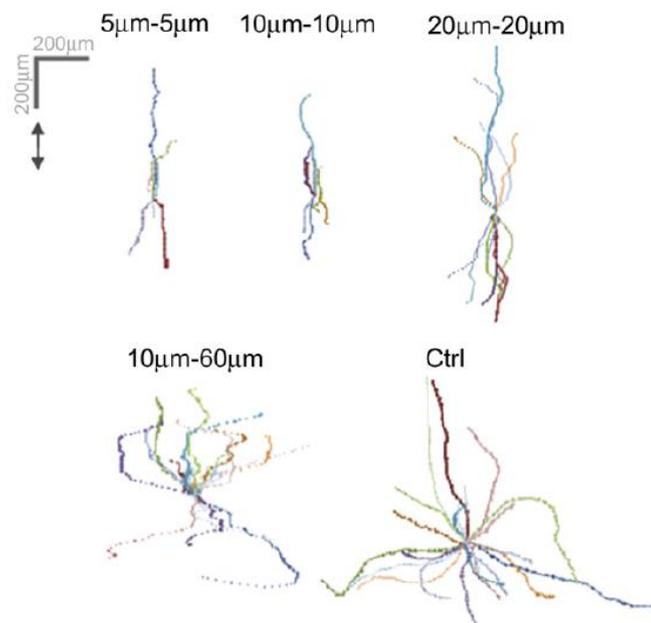


Figure 34 : Visualisation polaire des neurones différenciés en fonction du support étudié⁸

V - Les hydrogels auto-assemblés de N-alkyl-D-galactonamides

Parmi l'ensemble des supports actuellement employés et décrits ci-dessus pour réaliser des cultures in vitro en 3D de neurones, aucune rassemble les propriétés optimales, qui pourraient être qualifiées de la façon suivante: biocompatible, permissif aux cellules en 3D, de composition et de structure bien contrôlée (notamment synthétique pour cette raison), qui favorise la différenciation en neurones (notamment, de faible rigidité), injectable, et si nécessaire, capable de guider la croissance des neurones dans une direction privilégiée, à l'instar de l'organisation des neurones dans le cerveau ou dans la moelle épinière. D'autres propriétés pourraient venir rallonger cette description du support idéal, notamment, qu'il favorise l'adhésion cellulaire, qu'il soit déformable, dégradable avec un temps de dégradation adapté à la vitesse de croissance cellulaire... La permissivité aux cellules est notamment un des points clés pour obtenir de réelles organisations dans l'espace des cellules, au lieu qu'elles restent à la surface des matériaux. Même sur des hydrogels très mous, la plupart du temps, les cellules ne colonisent pas l'intérieur de l'hydrogel et restent en surface, où proche du lieu où elles ont étéensemencées. La notion de permissivité est donc importante, et en dehors de quelques hydrogels, dont le Matrigel et quelques études à base de collagène, cette colonisation en 3D n'est pas du tout acquise. Pour cette raison, et pour des raisons de contrôle de la composition du support, des chercheurs de laboratoires toulousains, chimistes et biologistes, ont cherché à développer des gels supramoléculaires saccharidiques entièrement synthétiques. Les gels spramoléculaires, dont les spécificités sont décrites plus en détail ci-dessous, devraient offrir au moins trois avantages: la reproductibilité grâce à la pureté de la molécule, un support mécanique très mou favorable à la différenciation en neurones, et la permissivité aux cellules grâce à la grande porosité et l'extrême flexibilité de la structure des gels.

Les premiers hydrogels supramoléculaires identifiés comme pouvant être de bons supports pour la culture de neurones sont des dérivés très simple de la galactonamide, à savoir des N-hexyl, N-heptyl et N-octyl-D-galactonamides (respectivement GalC6, GalC7, GalC8). La facilité d'obtention de cette molécule et le rendement intéressant de sa synthèse offrent la possibilité de sa création à grande échelle. Ces petites molécules s'auto-assemblent dans l'eau en un réseau de fibres capable de composer un hydrogel. Les propriétés de ces dernières ont été étudiées en détail dans le cadre de leur utilisation comme support de culture pour les neurones et sont précisées ci-après. Le composé a principalement été établi et étudié par Anaïs CHALARD, Juliette FITREMANN, Morgane MAUDUIT et Laurence VAYSSE. Il a

été montré qu'il est également possible d'imprimer en 3D des structures à base de ces hydrogels. Cependant, il s'agit d'une première étude, et beaucoup d'aspects restent à développer, tels que l'amélioration des propriétés d'adhésion cellulaire, la modulation à façon de la rigidité des supports, la modulation de la durée de vie du support, la mise au point de bioencres... Ces différents points font l'objet de la partie expérimentale de cette thèse et seront rediscutés plus loin.

1 - Structure du composé

a. Conditions de formation du composé et importance d'obtenir un refroidissement lent

La N-heptyl-D-galactomanide (Gal-C7) est une alkylgalactonamide résultant de la réaction entre la gamma lactone de l'acide D-galactonique et de la n-heptylamine.



Figure 35 : Réaction de synthèse du Gal-C7¹⁸

Cette synthèse est réalisée avec un rendement de 81% dans du méthanol. Après refroidissement, le composé est alors filtré et purifié par recristallisation dans de l'éthanol.

Ensuite, le gel est formé par dissolution à chaud de la molécule dans l'eau et auto assemblage en fibres lors du refroidissement. Ce qui emprisonne de l'eau et forme l'hydrogel. Plus le refroidissement est lent, plus les fibres sont longues et le gel est cohésif, ce qui permet son utilisation en culture cellulaire.

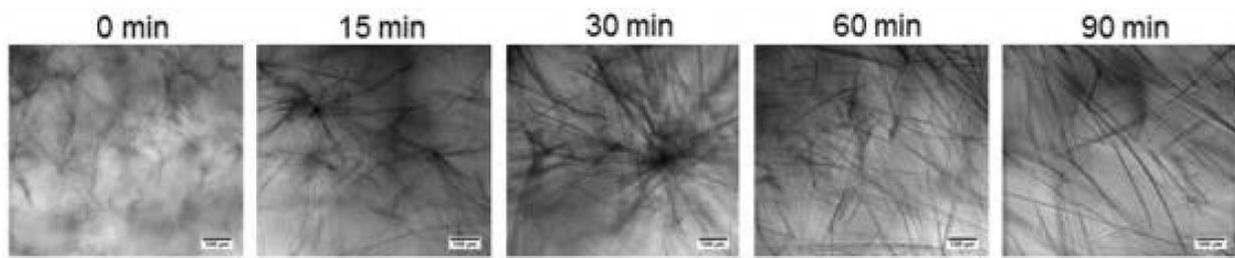


Figure 36 : Microscopie optique du gel formé à partir du Gal-C7¹⁸

b. Le Gal-C7, un composé sélectionné

Il est important de comprendre pourquoi le Gal-C7 a été retenu par rapport à ses homologues plus longs ou plus courts. En culture cellulaire, les trois composés permettent une très bonne survie des cellules, mais quantitativement, c'est sur le Gal C7 puis sur le Gal C8 qu'on observe la plus grande quantité de cellules. Le Gal C6 est moins bon. Il est important de noter que plus une amine est courte, plus celle-ci est toxique pour les cellules. D'autre part, la longueur des fibres formées pour le Gal C7 est nettement supérieure par rapport aux deux autres composés et ceci est une hypothèse pour expliquer la différence de multiplication cellulaire, moins marquée néanmoins, entre Gal C7 et Gal C8.

2 - Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques des gels formés à partir des Gal-C6, C7 et C8 ont ensuite été mesurées par rhéologie dynamique, les modules de stockage (G') et de perte (G'') ont alors été mesurés et des mesures de contrainte mécaniques uni-axiale et sans confinement ont permis d'obtenir les modules d'Young initiaux. Ces mesures révèlent que la rigidité des gels de Gal C7 est dans la gamme des 7 kPa, ce qui correspond à un gel très mou et se rapproche de la rigidité du cerveau, qui est comprise entre 0,1 et 1 kPa. On devrait donc être avec ces hydrogels dans une gamme de rigidité assez favorable à la différenciation de cellules souches en neurones.

Ces gels ont tous des comportements d'« éponges » lorsque des petites contraintes sont appliquées. Il est d'ailleurs possible d'observer un relargage d'eau sous forme de gouttelettes à la surface de ces gels au moment où la contrainte est appliquée qui s'internalisent à l'arrêt de la

contrainte. Il s'agit de gels très fragiles qui, sous l'effet d'une contrainte plus importante, vont d'effondrer de façon irréversible un peu comme un paquet de « Mikado ». Cette fragilité augmente la difficulté pour travailler avec, mais est probablement un facteur favorable pour une migration cellulaire et va de pair avec la faible rigidité favorable à la différenciation en neurones.

3 - Capacités de culture cellulaire

a. Viabilité cellulaire après culture sur ces supports

Afin de mesurer la capacité des gels formés à permettre une culture cellulaire, des gels fins de 3 à 4 mm d'épaisseur ont été disposés dans des puits de culture. La viabilité cellulaire a été déterminée par des tests Deal-Live et des tests au MTT d'abord avec des cellules neuronales de lignées cellulaires, relativement faciles à cultiver, les Neuro2A. On constate que le nombre de cellules viables après 4 jours de culture est significativement supérieur pour le Gal-C7 par rapport aux autres gels testés, à condition que le nombre de cellulesensemencées par puits soit assez élevé (70 000 au lieu de 35 000), ce qui est une des caractéristiques des cultures en 3D, puisque la surface de culture est bien plus importante que pour les cultures en 2D. Il est probable que les cellules se développent mieux lorsqu'elles sont plus nombreuses car elles peuvent ainsi recevoir les signaux moléculaires des autres cellules voisines.

b. Pénétration 3D des cellules lors de leur culture

Après avoir évalué la viabilité des cellules cultivées sur ces gels, il est intéressant de vérifier que ces derniers permettent une culture en profondeur des cellules. En effet, beaucoup de supports sont aptes à supporter la culture cellulaire mais elle ne reste très superficielle. Pour cela, le gel formé à partir du Gal-C7 après 90 minutes de refroidissement est scanné après 5 jours de culture de cellules GFP-Neuro2A à l'aide d'une microscopie confocale.

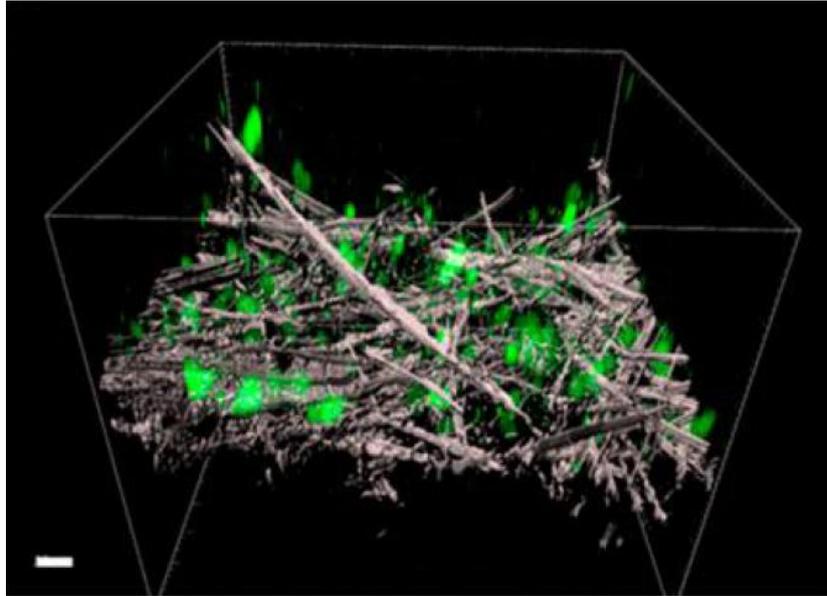


Figure 37 : Microscopie confocale d'un gel formé à partir du Gal-C7 et avec 90 minutes de refroidissement après 5 jours culture de cellules GFP-Neuro2A¹⁸

Echelle de taille : 50 μm

Avec en blanc, les fibres du support et en vert, les cellules

On remarque que les cellules cultivées pénètrent le gel jusqu'à 200 μm de profondeur.

c. Culture de cellules souches neuronales humaines et différenciation cellulaire

Enfin, des cellules souches neuronales humaines ont été cultivées sur un gel formé à partir du Gal-C7 après un refroidissement de 90 minutes. Après 7 jours de culture, une imagerie du gel par microscopie de réflexion. On constate que ces cellules s'agglomèrent en neurosphères par rapport aux cellules de la lignée Neuro2A. Il est aussi possible de constater que les seules cellules non viables sont celles situées au centre de cette neurosphère.

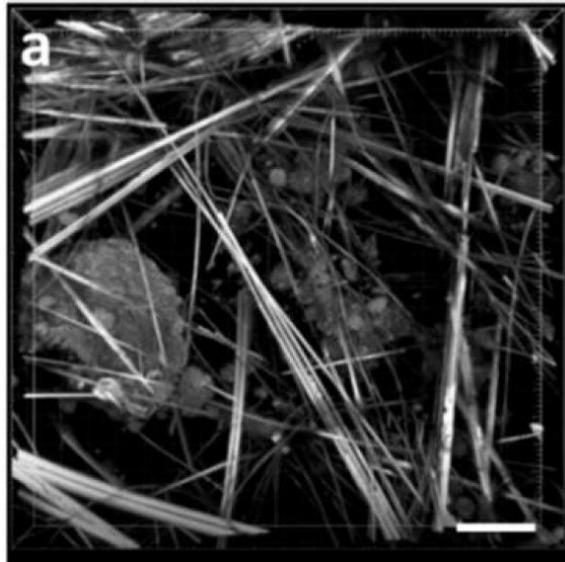


Figure 38 : Microscopie réfective d'un gel formé à partir du Gal-C7 avec 90 minutes de refroidissement après 7 jours de culture de cellules souches neuronales humaines¹⁸

Ces mêmes cellules en ensuite été marquées avec des marqueurs spécifiques pour les cellules gliales et neuronales, respectivement le marqueur GFAP et Tuj-1. C'est donc la capacité de différenciation des cellules souches neuronales humaines en cellules gliales et neuronales qui est alors évaluée.

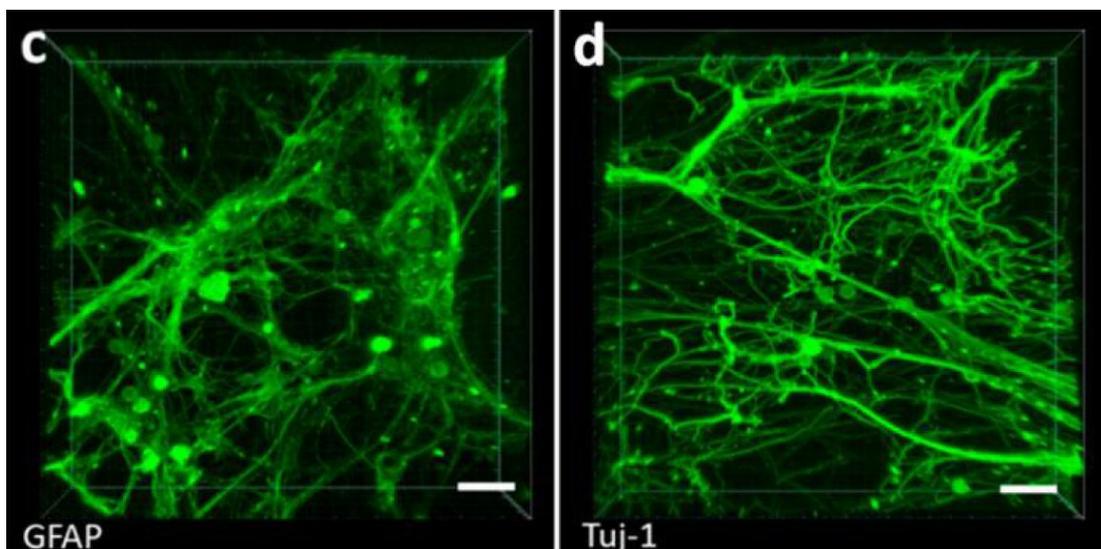


Figure 39 : Microscopie réfective d'un gel formé à partir du Gal-C7 avec 90 minutes de refroidissement après 7 jours de culture de cellules souches neuronales humaines testé avec différents marqueurs :¹⁸

- (a) GFAP caractéristiques des cellules gliales
- (b) Tuj-1, caractéristiques des cellules neuronales

Echelle de taille : 50 μ m

Sur ces deux images, on remarque la présence d'un réseau important de cellules gliales mais aussi neuronales, ces deux derniers étant alors enchevêtrés. Le gel formé par le Gal-C7 semble donc être non seulement un support idéal de culture cellulaire mais permet aussi leur différenciation.

4 - Mises en forme possibles de ce support

a. Technique du « wet spinning » appliqué au Gal-C7

La technique du « wet spinning » est une technique qui permet d'assembler des molécules amphiphiles par fuite de leur solvant et réorganisation de celles-ci dans l'eau. Cette technique a été testée avec les molécules de Gal-C7 qui sont, rappelons-le, amphiphiles grâce à leur tête galactonamide et leur queue heptyl.

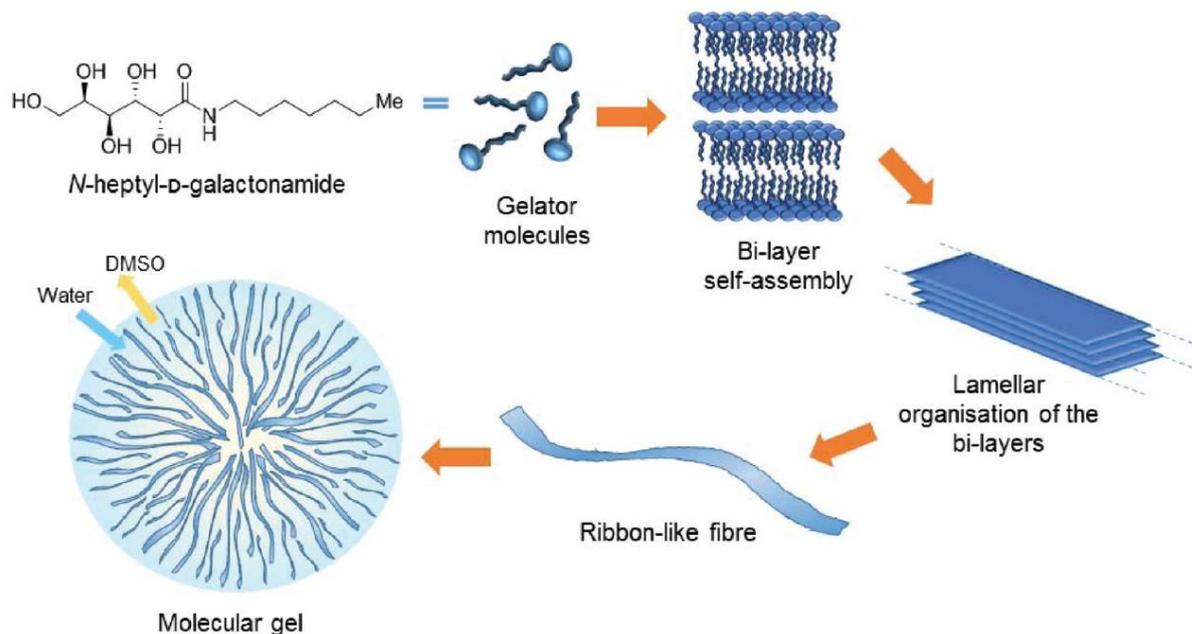


Figure 40 : Schéma théorique de l'assemblage possible des molécules de Gal-C7¹⁷

Le Gal-C7 est soluble dans un solvant organique comme le diméthylsulfoxyde plus connu sous le nom de DMSO mais très peu soluble dans l'eau. Le solvant utilisé est le DMSO car il est non toxique pour les cellules à faible concentration et est miscible à l'eau. On remarque que lorsque le Gal-C7 est dissous dans du DMSO puis injecté dans de l'eau, un phénomène de fuite de DMSO a lieu. Les molécules de Gal-C7 s'assemblent à nouveau en fibres par auto-

assemblage via les liaisons faibles (liaison hydrogène pour la tête polaire, liaison hydrophobes pour la chaîne alkyle) et emprisonnent des molécules d'eau formant alors un hydrogel.

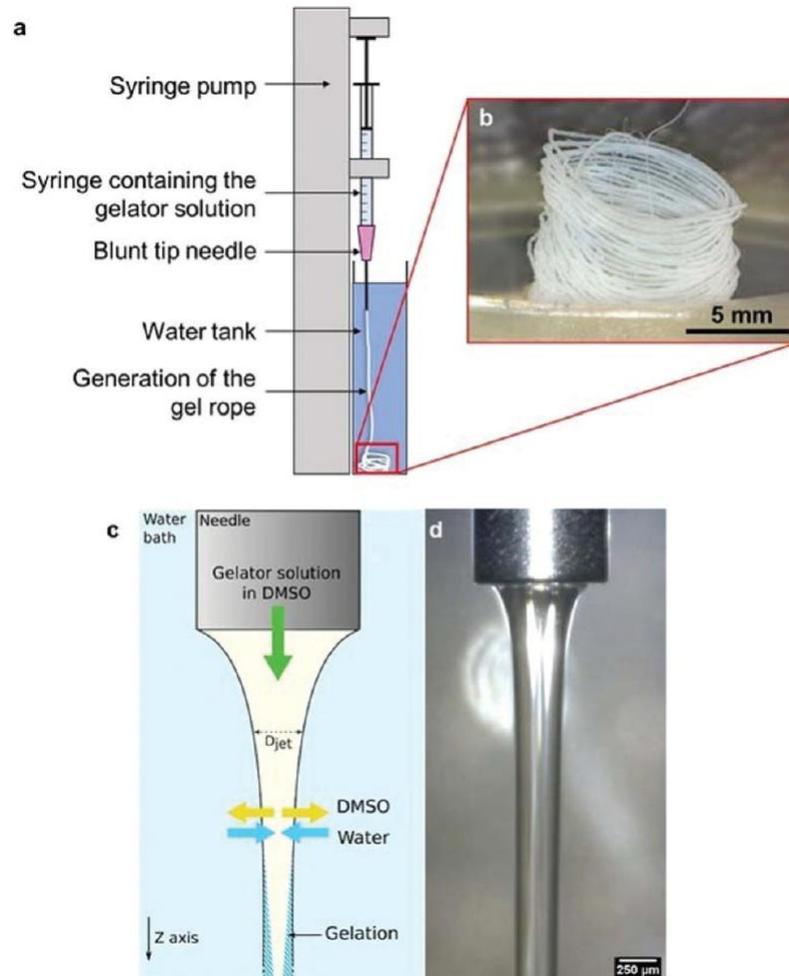


Figure 41 : Schéma et photos de la technique du « wet spinning » appliqué au Gal-C7¹⁷

- (a) Schéma du montage
- (b) Filament de gel obtenu à partir d'une solution de Gal-C7 à 4% wt dans du DMSO traversant une aiguille de 20G et du diamètre interne égal à 600 μm à une vitesse de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$
- (c) Schéma résumant le principe du « wet spinning » appliqué à cette situation
- (d) Photographie du jet de DMSO sortant d'une aiguille à une vitesse de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$

b. Conditions de formation du gel du « wet spinning »

Plusieurs paramètres sont alors testés afin de préciser les conditions de formation du gel de Gal-C7 lors du « wet spinning ». Ces paramètres sont : la vitesse de sortie du fluide qui varie de 0,5 à 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, la concentration de la solution en Gal-C7 qui varie de 1,25 à 5 wt et

enfin le diamètre de l'aiguille utilisé qui varie de 160 à 600 μm . Trois états du gel sont définis : soit le gel forme un bouchon lors de sa sortie de l'aiguille, soit il y a formation d'un filament continu du gel, soit la gélification du Gal-C7 n'a pas lieu et aucun filament n'est formé. Deux états intermédiaires entre ces 3 précédemment cités sont aussi définis.

