

Titre: Influence de différents polymères aminés sur le développement de
neurons corticaux primaires

Auteur: Lucile Gielly
Author:

Date: 2025

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Gielly, L. (2025). Influence de différents polymères aminés sur le développement
de neurones corticaux primaires [Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal].
Citation: PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/67508/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/67508/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Gregory De Crescenzo, & Jean-François Bouchard
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Influence de différents polymères aminés sur le développement de neurones
corticaux primaires**

LUCILE GIELLY

Institut de génie biomédical

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie biomédical

Août 2025

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

Influence de différents polymères aminés sur le développement de neurones corticaux primaires

présenté par **Lucile GIELLY**

en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Fabio CICOIRA, président

Gregory DE CRESCENZO, membre et directeur de recherche

Jean-François BOUCHARD, membre et codirecteur de recherche

Olivier HENRY, membre

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Gregory DE CRESCENZO, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et offert l'opportunité de travailler sur ce projet. Merci pour ta confiance, ton encadrement et tes conseils tout au long de ce parcours.

Je tiens également à remercier mon co-directeur de recherche, Jean-François BOUCHARD, pour m'avoir intégrée dans son équipe et permis de découvrir le domaine des neurosciences dans un environnement aussi stimulant.

Un grand merci à Aurélie et Benoît pour leur aide précieuse lors de mes expérimentations. Votre accompagnement, votre disponibilité et vos connaissances ont grandement contribué à la réalisation de ce travail.

Merci à tous les membres du laboratoire de Polytechnique pour leur soutien : Vaiana, Emma, Faranak, Ilona, Julie, Hélène, Benjamin, Romane et Jimmy. Merci également à mes collègues de l'École d'Optométrie : Pascale, Catarina, Catherine, Guillaume, Ismaël, Geneviève et Lucile, ainsi qu'à toutes les personnes que j'ai croisées au cours de ce projet.

RÉSUMÉ

Ce mémoire s'intéresse à l'optimisation de surfaces pour la culture cellulaire afin de favoriser spécifiquement le développement et la maturation de neurones corticaux primaires *in vitro*. La problématique principale est de comparer l'influence de revêtements de polymère aminé sur l'adhésion cellulaire, la croissance des neurites et la formation de réseaux synaptiques fonctionnels. Pour cela, quatre polymères ont été étudiés : le polyvinylamine (PVAm), le polyéthylèneimine branché 25 kDa et 800 Da (respectivement nommés PEIb1 et PEIb2) et le polyallylamine (PAAm). Ces polymères ont été attachés de manière covalente sur des lamelles de verre, puis comparés à la poly-D-lysine (PDL 5) prise pour référence.

Les méthodes utilisées combinent une évaluation colorimétrique de la densité surfacique de groupes amines sur les lamelles fonctionnalisées, grâce au test au bleu de Coomassie brillant, et une analyse du développement neuronal par immunocytochimie, en utilisant la synaptophysine et la sous-unité GluR1 du récepteur au glutamate de type AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate) comme marqueurs. Par ailleurs, la croissance des neurites et l'évolution de la surface cellulaire ont été suivies par microscopie en temps réel.

Les résultats montrent que le PEIb1 à 20 $\mu\text{g/mL}$ (PEIb1 20) favorise la croissance des neurites, induit une densité élevée de contacts synaptiques et limite la formation d'amas cellulaires. Le PVAm, bien que favorable au développement synaptique, entraîne une organisation des réseaux moins homogène. Le PEIb2 présente une densité d'amines insuffisante pour soutenir le développement des neurones et le PAAm a été écarté en raison d'une mauvaise homogénéité de greffage. L'analyse des contacts synaptiques indique, qu'après dix jours de culture, l'interconnexion des neurones est plus grande et la maturation est plus rapide sur la PDL 5. Après deux semaines de culture, les neurones semblent avoir établi plus de connexions entre eux sur le PEIb1 20, mais leur maturation est toujours retardée par rapport à ceux cultivés sur la PDL 5.

En conclusion, ce travail souligne la complexité du choix du polymère et de sa concentration pour la culture de neurones corticaux *in vitro*. Si le PEIb1 20 se distingue par sa capacité à favoriser la croissance des neurites et la densité synaptique, il présente toutefois un retard de maturation par rapport à la PDL 5. Ces résultats invitent à affiner les approches de fonctionnalisation des surfaces pour répondre aux exigences spécifiques de chaque application en recherche fondamentale.

Mots-clés : chimie de surface, polymères aminés, neurones corticaux primaires, maturation des neurones, activité synaptique

ABSTRACT

This thesis focuses on optimizing culture surfaces to promote the development and maturation of primary cortical neurons *in vitro*. The main goal is to compare the effects of different amine-based polymer coatings on cell adhesion, neurite growth and the formation of functional synaptic networks. Four polymers are studied: polyvinylamine (PVAm), branched polyethyleneimine at 25 kDa and 800 Da (PEIb1 and PEIb2, respectively) and polyallylamine (PAAm). These polymers were covalently grafted onto glass coverslips and compared to poly-D-lysine (PDL 5), used as a reference.

Methods combine a colorimetric assay, using Coomassie Brilliant Blue, to measure surface amine density, and immunocytochemical analysis of neuronal development, using synaptophysin and the GluR1 sub-unit of AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) receptor as markers. Neurite growth and cell surface area were also monitored by live microscopy.

Results indicate that PEIb1 at 20 μ g/mL (PEIb1 20) enhances neurite growth, high synaptic contact density and limits cell clustering. PVAm supports synaptic development but leads to less homogeneous network organization. PEIb2 shows insufficient amine density to sustain neuronal growth and PAAm was excluded due to poor coating homogeneity. After ten days of culture, analysis of synaptic contacts indicate that neuron interconnection and maturation are greater and faster on PDL 5. After two weeks, neurons on PEIb1 20 appear more interconnected, but still show delayed maturation compared to those grown on PDL 5.

In conclusion, this work highlights the complexity of choosing the right polymer and its concentration for *in vitro* cortical neuron cultures. Although PEIb1 20 stands out for supporting neurite growth and synaptic density, it exhibits slower maturation relative to PDL 5. These findings emphasize the need to refine surface functionalization approaches to meet the specific requirements of each fundamental research application.