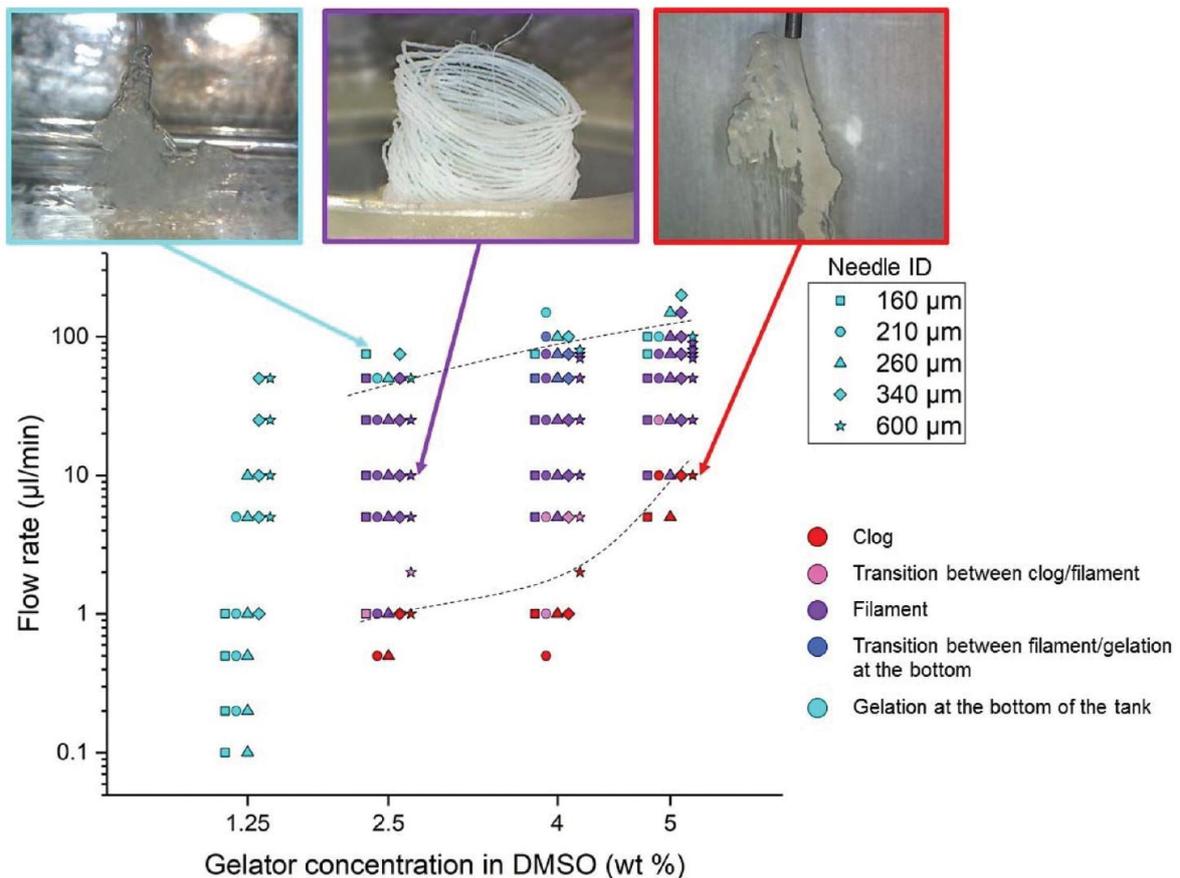


Figure 42 : Résultats du test de la formation du gel de Gal-C7 lors de technique du « wet spinning »¹⁷

- Un gel formé un bouchon lors de sa sortie de l'aiguille (en rouge)
 - Formation d'un filament continu du gel (en violet)
- Gélification du Gal-C7 n'a pas lieu et aucun filament n'est formé (en bleu)
- Etats intermédiaires entre ces 3 précédemment cités (en rose et en bleu foncé)

La formation d'un filament continu dépend essentiellement de deux paramètres qui sont la vitesse de sortie du fluide et la concentration de la solution en Gal-C7. En effet, lorsque la concentration en Gal-C7 est trop faible, c'est-à-dire inférieure à 2,5% aucun filament continu ne se forme. Les fibres ne peuvent se former par manque de densité des molécules de Gal-C7.

De même, lorsque la vitesse de sortie du fluide est inférieure à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ et supérieure à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, aucun filament continu n'est possible. En effet, lorsque cette vitesse est trop faible, un bouchon de gel se forme à la sortie de l'aiguille et lorsqu'elle est trop grande, les molécules de Gal-C7 n'ont pas le temps de s'organiser en fibres.

c. Possibilité de culture cellulaire sur le filament formé

Afin d'évaluer la possibilité de culture sur le filament de Gal-C7 formé par « wet spinning », une culture de cellules de la lignée « Neuro2A » est réalisée. De la même manière que précédemment, la viabilité cellulaire est caractérisée avec, en vert, les cellules viables et en rouge, les cellules mortes.

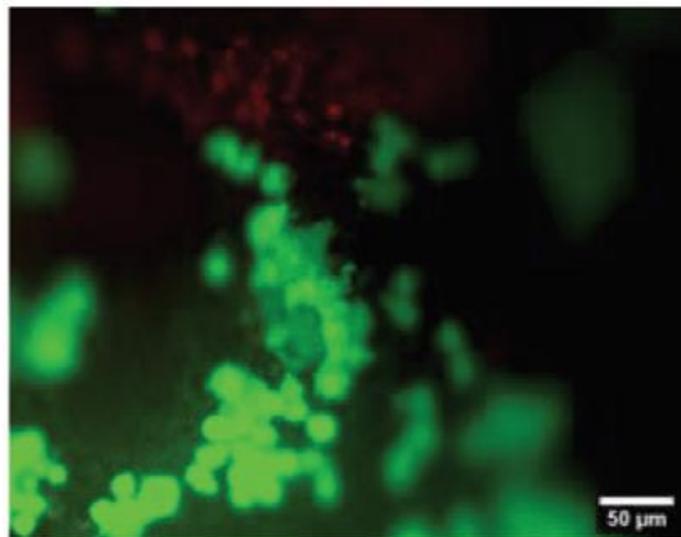


Figure 43 : Culture de cellules de la lignée « Neuro2A » sur le filament de Gal-C7 formé par « wet spinning » après 3 jours de culture¹⁷

Avec en **vert**, les cellules viables et en **rouge**, les cellules mortes

On remarque que le nombre de cellules mortes au bout de 3 jours de culture sur filament est un peu plus élevé que sur gel « brut », ce qui n'est probablement pas imputable au DMSO car celui-ci n'est déjà plus décelable dans le filament tout juste extrudé (forte dilution dans le bain de wet spinning) et il est rincé plusieurs fois avec du milieu de culture avant ensemencement. D'autres facteurs liés à la structure du filament sont à rechercher. Cependant, la viabilité reste bonne, justifiant la possibilité d'utiliser cette méthode pour préparer des filaments de gels bien définis comme support de culture. Par rapport au gel « en bulk » obtenu par voie thermique,

malgré sa faible durée de vie, il présente l'avantage d'être injectable et d'avoir des fibres beaucoup plus homogènes, régulières et alignées radialement. Ce qui pourrait être favorable pour donner des signaux beaucoup plus homogènes aux cellules lors de la culture.

Conclusion de la partie bibliographique :

La médecine régénérative représente aujourd'hui une branche innovante de la médecine dans laquelle on ne cherche plus à soigner le vivant, mais à remplacer ce qui est défaillant dans l'organisme. Bien qu'encore incomparable au « Gold Standard » que représente l'autogreffe, les techniques de cette nouvelle médecine s'améliorent de plus en plus. Ainsi, il deviendra possible de pallier au manque de donneurs d'organes, de réaliser des tests médicaux les plus précis possibles ... Nous avons pu voir que ce n'était pas le nombre de patients atteints qui justifiait une recherche dans le domaine de la médecine régénérative neuronale. Toutefois, les maladies neurodégénératives représentent actuellement un fléau du à une population vieillissante et ayant des facteurs de risque augmentés associés à un mode de vie toujours plus moderne.

Nous avons aussi pu comprendre l'importance de la matrice extracellulaire dans la survie, le renouvellement mais aussi la communication cellulaire. Elle est donc un outil central dans la compréhension mais aussi l'amélioration de cultures cellulaires en médecine régénérative. Dans ce cas précis, il semble crucial de comprendre au mieux sa structure et sa fonction afin de la mimer le plus précisément possible. Il s'agira alors de composition en saccharides mais aussi en protéines ou encore dans diverses améliorations structurales ou chimiques comme une surface rainurée, l'ajout de protéines d'adhésion ...

Les gélifiants supramoléculaires saccharidiques, par exemple les N-alkyl-D-galactonamides, représentent une famille encore peu étudiée en tant que support du vivant. Certaines d'entre elles sont des molécules simples à synthétiser et faciles à gélifier, et représentent alors un outil de choix de culture cellulaire. De plus, ces molécules ont aussi l'avantage de pouvoir être façonnées grâce à des méthodes comme le wet-spinning ou l'impression 3D.

Dans la partie expérimentale de cette thèse, deux approches ont été entreprises dans le but d'améliorer les hydrogels de N-alkyl-D-galactonamide décrits dans la partie bibliographique. En effet, il s'agit d'améliorer dans ces gels plusieurs points. Le point principal à améliorer, c'est la fragilité des hydrogels, qu'ils soient obtenus par voie thermique ou par wet spinning. Leur fragilité mécanique, reliée à une très faible densité du réseau de fibres, est sans doute un atout pour la dissémination des cellules en 3D au cœur de l'hydrogel, mais cette fragilité les rend difficile à manipuler et réduit leur durée de vie dans des conditions de culture. Celle-ci est d'environ 7-10 jours pour les gels obtenus par voie thermique, et de 2 jours pour les gels

obtenus par wet spinning (à cause de la taille beaucoup plus petite des fibres supramoléculaires). Il est donc utile de chercher des alternatives qui permettent d'améliorer et de moduler à volonté cette tenue mécanique. Ces alternatives vont consister soit à rajouter des additifs susceptibles d'améliorer leur tenue mécanique sans trop affecter la porosité, soit à utiliser d'autres gélifiants moléculaires saccharidiques, choisis dans une librairie de molécules synthétisées préalablement au laboratoire.

Le second point est que ces hydrogels présentent aux cellules une surface de groupements hydroxylés, non chargés, assez similaire aux polysaccharides neutres. Or, il est connu que l'adhésion cellulaire n'est pas très bonne sur ce type de surface. Comme décrit dans la partie bibliographique, on peut améliorer les propriétés d'adhésion par simple "coating" par des molécules biologiques appropriées, ce qui peut être réalisé par l'addition de protéines aux hydrogels. Ainsi, nous étudierons d'abord comment l'ajout de protéine modifie caractéristiques physiques des gels de N-heptyl-D-galactonamide. Les propriétés mécaniques, mesurées par des tests de compression, ont été plus particulièrement étudiées.

Dans un second temps, nous avons sélectionné deux molécules de la librairie de gélifiants disponible au laboratoire et avons étudié les conditions et les limites du wet-spinning appliquée à ces molécules et enfin nous avons étudié la possible impression 3D de ces molécules afin d'automatiser encore plus son procédé de fabrication.

Chapitre 2 : Etude expérimentale

I - Amélioration des caractéristiques physiques des gels formés par refroidissement grâce à l'ajout de protéines

1 - Protocole expérimental

Il a été montré incidemment lors de précédents essais que l'ajout d'un « cocktail de protéines » puis d'une protéine bien définie de ce cocktail, identifiée, avait un effet important sur la tenue mécanique des hydrogels de GalC7. En effet, les hydrogels purs ne peuvent pas du tout être manipulés à la spatule, ni sortis des puits dans lesquels ils ont été coulés. Toute manipulation mécanique conduit à l'affaissement du gel sur lui-même et l'expulsion de l'eau qu'il contient. Or, il se trouve que si on imbibe le gel avec ce cocktail ou cette protéine (dont aucune n'a de pouvoir gélifiant), le gel devient bien moins fragile mécaniquement : on peut le manipuler à la spatule ou à la pince, il reste gonflé de liquide (un tampon physiologique) et ne s'affaisse pas. On a donc voulu dans cette partie caractériser par des mesures mécaniques cette meilleure tenue et comparer l'effet obtenu avec une autre protéine.

Deux protéines, que nous nommerons P1 et P2, ont été ajoutées au gel Gal-C7 dans le but d'améliorer sa tenue et sa rigidité.

a. Formation des gels

Formation des gels purs :

Pour préparer les gels, 80 mg de gélifiant Gal C7 a été dissous dans 16 ml d'eau déionisée chauffée à 100°C à l'aide d'une plaque chauffante (concentration de 0,5% massique). Des puits de 1,15 cm de diamètre ont alors été comblés avec 0,5 ml de solution, toujours à 100°C, et à l'aide d'une seringue en verre montée avec une aiguille en métal et préalablement chauffée. Une fois, ceux-ci formés, ils ont ensuite été refroidis progressivement en suivant une rampe de diminution de 80°C/heure grâce à une plaque chauffante.

Ajout des protéines :

Les puits ont ensuite été imbibés à l'aide de 0,5 ml de solution contenant les protéines P1 et P2. Pour cela, des solutions aux concentrations de 16 mg/ml, 8 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml et 1 mg/ml de ces protéines ont été réalisées par dilution à partir de 2ml de la solution la plus concentrée, c'est-à-dire 16 mg/ml. Le schéma de dilution est le suivant :

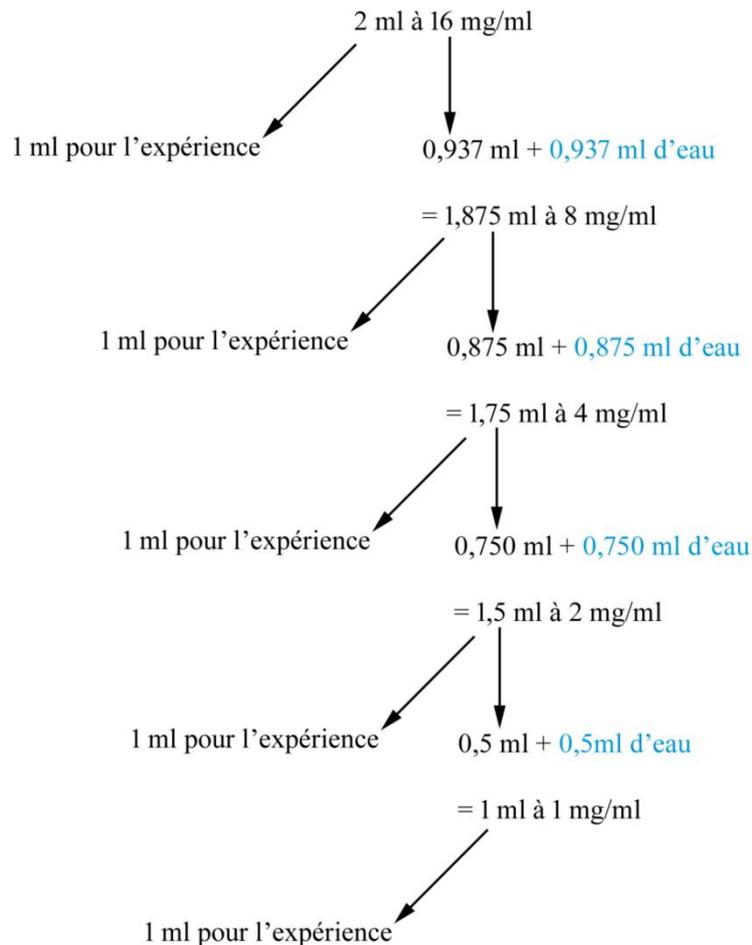


Figure 44 : Schéma de dilution des solutions contenant les protéines P1 et P2

Ces solutions ont été instillées dans les différents puits à l'aide d'une micropipette. Puis, 0,5 mL de la solution surnageante de chaque puits a été retirée à l'aide d'une micropipette, divisant alors par deux la concentration finale en protéines. On obtient ainsi des gels imbibés avec des solutions de 8 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml et 0,5 mg/ml des protéines P1 et P2.

diamètre de 1,15 cm et contient 0,5 ml de gel. On peut donc calculer la hauteur théorique de chaque échantillon :

$$h = \frac{0,5}{\pi * \left(\frac{1,15}{2}\right)^2} = 0,481 \text{ cm}$$

En arrondissant cette valeur à 5 mm, on peut estimer que la mesure débute lorsque l'entrefer, c'est-à-dire la distance entre le plateau du rhéomètre, servant de point « 0 » et la sonde de mesure, est de 11 mm.

2 - Mesures

Lorsque l'on étudie la résistance d'un matériau en compression, il est possible d'utiliser la loi de Hooke qui exprime une force en fonction de la réduction de la longueur appliquée sur cet objet :

$$\frac{F}{S} = E * \varepsilon$$

Avec F, la force mesurée en Newton

S, la surface de la sonde de mesure en m² soit, $S = \pi * (0,004)^2$

E, le module d'élasticité (ou module d'Young) en Pa

ε , le rapport entre la réduction de la longueur et la longueur initiale soit $(d_0 - dt) / d_0$

d_0 étant la valeur de l'entrefer au début de la mesure, soit 11 mm

dt étant la valeur de l'entrefer à l'instant de la mesure

Ainsi, en réalisant un graphique exprimant F/S en fonction de ε , on peut dire que le coefficient directeur de la droite obtenue est donc équivalent au module d'élasticité.

En réalisant les mesures, on constate qu'elles sont fortement bruitées. En effet, les valeurs de la force varient typiquement de $\pm 0,1$ N entre trois points consécutifs (différence creux-crête) pris au niveau d'un plateau de la courbe. D'après la sensibilité indiquée pour la machine, ces

valeurs devraient ne pas être aussi bruitées, donnant des résultats qui ne sont pas ceux qui étaient espérés. Ces mesures indiquent clairement que cet instrument n'est pas suffisamment sensible pour mesurer des échantillons de ce type là. Une machine plus sensible et/ou des échantillons de plus grande taille, et donc utilisant des quantités plus importantes d'un produit synthétique fabriqué à façon au laboratoire, seraient nécessaires. En outre, la validation finale des mesures nécessiterait des mesures au moins en triplicate, pour tenir compte de la variabilité des gels. On a cependant tenté d'analyser les données des mesures réalisées, malgré l'intensité du bruit, pour se faire une idée de l'exploitabilité ou non de ces mesures. Ceci est présenté dans les paragraphes suivants.

3 - Interprétations

(i) Effet du décollement des parois de l'échantillon dans son puit

Une première question s'est posée aussi quant à la façon de conduire les mesures, concernant la préparation du gel. En effet, lorsqu'il est coulé puis refroidit dans le puit, il va adhérer aux parois. Lors de la compression, la force mesurée prendra donc en compte la résistance du gel à la compression, mais également, les forces d'adhésion du gel aux parois.

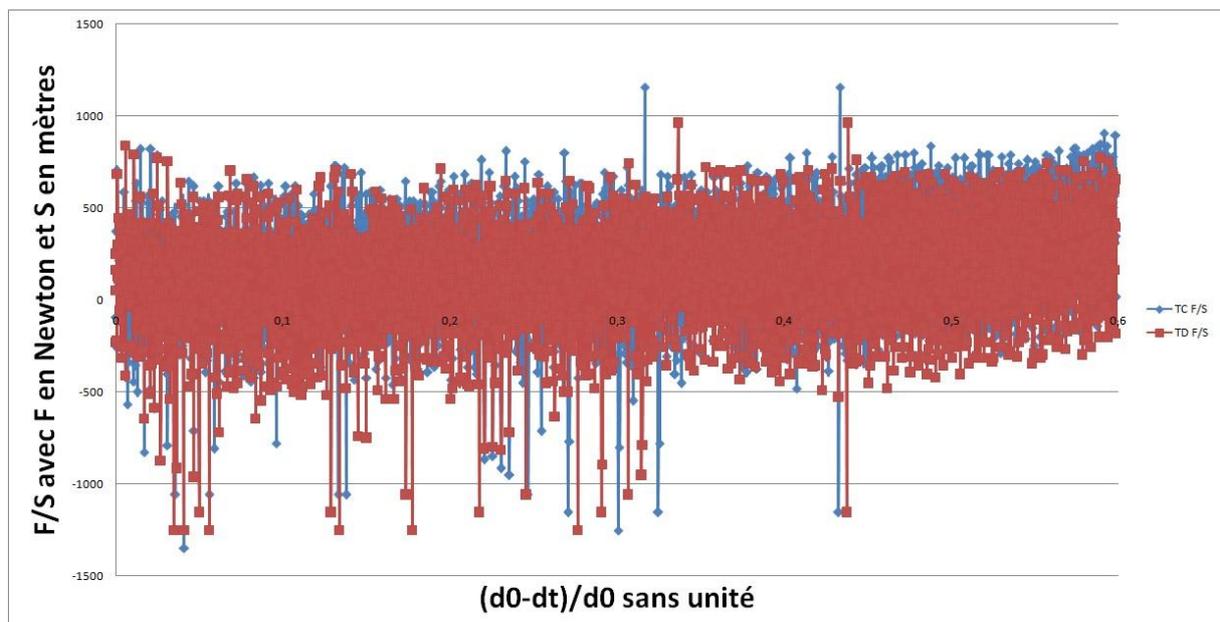


Figure 47 : Effet du décollement des parois d'un échantillon comparé à un échantillon témoin dont les parois sont collées lors d'un test en compression de 0,01 mm/s

Echantillon	Equation de la courbe
Parois collées	$y = 1924*x + 168,0$
Parois décollées	$y = 1683*x + 80,77$

Tableau 15 : Equation des courbes des échantillon testés en suivant une modélisation affine

Le coefficient directeur de la courbe pour l'échantillon avec les parois collées apparait donc plus grand que pour celui dont les parois sont décollées. Ainsi, on peut affirmer que le module élastique est plus important dans ce premier cas.

Cette constatation peut sembler logique puisqu'il est facile d'imaginer que l'adhésion de l'échantillon aux parois du support ajoute de des forces que la sonde doit contrer. Tandis que dans le cas des parois décollées, le support étant « libre », les forces mesurées par la sonde ne correspondent qu'à la compression du gel.

(ii) Effet de la protéine P1 sur le gel de Gal C7

Malgré la constatation précédente et avec un nombre d'échantillons réduits, il a été décidé de réaliser ces mesures pour des échantillons dont les parois sont collées. Ceci évite une éventuelle déstructuration préalable et mal contrôlée des gels, compte tenu de leur fragilité mécanique. Le but est, ici, de comparer l'effet de l'augmentation de la concentration en protéine P1 dans le gel de Gal C7 sur la résistance de ce dernier aux forces de compression. La mesure qui en résulte doit donc être considérée comme la rigidité du gel et les forces d'adhésion du gel aux parois. Il faut noter que ces forces ne sont probablement pas d'un ordre de grandeur très différent à celles du gel lui-même, car le gel est composé de fibres supramoléculaires, sans aucun point de réticulation fort et sont facilement dissociées les unes des autres et donc, facilement dissociées aussi des parois.

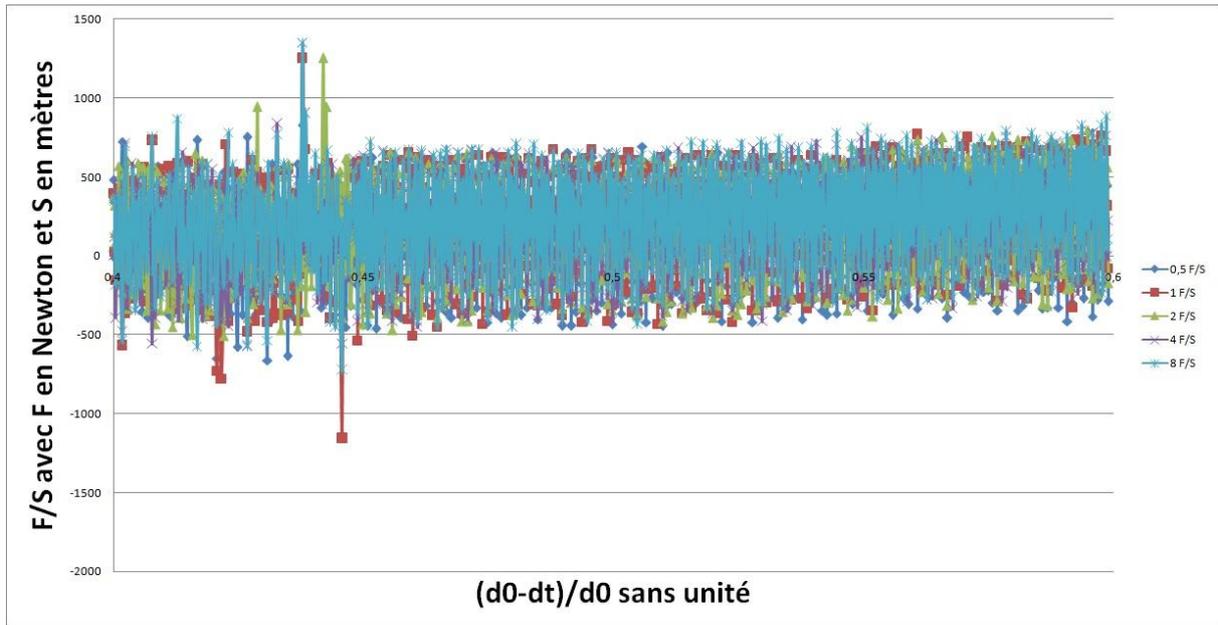


Figure 48 : Effet de la concentration en protéine P1 sur les gels de Gal C7 avec des échantillons dont les parois sont collées lors d'un test en compression de 0,01 mm/s avec :

0,5 = 0,5 mg/ml,

1 = 1 mg/ml,

2 = 2 mg/ml,

4 = 4 mg/ml,

Et 8 = 8 mg/ml

Concentration en protéines	Equation de la courbe
0,5 mg/ml	$y = 1087*x + 11,52$
1 mg/ml	$y = 1352*x + 108,3$
2 mg/ml	$y = 1543*x + 47,98$
4 mg/ml	$y = 1536*x + 89,69$
8 mg/ml	$y = 1563*x + 130,1$

Tableau 16 : Equation des courbes des échantillon testés en suivant une modélisation affine

On constate une augmentation du coefficient directeur de la courbe de 1087 pour 0,5 mg/ml de concentration en protéine P1 jusqu'à 1563 pour 8 mg/ml de concentration en protéine P1.

On peut donc supposer que l'augmentation de la concentration en protéine P1 augmente le module élastique du gel.

(iii) Effets de la protéine P2 sur le gel de Gal C7

Les mesures ont été réalisées, ici, avec des échantillons dont les parois ont été préalablement décollées.

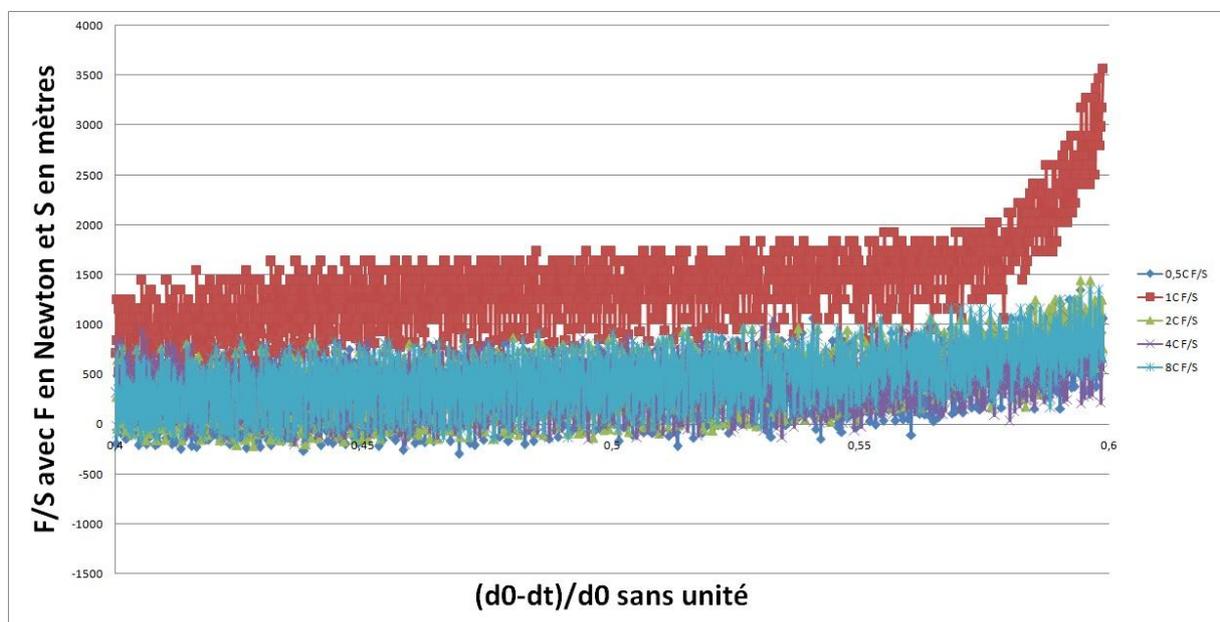


Figure 49 : Effet de la concentration en protéine P2 sur les gels de Gal C7 avec des échantillons dont les parois sont décollées lors d'un test en compression de 0,01 mm/s avec :

0,5 = 0,5 mg/ml,

1 = 1 mg/ml,

2 = 2 mg/ml,

4 = 4 mg/ml,

Et 8 = 8 mg/ml

Concentration en protéines	Equation de la courbe
0,5 mg/ml	$y = 2072*x - 1399$
1 mg/ml	$y = 1675*x - 45,10$
2 mg/ml	$y = 2796*x - 71,15$
4 mg/ml	$y = 2444*x - 61,29$
8 mg/ml	$y = 4387*x + 17,74$

Tableau 17 : Equation des courbes des échantillon testés en suivant une modélisation affine

On constate une augmentation du coefficient directeur de la courbe de 1675 pour 1 mg/ml de concentration en protéine P2 jusqu'à 4387 pour 8 mg/ml de concentration en protéine P2. On peut donc supposer que l'augmentation de la concentration en protéine P2 augmente le module élastique du gel.

Les mesures ont ensuite été réalisées avec des échantillons dont les parois sont collées.

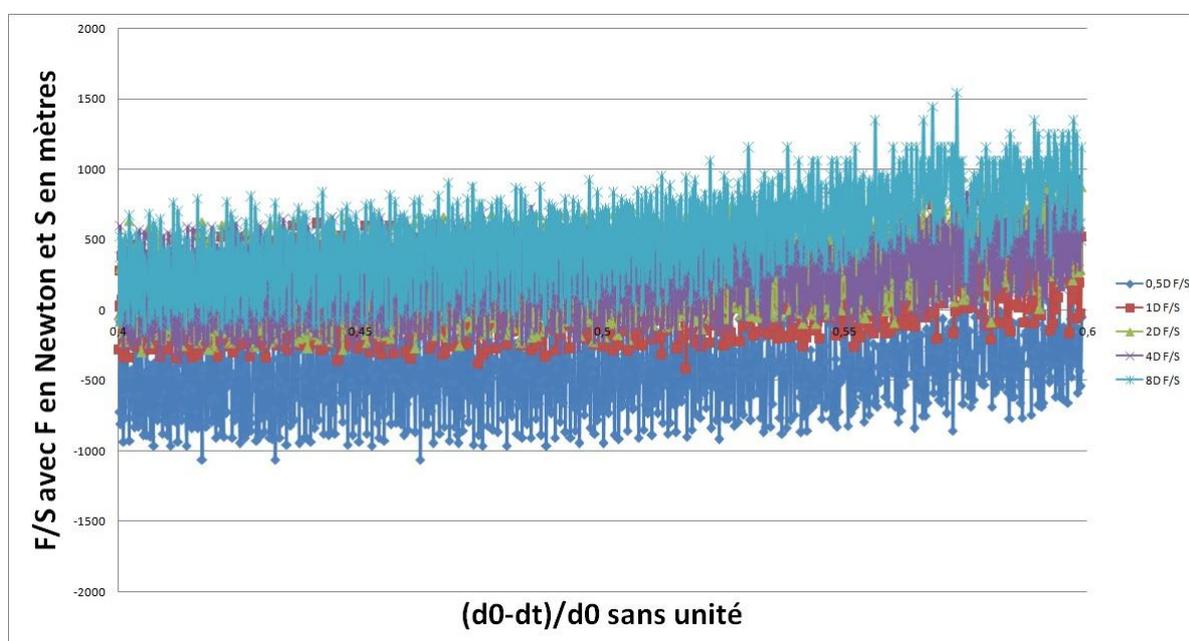


Figure 50 : Effet de la concentration en protéine P2 sur les gels de Gal C7 avec des échantillons dont les parois sont collées lors d'un test en compression de 0,01 mm/s avec :

$$0,5 = 0,5 \text{ mg/ml,}$$

1 = 1 mg/ml,

2 = 2 mg/ml,

4 = 4 mg/ml,

Et 8 = 8 mg/ml

Concentration en protéines	Equation de la courbe
0,5 mg/ml	$y = 1900*x + 289,4$
1 mg/ml	$y = 13248*x - 396,1$
2 mg/ml	$y = 3189*x + 135,1$
4 mg/ml	$y = 2058*x + 333,1$
8 mg/ml	$y = 3445*x + 127,4$

Tableau 18 : Equation des courbes des échantillon testés en suivant une modélisation affine

On constate une augmentation du coefficient directeur de la courbe de 1900 pour 0,5 mg/ml de concentration en protéine P2 jusqu'à 3445 pour 8 mg/ml de concentration en protéine P2. On peut donc supposer que l'augmentation de la concentration en protéine P2 augmente le module élastique du gel.

Contrairement à ce que nous avons pu constater dans un premier lieu, ces valeurs semblent supérieures lorsque les parois du gel sont décollées du puit.

Enfin, si l'on compare les effets entre les protéines P1 et P2, on constate que ces valeurs sont plus importantes pour la protéine P2 que pour P1. Ceci suggère que l'utilisation de la protéine P2 est plus efficace que pour la protéine P1 en ce qui concerne l'augmentation du module élastique du gel étudié.

4 - Discussion

Tout d'abord, il est important d'avoir à l'esprit les différentes « erreurs » de manipulation. Par exemple, un biais peut être généré par déstructuration du gel au moment où les parois sont décollées.

De la même manière, la sensibilité minimale annoncée du rhéomètre utilisé est de 0,005 N en force normale. Cependant, il a été constaté que les valeurs variaient beaucoup d'un point au suivant, de proche en proche et jusqu'à $\pm 0,1$ N, ce qui n'est pas en accord avec la sensibilité annoncée. Il semblerait donc que nos mesures soient à la limite de cette sensibilité inférieure du rhéomètre, c'est pourquoi celles-ci semblent « parasitées » par un bruit de fond constant très important. On a comparé ces résultats avec les courbes de tests en compression réalisées lors d'une étude précédente avec une machine de sensibilité annoncée comparable (0,006 N) BOSE ELF 3100 et sur des échantillons de diamètre à peu près le double de ceux réalisés dans cette étude (13 à 14 mm). Dans ces tests, on remarque que le bruit est bien plus faible, avec des différences creux-crêtes de points consécutifs pris au niveau d'un plateau de l'ordre de 0,004 N, coïncidant avec la sensibilité annoncée. Avec cette machine, on met bien en évidence l'augmentation de la contrainte F/S avec l'avancée de la sonde dans le gel.

Plus que la sensibilité en force, on s'est demandé si c'est peut être aussi la mesure de déplacement qui manque de précision et qui pourrait expliquer ce bruit de fond constant absent lors d'une étude antérieure similaire réalisé avec un autre appareil de mesure (BOSE ELF 3100). En effet, la sensibilité de mesure du déplacement constaté est de 1 μm pour l'appareil BOSE tandis qu'il semble aussi être de 1 μm pour l'appareil que nous avons utilisé. Or, les différences de déplacement pour les deux machines présentent la même précision d'un point à un autre. La différence vient donc plutôt de la sensibilité en force.

Il serait aussi intéressant de pouvoir évaluer de quelle manière les protéines se sont ancrées dans le gel. Ces protéines, notamment P2, peuvent-elles se lier par des liaisons faibles au gel améliorant ainsi sa résistance aux forces de compression ou s'agit-il de simples effets de « comblement du vide » améliorant ainsi le module élastique du gel ?

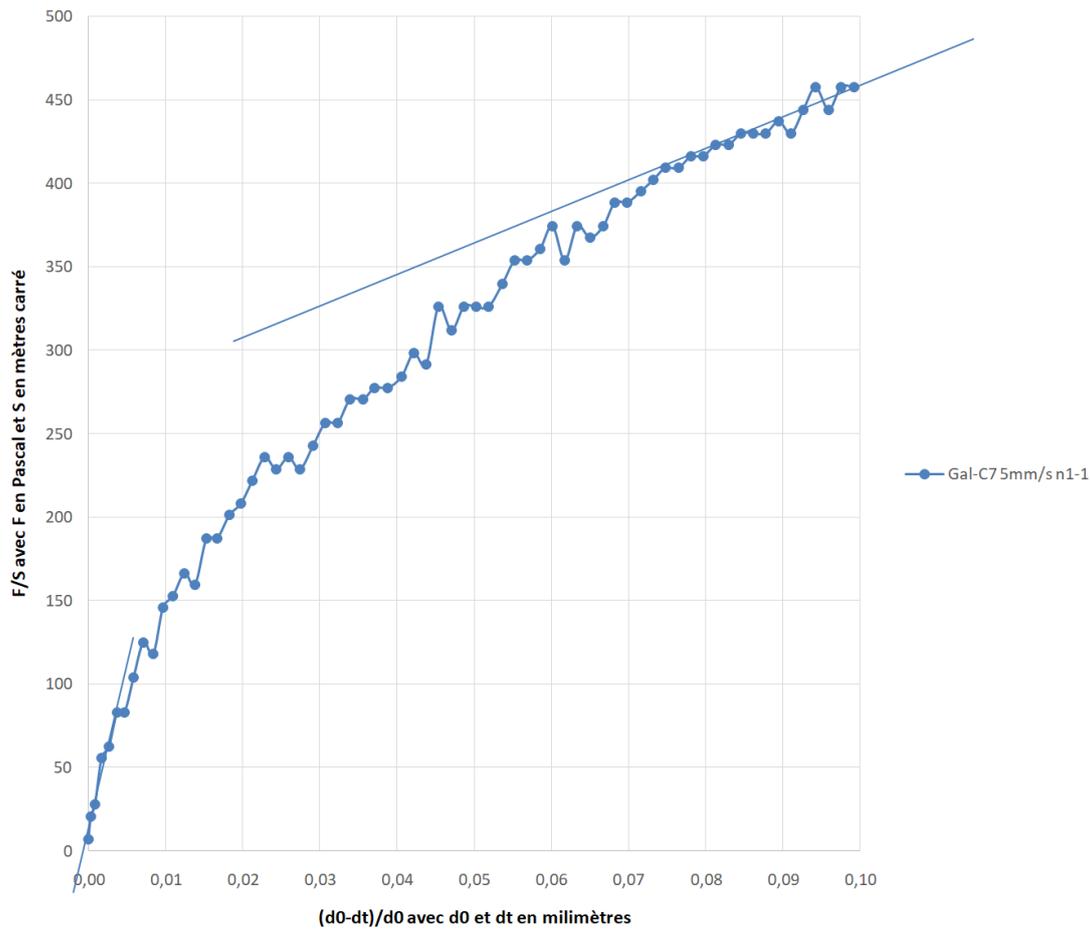


Figure 51 : Test en compression de 5 mm/s sur des gels de Gal C7

Enfin, il est important de noter que le comportement du gel de Gal C7 n'est pas constant au fur et à mesure que la force de compression est appliquée. Le comportement est plus facilement expliqué à l'aide des courbes non bruitées enregistrées avec la machine BOSE ELF 3100 lors d'une étude précédente. Au fur et à mesure de la compression, le matériau s'écrase et tend à subir un « flambage », c'est-à-dire que les fibres qui soutiennent le gel se tassent ou se cassent, présentant alors moins de résistance. L'équation de la tangente en fin du test en compression est d'ailleurs $y = 2016 \cdot x + 255,4$.

Pour expliquer la diminution du module élastique du gel en fonction de la compression, il est possible de voir ce gel sous la forme de fibres enchevêtrées à la manière d'un amas de « Mikados » (en effet certaines fibres, les plus grosses, doivent probablement être relativement rigides et des fibres fines, plus souples font le lien entre ces fibres rigides). En début de compression, les fibres résistent face à la force appliquée puis commencent à se tasser ou à subir un "flambage" (elles se plient ou se cassent). Si on réalise un second test avec

le même échantillon, alors on constate que les modules sont systématiquement plus faibles, similaires à ceux de la fin de la courbe de la Figure 51, puisque la structure formée par les fibres est « tombée », ne tenant plus le gel.

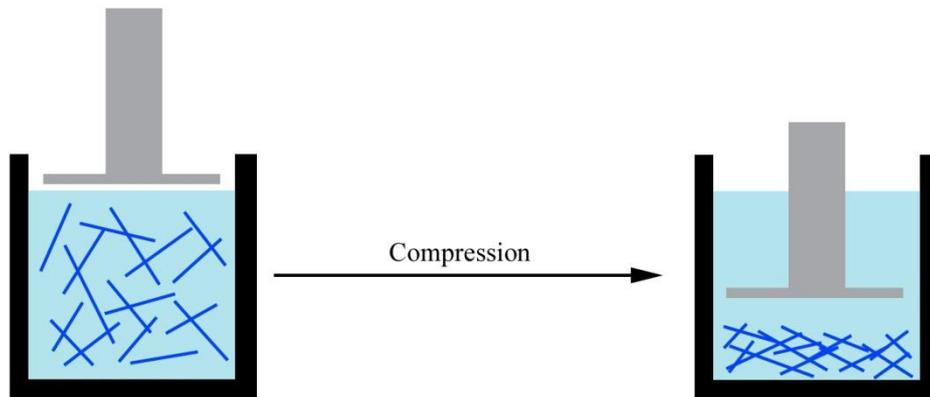


Figure 52 : Structure supposée du gel de Gal C7 lors d'un test en compression

II - Wet-spinning de deux nouveaux gélifiants G2 et G3

1 - Protocole expérimental

Deux gélifiants nommés G2 et G3 ont ensuite été testés au wet-spinning. Pour cela, ces gélifiants sont dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Les concentrations réalisées sont présentes dans la tableau 19. On applique par convention la formule suivante, reliant le pourcentage massique à la concentration de la solution (l'équation ci-dessous est valable pour l'eau dont la densité est de 1.0 g/mL, et pour garder la même convention, on néglige ici la correction qu'il faudrait apporter dans le cas du DMSO, dont la densité est de 1,1 g/mL). Une solution dont le pourcentage massique de gélifiant est de 1% correspond 10 mg/ml, ce qui correspond à :

$$1\% \text{ massique} = \frac{1 \text{ mg de gélifiant}}{100 \text{ mg de solution}} = \frac{10 \text{ mg}}{1000 \text{ mg}} = \frac{10 \text{ mg}}{1 \text{ ml}}$$

Les solutions sont ensuite placées dans une seringue de 1 mL montée avec une aiguille de 30 G, dont le diamètre interne est égal à 0,140 mm. La seringue est alors mise en place sur un

pousse seringue 111 legato KDS (KD scientific) de manière à être verticale et à permettre un écoulement de haut en bas. Des flacons de culture cellulaire de l'entreprise Falcon ont alors été remplis à l'aide de 50 ml d'eau déionisée et placées sous la seringue verticale de manière à ce que le bout de l'aiguille soit immergé. L'avantage de ces flacons à parois plates et bien transparentes est de permettre une bonne visualisation des filaments de gel en cours de formation. Le pousse seringue a été préalablement réglé pour que le bout de l'aiguille reste le moins longtemps possible immergée dans l'eau, sans flux la traversant. En effet, cela peut engendrer la formation d'un bouchon de gel dans l'aiguille. Le pousse seringue est ensuite lancé de manière à injecter une quantité de 50 μ l par test. Les deux paramètres modifiés sont la vitesse d'extrusion ainsi que la concentration en gélifiant. Une caméra, le modèle EOS 600D de la marque Canon possédant un objectif modifié, a aussi été placée face à la cuve. Le cadrage a été choisi de manière à pouvoir visualiser tout le parcours du jet de solution, puis du filament de gel, depuis la pointe de l'aiguille jusqu'au fond du flacon. Enfin, une fois l'injection terminée et le gélifiant déposé dans la cuve, 40 ml d'eau a été retiré afin de limiter la possible dissolution du filament de gel (50 μ l de gel) et observer son évolution dans un volume plus limité d'eau déionisée (10 ml). En effet, dans le cas du GalC7, premier gélifiant testé par cette technique, la durée de vie du filament est d'autant plus courte que le volume d'eau reste élevé, car il se dissout, et il tend se transformer en cristaux. Nous souhaitons donc savoir si les deux nouveaux gels G2 et G3 sont plus résistants à ces deux phénomènes, ce qui permettrait leur utilisation comme support de culture sur de plus longues durées.