Keywords: surface chemistry, amine functional polymers, primary cortical neurons, neuronal maturation, synaptic activity

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XII
LISTE DES ANNEXES.....	XV
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Contexte	1
1.2 Organisation du projet.....	2
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	5
2.1 Cultures cellulaires sur des biomatériaux	5
2.1.1 Différents matériaux et biomatériaux utilisés en culture cellulaire.....	5
2.1.2 Modifications de surfaces des matériaux pour les cultures cellulaires	7
2.1.3 Caractérisation des surfaces modifiées avec des groupes amines.....	13
2.2 Étude du développement de neurones corticaux primaires	18
2.2.1 Les neurones corticaux et leur culture.....	18
2.2.2 Méthodes d'évaluation de l'adhésion et de la maturation neuronale	25
CHAPITRE 3 DÉMARCHE DU TRAVAIL DE RECHERCHE	28
3.1 Déterminer les concentrations correspondant à une densité surfacique de groupes amines similaire à la PDL 5.....	30
3.2 Comparer le développement synaptique des neurones sur les différents polymères	30
3.3 Comparer la maturation, la survie et la fonctionnalité des neurones	31

CHAPITRE 4	MATÉRIEL ET MÉTHODES	33
4.1	Réactifs	33
4.2	Animaux	34
4.3	Préparation des surfaces	34
4.3.1	Solutions de polymères aminés	34
4.3.2	Silanisation des lamelles	35
4.3.3	Greffage.....	36
4.4	Test colorimétrique au bleu de Coomassie brillant	37
4.5	Cultures de neurones corticaux primaires	37
4.6	Immunocytochimie et microscopie confocale.....	38
4.7	Quantification des réseaux synaptiques – Analyse de densité de pixels	39
4.8	Analyse des contacts synaptiques	39
4.9	Imagerie des cellules vivantes.....	40
4.10	Test de viabilité LIVE/DEAD	40
4.11	Analyse statistique.....	40
CHAPITRE 5	RÉSULTATS	42
5.1	Estimation de la densité de groupes amines en surface	42
5.2	Développement des réseaux synaptiques	45
5.3	Analyse des contacts synaptiques	51
5.4	Microscopie en temps réel : longueur des neurites et aire cellulaire	55
5.5	Test de survie cellulaire.....	58
CHAPITRE 6	DISCUSSION GÉNÉRALE	60
6.1	Déterminer les concentrations correspondant à une densité surfacique de groupes amines similaire à la PDL 5.....	60
6.2	Comparer le développement synaptique des neurones sur les différents polymères	61

6.3	Comparer la survie, la maturation et la fonctionnalité des neurones	62
CHAPITRE 7	CONCLUSION	65
RÉFÉRENCES		67
ANNEXES		78

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4.1 Concentrations utilisées pour les différentes solutions de polymères 35

Tableau A.1 Concentrations utilisées pour les solutions de PAAm et de PDL 79

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Formules structurales des polymères aminés utilisés dans cette étude.....	3
Figure 2.1 Colorants utilisés pour la détection de groupes amines	14
Figure 2.2 Mesure des angles de contact d'une surface hydrophile et d'une surface hydrophobe	17
Figure 2.3 Représentation schématique d'un neurone.....	19
Figure 2.4 Représentation schématique d'une synapse glutamatergique	21
Figure 3.1 Illustration schématique de la procédure de greffage chimique, inspirée de (Stil et al., 2023).....	29
Figure 5.1 Test colorimétrique au bleu de Coomassie brillant réalisé sur des lamelles fonctionnalisées avec du PEIb1.....	43
Figure 5.2 Impact de la concentration du polymère sur la densité surfacique de groupes aminés disponibles.....	44
Figure 5.3 Quantification des densités de pixels de la synaptophysine, une protéine présynaptique	47
Figure 5.4 Effet des différents polymères sur le développement des réseaux synaptiques, en fluorescence.....	51
Figure 5.5 Influence du type de polymère sur la maturation synaptique des neurones corticaux	55
Figure 5.6 Influence du type de polymère sur la longueur des neurites, évaluée sur quatre cultures indépendantes	57
Figure 5.7 Influence du type de polymère sur l'aire cellulaire, évaluée sur quatre cultures indépendantes	58
Figure 5.8 Influence du revêtement sur le taux de survie cellulaire	59
<u>Figure A.1 Résultats du test colorimétrique au CBB, effectué sur des lamelles de verre fonctionnalisées avec du PAAm</u>	<u>81</u>
Figure B.1 Résultats du test colorimétrique à l'Orange II, effectué sur des lamelles de verre fonctionnalisées avec de la PDL	85

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AFM	Microscopie à force atomique
AMPA	Récepteur au glutamate de type AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate)
APTES	(3-aminopropyl)triéthoxysilane
BSA	Albumine de sérum bovin
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CBB	Bleu de Coomassie brillant
DIV	Jour <i>in vitro</i>
EGF	Facteur de croissance épidermique
EtDA	Ethylènediamine
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GOPS	(3-glycidyloxypropyl)triméthoxysilane
HBSS	Solution saline équilibrée de Hanks
HCl	Acide chlorhydrique
KCl	Chlorure de potassium
KH ₂ PO ₄	Phosphate de potassium monobasique
KOH	Hydroxyde de potassium
MeOH	Méthanol
MgSO ₄	Sulfate de magnésium
M _n	Masse molaire moyenne en nombre
M _w	Masse molaire moyenne en masse
NaCl	Chlorure de sodium
Na ₂ CO ₃	Carbonate de sodium