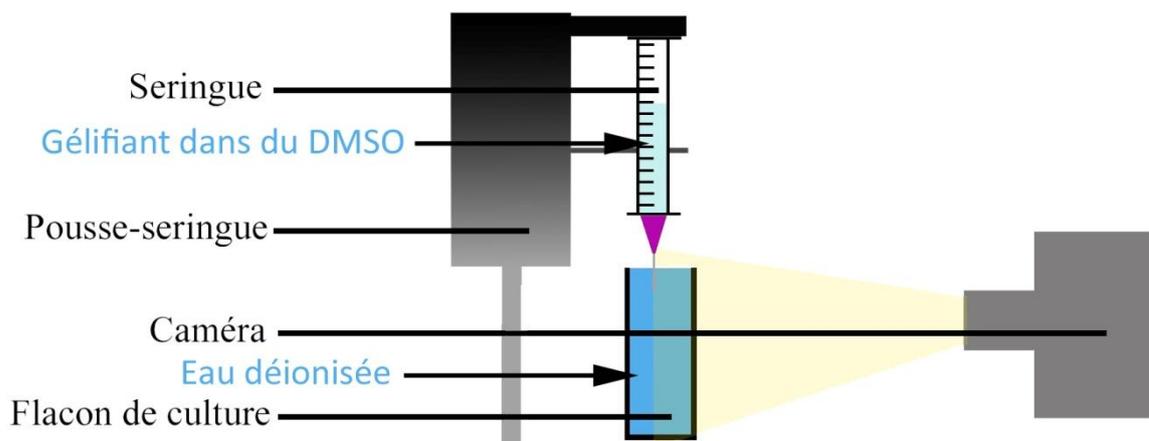


Figure 53 : Schéma de l'expérience de wet-spinning

Géifiant	Concentration	Vitesse d'extrusion
G2	10 mg/ml	150 µL/min
		100 µL/min
		50 µL/min
		10 µL/min
	20 mg/ml	150 µL/min
		100 µL/min
		50 µL/min
		10 µL/min
	30 mg/ml	150 µL/min
		100 µL/min
		50 µL/min
		10 µL/min
	40 mg/ml	150 µL/min
		100 µL/min
		50 µL/min
		10 µL/min
	50 mg/ml	150 µL/min
		100 µL/min
		50 µL/min
		10 µL/min
G3	10 mg/ml	150 µL/min
		100 µL/min
		75 µL/min
		50 µL/min
		40 µL/min
		30 µL/min
		20 µL/min
		10 µL/min
	20 mg/ml	150 µL/min
		100 µL/min
		75 µL/min

		50 µL/min
		40 µL/min
		30 µL/min
		20 µL/min
		10 µL/min
	30 mg/ml	150 µL/min
		100 µL/min
		75 µL/min
		50 µL/min
		40 µL/min
		30 µL/min
		20 µL/min
		10 µL/min

Tableau 19 : Tableau récapitulatif des concentrations et vitesses d'extrusion testées en wet spinning pour les deux gélifiants

2 - Mesures et traitements des données

a. Wet-spinning de filaments de gélifiant G3

(i) Diagramme de phases du wet-spinning du gélifiant G3

Lors de cette expérience avec le gel G3, cinq phases différentes du filament ont pu être distinguées :

- Formation d'un bouchon ou « cloag » au bout de l'aiguille empêchant la création du filament
- Formation d'un filament mais qui peut être interrompu par la formation d'un ou plusieurs « cloag »
- Formation d'un filament fin et continu
- Formation d'un filament fin et continu avec prise tardive dans le bain d'eau déionisée
- Amas résultant de la prise tardive d'un gel non formé

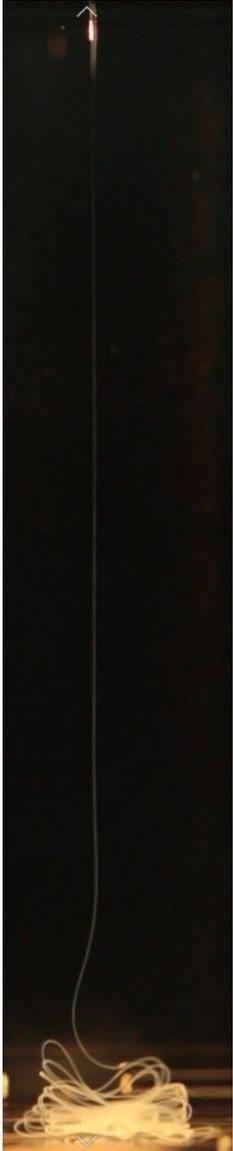
<p>Images</p>				
<p>Description</p>	<p>Formation d'un amas de gel avec une concentration de 1% de gélifiant et une vitesse d'extrusion de 150 $\mu\text{l}/\text{min}$</p>	<p>Formation d'un filament fin et continu avec prise tardive avec une concentration de 2% de gélifiant et une vitesse d'extrusion de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$</p>	<p>Formation d'un filament fin et continu avec une concentration de 3% de gélifiant et une vitesse d'extrusion de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$</p>	<p>Formation d'un « cloag » avec une concentration de 2% de gélifiant et une vitesse d'extrusion de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$</p>

Tableau 20 : Image des différents états de gel rencontrés lors du wet-spinning du gélifiant G3

Sur chaque image, le diamètre externe de l'aiguille, visible sur le bord supérieur de l'image est de 0,305 mm.

Ces différentes phases sont ensuite répertoriées dans un diagramme :

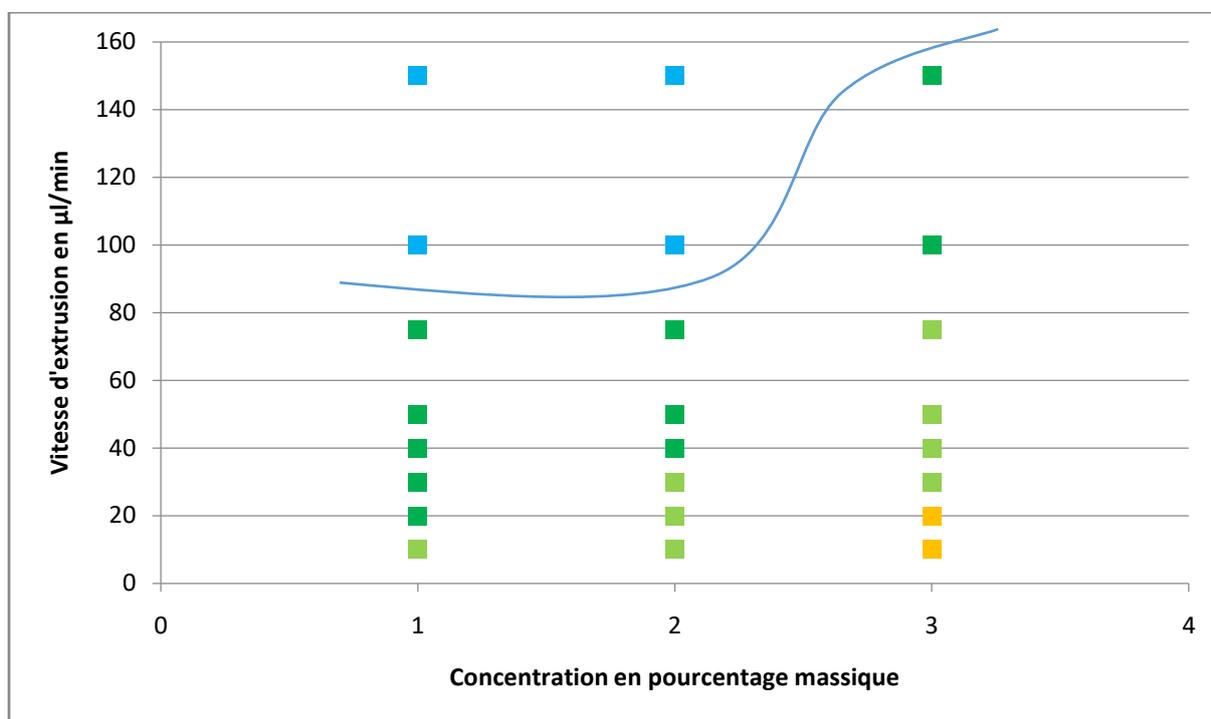


Figure 54 : Diagramme de phases lors du wet-spinning du géliifiant G3 en fonction de sa concentration dans la solution initiale et de la vitesse d'extrusion avec :

- En orange, la formation d'un filament mais qui peut être interrompu par la formation d'un ou plusieurs « cloag »
- En vert clair, la formation d'un filament fin et continu
- En vert foncé, la formation d'un filament fin et continu avec prise tardive dans le bain d'eau déionisée
- En bleu, la formation d'un amas résultant de la prise tardive d'un gel non formé

On constate l'existence d'une fenêtre d'action assez large permettant la formation d'un filament fin et continu pour des pourcentages massiques en géliifiant de 1% à 3% et avec des vitesses d'extrusion allant de 10 µl/min à 150 µl/min. Cette large fenêtre rend ce géliifiant prometteur pour plusieurs applications comme le 3D printing et le rend, à terme, façonnable en différents scaffolds. Toutefois, un effet « pulse » du pousse seringue a pu être constaté pour des vitesses d'extrusion de 150 à 75 µl/min. De plus, la formation de « cloag » a pu être constatée pour le géliifiant de concentration massique égale à 3% à des vitesses d'extrusion de 20 et 10 µl/min. Ces derniers peuvent aisément tomber lorsque de légères secousses sont produites sur la seringue. Un filament fin et continu peut alors se produire si on élimine

régulièrement le cloag en secouant l'aiguille... Il peut arriver également dans le domaine des faibles vitesses d'extrusion (10 et 20 $\mu\text{l}/\text{min}$) qu'un cloag se forme au début de l'extrusion, mais une fois ce cloag éliminé, un filament continu bien formé se forme pour le reste de l'extrusion. Ces conditions ont été considérées comme étant "vertes".

En conclusion, il est possible de penser que c'est la présence d'un flux continu et laminaire qui permet la formation d'un filament fin et continu, considéré comme parfait. Cependant, dès que ce flux est perturbé, on peut constater l'apparition d'un « cloag » empêchant la création d'un filament correct. Le phénomène de formation du « cloag » s'auto-entretient alors.

(ii) Suivi des filaments formés par wet-spinning sur le court terme

Suivi quantitatif :

Afin de suivre quantitativement l'évolution des filaments formés, notamment en ce qui concerne le phénomène de cristallisation de ceux-ci, un protocole de séchage des flacons avait été mis en place. Des tubes à centrifuger de la marque Falcon et de contenance de 15 ml ont alors été pesés vides à l'aide de la balance analytique semi micro modèle MSE225P. Ils ont ensuite été centrifugés et l'eau déionisée a été extraite à l'aide d'une seringue de 20 ml montée avec une aiguille de 21 G. Ils ont alors mis à sécher, de manière à permettre une évaporation complète de l'eau tout en étant recouverts d'un papier d'aluminium pour éviter que de la poussière n'y entre. Il s'agissait donc de pouvoir comparer la masse théorique de gélifiant extrait, en sachant que pour chaque expérience, le volume extrudé est de 50 μl , avec les valeurs mesurées au cours du temps.

Gel	Concentration (mg/ml)	Masse sèche théorique de gélifiant extrudé (mg)
G2	10	0,5
	20	1
	30	1,5
	40	2
	50	2,5
G3	10	0,5
	20	1
	30	1,5

Tableau 21 : Masse théorique de gélifiant extrudé lors du wet-spinning après séchage du filament de gel

Cependant, nous avons pu constater que le séchage correct de nos échantillons était quasi impossible vu la rétention d'eau par le filament. De plus, nous avons pu remarquer qu'au cours de cette évaporation, les filaments se dissolvaient dans l'eau restante et s'agglutinaient sur les parois. Enfin, bien que la précision annoncée de la balance soit de 0,01 mg, les masses mesurées semblaient trop variables pour être interprétées.

Il est aussi important de garder à l'esprit que cette technique comporte beaucoup de variables de manipulation comme la quantité d'eau enlevée à la seringue qui peut contenir des molécules non visibles (dissoutes ou en petits agrégats qui n'auraient pas décanté après centrifugation) ou encore une masse mesurée variable suivant que la lecture est réalisée 5 min ou 1 heure après avoir posé le tube sur la balance. D'autant plus qu'on a choisi de laisser l'évaporation de l'eau se faire « naturellement » à la pression atmosphérique pour éviter des pertes supplémentaires, ce qui demande un temps de séchage bien trop long.

Suivi qualitatif :

Un suivi qualitatif des filaments formés a également été réalisé, pour déterminer leur solubilité sur le long terme (dans 10 mL d'eau), leur stabilité dans le temps et si un phénomène transformation morphologique en cristaux se fait, comme cela avait observé pour

le GalC7. Les filaments de gélifiant G3 ne sont toujours pas dissous 9 jours après leur formation. Ils ont été observés au microscope optique avec le microscope Olympus BX53, soit sous leur forme humide, soit après séchage sur lame de microscope.



Figure 55 : Observation d'un amas de gélifiant G3 sec de concentration massique de 1% formé à 50 µl/min



Figure 56 : Observation d'un amas de gélifiant G3 sec de concentration massique de 1% formé à 100 µl/min



Figure 57 : Observation d'un filament de gélifiant G3 sec de concentration massique de 3% formé à 50 $\mu\text{l}/\text{min}$



Figure 58 : Observation d'un filament de gélifiant G3 humide de concentration massique de 3% formé à 100 $\mu\text{l}/\text{min}$

On remarque une cristallisation pour tous les filaments et amas observés, mais celle-ci ne touche pas la totalité du filament, puisque celui-ci est toujours bien visible après 9 jours, et même après 2 mois dans 10 mL d'eau. Si tout avait cristallisé, comme les cristaux sont transparents, on ne verrait plus aucune formation blanche dans le récipient. Cependant, malgré la formation d'un filament bien défini au départ, et sa persistance sur le long terme, sa

structure est probablement affectée par ce phénomène de cristallisation partielle qui tend à le briser en petits fragments.

(iii) Observation par microscopie électronique à balayage des filaments fraîchement formés par wet-spinning

Préparation des échantillons :

Deux échantillons ont été préparés : un filament de gélifiant G3 de concentration égale à 2% formé par wet-spinning avec une vitesse d'extrusion de 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ et un autre de gélifiant G3 de concentration de 3% formé avec une vitesse d'extrusion de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. Ces deux filaments ont été formés dans un pot d'une contenance de 100 ml au fond duquel on dispose un tamis cellulaire lesté avec un plot, c'est-à-dire le support de l'échantillon utilisé dans ce type d'imagerie. Au fur et à mesure que le wet-spinning a lieu, le pot est déplacé de manière à faire tomber le filament sur le plot. Le surplus d'eau est ensuite retiré à l'aide d'une seringue de 50 ml dont l'embout est placé en dehors du tamis lors de l'aspiration d'eau. Ceci permet d'éviter d'éventuels flux qui risqueraient de déplacer le filament. Le reste d'eau est ensuite retiré à l'aide de la même seringue mais montée avec un embout de micropipette. L'aspiration a lieu, cette fois-ci, dans le tamis. Enfin, le plot contenant l'échantillon est récupéré à l'aide d'une pince et est asséché en périphérie à l'aide d'un papier buvard.



Figure 59 : Préparation des échantillons sur le plot d'échantillonnage

Les échantillons sont tout d'abord refroidis avec leur plot à -220°C dans de l'azote pâteux. Ils sont ensuite fracturés à une température de -145°C sous vide dans une chambre de cryo transfert dont le modèle est Quorum PP3000T. Le premier échantillon, c'est-à-dire le filament formé à partir du gélifiant G3 de concentration égale à 2% et extrudé à $40\ \mu\text{l}/\text{min}$ a ensuite subi une sublimation de 30 minutes à 110°C puis une seconde de 10 minutes à 90°C . En effet, beaucoup de glace était encore visible lors de la première observation. Le second échantillon, c'est-à-dire le filament formé à partir du gélifiant G3 de concentration égale à 3% et extrudé à $50\ \mu\text{l}/\text{min}$, a été sublimé à 110°C pendant 2 heures.

Les échantillons sont ensuite imprégnés de palladium pendant 60 secondes et introduits dans la chambre d'observation. La température est alors maintenue à -145°C . Le microscope utilisé afin d'observer les échantillons est le modèle FEG FEI Quanta 250.

Observations :

L'interprétation des images obtenues avec le gélifiant à 2 % est ambiguë. On remarque la présence de fibres, elles-mêmes composées de fibres plus petites. Celles-ci sont cependant encore rares. Mais on n'a pas la certitude que ces "fibres" ne soient pas liées à la glace encore très présente, venant altérer la lecture de ces images et orientant « faussement » ces fibres.

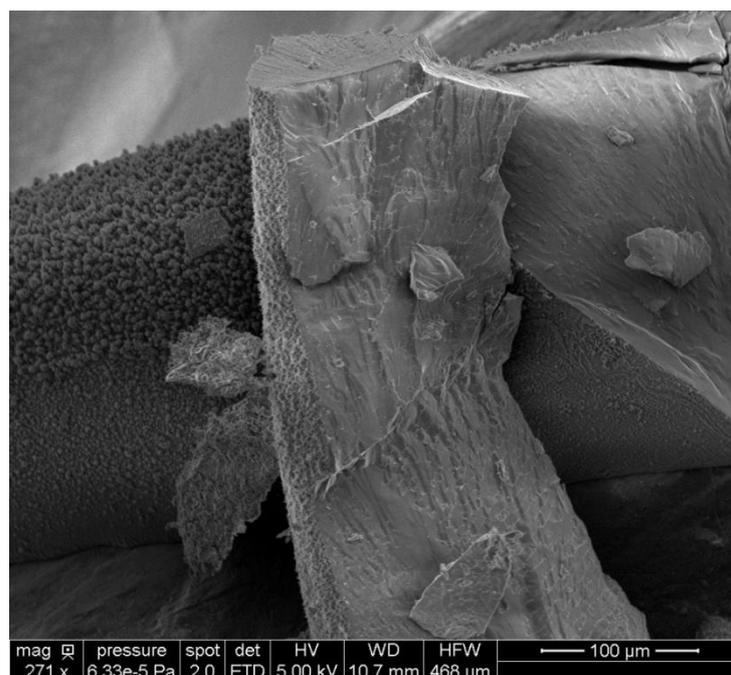


Figure 60 : Observation d'un filament de gélifiant G3 de concentration 2% extrudé à $40\ \mu\text{l}/\text{min}$ au MEB



Figure 61 : Observation d'un filament de géliifiant G3 de concentration 2% extrudé à 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ au MEB

C'est à cause de la présence de cette glace visible lors des premières observations, qu'il a été décidé de réaliser une sublimation d'une durée plus importante pour le second échantillon. Pour celui-ci, on remarque notamment une formation de nombreuses alvéoles à sa surface qui peuvent être expliquées par la formation de cristaux de glace ayant repoussé la structure. Cette formation d'alvéoles est un phénomène classiquement observé en cryo-MEB lorsque le refroidissement des hydrogels, quels qu'ils soient, est fait dans l'azote pâteux. Il y a donc probablement une déformation de la structure native du gel à cause de cette formation de glace. Cependant, les observations des parois des alvéoles et de leur densité, leur organisation relative reste cependant instructive sur la structure initiale du gel. Contrairement à l'échantillon précédent, on ne constate pas la présence de fibres bien définies pour celui-ci mais plutôt des feuillets, observables au niveau des parois des alvéoles. Certains semblent bien plats, voire même alignés, mais seulement à certains endroits. Ailleurs, ce sont plutôt des plaques ondulées, compactées avec une répartition aléatoire. Certains alignements radiaux en feuillets pourraient correspondre à ce qui a été observé pour le GaC7, compatibles avec la fuite du DMSO et l'entrée d'eau dans le filament lors du wet-spinning, puisque perpendiculaires à la bordure de la structure. Ces observations demandent à être confirmées

en utilisant une technique induisant moins d'artéfacts liés à la glace, que l'on peut espérer en utilisant une technique de congélation de l'échantillon à haute pression.

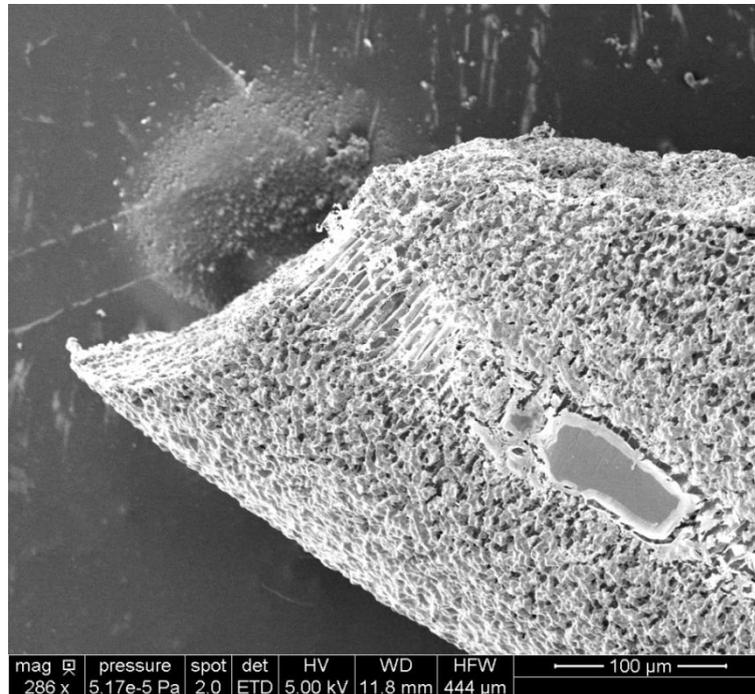


Figure 62 : Observation d'un filament de gélifiant G3 de concentration 3% extrudé à 50 µl/min au MEB

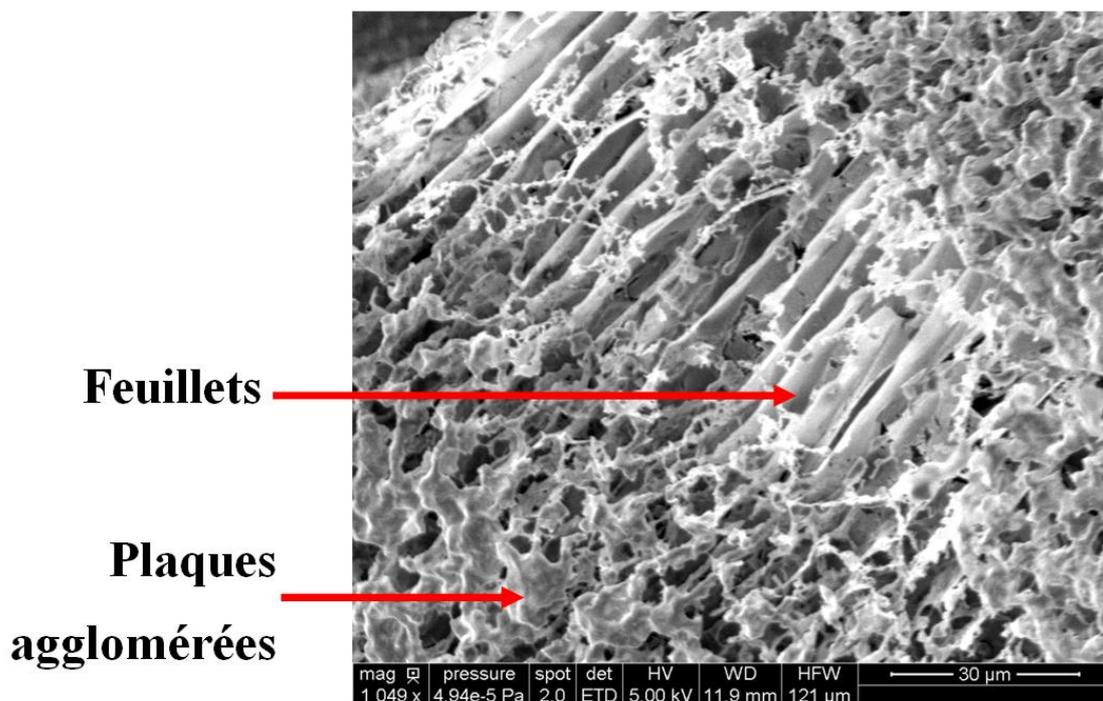


Figure 63 : Observation de la même d'un filament de gélifiant G3 de concentration 3% extrudé à 50 µl/min au MEB et à plus fort grossissement

Interprétations :

Le Gal-C7 présentait, lui, une structure en fibres dont l'orientation radiale très marquée semblait régie par la diffusion de l'eau au sein de la corde liquide de DMSO pendant le wet-spinning. Cependant, le gélifiant G3 étudié semble former une structure poreuse en plaques plutôt d'en fibres et présente donc une structure microscopique très différente.

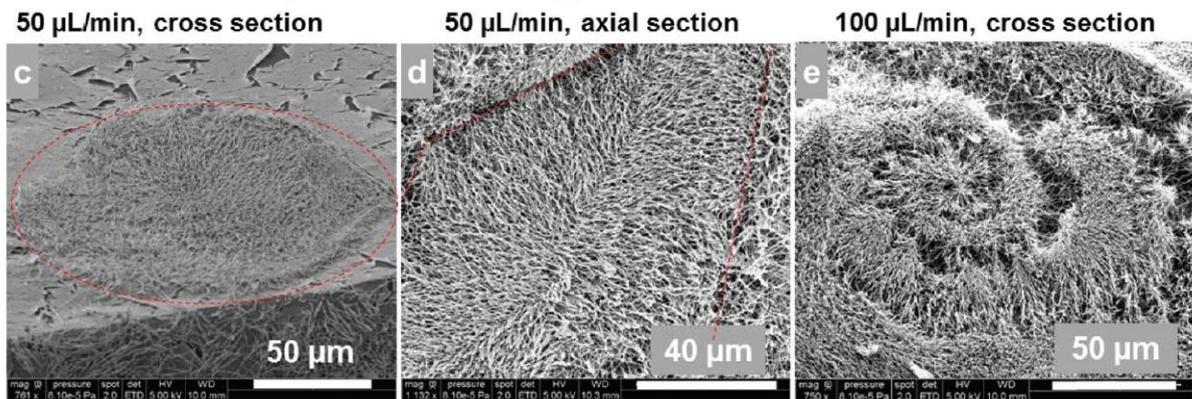


Figure 64 : Observation de filaments de Gal-C7 de concentration égale à 5% formés par wet spinning à différentes vitesses d'extrusion¹⁶

Cependant, la formation de cristaux de glace à l'origine de l'apparence alvéolaire de la structure semble compromettante pour une bonne caractérisation des filaments formés. C'est pourquoi il a été décidé de réaliser une observation microscopique à balayage de ces filaments mais après une sublimation à haute pression.

b. Wet-spinning du gélifiant G2

(i) Diagramme de phases du wet-spinning du gélifiant G2

Comme précédemment pour le gélifiant G3, cinq phases ont pu être distinguées lors du wet-spinning du gélifiant G2 :

- Formation d'un bouchon ou « cloag » au bout de l'aiguille empêchant la création du filament
- Formation d'un filament mais qui peut être interrompu par la formation d'un ou plusieurs « cloag »
- Formation d'un filament fin et continu
- Formation d'un filament fin et continu avec prise tardive dans le bain d'eau déionisée
- Amas résultant de la prise tardive d'un gel non formé

Ces différentes phases sont ensuite répertoriées dans un diagramme :

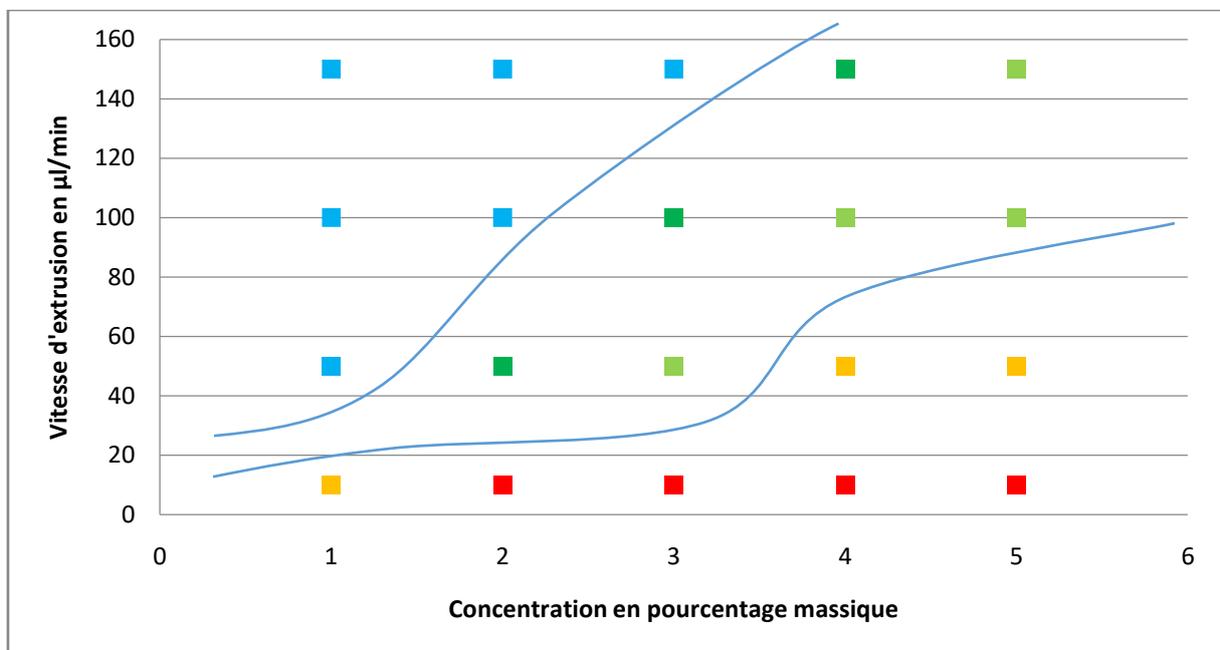


Figure 65 : Diagramme de phases lors du wet-spinning du gélifiant G2 en fonction de sa concentration dans la solution initiale et de la vitesse d'extrusion avec :

- En **rouge**, la formation d'un bouchon ou « cloag » au bout de l'aiguille empêchant la création du filament
- En **orange**, la formation d'un filament mais qui peut être interrompu par la formation d'un ou plusieurs « cloag »
- En **vert clair**, la formation d'un filament fin et continu
- En **vert foncé**, la formation d'un filament fin et continu avec prise tardive dans le bain d'eau déionisée
- En **bleu**, la formation d'un amas résultant de la prise tardive d'un gel non formé

Pour le gélifiant G2, on constate une fenêtre d'action suffisamment large, notamment en terme de concentration, ce qui devrait affecter la densité du filament. Cependant, un quatrième état du filament a pu être mis en évidence. En effet, un filament fin et continu a pu être formé mais a été interrompu par la formation d'un ou plusieurs « cloag » le rendant donc difficile à obtenir correctement. De même que pour le gélifiant G3, un effet « pulse » du pousse seringue a pu être remarqué à des vitesses d'extrusion de 150 et 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, ce qui a perturbé la formation d'un filament fin et continu.

(ii) Suivi des filaments formés par wet-spinning sur le court terme

De la même façon que pour G3 et pour limiter un éventuel phénomène de dissolution, 40 mL d'eau ont été retirés des flacons, puis les filaments sont observés, soit immédiatement après formation, soit après plusieurs jours. Ici, seuls les filaments jugés corrects ont été observés avec le microscope Olympus BX53. Ces filaments sont ceux formés avec une concentration massique de 2% et extrudé à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, puis avec une concentration massique de 3% et extrudé à 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, puis avec une concentration massique de 4% et extrudé à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ et enfin celui avec une concentration massique de 5% et extrudé à 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. Les filaments ont été prélevés dans 50 μl à l'aide d'une micropipette avec un cône tronqué pour limiter le cisaillement du filament. Ils ont ensuite été déposés sur une lame et observés à même la goutte d'eau déionisée dans un premier temps. Dans un second temps, ces lames ont été séchées sous cloche pendant 24h et ré-observées au microscope une fois sèches.

Seules les images les plus caractéristiques seront présentées ici.



Figure 66 : Observation d'un filament de gélifiant G2 de concentration massique de 5% formé à 50 $\mu\text{l}/\text{min}$, humide, après formation

On constate un agencement en « queue de chat » des fibres de gélifiant G2 lors du wet-spinning. Il y donc une « vertèbre » plus dense du filament entourée de fibres qui rayonnent autour de celle-ci.



Figure 67 : Observation d'un filament de gélifiant G2 de concentration massique de 4% formé à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, suite à 24h de séchage après formation

Ici, on constate que cet agencement est marqué lors du séchage et on observe assez nettement des fibres de gel. Les images en microscopie optique étant similaires pour le GalC7 (aspect en "queue de chat", fibres hérissées en périphérie, centre plus sombre), ces observations pour le

gélifiant G2 laissent penser que celui-ci forme également des fibres supramoléculaires organisées radialement

Cependant, ces observations en microscopie optique ont permis de déceler une cristallisation importante des filaments, seulement 24h après leur formation.

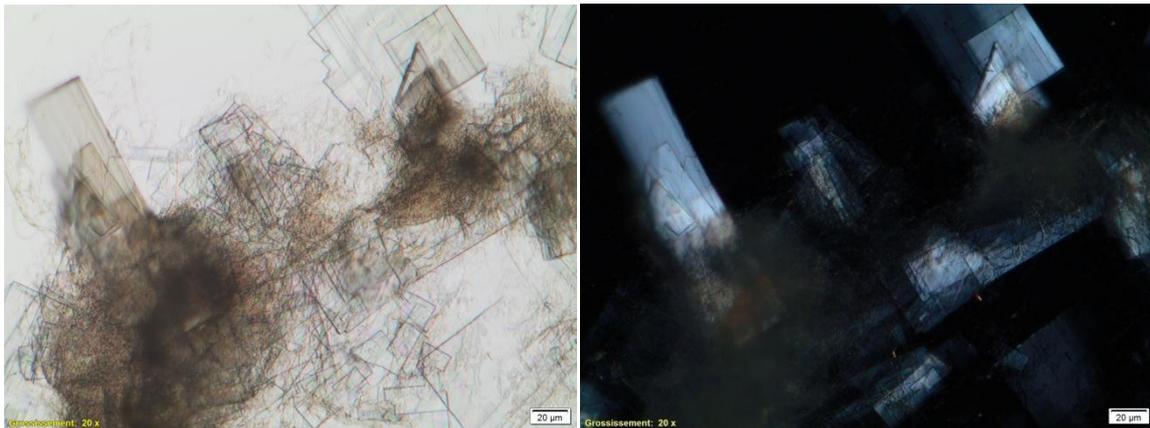


Figure 68 : Observation d'un filament de gélifiant G2 de concentration massique de 4% formé à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, humide, 24h après formation

A gauche, en lumière blanche

A droite, en lumière polarisée

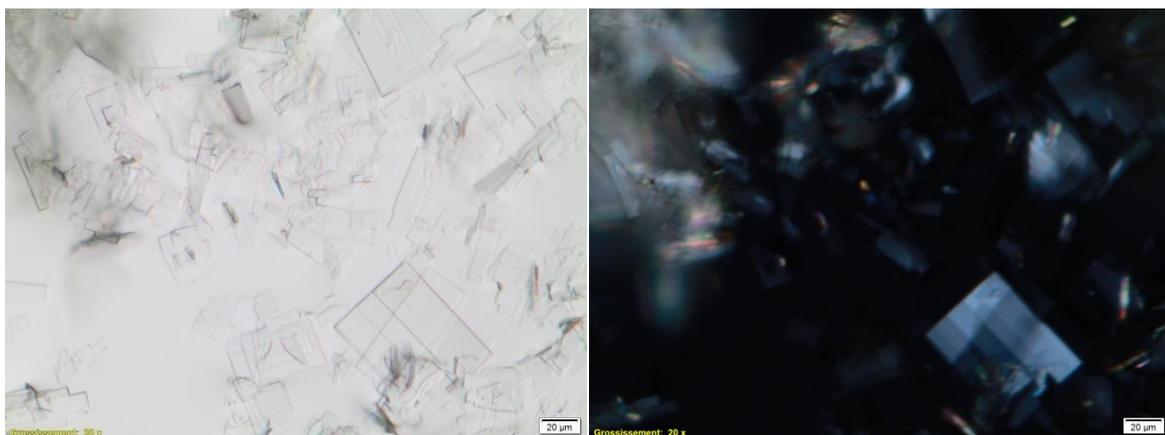


Figure 69 : Observation d'un filament de gélifiant G2 de concentration massique de 4% formé à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, humide, 48h après formation

A gauche, en lumière blanche

A droite, en lumière polarisée

3 - Interprétations

En conclusion de cette expérience, nous pourrions affirmer que ces études préliminaires nous permettent d'identifier les caractéristiques, les atouts et les désavantages de chacun des ces deux gélifiants en wet-spinning.

Le gélifiant G3 présente tout d'abord une fenêtre d'action en wet-spinning large ce qui le rend polyvalent. Il paraît donc prometteur pour certains tests d'impressions 3D. Cependant, bien qu'il soit très résistant dans l'eau déionisée puisqu'il ne se dissout pas après 9 jours ou même deux mois, le phénomène de cristallisation partielle semble parasiter cette endurance.

Le gélifiant G2 possède lui aussi une large fenêtre d'action. Toutefois, la formation d'un filament fin et continu semble être plus difficile car ce phénomène a pu être parasité par la présence de « cloag » ou d'effet « pulse » du pousse seringue. De plus, les gels formés se dissolvent plus facilement dans l'eau déionisée et le phénomène de cristallisation semble beaucoup plus rapide pour ce gélifiant puisqu'il envahit la structure formée seulement 24h après sa formation.

III - « Impression 3D » de Gal-C7

Il a été montré que la technique de wet spinning peut être transposée à l'impression 3D dans le cas du gélifiant GalC7 (travaux d'Anaïs Chalard¹⁶). Ces premiers essais ont été réalisés à l'aide d'une plateforme motorisée en XY (mais pas en Z) en collaboration avec le LAAS. Un équipement équivalent est en cours de développement au laboratoire des IMRCP (par Jean-Michel Martin, service d'électronique de l'Institut de Chimie de Toulouse), afin de pouvoir tester facilement diverses "encres" d'impression. Certaines particularités de l'impression des gélifiants moléculaires (aiguille mobile, lit fixe, extrusion d'un liquide et non d'une pâte, contrôle de la vitesse d'extrusion et non pas de la pression, extrusion à température ambiante) font que la plupart des imprimantes 3D du marché "grand public" sont incompatibles avec la technique et nécessite alors ce développement "maison". Les travaux présentés constituent donc les premiers essais d'impression avec ce prototype d'imprimante 3D "maison", avec des ajustements nécessaires.

1 - Etude préliminaire

Une modélisation en trois dimensions est tout d'abord dessinée avec un logiciel 3D. Dans notre cas, nous utilisons Google Sketchup. Le fichier est ensuite exporté en format .STL.

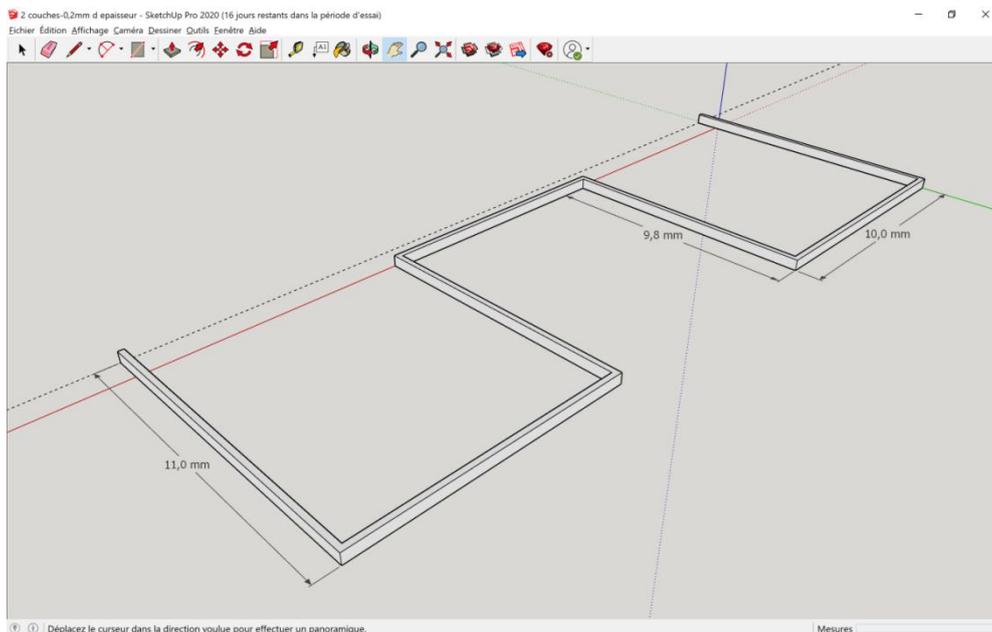


Figure 70 : Exemple de modélisation sur Google Sketchup Pro 2020

Dans un second temps, pour permettre son impression en couches, celui-ci est « découpé » en utilisant un « slicer ». Ce second logiciel permet de diviser l'objet dessiné en couches horizontales à la manière d'un scanner et exporte alors ce fichier en G-code, c'est-à-dire une suite de commandes permettant sa réalisation. Nous utilisons, ici, le logiciel Repetier-Host qui travaille via le logiciel Slic3r pour convertir les modèles 3D.

Une imprimante 3D a été montée grâce à une carte de la marque Arduino. Celle-ci sert de traducteur et permet de convertir les commandes en G-code issus de l'interface utilisateur, ici le logiciel Repetier-Host, en impulsions vers les 3 moteurs de cette imprimante. Les trois moteurs mettent en mouvements des vis sans fins sur 3 axes : l'axe X agissant de gauche à droite, l'axe Y agissant sur la profondeur et enfin l'axe Z agissant sur la hauteur. Ainsi, un point situé dans la zone de travail, comme une aiguille reliée à une seringue contenant du gélifiant, par exemple, peut être déplacé en trois dimensions. La surface de dessin a été

définie dans un cristallisateur de 15 cm de diamètre, permettant un travail à partir de l'origine du repère.

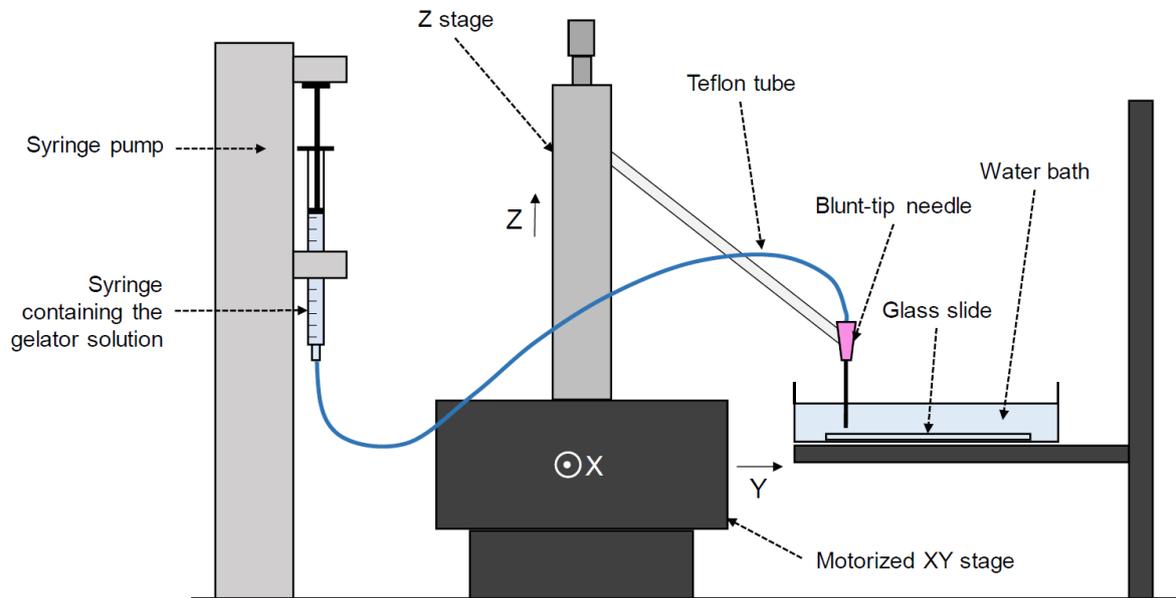


Figure 71 : Schéma du montage d'impression 3D¹⁷

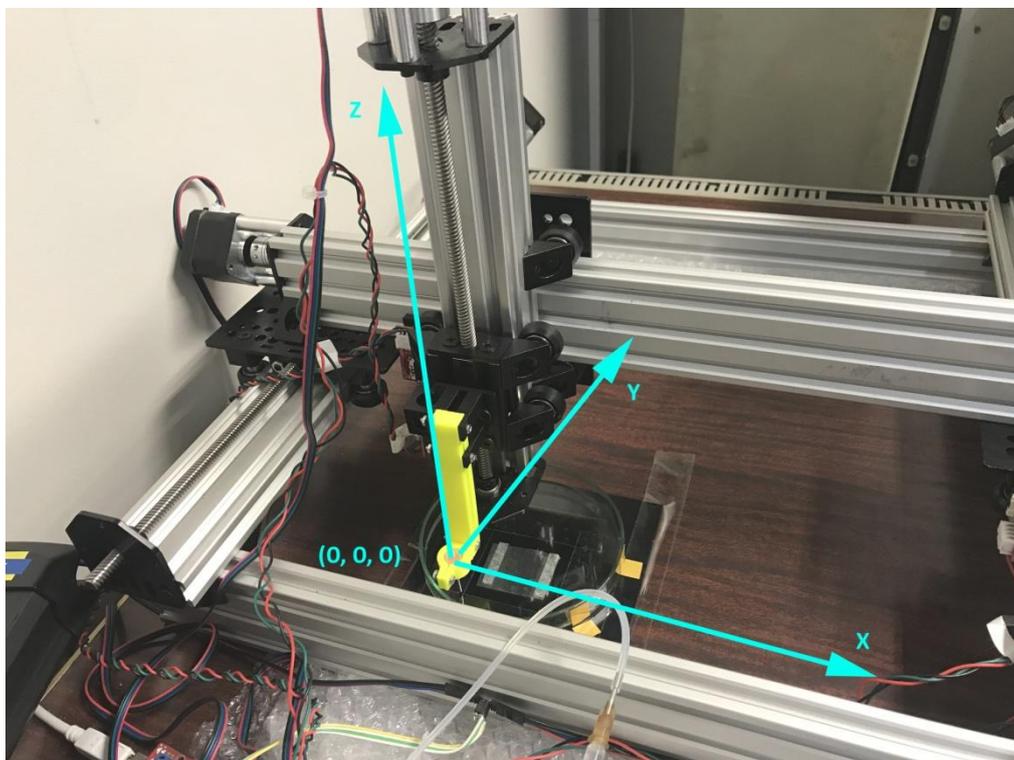


Figure 72 : Photographie de l'imprimante 3D avec ses différents axes de travail

L'imprimante 3D utilisée a été fabriquée de toutes pièces. Dans cette partie, on cherche à trouver un ensemble de conditions permettant l'impression du modèle 3D avec du gel. Ces paramètres sont nombreux, parmi ceux-ci on compte :

- La nature et la concentration du gélifiant utilisé
- Le diamètre interne de l'aiguille sur la tête d'impression
- La distance entre l'aiguille sur la tête d'impression et le fond du cristalliseur
- La vitesse d'extrusion réglée sur le pousse-seringue
- La vitesse de déplacement de la tête d'impression sur les différents axes : X, Y et Z

Afin de pouvoir définir au mieux les paramètres à étudier et donc les variables, les travaux précédemment réalisés avec le GalC7 ont été analysés (thèse A. Chalard).