NaHCO ₃	Bicarbonate de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NGS	Sérum normal de chèvre
-NH ₂	Groupe amine primaire
NMDAR	Récepteur au N-méthyl-D-aspartate
PAAm	Polyallylamine
PCL	Polycaprolactone
PDL	Poly-D-lysine
PDL 5	Poly-D-lysine à 5µg/mL, pH 9.7, utilisée comme référence
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PEG	Polyéthylèneglycol
PEIb	Polyéthylèneimine branché
PEIb1	Polyéthylèneimine branché 25 kDa
PEIb1 1	Polyéthylèneimine branché 25 kDa, à 1 µg/mL
PEIb1 5	Polyéthylèneimine branché 25 kDa, à 5 µg/mL
PEIb1 10	Polyéthylèneimine branché 25 kDa, à 10 µg/mL
PEIb1 20	Polyéthylèneimine branché 25 kDa, à 20 µg/mL
PEIb2	Polyéthylèneimine branché 800 Da
PEIb2 40	Polyéthylèneimine branché 800 Da, à 40 µg/mL
PEIb2 80	Polyéthylèneimine branché 800 Da, à 80 µg/mL
PEIb2 100	Polyéthylèneimine branché 800 Da, à 100 µg/mL
PEIb2 300	Polyéthylèneimine branché 800 Da, à 300 µg/mL
PET	Polytéréphtalate d'éthylène
PFA	Paraformaldéhyde

PLA	Acide polylactique
PLL	Poly-L-lysine
PPSE	Potentiel postsynaptique excitateur
PVAm	Polyvinylamine
PVAm 10	Polyvinylamine à 10 µg/mL
PVAm 40	Polyvinylamine à 40 µg/mL
PVAm 60	Polyvinylamine à 60 µg/mL
PVAm 100	Polyvinylamine à 100 µg/mL
S-MEM	Milieu essentiel minimum d'Eagle
SNC	Système nerveux central
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
XPS	Spectroscopie photoélectronique par rayons X

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE A Motivations pour l'abandon de l'utilisation du polyallylamine à la suite du test colorimétrique au bleu de Coomassie brillant.....	78
ANNEXE B Motivations pour l'abandon du test colorimétrique au sel de sodium orange II.....	83

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Contexte

Les déficiences visuelles sont un problème de santé mondial affectant des millions de personnes. En 2020, selon une étude rapportée par Bourne et al. (2021), 43 millions de personnes étaient atteintes de cécité et 295 millions de personnes souffraient de déficience visuelle modérée à sévère dans le monde. Avec le vieillissement des populations, il est attendu que ces nombres augmentent respectivement jusqu'à 61 millions et 474 millions d'ici 2050 (Bourne et al., 2021). Les principales causes de déficience visuelle, telles que la cataracte et les défauts de réfraction (Flaxman et al., 2017), résultent d'un problème d'origine oculaire pouvant être corrigé par le port de lunettes de vue ou par chirurgie. Cependant, d'autres cas résultent de problèmes cérébraux. Ces cas, connus sous le nom de cécité ou déficience visuelle corticale, apparaissent lorsque le cerveau ne traite pas correctement les informations visuelles reçues par l'œil. Aucun traitement n'existe pour le moment, il est donc primordial de comprendre comment se forment les circuits nerveux visuels. C'est précisément l'objectif des recherches menées par le laboratoire du Professeur Bouchard, à travers deux axes principaux : le guidage axonal ainsi que la synaptogénèse et la plasticité du système nerveux. Le guidage axonal étudie comment les axones, prolongements des neurones, cherchent et se connectent à leurs cellules cibles lors du développement du système nerveux. La synaptogénèse, quant à elle, étudie la connexion des cellules nerveuses entre elles, par le biais de synapses. Les principaux objectifs de ces études sont de régénérer les voies visuelles, et ainsi, de traiter les déficiences visuelles.

Pour étudier ces mécanismes, il est essentiel d'avoir des neurones matures et donc des cultures stables dans le temps. En effet, une durée minimale de dix jours est nécessaire pour observer des synapses matures (M. Li et al., 2010). Le verre est souvent privilégié comme substrat de culture, du fait de sa compatibilité avec l'observation des cellules, notamment en microscopie confocale ou à fluorescence, ou encore avec la réalisation de tests fonctionnels, tels que le patch-clamp, une méthode d'électrophysiologie qui consiste en l'évaluation de l'activité synaptique des neurones ainsi que de l'excitabilité de leur membrane. Cependant, l'adhésion cellulaire sur le verre non traité est généralement insuffisante (Milky et al., 2022), c'est pourquoi l'utilisation de revêtements sur la surface de verre est nécessaire. L'un des revêtements les plus couramment utilisés en culture

neuronale est la polylysine, un polymère cationique favorisant l'adhésion des cellules grâce à des interactions électrostatiques entre les membranes cellulaires chargées négativement et la surface de polymère chargée positivement (Mazia et al., 1975). En effet, des groupements amines sont présents sur les chaînes latérales de ce polymère, et ces amines sont chargés positivement dans les conditions de culture cellulaire. La forme synthétique de la polylysine, l' α -polylysine, existe sous la forme de deux énantiomères, la poly-L-lysine (PLL) et la poly-D-lysine (PDL). Les liaisons peptidiques de la PLL sont plus facilement dégradées par les cellules, ce qui fait de la PDL un choix privilégié (J. Li & Yeung, 2008). Pour obtenir ces surfaces fonctionnelles, l'adsorption non spécifique de la PDL sur le verre reste la méthode la plus répandue. Néanmoins, cette dernière mène à des résultats variables ; les cellules ayant tendance à se réagréger après une semaine de culture (Y. H. Kim et al., 2011). Ce défi d'attachement stable de la PDL sur le verre a été mis en lumière lors d'une précédente collaboration entre le laboratoire du Professeur Bouchard et le laboratoire du Professeur De Crescenzo (Stil et al., 2023). Un protocole simple de greffage covalent de la PDL sur le verre a été mis en place, en utilisant du (3-glycidyloxypropyl)triméthoxysilane (GOPS) comme agent de liaison. Dans cette étude, l'influence du substrat sur la maturation de neurones corticaux primaires a été démontrée. Sans revêtement, les cellules n'adhèrent pas et se regroupent en amas. Une concentration trop faible en PDL entraîne rapidement une réagrégation des cellules sous forme d'amas, tandis qu'une concentration trop forte ne permet pas l'adhésion des cellules. Enfin, à une concentration surfacique optimale, l'adhésion des neurones et le développement de réseaux synaptiques fonctionnels sont plus importants sur la PDL greffée que sur la PDL adsorbée. Ainsi, cette méthode standardisée d'attachement covalent de la PDL permet d'obtenir des résultats reproductibles d'une culture à l'autre.