Dans cette étude initiale, le facteur limitant la bonne création du modèle 3D était l'adhérence de celui-ci au fond du support. Pour améliorer cela, plusieurs membranes poreuses ont été testées mais c'est la membrane de polycarbonate qui permet la meilleure adhésion et qui a été conservée dans les tests réalisés ici.

Les diagrammes suivants représentent des diagrammes d'adhésion du filament formé en fonction de plusieurs paramètres, dans le cas du GalC7 :

- la vitesse d'extrusion de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ ou de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$
- le diamètre interne de l'aiguille, 0,406 mm pour une aiguille de 22G ou 0,330 mm pour une aiguille de 23G
- la distance entre l'aiguille et le fond du support de 0,5 à 5 mm
- la vitesse de la tête d'impression sur les axes X et Y de 2 à 6 mm/s

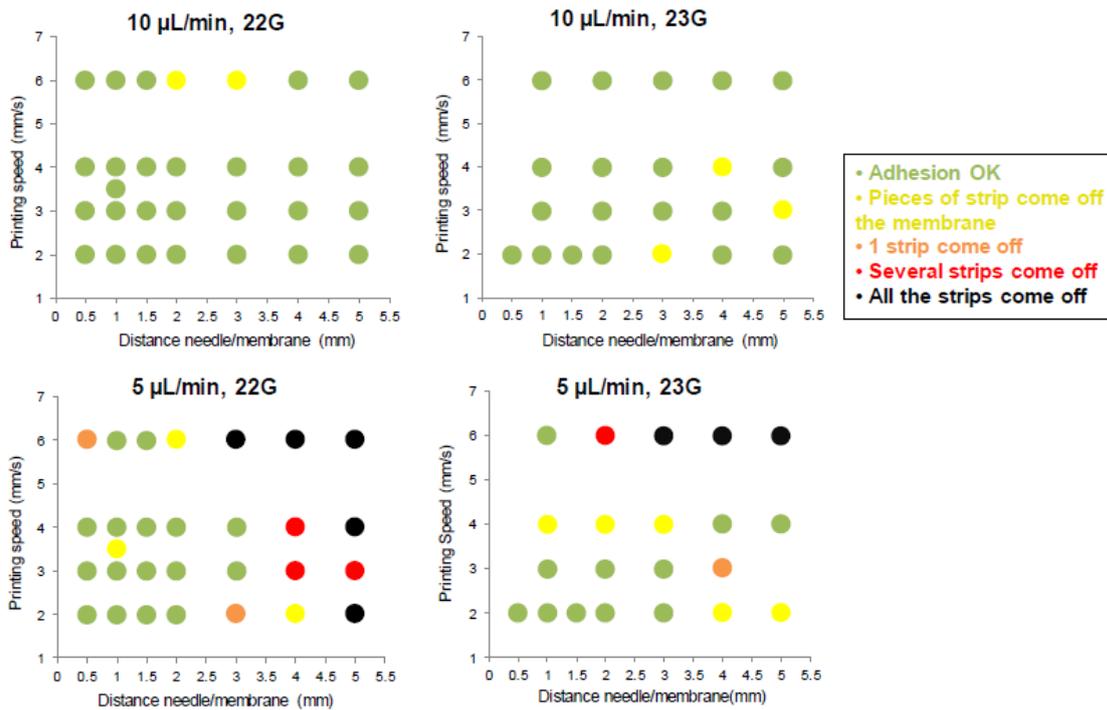


Figure 73 : Diagramme d'adhésion du modèle 3D en fonction de plusieurs paramètres, pour le géliifiant Gal-C7 à 2,5% massique¹⁶

- la vitesse d'extrusion de 5 µl/min ou de 10 µl/min
- le diamètre interne de l'aiguille, 0406 mm pour une aiguille de 22G ou 0,330 mm pour une aiguille de 23G
- la distance entre l'aiguille et le fond du support de 0,5 à 5 mm sur l'axe des abscisses
- la vitesse de la tête d'impression sur les axes X et Y de 2 à 6 mm/s sur l'axe des ordonnées

On constate que l'adhésion semble être optimale pour une vitesse d'extrusion de 10 µl/min avec une distance entre l'aiguille et le fond du support de 2 mm voire moins. Sauf pour les vitesses les plus grandes (6 mm/s), la vitesse de la tête d'impression influence beaucoup sur cette adhésion, tout comme le diamètre interne de l'aiguille utilisé.

2 - Protocole expérimental

Le modèle 3D qui sera utilisé par la suite est une serpentine dont la ligne du début et celle de fin ont été allongées. Il est représenté dans la figure 70. Cela permet donc de réaliser un motif en deux couches avec un passage de la première couche à la seconde en une seule ligne droite.

Le choix de créer un motif en deux couches a été décidé pour augmenter la visibilité du motif dans l'eau déionisée. De plus, l'étude précédente avait montré une adhésion plus importante du filament de la seconde couche sur celui de la première couche.

Le gélifiant utilisé dans cette expérience est le gélifiant GalC7 dilué dans du DMSO avec une concentration massique de 2,5%. L'impression 3D de ce gélifiant est donc connue, mais avec une autre machine. Ce gélifiant est disponible en assez grande quantité au laboratoire, permettant alors de mettre au point l'imprimante 3D sans gaspiller des gélifiants plus précieux. Deux aiguilles ont été testées : une première aiguille de 22G, ce qui correspond à un diamètre interne de 0,406 mm et une aiguille de 30G, ce qui correspond à un diamètre interne de 0,140 mm. La distance entre l'aiguille et le fond du cristalliseur a été fixée à 1,9 mm. Enfin, la vitesse d'extrusion du pousse seringue a été testée de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ à 10 voire 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ et la vitesse de déplacement de la tête d'impression a été testée de 2 mm/s à 6 mm/s.

3 - Résultats

Pour interpréter ces résultats, on objective quatre états possibles de la figure réalisée, correspondant aux quatre états du filament définis lors des tests en wet-spinning :

- La prise du gélifiant n'a pas lieu, la figure n'est pas visible.
- La figure est visible, mais le dépôt semble large et peu défini.
- La figure est bien visible, les contours sont définis et nets.
- La figure est fine voire discontinue, des « cloags » apparaissent.
- La figure n'est pas réalisée, un « cloag » empêche sa formation.

On traduit ensuite ces quatre états de la figure en couleurs assimilables à celles utilisées lors de l'expérience du wet-spinning.

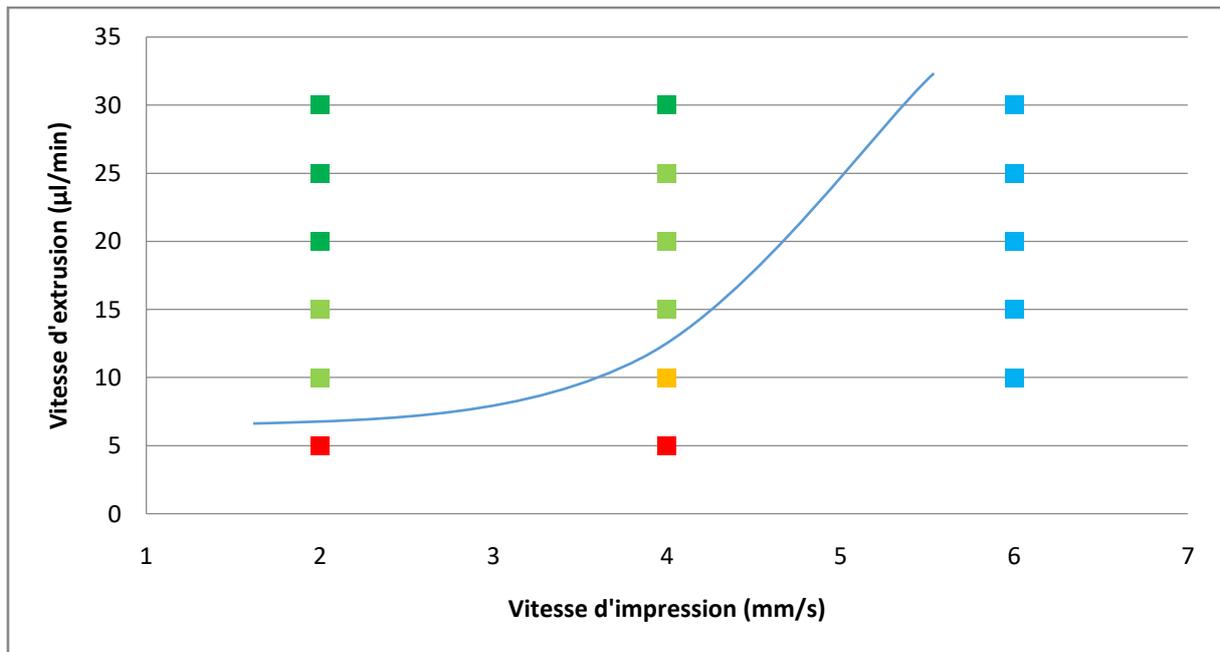


Figure 74 : Diagramme de phases de la figure réalisée en 3D printing à l'aide d'une aiguille de 22G dont le diamètre interne est égal à 0,406 mm en fonction de la vitesse de la tête d'impression en mm/s sur l'axe des abscisses et de la vitesse d'extrusion sur le pousse seringue en µl/min sur l'axe des ordonnées.

- En **bleu**, la prise du gélifiant n'a pas lieu, la figure n'est pas visible.
- En **vert foncé**, la figure est visible, mais le dépôt semble large et peu défini.
- En **vert clair**, la figure est bien visible, les contours sont définis et nets.
- En **orange**, la figure est fine voire discontinue, des « cloags » apparaissent.
- En **rouge**, la figure n'est pas réalisée, un « cloag » empêche sa formation.

On constate, pour ce test réalisé avec une aiguille de 22G, que la vitesse d'impression de 6 mm/s semble trop élevée. En effet, aucune des figures n'a pu être correctement réalisée. Les vitesses d'impression idéales semblent être 2 mm/s et 4 mm/s. De plus, on constate une fenêtre d'action assez large en ce qui concerne les vitesses d'extrusions, cette fenêtre peut notamment aller de 10 µl/min jusqu'à 30 µl/min. Toutefois, pour chacune des vitesses d'impression, on constate des vitesses d'extrusion optimales.

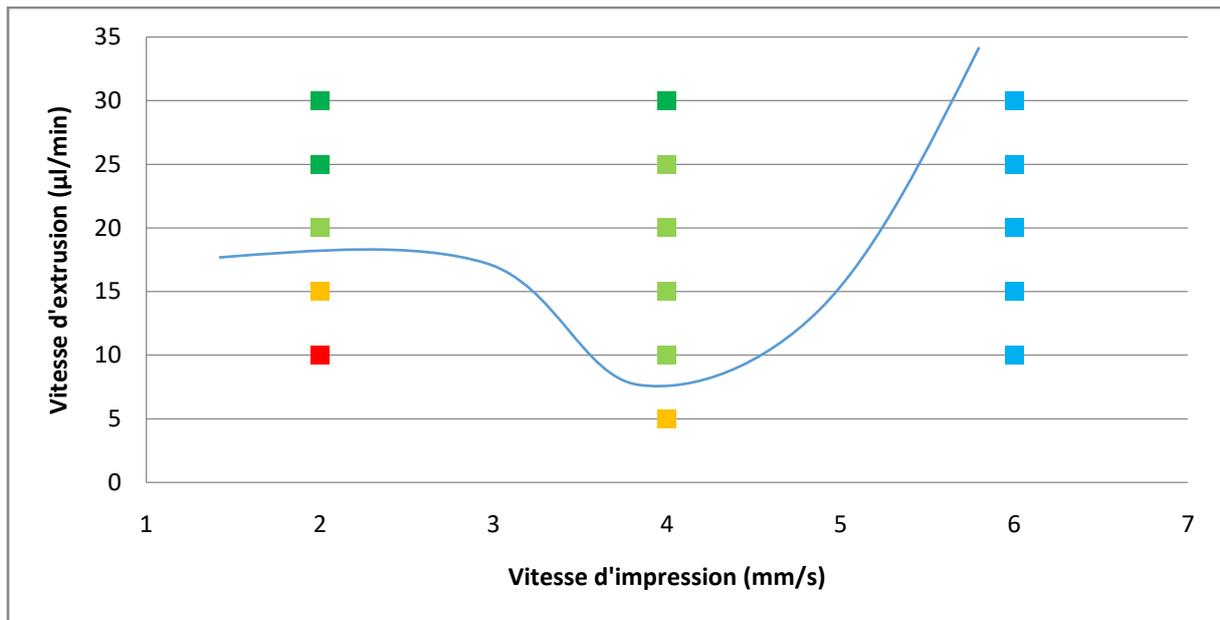


Figure 75 : Diagramme de phases de la figure réalisée en 3D printing à l'aide d'une aiguille de 30G dont le diamètre interne est égal à 0,140 mm en fonction de la vitesse de la tête d'impression en mm/s sur l'axe des abscisses et de la vitesse d'extrusion sur le pousse seringue en µl/min sur l'axe des ordonnées.

- En **bleu**, la prise du gélifiant n'a pas lieu, la figure n'est pas visible.
- En **vert foncé**, la figure est visible, mais le dépôt semble large et peu défini.
- En **vert clair**, la figure est bien visible, les contours sont définis et nets.
- En **orange**, la figure est fine voire discontinue, des « cloags » apparaissent.
- En **rouge**, la figure n'est pas réalisée, un « cloag » empêche sa formation.

Tout comme pour le test précédent, lors de ce test réalisé avec une aiguille de 30G, nous avons pu constater une impossibilité de former une figure à partir d'une vitesse d'impression de 6 mm/s. Toutefois, dans ce cas, une vitesse d'impression optimale semble se distinguer, celle de 4 mm/s. C'est à cette vitesse que la formation de figures jugées « correctes » a été le plus possible. L'aiguille étant plus petite que pour le test précédent, il a été plus facile d'obtenir une figure avec des contours nets et définis.

Cependant, on observe dans le cas de l'aiguille 30G que le motif est constitué d'une succession d' "ondulations", au lieu d'être des traits droits. Ceci est lié aux vibrations produites par le déplacement des axes de l'imprimante, et qui empêche donc d'avoir un motif "propre". Cet effet est beaucoup moins visible dans le cas de l'aiguille 22G. Ceci est peut-être lié au fait que le jet de DMSO est plus large, donc plus "lourd" et donc pourrait être moins sensible aux

vibrations. L'autre interprétation serait que le jet plus large prend moins vite au contact de l'eau. Le dépôt a donc le temps de s'étaler de façon uniforme avant de prendre en gel.



Figure 76 : Photographie de la figure en 2 couches réalisée avec une vitesse d'impression de 4 mm/s, une vitesse d'extrusion de 20 μ l/min et une aiguille de 30G



Figure 77 : Photographie de la figure en 2 couches réalisée avec une vitesse d'impression de 4 mm/s, une vitesse d'extrusion de 15 μ l/min et une aiguille de 22G

4 - Interprétations

Cette expérience est à mettre en comparaison avec les expériences de wet-spinning réalisées précédemment. En effet, l'impossibilité à obtenir une figure visible à des vitesses d'impression élevées peut être assimilée à la formation de amas visibles précédemment. Lorsque la vitesse d'impression est trop élevée, la quantité de solution déposée par unité de surface est plus faible, ce qui la rend moins visible et plus facilement dispersée par les mouvements de flux autour de l'aiguille en mouvement. La concentration locale en gélifiant n'est alors plus assez forte pour permettre la formation d'un gel continu. Il a d'ailleurs été possible de voir les volutes de diffusion du DMSO dans l'eau faisant des mouvements aléatoires.

Lorsque cette fois-ci la vitesse d'impression est diminuée, nous avons pu constater la formation d'une figure plus ou moins définie et plus ou moins propre. Lorsqu'elle l'était moins définie, plus large, mais régulière, cela pouvait être assimilé à une prise de filament tardive. Le gélifiant dispose alors de temps pour s'étaler au fond du cristalliseur avant de gélifier.

Enfin, la formation d'une figure fine associée à l'apparition d' "ondulations" peut être expliquée par une réduction du diamètre de l'aiguille due à une prise du gel plus rapide, avant qu'il ait le temps de s'étaler uniformément sur la surface.

Ces expériences sur cette imprimante "maison" ont permis de valider pour la première fois le fonctionnement de cet instrument pour l'impression des gélifiants moléculaires. L'impression en elle-même est donc bien validée, mais il reste à améliorer le système en trouvant comment réduire les vibrations. Il peut s'agir d'un réglage mécanique des roues, des tiges filetées, du poids du chariot portant la tête d'injection et l'axe z, ou bien d'un réglage informatique et électronique lié à la qualité du slicer, à la finesse des impulsions données et au réglage des accélérations.

Conclusion de l'étude expérimentale :

Cette étude expérimentale, qui avait pour but de caractériser différents gélifiants moléculaires saccharidiques en vue d'applications biologiques, nous a permis de définir des fenêtres d'action pour les utilisations prochaines.

L'étude en compression nous a notamment permis de définir un protocole de travail bien qu'il ne nous a pas été possible de tirer profit des résultats obtenus. Il sera donc intéressant, par la suite, de reprendre cette étude mais en utilisant préférentiellement la machine BOSE, plus sensible que le rhéomètre Anton PAAR, mais avec l'inconvénient de nécessiter 3 à 4 fois plus de produit (gélifiant et protéines). Le but étant d'obtenir un matériau dont la résistance mécanique serait similaire à celle du cerveau et plus élastique que le gel pur.

En ce qui concerne le wet-spinning des gélifiants G2 et G3, des fenêtres d'action ont pu être définies en vue d'optimiser la caractérisation de filaments continus et stables que ce soit au moment même de leur formation ou lors de leur évolution dans le temps. Les études en microscopie électronique à balayage nous ont tout d'abord permis de mettre en évidence certaines tendances sur la structure microscopique de ces filaments mais la technique permettant leur réalisation doit encore être approfondie afin de permettre une meilleure caractérisation de ceux-ci. Il pourrait alors être intéressant de réaliser des microscopies électroniques à transmission de ces filaments afin de confirmer ou d'infirmer leur organisation supposée linéaire ou radiale. La cristallisation des filaments, qui peut être perçue comme un facteur limitant la culture cellulaire, peut être précisée par des tests dans des volumes d'eau différents. Ici, on rappelle que 50 μ l de filament avait été formé dans 50 ml d'eau mais que 40 ml de cette eau avait été retiré.

Il est possible de rendre ces gélifiants compatibles à la technique d'impression 3D via la technique du wet-spinning. L'imprimante utilisée étant encore sous forme de prototype, il semble intéressant de pouvoir définir les fenêtres d'action optimales pour la réalisation de figures plus ou moins complexes. Ces fenêtres alors définies, c'est une multitude de possibilités qui s'offre à nous pour le travail des gélifiants. On peut alors étudier l'évolution sur le long terme de ces figures, l'optimisation de celles-ci à la culture cellulaire par une structuration plus ou moins complexe ou encore l'utilisation d'autres gélifiants comme les gélifiants G2 ou G3.

Pour finir, cette étude a permis la caractérisation physique de ces gélifiants moléculaires saccharidiques mais il est utile de rappeler que leur biocompatibilité est tout aussi importante en vue de leur application en médecine régénérative. C'est pourquoi l'évaluation de cette biocompatibilité pourrait être intéressante, que ce soit sur gels dits en « bulk », c'est-à-dire formés par simple refroidissement comme pour l'expérience de tests en compression ou sur filaments formés par wet-spinning ou impression 3D.

Annexes :

Nom	Mots clefs	Nombre d'articles
Collagène	Scaffold, Cell culture, collagen	1933
Chitosane	Scaffold, Cell culture, chitosan	692
Polycaprolactone	Scaffold, Cell culture, PCL	606
Alginate	Scaffold, Cell culture, alginate	454
Soie	Scaffold, Cell culture, silk	373
Acide hyaluronique	Scaffold, Cell culture, hyaluronan ET Scaffold, Cell culture, hyaluronic	361
Acide polylactique-co-glycolique	Scaffold, Cell culture, PLGA	290
Peptide auto-assemblés	Scaffold, Cell culture, self assembling	239
Fibrine	Scaffold, Cell culture, fibrin	238
Cellulose	Scaffold, Cell culture, cellulose	230
Fibronectine	Scaffold, Cell culture, fibronectin	223
Acide polylactique	Scaffold, Cell culture, PLA	177
Polyéthylène glycol	Scaffold, Cell culture, PEG	177
Laminine	Scaffold, Cell culture, laminin	136
Agarose	Scaffold, Cell culture, agarose	98
Polydiméthylsiloxane	Scaffold, Cell culture, PDMS	84
Acide polyglycolique	Scaffold, Cell culture, PGA	45
Polypyrrole	Scaffold, Cell culture, Ppy	28

Les critères de bases sont tous les mêmes : articles écrits durant ces 5 dernières années, sans les "review".

Annexe 1 : Mots clefs et critères de choix utilisés pour comptabiliser le nombre d'articles évoquant les différents supports utilisés en culture cellulaire

Nom	Mots clefs	Nombre	Tri manuel	Nombre final
Collagène	Neuron*, Culture, Collagen, - Breast, - Myocyte, - Stress, - Wound healing	135	0	135
Matrigel	Neuron*, Culture, Matrigel*	49	9	40
Acide hyaluronique	Neuron*, Culture, Hyaluronic*, - Delivery ET Neuron*, Culture, Hyaluronan*, - Delivery	50	13	37
Alginate	Neuron*, Culture, Alginate*	41	5	36
Chitosane	Neuron*, Culture, Chitosan*, - Delivery	39	4	35
Laminine	Neuron*, Culture, Laminin*, Scaffold*	43	12	31
Polycaprolactone	Neuron*, Culture, Caprolactone*	29	4	25
Soie	Neuron*, Culture, Silk*, - Delivery	27	4	23
Acide polylactique	[Neuron*, Culture, Lactic*, Poly*, - Delivery] - [Nombre d'articles traitant de PLGA]	17	0	17
Peptide auto-assemblés	Neuron*, Culture, Self assembling*, - Hydrogel*, Peptide*	20	4	16
Polyéthylène	Neuron*, Culture, Ethylene*, - Elect*, - Toxicity	22	7	15
Acide polylactique-co-glycolique	Neuron*, Culture, Lactic*, Poly*, - Delivery, Glycolic*	13	0	13
Agarose	Neuron*, Culture, Agarose*	18	6	12
Cellulose	Neuron*, Culture, Cellulose*	15	4	11
Fibrine	Neuron*, Culture, Fibrin,- Delivery, - Toxic, - Hydrogel	12	2	10
Fibronectine	Neuron*, Culture, Fibronectine*, Scaffold*	14	6	8
Puramatrix	Neuron*, Culture, Puramatrix*	5	0	5
Polydiméthylsiloxane	Neuron*, Culture, Siloxane*	3	0	3
Polypyrrole	Neuron*, Culture, Pyrrole*	3	1	2
Acide polyglycolique	Neuron*, Culture, Glycolic*, - Lactic*	1	0	1

Les critères de bases sont tous les mêmes : articles écrits durant ces 5 dernières années, sans les "review".

De la même manière, une différence a été réalisée entre les articles évoquant l'acide polylactique et l'acide polylactique-co-glycolique afin de ne trouver que ceux qui évoquent l'acide polylactique. Le nombre d'articles évoquant l'acide poly glycolique a ensuite été déterminé dans un second temps.

Annexe 2 : Mots clefs et critères de choix utilisés pour comptabiliser le nombre d'articles évoquant les différents supports utilisés en culture cellulaire neuronale

Bibliographie :

- (1) ABOUNA, G.M., 2008. Organ Shortage Crisis: Problems and Possible Solutions. In : *Transplantation Proceedings*. janvier 2008. Vol. 40, n° 1, p. 34-38. DOI 10.1016/j.transproceed.2007.11.067.
- (2) ADAMS, Katrina L. et GALLO, Vittorio, 2018. The diversity and disparity of the glial scar. In : *Nature Neuroscience*. janvier 2018. Vol. 21, n° 1, p. 9-15. DOI 10.1038/s41593-017-0033-9.
- (3) ADAMS, Robert D., RENDELL, Sara R., COUNTS, Lauren R., PAPKE, Jason B., WILLITS, Rebecca K. et HARKINS, Amy B., 2014. Electrical and Neurotrophin Enhancement of Neurite Outgrowth Within a 3D Collagen Scaffold. In : *Annals of Biomedical Engineering*. juin 2014. Vol. 42, n° 6, p. 1282-1291. DOI 10.1007/s10439-014-1001-0.
- (4) ALI, Shahzad, WALL, Ivan B., MASON, Chris, PELLING, Andrew E. et VERAITCH, Farlan S., 2015. The effect of Young's modulus on the neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. In : *Acta Biomaterialia*. octobre 2015. Vol. 25, p. 253-267. DOI 10.1016/j.actbio.2015.07.008.
- (5) ALTMAN, J., 1962. Are New Neurons Formed in the Brains of Adult Mammals? In : *Science*. 30 mars 1962. Vol. 135, n° 3509, p. 1127-1128. DOI 10.1126/science.135.3509.1127.
- (6) ANON., 2020. Brain Basics: The Life and Death of a Neuron. In : [en ligne]. 23 avril 2020. Disponible à l'adresse : <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/Patient-CareGiver-Education/Life-and-Death-Neuron>.
- (7) ARULMOLI, Janahan, WRIGHT, Heather J., PHAN, Duc T.T., SHETH, Urmi, QUE, Richard A., BOTTEN, Giovanni A., KEATING, Mark, BOTVINICK, Elliot L., PATHAK, Medha M., ZAREMBINSKI, Thomas I., YANNI, Daniel S., RAZORENOVA, Olga V., HUGHES, Christopher C.W. et FLANAGAN, Lisa A., 2016. Combination scaffolds of salmon fibrin, hyaluronic acid, and laminin for human neural stem cell and vascular tissue engineering. In : *Acta Biomaterialia*. octobre 2016. Vol. 43, p. 122-138. DOI 10.1016/j.actbio.2016.07.043.
- (8) BÉDUE, Amélie, VIEU, Christophe, ARNAUDUC, Florent, SOL, Jean-Christophe, LOUBINOUX, Isabelle et VAYSSE, Laurence, 2012. Engineering of adult human neural stem cells differentiation through surface micropatterning. In : *Biomaterials*. janvier 2012. Vol. 33, n° 2, p. 504-514. DOI 10.1016/j.biomaterials.2011.09.073.
- (9) BEITZ, Janice M, 2014. Parkinson s disease a review. In : *Frontiers in Bioscience*. 2014. Vol. S6, n° 1, p. 65-74. DOI 10.2741/S415.
- (10) BENJAMIN, Emelia J., MUNTNER, Paul, ALONSO, Alvaro, BITTENCOURT, Marcio S., CALLAWAY, Clifton W., CARSON, April P., CHAMBERLAIN, Alanna M., CHANG, Alexander R., CHENG, Susan, DAS, Sandeep R., DELLING, Francesca N., DJOUSSE, Luc, ELKIND, Mitchell S.V., FERGUSON, Jane F., FORNAGE, Myriam, JORDAN, Lori Chaffin, KHAN, Sadiya S., KISSELA, Brett M., KNUTSON, Kristen L., KWAN, Tak W.,

LACKLAND, Daniel T., LEWIS, Tené T., LICHTMAN, Judith H., LONGENECKER, Chris T., LOOP, Matthew Shane, LUTSEY, Pamela L., MARTIN, Seth S., MATSUSHITA, Kunihiro, MORAN, Andrew E., MUSSOLINO, Michael E., O'FLAHERTY, Martin, PANDEY, Ambarish, PERAK, Amanda M., ROSAMOND, Wayne D., ROTH, Gregory A., SAMPSON, Uchechukwu K.A., SATOU, Gary M., SCHROEDER, Emily B., SHAH, Svati H., SPARTANO, Nicole L., STOKES, Andrew, TIRSCHWELL, David L., TSAO, Connie W., TURAKHIA, Mintu P., VANWAGNER, Lisa B., WILKINS, John T., WONG, Sally S., VIRANI, Salim S. et ON BEHALF OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION COUNCIL ON EPIDEMIOLOGY AND PREVENTION STATISTICS COMMITTEE AND STROKE STATISTICS SUBCOMMITTEE, 2019. Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association. In : *Circulation* [en ligne]. 5 mars 2019. Vol. 139, n° 10. [Consulté le 5 mai 2020]. DOI 10.1161/CIR.0000000000000659. Disponible à l'adresse : <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIR.0000000000000659>.

(11) BHAT, Sumrita, TRIPATHI, Anuj et KUMAR, Ashok, 2011. Supermacroscopic chitosan–agarose–gelatin cryogels: *in vitro* characterization and *in vivo* assessment for cartilage tissue engineering. In : *Journal of The Royal Society Interface*. 6 avril 2011. Vol. 8, n° 57, p. 540-554. DOI 10.1098/rsif.2010.0455.

(12) BIGNAMI, A., ASHER, R. et PERIDES, G., 1992. The extracellular matrix of rat spinal cord: A comparative study on the localization of hyaluronic acid, glial hyaluronate-binding protein, and chondroitin sulfate proteoglycan. In : *Experimental Neurology*. juillet 1992. Vol. 117, n° 1, p. 90-93. DOI 10.1016/0014-4886(92)90115-7.

(13) BIGNAMI, Amico, HOSLEY, Mark et DAHL, Doris, 1993. Hyaluronic acid and hyaluronic acid-binding proteins in brain extracellular matrix. In : *Anatomy and Embryology* [en ligne]. novembre 1993. Vol. 188, n° 5. [Consulté le 30 avril 2020]. DOI 10.1007/BF00190136. Disponible à l'adresse : <http://link.springer.com/10.1007/BF00190136>.

(14) BURKE, John F., YANNAS, Ioannis V., QUINBY, William C., BONDOC, Conrado C. et JUNG, Walter K., 1981. Successful Use of a Physiologically Acceptable Artificial Skin in the Treatment of Extensive Burn Injury: In : *Annals of Surgery*. octobre 1981. Vol. 194, n° 4, p. 413-428. DOI 10.1097/00000658-198110000-00005.

(15) BUZHOR, Ella, LESHANSKY, Lucy, BLUMENTHAL, Jacob, BARASH, Hila, WARSHAWSKY, David, MAZOR, Yaron et SHTRICHMAN, Ronit, 2014. Cell-based therapy approaches: the hope for incurable diseases. In : *Regenerative Medicine*. septembre 2014. Vol. 9, n° 5, p. 649-672. DOI 10.2217/rme.14.35.

(16) CHALARD, Anaïs, 2019. *Gélifiants supramoléculaires : synthèse, auto-assemblage, biocompatibilité et application pour la culture de cellules neuronales* [en ligne]. phd. S.l. : Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier. [Consulté le 6 juillet 2020]. Disponible à l'adresse : <http://thesesups.ups-tlse.fr/4290/>.

(17) CHALARD, Anaïs, JOSEPH, Pierre, SOULEILLE, Sandrine, LONETTI, Barbara, SAFFON-MERCERON, Nathalie, LOUBINOX, Isabelle, VAYSSE, Laurence, MALAQUIN, Laurent et FITREMANN, Juliette, 2019. Wet spinning and radial self-assembly of a carbohydrate low molecular weight gelator into well organized hydrogel filaments. In : *Nanoscale*. 2019. Vol. 11, n° 32, p. 15043-15056. DOI 10.1039/C9NR02727K.

- (18) CHALARD, Anaïs, VAYSSE, Laurence, JOSEPH, Pierre, MALAQUIN, Laurent, SOULEILLE, Sandrine, LONETTI, Barbara, SOL, Jean-Christophe, LOUBINOUX, Isabelle et FITREMANN, Juliette, [sans date]. Simple Synthetic Molecular Hydrogels from Self-Assembling Alkylgalactonamides as Scaffold for 3D Neuronal Cell Growth. In : . p. 11.
- (19) CHISTYAKOV, Dmitry V., ASTAKHOVA, Alina A., AZBUKINA, Nadezda V., GORIAINOV, Sergei V., CHISTYAKOV, Viktor V. et SERGEEVA, Marina G., 2019. High and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Differentially Influences Oxylipins Synthesis in Course of Neuroinflammation. In : *International Journal of Molecular Sciences*. 9 août 2019. Vol. 20, n° 16, p. 3894. DOI 10.3390/ijms20163894.
- (20) CLARKE, Bart, 2008. Normal Bone Anatomy and Physiology. In : *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. novembre 2008. Vol. 3, n° Supplement 3, p. S131-S139. DOI 10.2215/CJN.04151206.
- (21) COLLINS, Maurice N. et BIRKINSHAW, Colin, 2013. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. In : *Carbohydrate Polymers*. février 2013. Vol. 92, n° 2, p. 1262-1279. DOI 10.1016/j.carbpol.2012.10.028.
- (22) CONNOLLY, Barbara S. et LANG, Anthony E., 2014. Pharmacological Treatment of Parkinson Disease: A Review. In : *JAMA*. 23 avril 2014. Vol. 311, n° 16, p. 1670. DOI 10.1001/jama.2014.3654.
- (23) DIRNAGL, Ulrich, IADECOLA, Costantino et MOSKOWITZ, Michael A., 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. In : *Trends in Neurosciences*. septembre 1999. Vol. 22, n° 9, p. 391-397. DOI 10.1016/S0166-2236(99)01401-0.
- (24) DONG, Chanjuan et LV, Yonggang, 2016. Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. In : *Polymers*. 4 février 2016. Vol. 8, n° 2, p. 42. DOI 10.3390/polym8020042.
- (25) DOWNING, Timothy L., SOTO, Jennifer, MOREZ, Constant, HOUSSIN, Timothee, FRITZ, Ashley, YUAN, Falei, CHU, Julia, PATEL, Shyam, SCHAFFER, David V. et LI, Song, 2013. Biophysical regulation of epigenetic state and cell reprogramming. In : *Nature Materials*. décembre 2013. Vol. 12, n° 12, p. 1154-1162. DOI 10.1038/nmat3777.
- (26) DUGAN, James M, GOUGH, Julie E et EICHHORN, Stephen J, 2013. Bacterial cellulose scaffolds and cellulose nanowhiskers for tissue engineering. In : *Nanomedicine*. février 2013. Vol. 8, n° 2, p. 287-298. DOI 10.2217/nnm.12.211.
- (27) DUNCAN, Thomas et VALENZUELA, Michael, 2017. Alzheimer's disease, dementia, and stem cell therapy. In : *Stem Cell Research & Therapy*. décembre 2017. Vol. 8, n° 1, p. 111. DOI 10.1186/s13287-017-0567-5.
- (28) DWIVEDI, Ruby, KUMAR, Sumit, PANDEY, Rahul, MAHAJAN, Aman, NANDANA, Deepti, KATTI, Dharendra S. et MEHROTRA, Divya, 2020. Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. In : *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. janvier 2020. Vol. 10, n° 1, p. 381-388. DOI 10.1016/j.jobcr.2019.10.003.
- (29) ECKERT, Matthew J. et MARTIN, Matthew J., 2017. Trauma. In : *Surgical Clinics of North America*. octobre 2017. Vol. 97, n° 5, p. 1031-1045. DOI 10.1016/j.suc.2017.06.008.

- (30) EVANS, M. J. et KAUFMAN, M. H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. In : *Nature*. juillet 1981. Vol. 292, n° 5819, p. 154-156. DOI 10.1038/292154a0.
- (31) FAROKHI, Maryam, JONIDI SHARIATZADEH, Farinaz, SOLOUK, Atefeh et MIRZADEH, Hamid, 2020. Alginate Based Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering: A Review. In : *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 3 mars 2020. Vol. 69, n° 4, p. 230-247. DOI 10.1080/00914037.2018.1562924.
- (32) FEIGIN, Valery L, ROTH, Gregory A, NAGHAVI, Mohsen, PARMAR, Priya, KRISHNAMURTHI, Rita, CHUGH, Sumeet, MENSAH, George A, NORRVING, Bo, SHIUE, Ivy, NG, Marie, ESTEP, Kara, CERCY, Kelly, MURRAY, Christopher J L et FOROUZANFAR, Mohammad H, 2016. Global burden of stroke and risk factors in 188 countries, during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. In : *The Lancet Neurology*. août 2016. Vol. 15, n° 9, p. 913-924. DOI 10.1016/S1474-4422(16)30073-4.
- (33) GOULD, E., REEVES, A. J., FALLAH, M., TANAPAT, P., GROSS, C. G. et FUCHS, E., 1999. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 27 avril 1999. Vol. 96, n° 9, p. 5263-5267. DOI 10.1073/pnas.96.9.5263.
- (34) GROCHOWSKI, Cezary, RADZIKOWSKA, Elżbieta et MACIEJEWSKI, Ryszard, 2018. Neural stem cell therapy—Brief review. In : *Clinical Neurology and Neurosurgery*. octobre 2018. Vol. 173, p. 8-14. DOI 10.1016/j.clineuro.2018.07.013.
- (35) GUPTA, Ramesh C., LALL, Rajiv, SRIVASTAVA, Ajay et SINHA, Anita, 2019. Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. In : *Frontiers in Veterinary Science*. 25 juin 2019. Vol. 6, p. 192. DOI 10.3389/fvets.2019.00192.
- (36) HAO, Lei, ZOU, Zhongmin, TIAN, Hong, ZHANG, Yubo, ZHOU, Huchuan et LIU, Lei, 2014. Stem Cell-Based Therapies for Ischemic Stroke. In : *BioMed Research International*. 2014. Vol. 2014, p. 1-17. DOI 10.1155/2014/468748.
- (37) HARJO, Madis, ZONDAKA, Zane, LEEMETS, Kaur, JÄRVEKÜLG, Martin, TAMM, Tarmo et KIEFER, Rudolf, 2020. Polypyrrole-coated fiber-scaffolds: Concurrent linear actuation and sensing. In : *Journal of Applied Polymer Science*. 10 avril 2020. Vol. 137, n° 14, p. 48533. DOI 10.1002/app.48533.
- (38) HICKEY, Ryan J. et PELLING, Andrew E., 2019. Cellulose Biomaterials for Tissue Engineering. In : *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 22 mars 2019. Vol. 7, p. 45. DOI 10.3389/fbioe.2019.00045.
- (39) JIA, Zhen-Yu, ZHANG, Chen, CAO, Shi-qi, XUE, Chen-chen, LIU, Tian-ze, HUANG, Xuan et XU, Wei-Dong, 2017. Comparison of artificial graft versus autograft in anterior cruciate ligament reconstruction: a meta-analysis. In : *BMC Musculoskeletal Disorders*. décembre 2017. Vol. 18, n° 1, p. 309. DOI 10.1186/s12891-017-1672-4.
- (40) JIANG, Liming, SUN, Haizhu, YUAN, Anliang, ZHANG, Kai, LI, Daowei, LI, Chen, SHI, Ce, LI, Xiangwei, GAO, Kai, ZHENG, Changyu, YANG, Bai et SUN, Hongchen, 2013. Enhancement of Osteoinduction by Continual Simvastatin Release from Poly(lactic-co-

glycolic acid)-Hydroxyapatite-Simvastatin Nano-Fibrous Scaffold. In : *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 1 septembre 2013. Vol. 9, n° 11, p. 1921-1928. DOI 10.1166/jbn.2013.1692.

(41) JOHNSON, Christopher D., D'AMATO, Anthony R., PUHL, Devan L., WICH, Douglas M., VESPERMAN, Amanda et GILBERT, Ryan J., 2018. Electrospun fiber surface nanotopography influences astrocyte-mediated neurite outgrowth. In : *BIOMEDICAL MATERIALS*. septembre 2018. Vol. 13, n° 5. DOI 10.1088/1748-605X/aac4de.

(42) KALIA, Lorraine V et LANG, Anthony E, 2015. Parkinson's disease. In : *The Lancet*. août 2015. Vol. 386, n° 9996, p. 896-912. DOI 10.1016/S0140-6736(14)61393-3.

(43) KHAING, Zin Z, MILMAN, Brian D, VANSCOY, Jennifer E, SEIDLITS, Stephanie K, GRILL, Raymond J et SCHMIDT, Christine E, 2011. High molecular weight hyaluronic acid limits astrocyte activation and scar formation after spinal cord injury. In : *Journal of Neural Engineering*. 1 août 2011. Vol. 8, n° 4, p. 046033. DOI 10.1088/1741-2560/8/4/046033.

(44) KIM, Youjoung, MEADE, Seth M., CHEN, Keying, FENG, He, RAYYAN, Jacob, HESS-DUNNING, Allison et EREIFEJ, Evon S., 2018. Nano-Architectural Approaches for Improved Intracortical Interface Technologies. In : *Frontiers in Neuroscience*. 17 juillet 2018. Vol. 12, p. 456. DOI 10.3389/fnins.2018.00456.

(45) KIM, Young Hye, CHOI, Se Hoon, D'AVANZO, Carla, HEBISCH, Matthias, SLIWINSKI, Christopher, BYLYKBASHI, Enjana, WASHICOSKY, Kevin J., KLEE, Justin B., BRÜSTLE, Oliver, TANZI, Rudolph E. et KIM, Doo Yeon, 2015. A 3D human neural cell culture system for modeling Alzheimer's disease. In : *Nature Protocols*. juillet 2015. Vol. 10, n° 7, p. 985-1006. DOI 10.1038/nprot.2015.065.

(46) KNIGHT, Toyin A. et PAYNE, Richard G., 2013. Characterization of a PGA-Based Scaffold for Use in a Tissue-Engineered Neo-Urinary Conduit. In : BASU, Joydeep et LUDLOW, John W. (éd.), *Organ Regeneration* [en ligne]. Totowa, NJ : Humana Press. Methods in Molecular Biology. p. 179-188. [Consulté le 12 juin 2020]. ISBN 978-1-62703-362-6. Disponible à l'adresse : http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-363-3_15.

(47) KOJIMA, Chie, FUSAOKA-NISHIOKA, Eri, IMAI, Toshio, NAKAHIRA, Atsushi et ONODERA, Hiroshi, 2016. Dendri-graft polylysine coated-poly(glycolic acid) fibrous scaffolds for hippocampal neurons. In : *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART A*. novembre 2016. Vol. 104, n° 11, p. 2744-2750. DOI 10.1002/jbm.a.35807.

(48) KRISHNASWAMY, Venkat Raghavan, BENBENISHTY, Amit, BLINDER, Pablo et SAGI, Irit, 2019. Demystifying the extracellular matrix and its proteolytic remodeling in the brain: structural and functional insights. In : *Cellular and Molecular Life Sciences*. août 2019. Vol. 76, n° 16, p. 3229-3248. DOI 10.1007/s00018-019-03182-6.

(49) LANGER, R et VACANTI, J., 1993. Tissue engineering. In : *Science*. 14 mai 1993. Vol. 260, n° 5110, p. 920-926. DOI 10.1126/science.8493529.

(50) LE GROS CLARK, W. E., 1943. The problem of neuronal regeneration in the central nervous system: II. The insertion of peripheral nerve stumps into the brain. In : *Journal of Anatomy*. avril 1943. Vol. 77, n° Pt 3, p. 251-259.