1.2 Organisation du projet

Dans ce projet, une étude similaire à celle menée sur la PDL par Stil et al. (2023) est réalisée sur d'autres polymères aminés : le polyvinylamine (PVAm), le polyéthylèneimine branché (PEIb) et le polyallylamine (PAAm). L'objectif est de comparer l'influence de ces différents polymères cationiques sur le comportement cellulaire, en particulier sur le développement et la maturation des réseaux synaptiques, ainsi que sur la fonctionnalité des neurones. Le PVAm, le PEIb et le PAAm sont des polymères fréquemment utilisés dans le domaine biomédical. Ils ont notamment été

utilisés dans le laboratoire du Professeur De Crescenzo pour améliorer l'adhésion de cellules endothéliales sur des surfaces de polyester (Noel et al., 2015), pour de la transfection génique (Fortier et al., 2013) et à des fins d'ingénierie tissulaire (Haddad et al., 2016), respectivement. Le PEIb et le PAAm sont également des revêtements utilisés lors de cultures de cellules neuronales (Tsai et al., 2020; Yang et al., 2024). Ces trois polymères, tout comme la PDL, portent des groupes amines primaires à chaque unité de répétition de leur chaîne. Cependant, leurs structures moléculaires sont différentes (Figure 1.1). La PDL, le PVAm et le PAAm présentent une structure linéaire, tandis que le PEIb possède une conformation branchée. De plus, la longueur des chaînes carbonées varie d'un polymère à un autre.

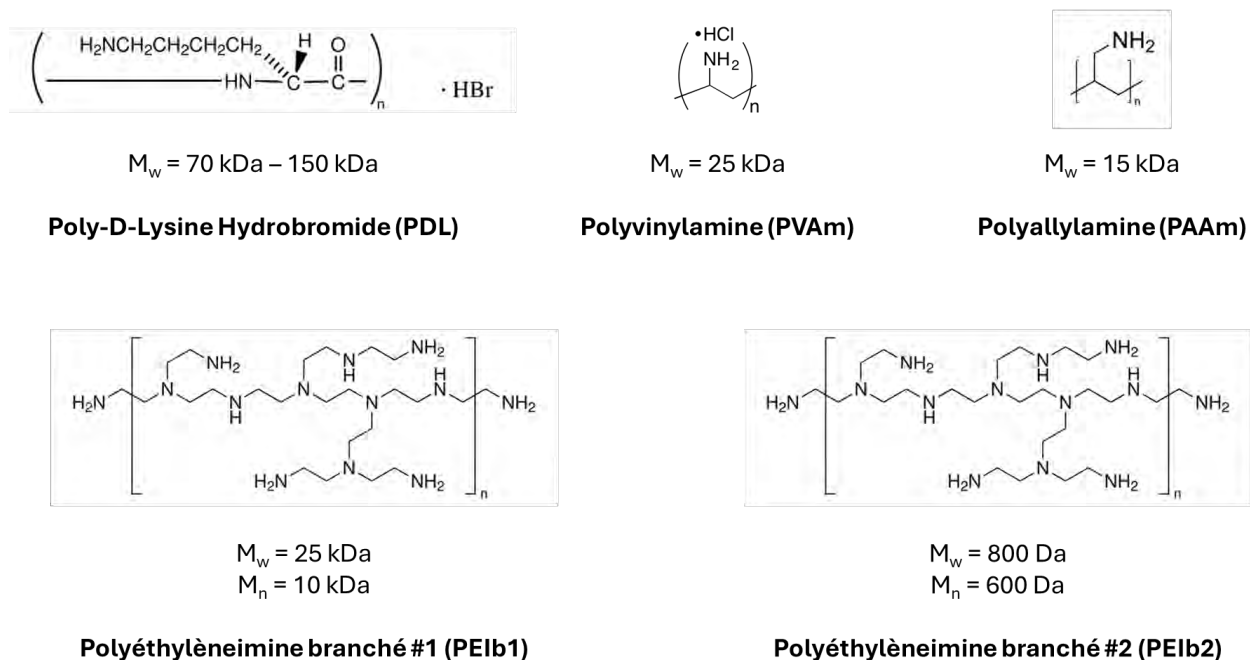


Figure 1.1 Formules structurales des polymères aminés utilisés dans cette étude.

M_w et M_n correspondent respectivement à la masse molaire moyenne en masse et à la masse molaire moyenne en nombre.

Ces différences structurales influencent leurs propriétés physicochimiques. Les chaînes carbonées influencent l'hydrophilie du polymère. Le pKa varie d'un polymère à un autre (PDL : pKa ~ 9.5 (Franzin & Macdonald, 2001); PEIb : pKa 8.5-9.5 (Choosakoonkriang et al., 2003;

von Harpe et al., 2000), PVAm : $pK_a \sim 9.5$ (Katchalsky et al., 1957; Pachpinde & Natarajan, 2021), PAAm : $pK_a \sim 9$ (X. Li et al., 2020)). Ainsi, pour un même pH, les degrés de protonation de ces polymères sont différents, ce qui influence la charge ainsi que l'hydrophilie de la surface (Iqbal et al., 2019). Les cellules étant sensibles à ces deux propriétés, il est intéressant de voir leurs différences de développement sur ces polymères (Ferrari et al., 2019). Par ailleurs, le PVAm, le PEIb et le PAAm n'ont pas de liaisons peptidiques, contrairement à la PDL, et ne sont donc pas sujets à la protéolyse (Clément et al., 2022). Ils seront comparés à la condition optimale de culture déterminée précédemment par Stil et al. (2023), à savoir la PDL greffée sur le verre à une concentration de 5 $\mu\text{g/mL}$ (PDL 5), qui sera considérée comme la condition de référence.

Afin de mener à bien cette étude, ce projet a été découpé en trois sous-objectifs.

- 1) Déterminer les concentrations optimales de chaque polymère permettant d'obtenir une densité de groupes amines en surface similaire à celle de la référence (PDL 5).
- 2) Comparer le développement synaptique des neurones cultivés sur chacun de ces polymères, aux concentrations déterminées au point 1).
- 3) Comparer la maturation, la survie et la fonctionnalité des neurones entre la condition optimale de développement synaptique obtenue en 2) et la condition de référence (PDL 5).