- (51) LI, Jianfeng, LIU, Xiao, CROOK, Jeremy M. et WALLACE, Gordon G., 2017. Development of a porous 3D graphene-PDMS scaffold for improved osseointegration. In : *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. novembre 2017. Vol. 159, p. 386-393. DOI 10.1016/j.colsurfb.2017.07.087.
- (52) LI, Xiaoran, XIAO, Zhifeng, HAN, Jin, CHEN, Lei, XIAO, Hanshan, MA, Fukai, HOU, Xianglin, LI, Xing, SUN, Jie, DING, Wenyong, ZHAO, Yannan, CHEN, Bing et DAI, Jianwu, 2013. Promotion of neuronal differentiation of neural progenitor cells by using EGFR antibody functionalized collagen scaffolds for spinal cord injury repair. In : *Biomaterials*. juillet 2013. Vol. 34, n° 21, p. 5107-5116. DOI 10.1016/j.biomaterials.2013.03.062.
- (53) LI, Zi-Heng, JI, Shi-Chen, WANG, Ya-Zhen, SHEN, Xing-Can et LIANG, Hong, 2013. Silk fibroin-based scaffolds for tissue engineering. In : *Frontiers of Materials Science*. septembre 2013. Vol. 7, n° 3, p. 237-247. DOI 10.1007/s11706-013-0214-8.
- (54) LIN, Hong-Ru et YEH, Yu-Jen, 2004. Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: Preparation, characterization, and in vitro studies. In : *Journal of Biomedical Materials Research*. 15 octobre 2004. Vol. 71B, n° 1, p. 52-65. DOI 10.1002/jbm.b.30065.
- (55) LO, Eng H., DALKARA, Turgay et MOSKOWITZ, Michael A., 2003. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. In : *Nature Reviews Neuroscience*. mai 2003. Vol. 4, n° 5, p. 399-414. DOI 10.1038/nrn1106.
- (56) LOSI, Paola, BRIGANTI, Enrica, MAGERA, Angela, SPILLER, Dario, RISTORI, Chiara, BATTOLLA, Barbara, BALDERI, Michela, KULL, Silvia, BALBARINI, Alberto, DI STEFANO, Rossella et SOLDANI, Giorgio, 2010. Tissue response to poly(ether)urethane-polydimethylsiloxane-fibrin composite scaffolds for controlled delivery of pro-angiogenic growth factors. In : *Biomaterials*. juillet 2010. Vol. 31, n° 20, p. 5336-5344. DOI 10.1016/j.biomaterials.2010.03.033.
- (57) LU, Tingli, LI, Yuhui et CHEN, Tao, 2013. Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. In : *International Journal of Nanomedicine*. janvier 2013. p. 337. DOI 10.2147/IJN.S38635.
- (58) MACPHEE, Graeme JA et STEWART, David A, 2006. Parkinson's disease. In : *Reviews in Clinical Gerontology*. février 2006. Vol. 16, n° 1, p. 1-21. DOI 10.1017/S0959259806002073.
- (59) MADL, Christopher M., LESAVAGE, Bauer L., DEWI, Ruby E., DINH, Cong B., STOWERS, Ryan S., KHARITON, Margarita, LAMPE, Kyle J., NGUYEN, Duong, CHAUDHURI, Ovijit, ENEJDER, Annika et HEILSHORN, Sarah C., 2017. Maintenance of neural progenitor cell stemness in 3D hydrogels requires matrix remodelling. In : *Nature Materials*. décembre 2017. Vol. 16, n° 12, p. 1233-1242. DOI 10.1038/nmat5020.
- (60) MAERTENS, A et DE NOORDHOUT, 2009. Traitement de la maladie de Parkinson en 2009. In : *Revue Médicale Suisse*. 2009. p. 6.
- (61) MANDAL, Biman B., PARK, Sang-Hyug, GIL, Eun Seok et KAPLAN, David L., 2011. Stem Cell-Based Meniscus Tissue Engineering. In : *Tissue Engineering Part A*. novembre 2011. Vol. 17, n° 21-22, p. 2749-2761. DOI 10.1089/ten.tea.2011.0031.

- (62) MCCOOL, Jennifer M, RODRIGUEZ, Isaac A, SELL, Scott A, HAN, Yang et BOWLIN, Gary L, 2014. A preliminary study on amelogenin-loaded electrospun scaffolds. In : *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. janvier 2014. Vol. 29, n° 1, p. 32-49. DOI 10.1177/0883911513513661.
- (63) MCCULLOCH, E. A. et TILL, J. E., 1960. The Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells, Determined by Quantitative Marrow Transplantation into Irradiated Mice. In : *Radiation Research*. juillet 1960. Vol. 13, n° 1, p. 115. DOI 10.2307/3570877.
- (64) MCKEE, Ann C. et DANESHVAR, Daniel H., 2015. The neuropathology of traumatic brain injury. In : *Handbook of Clinical Neurology* [en ligne]. S.l. : Elsevier. p. 45-66. [Consulté le 14 mai 2020]. ISBN 978-0-444-52892-6. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444528926000040>.
- (65) MCKEE, Turney J., PERLMAN, George, MORRIS, Martin et KOMAROVA, Svetlana V., 2019. Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis. In : *Scientific Reports*. décembre 2019. Vol. 9, n° 1, p. 10542. DOI 10.1038/s41598-019-46896-0.
- (66) MEDBERRY, Christopher J., CRAPO, Peter M., SIU, Bernard F., CARRUTHERS, Christopher A., WOLF, Matthew T., NAGARKAR, Shailesh P., AGRAWAL, Vineet, JONES, Kristen E., KELLY, Jeremy, JOHNSON, Scott A., VELANKAR, Sachin S., WATKINS, Simon C., MODO, Michel et BADYLAK, Stephen F., 2013. Hydrogels derived from central nervous system extracellular matrix. In : *Biomaterials*. janvier 2013. Vol. 34, n° 4, p. 1033-1040. DOI 10.1016/j.biomaterials.2012.10.062.
- (67) MICHELOZZI, Caterina et COGNARD, Christophe, 2019. Rôle de la neuroradiologie interventionnelle dans la prise en charge de l'accident vasculaire cérébral hémorragique. In : *La Presse Médicale*. juin 2019. Vol. 48, n° 6, p. 684-695. DOI 10.1016/j.lpm.2019.05.002.
- (68) MOUW, Janna K., OU, Guanqing et WEAVER, Valerie M., 2014. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. In : *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. décembre 2014. Vol. 15, n° 12, p. 771-785. DOI 10.1038/nrm3902.
- (69) MURPHY, Ashley R., LASLETT, Andrew, O'BRIEN, Carmel M. et CAMERON, Neil R., 2017. Scaffolds for 3D in vitro culture of neural lineage cells. In : *Acta Biomaterialia*. mai 2017. Vol. 54, p. 1-20. DOI 10.1016/j.actbio.2017.02.046.
- (70) NAIR, Bindu P., GANGADHARAN, Dhanya, MOHAN, Neethu, SUMATHI, Babitha et NAIR, Prabha D., 2015. Hybrid scaffold bearing polymer-siloxane Schiff base linkage for bone tissue engineering. In : *Materials Science and Engineering: C*. juillet 2015. Vol. 52, p. 333-342. DOI 10.1016/j.msec.2015.03.040.
- (71) NEWELL, N., LITTLE, Jp, CHRISTOU, A., ADAMS, Ma, ADAM, Cj et MASOUIROS, Sd, 2017. Biomechanics of the human intervertebral disc: A review of testing techniques and results. In : *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. mai 2017. Vol. 69, p. 420-434. DOI 10.1016/j.jmbbm.2017.01.037.
- (72) NIELSEN, Peter Brønnum, LARSEN, Torben Bjerregaard, SKJØTH, Flemming et LIP, Gregory Y. H., 2017. Outcomes Associated With Resuming Warfarin Treatment After Hemorrhagic Stroke or Traumatic Intracranial Hemorrhage in Patients With Atrial

Fibrillation. In : *JAMA Internal Medicine*. 1 avril 2017. Vol. 177, n° 4, p. 563. DOI 10.1001/jamainternmed.2016.9369.

(73) OBOUDIYAT, Carly, GLAZER, Hilary, SEIFAN, Alon, GREER, Christine et ISAACSON, Richard, 2013. Alzheimer's Disease. In : *Seminars in Neurology*. 14 novembre 2013. Vol. 33, n° 04, p. 313-329. DOI 10.1055/s-0033-1359319.

(74) OKOLICSANYI, Rachel K., GRIFFITHS, Lyn R. et HAUPT, Larisa M., 2014. Mesenchymal stem cells, neural lineage potential, heparan sulfate proteoglycans and the matrix. In : *Developmental Biology*. avril 2014. Vol. 388, n° 1, p. 1-10. DOI 10.1016/j.ydbio.2014.01.024.

(75) PARK, Kyung Min, SHIN, Young Min, KIM, Kyobum et SHIN, Heungsoo, 2018. Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2017: A Year in Review. In : *Tissue Engineering Part B: Reviews*. octobre 2018. Vol. 24, n° 5, p. 327-344. DOI 10.1089/ten.teb.2018.0027.

(76) PATEL, Madhumita, MIN, Ji Hong, HONG, Min-Ho, LEE, Hyo-Jung, KANG, Seungmin, YI, Seong et KOH, Won-Gun, 2020. Culture of neural stem cells on conductive and microgrooved polymeric scaffolds fabricated via electrospun fiber-template lithography. In : *BIOMEDICAL MATERIALS*. juillet 2020. Vol. 15, n° 4. DOI 10.1088/1748-605X/ab763b.

(77) PELTO, Jani, BJÖRNINEN, Miina, PÄLLI, Aliisa, TALVITIE, Elina, HYTTINEN, Jari, MANNERSTRÖM, Bettina, SUURONEN SEPPANEN, Riitta, KELLOMÄKI, Minna, MIETTINEN, Susanna et HAIMI, Suvi, 2013. Novel Polypyrrole-Coated Polylactide Scaffolds Enhance Adipose Stem Cell Proliferation and Early Osteogenic Differentiation. In : *Tissue Engineering Part A*. avril 2013. Vol. 19, n° 7-8, p. 882-892. DOI 10.1089/ten.tea.2012.0111.

(78) PERL, Daniel P., 2010. Neuropathology of Alzheimer's Disease. In : *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*. janvier 2010. Vol. 77, n° 1, p. 32-42. DOI 10.1002/msj.20157.

(79) PERSIDIS, Aris, 1999. Tissue engineering. In : *Nature Biotechnology*. mai 1999. Vol. 17, n° 5, p. 508-510. DOI 10.1038/8700.

(80) PRABHAKARAN, Shyam, RUFF, Ilana et BERNSTEIN, Richard A., 2015. Acute Stroke Intervention: A Systematic Review. In : *JAMA*. 14 avril 2015. Vol. 313, n° 14, p. 1451. DOI 10.1001/jama.2015.3058.

(81) RAVICHANDRAN, Ranjithkumar, GRIFFITH, May et PHOPASE, Jaywant, 2014. Applications of self-assembling peptide scaffolds in regenerative medicine: the way to the clinic. In : *J. Mater. Chem. B*. 10 octobre 2014. Vol. 2, n° 48, p. 8466-8478. DOI 10.1039/C4TB01095G.

(82) REISS, Allison B., ARAIN, Hirra A., STECKER, Mark M., SIEGART, Nicolle M. et KASSELMAN, Lora J., 2018. Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. In : *Reviews in the Neurosciences*. 28 août 2018. Vol. 29, n° 6, p. 613-627. DOI 10.1515/revneuro-2017-0063.

- (83) RODRIGUES, Natacha, BENNING, Matthew, FERREIRA, Ana M., DIXON, Luke et DALGARNO, Kenny, 2016. Manufacture and Characterisation of Porous PLA Scaffolds. In : *Procedia CIRP*. 2016. Vol. 49, p. 33-38. DOI 10.1016/j.procir.2015.07.025.
- (84) RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, Martin, VEGA-RUIZ, Brenda, RAMOS-ZUÑIGA, Rodrigo, SALDAÑA-KOPPEL, Daniel Alexander et QUIÑONES-OLVERA, Luis Fernando, 2015. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. In : *BioMed Research International*. 2015. Vol. 2015, p. 1-15. DOI 10.1155/2015/821279.
- (85) ROUWKEMA, Jeroen, GIBBS, Susan, LUTOLF, Matthias P., MARTIN, Ivan, VUNJAK-NOVAKOVIC, Gordana et MALDA, Jos, 2011. In vitro platforms for tissue engineering: implications for basic research and clinical translation. In : *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. août 2011. Vol. 5, n° 8, p. e164-e167. DOI 10.1002/term.414.
- (86) SACCO, Ralph L., KASNER, Scott E., BRODERICK, Joseph P., CAPLAN, Louis R., CONNORS, J.J. (Buddy), CULEBRAS, Antonio, ELKIND, Mitchell S.V., GEORGE, Mary G., HAMDAN, Allen D., HIGASHIDA, Randall T., HOH, Brian L., JANIS, L. Scott, KASE, Carlos S., KLEINDORFER, Dawn O., LEE, Jin-Moo, MOSELEY, Michael E., PETERSON, Eric D., TURAN, Tanya N., VALDERRAMA, Amy L. et VINTERS, Harry V., 2013. An Updated Definition of Stroke for the 21st Century: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. In : *Stroke*. juillet 2013. Vol. 44, n° 7, p. 2064-2089. DOI 10.1161/STR.0b013e318296aeca.
- (87) SAHA, Krishanu, KEUNG, Albert J., IRWIN, Elizabeth F., LI, Yang, LITTLE, Lauren, SCHAFFER, David V. et HEALY, Kevin E., 2008. Substrate Modulus Directs Neural Stem Cell Behavior. In : *Biophysical Journal*. novembre 2008. Vol. 95, n° 9, p. 4426-4438. DOI 10.1529/biophysj.108.132217.
- (88) SCHULZ III, J. T., TOMPKINS, R. G. et BURKE, J. F., 2000. Artificial Skin. In : *Annual Review of Medicine*. février 2000. Vol. 51, n° 1, p. 231-244. DOI 10.1146/annurev.med.51.1.231.
- (89) SCHWAMM, Lee H, ALI, Syed F, REEVES, Mathew J, SMITH, Eric E, SAVER, Jeffrey L, MESSE, Steven, BHATT, Deepak L, GRAU-SEPULVEDA, Maria V, PETERSON, Eric D et FONAROW, Gregg C, 2013. Temporal Trends in Patient Characteristics and Treatment With Intravenous Thrombolysis Among Acute Ischemic Stroke Patients at Get With the Guidelines–Stroke Hospitals. In : . 2013. p. 10.
- (90) SCHWARZBAUER, J. E. et DESIMONE, D. W., 2011. Fibronectins, Their Fibrillogenesis, and In Vivo Functions. In : *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 1 juillet 2011. Vol. 3, n° 7, p. a005041-a005041. DOI 10.1101/cshperspect.a005041.
- (91) SHAFIEE, Ashkan et ATALA, Anthony, 2017. Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine. In : *Annual Review of Medicine*. 14 janvier 2017. Vol. 68, n° 1, p. 29-40. DOI 10.1146/annurev-med-102715-092331.
- (92) SHERWOOD, Lauralee et ECTORS, Fabien, 2015. *Physiologie humaine*. Louvain-la-Neuve : De Boeck. ISBN 978-2-8041-8996-9.
- (93) SHRIVASTAVA, Amulya Nidhi, REDEKER, Virginie, PIERI, Laura, BOUSSET, Luc, RENNER, Marianne, MADIONA, Karine, MAILHES-HAMON, Caroline, COENS, Audrey,

BUÉE, Luc, HANTRAYE, Philippe, TRILLER, Antoine et MELKI, Ronald, 2019. Clustering of Tau fibrils impairs the synaptic composition of $\alpha 3$ -Na⁺/K⁺-ATPase and AMPA receptors. In : *The EMBO Journal* [en ligne]. février 2019. Vol. 38, n° 3. [Consulté le 7 mai 2020]. DOI 10.15252/emj.201899871. Disponible à l'adresse : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.15252/emj.201899871>.

(94) SIDDALL, Philip J et MIDDLETON, James W, 2015. Spinal cord injury-induced pain: mechanisms and treatments. In : *Pain Management*. novembre 2015. Vol. 5, n° 6, p. 493-507. DOI 10.2217/pmt.15.47.

(95) SILL, Travis J. et VON RECUM, Horst A., 2008. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. In : *Biomaterials*. mai 2008. Vol. 29, n° 13, p. 1989-2006. DOI 10.1016/j.biomaterials.2008.01.011.

(96) SOHEILMOGHADDAM, Mohammad, SHARIFZADEH, Ghorbanali, POUR, Raheleh Heidar, WAHIT, Mat Uzir, WHYE, Wong Tuck et LEE, Xiau Yeen, 2014. Regenerated cellulose/ β -cyclodextrin scaffold prepared using ionic liquid. In : *Materials Letters*. novembre 2014. Vol. 135, p. 210-213. DOI 10.1016/j.matlet.2014.07.169.

(97) SONG, Jialin, SUN, Binbin, LIU, Shen, CHEN, Wei, ZHANG, Yuanzheng, WANG, Chunyang, MO, Xiumei, CHE, Junyi, OUYANG, Yuanming, YUAN, Weien et FAN, Cunyi, 2016. Polymerizing Pyrrole Coated Poly (l-lactic acid-co-epsilon-caprolactone) (PLCL) Conductive Nanofibrous Conduit Combined with Electric Stimulation for Long-Range Peripheral Nerve Regeneration. In : *FRONTIERS IN MOLECULAR NEUROSCIENCE*. 8 novembre 2016. Vol. 9. DOI 10.3389/fnmol.2016.00117.

(98) SOOD, Disha, CHWALEK, Karolina, STUNTZ, Emily, POULI, Dimitra, DU, Chuang, TANG-SCHOMER, Min, GEORGAKOUDI, Irene, BLACK, Lauren D., III et KAPLAN, David L., 2016. Fetal Brain Extracellular Matrix Boosts Neuronal Network Formation in 3D Bioengineered Model of Cortical Brain Tissue. In : *ACS BIOMATERIALS SCIENCE & ENGINEERING*. janvier 2016. Vol. 2, n° 1, p. 131-140. DOI 10.1021/acsbiomaterials.5b00446.

(99) SPROUL, E., NANDI, S. et BROWN, A., 2018. Fibrin biomaterials for tissue regeneration and repair. In : *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair* [en ligne]. S.l. : Elsevier. p. 151-173. [Consulté le 12 juin 2020]. ISBN 978-0-08-100803-4. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081008034000061>.

(100) SUN, Tao, KHAN, Tareef Hayat et SULTANA, Naznin, 2014. Fabrication and In Vitro Evaluation of Nanosized Hydroxyapatite/Chitosan-Based Tissue Engineering Scaffolds. In : *Journal of Nanomaterials*. 2014. Vol. 2014, p. 1-8. DOI 10.1155/2014/194680.

(101) TAKAHASHI, Kazutoshi et YAMANAKA, Shinya, 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. In : *Cell*. août 2006. Vol. 126, n° 4, p. 663-676. DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024.

(102) TATE, Ciara C., SHEAR, Deborah A., TATE, Matthew C., ARCHER, David R., STEIN, Donald G. et LAPLACA, Michelle C., 2009. Laminin and fibronectin scaffolds enhance neural stem cell transplantation into the injured brain. In : *Journal of Tissue*

Engineering and Regenerative Medicine. mars 2009. Vol. 3, n° 3, p. 208-217. DOI 10.1002/term.154.

(103) TESTA, Damien, PROCHIANTZ, Alain et DI NARDO, Ariel A., 2019. Perineuronal nets in brain physiology and disease. In : *Seminars in Cell & Developmental Biology*. mai 2019. Vol. 89, p. 125-135. DOI 10.1016/j.semcd.2018.09.011.

(104) TIMPL, Rupert et BROWN, Judith C., 1994. The laminins. In : *Matrix Biology*. août 1994. Vol. 14, n° 4, p. 275-281. DOI 10.1016/0945-053X(94)90192-9.

(105) UDE, Chinedu Cletus, MISKON, Azizi, IDRUS, Ruszymah Bt Hj et ABU BAKAR, Muhamad Bin, 2018. Application of stem cells in tissue engineering for defense medicine. In : *Military Medical Research*. décembre 2018. Vol. 5, n° 1, p. 7. DOI 10.1186/s40779-018-0154-9.

(106) WANG, Pangbo, WANG, Hufei, MA, Kang, WANG, Shi, YANG, Chuanyan, MU, Ning, YANG, Fei, FENG, Hua et CHEN, Tunan, 2020. Novel cytokine-loaded PCL-PEG scaffold composites for spinal cord injury repair. In : *RSC Advances*. 2020. Vol. 10, n° 11, p. 6306-6314. DOI 10.1039/C9RA10385F.

(107) WELLER, Jason et BUDSON, Andrew, 2018. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. In : *F1000Research*. 31 juillet 2018. Vol. 7, p. 1161. DOI 10.12688/f1000research.14506.1.

(108) WILLERTH, Stephanie, 2017. Design considerations when engineering neural tissue from stem cells. In : *Engineering Neural Tissue from Stem Cells* [en ligne]. S.l. : Elsevier. p. 65-88. [Consulté le 12 avril 2020]. ISBN 978-0-12-811385-1. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128113851000042>.

(109) WITIWI, Christopher D. et FEHLINGS, Michael G., 2015. Acute Spinal Cord Injury: In : *Journal of Spinal Disorders and Techniques*. juillet 2015. Vol. 28, n° 6, p. 202-210. DOI 10.1097/BSD.0000000000000287.

(110) YEONG, W.Y., SUDARMADJI, N., YU, H.Y., CHUA, C.K., LEONG, K.F., VENKATRAMAN, S.S., BOEY, Y.C.F. et TAN, L.P., 2010. Porous polycaprolactone scaffold for cardiac tissue engineering fabricated by selective laser sintering. In : *Acta Biomaterialia*. juin 2010. Vol. 6, n° 6, p. 2028-2034. DOI 10.1016/j.actbio.2009.12.033.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Isabelle RAYMOND-LETRON, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directrice de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **PETERS Salomé** intitulée « **Développement de nouveaux hydrogels supramoléculaires comme supports de culture des cellules du système nerveux** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 13/11/2020
Enseignant-chercheur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeure Isabelle RAYMOND-LETRON



Vu :
Le Président du jury
Professeur Olivier ABBO



Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
M. Pierre SANS



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université Paul Sabatier
M. Jean-Marc BROTO



Mme PETERS Salomé
a été admis(e) sur concours en : 2015
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le: 09/07/2019
a validé son année d'approfondissement le: 15/10/2020
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Développement de nouveaux hydrogels supramoléculaires comme supports de culture des cellules du système nerveux.

La médecine régénérative neuronale qui associe à la fois ingénierie tissulaire et biologie cellulaire consiste à remplacer un tissu ou un organe lésé par un autre synthétique issu d'une culture cellulaire sur un support nommé scaffold. La matrice extracellulaire est donc essentielle puisqu'elle doit être mimée au mieux pour permettre une croissance optimale de cellules souches. De nouveaux gélifiants moléculaires saccharidiques, pouvant servir de supports de culture, sont étudiés dans ce travail. Le gel de N-heptyl-D-galactonamide, issu de cette famille, présente une résistance mécanique similaire à celle du cerveau et permet la culture cellulaire. Il est aussi très malléable car il peut être modelé en filament grâce à la technique du wet-spinning. Dans ces travaux, les propriétés mécaniques de ces nouveaux hydrogels sont testées et les conditions de formation des filaments par wet-spinning sont évaluées. Enfin, les conditions optimales permettant leur impression en 3D sont définies.

Mots-clefs : culture cellulaire, hydrogel, impression 3D, matrice extracellulaire, neurone

Development of new molecular saccharide-based hydrogels as scaffolds for neural cell culture.

Neuronal regenerative medicine which associates tissue engineering and cell biology consists in replacing a damaged tissue or organ by another synthetic, the result of cell culture on a scaffold. Extracellular matrix is essential because we must perfectly mime it to let the stem cells grow better. In this work, we studied new molecular saccharide-based gelling agents which may be used as scaffold. N-heptyl-D-galactonamide which belongs to this family showed a similar resistance to the resistance of the brain and cell culture is possible on it. Moreover it is malleable because we can shape coils with it due to the wet-spinning technique. In this work, we tested the mechanical properties of these new hydrogels and we evaluated the making process of materials created from these compounds using wet-spinning. Last but not least we defined optimal conditions in which these agents are printed using 3D printing technique.

Key-words : cell culture, hydrogel, 3D printing, extracellular matrix, neuron