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Cultures cellulaires sur des biomatériaux

2.1.1 Différents matériaux et biomatériaux utilisés en culture cellulaire

Depuis les débuts de la culture cellulaire dans les années 1900, les matériaux utilisés pour cultiver des cellules ont beaucoup évolué. Le choix du substrat dépend du type de cellules, de la méthode de culture et de l'application visée.

Il existe trois grands types de cellules en culture : les cellules primaires, les cellules immortalisées et les cellules souches (Segeritz & Vallier, 2017). Les cellules primaires, dont font partie les neurones, sont isolées directement à partir d'un organisme vivant. Elles sont privilégiées en raison de leur représentation plus adéquate des conditions *in vivo*. Les cellules immortalisées subissent une transformation génétique qui leur permet de se multiplier indéfiniment. Pour finir, les cellules souches ont la capacité de se différencier en une multitude de types de cellules et représentent également les conditions *in vivo* avec une grande ressemblance.

Les méthodes de culture cellulaire se divisent en deux grandes catégories. Premièrement, les cultures en deux dimensions (2D), dites adhérentes, permettent aux cellules de se développer sous la forme d'une seule couche sur une surface rigide. Ce type de culture est le plus utilisé, du fait de sa simplicité et de la possibilité d'y réaliser des tests fonctionnels (Kapałczyńska et al., 2018). La seconde catégorie correspond aux cultures 3D, où les cellules peuvent se développer dans toutes les directions, sous la forme de structures tridimensionnelles. Ces modèles, parmi lesquels se trouvent les cultures en suspension ou sur échafaudage, sont de plus en plus utilisés, notamment en génie tissulaire, car ils se rapprochent davantage de la réalité *in vivo*.

Au tout début de la culture cellulaire, le verre était le matériau privilégié. Sa transparence, permettant l'observation des cellules au microscope, et sa nature inerte, n'affectant pas les cellules, comptent parmi ses nombreux avantages. Par exemple, les lamelles et les boîtes de Petri en verre sont toujours utilisées aujourd'hui, en particulier pour des expériences où il est nécessaire de déplacer facilement les cellules, comme lors de tests électrophysiologiques. Cependant, le verre n'est pas naturellement favorable à l'adhésion des cellules. Il est donc essentiel de modifier sa surface afin d'améliorer cette adhésion.

Avec le temps, le plastique, en particulier le polystyrène, a pris une place très importante. Il est peu coûteux, facile à produire à grande échelle et existe sous de nombreux formats (flasques, plaques multipuits, boîtes de Petri, etc.). Cependant, le polystyrène est très hydrophobe, ce qui rend l'attachement des cellules sur ce type de surface très difficile. Il est donc nécessaire d'effectuer des modifications de surface afin d'améliorer sa mouillabilité. Le polystyrène de culture cellulaire utilisé de nos jours a d'ailleurs été créé de manière accidentelle par l'entreprise Falcon Plastics. Alors que l'objectif était de recouvrir le polystyrène de verre, le traitement plasma à l'oxygène, utilisé pour préparer les surfaces de polystyrène, a permis d'obtenir une surface assez hydrophile pour cultiver des cellules (Lerman et al., 2018). Cependant, les interactions entre les cellules et le matériau ne sont pas contrôlées et l'ajout de revêtements chimique et/ou biologique est souvent nécessaire (Krutty et al., 2016).

Pour une meilleure reproduction de l'environnement naturel des cellules, de plus en plus de supports tridimensionnels tels que les hydrogels et les échafaudages sont utilisés. Ces matériaux peuvent être d'origine naturelle (comme le collagène, la gélatine, le chitosane ou la soie) ou synthétique (comme l'acide polylactique, le polycaprolactone, le polydiméthylsiloxane (PDMS) ou le polyéthylèneglycol (PEG)) (Elsayed & Teow, 2025; Y. Li & Kilian, 2015; Wu et al., 2025). Le choix du matériau dépend du type de tissu que l'on cherche à imiter. Par exemple, le collagène est très utilisé pour la culture de cellules du cerveau, de la peau ou du cœur, tandis que le PEG est apprécié en ingénierie tissulaire pour les tissus nerveux (Moysidou et al., 2021). Les supports 3D peuvent être composés d'un ou de plusieurs polymères. La combinaison de différents polymères permet d'améliorer les résultats cellulaires. Il a précédemment été observé que des neurones corticaux de rats étaient capables d'établir des connexions neuronales lorsqu'ils étaient cultivés sur des échafaudages de soie recouverts de collagène, tandis que ces neurones poussaient individuellement sur du collagène seul (Tang-Schomer et al., 2014). Par ailleurs, certains polymères, comme le PDMS, sont hydrophobes et ne peuvent donc pas être utilisés seuls. L'utilisation de revêtements permettant l'adhésion et le développement des cellules doit être envisagée (Liu et al., 2019).

De nos jours, le verre et le plastique restent les matériaux les plus utilisés pour les cultures 2D, même si ces modèles ne reproduisent pas parfaitement l'environnement cellulaire. Pour y remédier, l'utilisation supports 3D est en plein développement. Néanmoins, les cultures 2D gardent

un avantage pour l'observation des cellules au microscope et pour la réalisation de certains tests, grâce à la facilité de manipulation des supports, comme les lamelles.

2.1.2 Modifications de surfaces des matériaux pour les cultures cellulaires

Comme mentionné dans le paragraphe précédent, les surfaces des matériaux utilisés en culture cellulaire ne permettent pas toujours, à elles seules, une bonne adhésion et croissance des cellules. Il est donc essentiel de modifier ces surfaces pour les rendre plus favorables au développement cellulaire. Dans cette section, trois grandes familles de modifications de surfaces seront abordées : l'ajout de groupements chimiques fonctionnels, l'utilisation de polymères et l'intégration de matériel biologique.

2.1.2.1 Modifications de surface avec ajout de groupements chimiques fonctionnels

La fonctionnalisation chimique des surfaces est une étape essentielle pour rendre les matériaux plus adaptés à la culture cellulaire. Les membranes des cellules sont chargées négativement, ce qui favorise leur développement sur des surfaces chargées positivement. L'ajout de groupes fonctionnels en surface permettra ainsi de moduler l'hydrophilie, la charge et la rugosité de la surface. Plusieurs techniques ont été développées afin d'effectuer ces modifications, notamment par traitement plasma ou par chimie des solutions.

Le plasma correspond au quatrième état de la matière : il s'agit d'un gaz partiellement ionisé, composé d'ions, d'électrons et de particules neutres. Lorsqu'un matériau est exposé à un plasma, la composition chimique de sa surface peut être modifiée sans que sa structure ne soit altérée (Asadian et al., 2020). Le choix du gaz utilisé lors du traitement permet d'introduire différents groupes fonctionnels. Un plasma d'oxygène (O_2) ajoutera des atomes d'oxygène en surface, permettant la formation de groupes hydroxyles ($-OH$), carbonyles ($-CO$) ou carboxyles ($-COOH$), tandis qu'un plasma d'azote (N_2) ou d'ammoniac (NH_3) ajoutera des atomes d'azote en surface, permettant la formation de groupes amines (Teimouri et al., 2023).

Le traitement par plasma trouve de nombreuses applications dans le domaine biomédical. Comme mentionné en section 2.1.1, le polystyrène utilisé aujourd'hui en culture cellulaire a été soumis à

un traitement plasma d'oxygène préalable. Ce dernier peut entraîner la rupture des groupes phényles présents en surface du polystyrène et modifier les propriétés de surface en créant des groupes hydroxyles, carbonyles ou encore carboxyles (Lerman et al., 2018). Un autre exemple concerne la modification d'échafaudages de polycaprolactone (PCL) dans le but d'améliorer la régénération du tissu osseux et du fibrocartilage sur un modèle murin (W. Kim et al., 2021). Bien que les propriétés mécaniques, la biodégradabilité et la biocompatibilité du PCL en font un excellent choix pour la fabrication d'échafaudages pour le génie tissulaire, l'affinité cellulaire du PCL est limitée en raison de son hydrophobicité. Pour pallier ce problème, W. Kim et al. ont soumis le PCL à des plasmas d'O₂ et de N₂, augmentant ainsi son hydrophilie grâce à l'incorporation de groupes fonctionnels à sa surface. Le plasma d'O₂ a également généré des pores à la surface du PCL, créant une forte ressemblance structurale avec l'environnement extracellulaire, ce qui a permis aux cellules de proliférer en plus grand nombre. La technique de traitement au plasma a également été utilisée dans le laboratoire du Pr. De Crescenzo pour fonctionnaliser des films de polytéréphtalate d'éthylène (PET), avec l'objectif d'accroître l'adhésion et la prolifération de cellules épithéliales cornéennes (Boucher et al., 2010). Le PET a été exposé à un plasma d'ammoniac, ce qui a permis de former des groupes amines primaires en surface. Grâce à cette modification, des facteurs de croissance ont ensuite été attachés de manière covalente au PET. L'adhésion des cellules, tout comme leur développement, se sont améliorés sur les surfaces de PET fonctionnalisées.

En plus du plasma, la chimie des solutions permet aussi de fonctionnaliser des surfaces. L'hydrolyse et l'aminolyse sont deux méthodes utilisées pour modifier des polyesters de nature hydrophobe principalement.

L'hydrolyse consiste à traiter un substrat avec une solution alcaline, à base d'hydroxyde de sodium (NaOH) ou d'hydroxyde de potassium (KOH), ou une solution acide, à base d'acide chlorhydrique (HCl). Après ce traitement, les groupes esters (-COO) présents sur le polymère sont hydrolysés en groupes hydroxyles et carboxyles (Rana et al., 2016). Ce traitement a été appliqué à des nanofibres de PCL pour améliorer leur affinité cellulaire et les rendre appropriées à une utilisation en génie tissulaire (Yaseri et al., 2023). L'apparition de groupes hydroxyles et carboxyles a été confirmée par spectroscopie infrarouge. Ces groupes fonctionnels ont augmenté l'hydrophilie du PCL, comme le démontre la mesure d'angle de contact. La prolifération de fibroblastes cultivés sur le PCL hydrolysé a été amplifiée et leur viabilité prolongée.

L'aminolyse, quant à elle, introduit des groupes amides ($-\text{CONH}_2$) et hydroxyles en utilisant des composés organiques tels que l'éthylènediamine (EtDA) (Hetemi & Pinson, 2019). Des échafaudages composés de nanofibres d'acide polylactique (PLA) ont été traités avec de l'EtDA pour le rendre plus hydrophile et promouvoir l'adhésion de cellules souches neuronales (Haddad et al., 2016). En plus de groupes amides, l'utilisation d'EtDA a permis d'inclure des amines primaires à la surface du PLA, sur lesquels des facteurs de croissance ont été greffés. L'aminolyse avec l'EtDA a aussi été utilisée pour ajouter des groupes fonctionnels à la surface d'échafaudages de PET (Noel et al., 2013). L'incorporation de groupes amines rend ensuite possible l'immobilisation de biomolécules à la surface du PET.

En conclusion, la fonctionnalisation chimique des surfaces grâce aux méthodes décrites précédemment permet de modifier les propriétés physicochimiques de matériaux initialement inertes. Selon le gaz ou la solution choisi, différents groupes fonctionnels sont créés en surface. L'hydrophilie, la charge ou encore la rugosité de la surface peuvent être modulées et ainsi optimiser l'adhésion et le développement cellulaires.

2.1.2.2 Modifications de surface avec des polymères

Les polymères jouent un rôle essentiel dans l'optimisation des surfaces pour la culture cellulaire. Ils sont souvent utilisés en tant que revêtement sur des substrats initialement inertes. Leur sélection repose sur leurs propriétés physicochimiques favorisant le développement des cellules (hydrophilie, charge, etc.). Ces propriétés proviennent de la structure du polymère et de la présence de groupes fonctionnels. Les groupes fonctionnels privilégiés en culture sont les amines primaires ($-\text{NH}_2$). En effet, leur charge positive facilite les interactions avec les cellules, chargées négativement (Martocq & Douglas, 2021). Avec la méthode de revêtement, la surface initiale est entièrement recouverte et les cellules interagissent ainsi uniquement avec la couche polymérique.

Les polymères aminés peuvent être d'origine naturelle ou bien synthétiques.

Un des polymères naturels les plus utilisés est le chitosane. Ce polysaccharide résulte de la désacétylation de la chitine, laissant apparaître des groupes amines primaires sur ses chaînes. Il est souvent privilégié pour l'élaboration d'échafaudages 3D, mais il peut également être employé en tant que revêtement de surfaces 2D (Croisier & Jérôme, 2013). Par exemple, des lamelles de verre

fonctionnalisées avec une couche de chitosane ont supporté l'adhésion et la maturation de neurones corticaux et hippocampiques de rats, ainsi que de neurones corticaux dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines (Di Lisa et al., 2022).

Concernant les polymères synthétiques, la poly-D-lysine (PDL) et la polyornithine font partie des revêtements les plus courants en culture cellulaire. Ce sont deux polycations qui portent également des groupes $-NH_2$ sur leurs chaînes. Cependant, ils présentent des liaisons peptidiques qui peuvent être clivées par certaines enzymes comme la trypsine, utilisée pour séparer les cellules primaires avant leur mise en culture. Pour éviter ce problème, des polymères ne présentant aucune liaison peptidique peuvent être utilisés (Clément et al., 2022). Le polyvinylamine (PVAm), le polyéthylèneimine branché (PEIb) et le polyallylamine (PAAm), utilisés dans ce projet de maîtrise, rentrent dans cette catégorie et trouvent de nombreuses applications dans le domaine biomédical.

Le PVAm est le polymère contenant le plus grand nombre d'amines primaires, ce qui fait de lui un excellent choix dans la modification de surfaces (Pelton, 2014). Il est notamment utilisé en thérapie génique pour la livraison d'acide ribonucléique ciblant des cellules cancéreuses (Tian et al., 2022). Par ailleurs, plusieurs études mentionnent l'utilisation du PVAm comme revêtement polymérique. Noel et al. (2015) ont montré que le PVAm greffé sur des surfaces de PET a augmenté l'adhésion de cellules endothéliales d'un facteur 4. Dans une autre étude, le PVAm a été utilisé en combinaison de la dopamine afin d'élaborer un revêtement inhibant la croissance de cellules cancéreuses (T.-D. Zhang et al., 2020). Le PVAm et la dopamine ont été déposés sur différents substrats (verre, polychlorure de vinyle et acier inoxydable) avec la technique d'assemblage couche par couche. La mouillabilité de tous les substrats testés a été augmentée après le dépôt du revêtement, riche en groupes $-NH_2$. Le revêtement a également considérablement réduit la survie de cellules cancéreuses, tout en promouvant le développement de cellules du système immunitaire.

Le PEIb est la référence absolue en thérapie génique mais son utilisation en tant que promoteur d'adhésion cellulaire est en plein essor depuis plusieurs années (Vancha et al., 2004). Plusieurs études mentionnent cependant sa cytotoxicité, qui augmente avec son poids moléculaire (J. Song et al., 2020). Il reste néanmoins fortement utilisé en culture cellulaire neuronale, où sa cytotoxicité n'est pas mentionnée (Bledi et al., 2000; Hu et al., 2005; Lakard et al., 2005; Yang et al., 2024). Le PEIb peut également être combiné à d'autres polymères pour revêtir certains substrats. En ingénierie tissulaire, il a été associé avec de la gélatine pour modifier la surface d'échafaudages de

carbonate de propylène, dont l'hydrophobie n'est pas compatible avec le développement de cellules (Zhong et al., 2012). La spectroscopie infrarouge a confirmé la présence de groupes amines en surface, qui ont augmenté son hydrophilie. Le substrat modifié a favorisé l'adhésion et la prolifération d'ostéoblastes humains.

Pour finir, le PAAm, tout comme le PVAm et le PEIb, est également fréquemment utilisé en thérapie génique (Kondinskaia & Gurtovenko, 2018). En culture cellulaire, le PAAm polymérisé par plasma sur des surfaces de verre, de polystyrène ou de titane améliore significativement l'adhésion cellulaire (Milky et al., 2022; Zhao et al., 2018). Par ailleurs, des travaux comme ceux de Haddad et al. (2016) et Tallec et al. (2018) exploitent la fonctionnalisation préalable d'échafaudages de PLA ou de plaques CellBIND avec du PAAm pour ensuite effectuer un greffage de peptides ou de facteurs de croissance, et ainsi favoriser l'interaction entre le substrat et les cellules.

En conclusion, le PVAm, le PEIb et le PAAm sont des polymères aminés présentant des structures différentes, qui trouvent de nombreuses applications en tant que revêtements sur des substrats de culture cellulaire. Dans ce projet, l'objectif principal est de voir si la structure du polymère peut influencer le développement des cellules en culture.

2.1.2.3 Modifications de surface avec matériel biologique

Les modifications de surface intégrant du matériel biologique visent à reproduire l'environnement de la matrice extracellulaire afin d'améliorer l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire sur des supports peu fonctionnels. Cette approche consiste à déposer sur des protéines, des peptides ou encore des facteurs de croissance sur les substrats utilisés en culture cellulaire ou en ingénierie tissulaire.

Les protéines de la matrice extracellulaire, telles que la laminine, la fibronectine et le collagène, sont régulièrement utilisées pour fonctionnaliser des surfaces. Elles favorisent l'adhésion cellulaire en émettant des signaux biochimiques reconnus par les intégrines, récepteurs présents à la surface des membranes des cellules (Chen et al., 2024). Par exemple, la laminine a été utilisée par Ghollasi et Poormoghadam (2022) pour recouvrir des nanofibres de polyéthersulfone, un polymère naturellement hydrophobe et donc peu idéal pour la culture

cellulaire. L'adhésion et la prolifération de cellules souches pluripotentes induites ont été nettement améliorées sur les nanofibres fonctionnalisées, tout comme leur différenciation en cellules neuronales. Dans une autre étude, un revêtement de collagène a été appliqué sur des surfaces de titane afin de promouvoir la différenciation ostéogénique de la lignée cellulaire SaOS-2 (Mieszkowska et al., 2020). Cette modification permet d'améliorer les implants utilisés à des fins de régénération osseuse, comme en dentisterie ou en orthopédie.

À la place des protéines de la matrice extracellulaire, des peptides courts dérivés de ces protéines, moins coûteux et plus faciles à synthétiser, peuvent être greffés sur les surfaces à fonctionnaliser (Visser et al., 2016). Le motif RGD, issu de la fibronectine, et le motif YIGSR, issu de la laminine, font partie des peptides d'adhésion les plus répandus (Chausse et al., 2023). Ces deux peptides d'adhésion ont été immobilisés, en plus de deux autres séquences de peptides (REDV, issue de la laminine, et CAG, issue du collagène) sur des substrats de dextrane afin d'évaluer leur influence sur l'adhésion de cellules endothéliales vasculaires (Noel et al., 2016). Les séquences RGD et YIGSR ont donné les meilleurs résultats. Dans une autre étude, le développement de neurones hippocampiques primaires sur des surfaces de verre recouvertes de nanofibres de térapeptides a été étudié (Martin et al., 2020). L'objectif était de comparer l'influence de l'ordre des acides aminés dans la séquence du peptide sur la viabilité et la croissance des neurones.

En plus des protéines de la matrice extracellulaire ou des peptides d'adhésion, des facteurs de croissance tels que l'EGF (facteur de croissance épidermique) ou le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) peuvent être greffés à la surface des matériaux. Haddad et al. (2016) ont montré que l'ajout de EGF sur des échafaudages de PLA a augmenté la viabilité et la prolifération de cellules souches neurales, tandis que Noel et al. (2016) ont utilisé le VEGF, en combinaison avec le peptide d'adhésion RGD, pour stimuler la croissance de cellules endothéliales vasculaires sur du dextrane. Dans une autre étude, Riahi et al. (2017) ont comparé deux manières de présenter l'EGF sur des substrats de sulfate de chondroïtine. La viabilité des cellules vasculaires musculaires était plus grande lorsque l'EGF était greffé sur le substrat par superhélice que lorsqu'il était simplement lié de manière covalente.

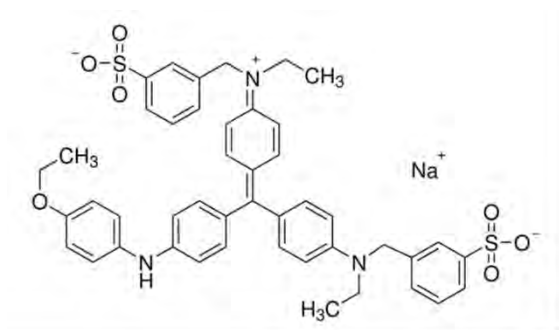
Ainsi, il est possible de décorer des surfaces avec du matériel biologique ayant des fonctions précises pour guider et influencer l'adhésion, la prolifération voire la différenciation des cellules.

2.1.3 Caractérisation des surfaces modifiées avec des groupes amines

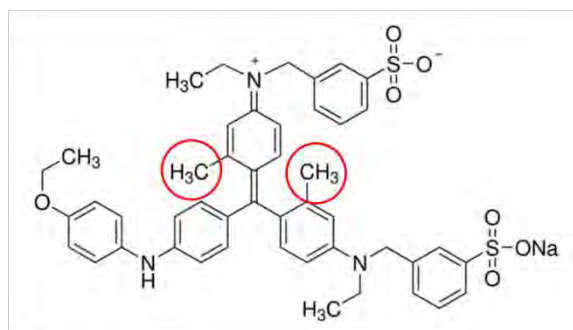
Pour valider la modification des matériaux et leur impact sur leurs propriétés physicochimiques, diverses méthodes de caractérisation existent. Cette section se concentrera sur la caractérisation des surfaces fonctionnalisées avec des groupes amines.

2.1.3.1 Tests colorimétriques

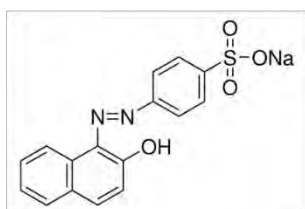
Les tests colorimétriques permettent d'évaluer qualitativement, par observation de la coloration des substrats, et quantitativement, par mesure d'absorbance, la présence de groupes amines en surface des matériaux. Les colorants les plus utilisés pour caractériser la présence d'amines sont le bleu de Coomassie (CBB), le sel de sodium Orange II (Orange II) et la ninhydrine (Martocq et al., 2021; Stauß et al., 2024). Leurs formules moléculaires sont présentées en Figure 2.1.



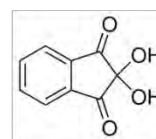
Bleu de Coomassie brillant R-250



Bleu de Coomassie brillant G-250



Sel de sodium Orange II



Ninhydrine

Figure 2.1 Colorants utilisés pour la détection de groupes amines

Les cercles rouges indiquent les deux groupes méthyles supplémentaires présents sur la forme G-250 du bleu de Coomassie brillant.

Le CBB est un colorant anionique de la famille des triphénylméthanés. Deux formes de CBB existent : le R-250 et le G-250, qui possède deux groupes méthyles supplémentaires, encerclés en rouge sur la figure 2.1. Le CBB se lie aux protéines par l'intermédiaire des groupes amines présents sur leurs chaînes (El-Ashram et al., 2015). La forme G-250 est majoritairement utilisée pour les tests de Bradford tandis que la forme R-250 est principalement utilisée pour les SDS-PAGE. De plus, le CBB peut être exploité pour détecter les amines primaires de revêtements polymériques (Coussot et al., 2011). Il est préparé dans une solution acide et est ensuite déposé sur les surfaces à caractériser. Cela entraîne la protonation de toutes les amines primaires, qui permet d'établir un lien électrostatique avec les groupes sulfonés, chargés négativement, du colorant anionique. Les surfaces sont ensuite immergées dans une solution alcaline, déprotonant les amines, ce qui permet la libération du colorant en solution, dont l'absorbance est mesurée à 630nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la densité surfacique de groupes amines.

Cependant, la grande taille moléculaire du CBB et la présence de deux charges négatives peut induire une sous-estimation de la quantité d'amines présentes en surface (Noel et al., 2011). Il a néanmoins été utilisé précédemment par Stil et al. (2023) afin de d'évaluer qualitativement la densité surfacique d'amines pour différentes concentrations de poly-D-lysine, utilisée en tant que revêtement pour des cultures neuronales.

L'Orange II est lui aussi un colorant anionique sulfoné, mais de plus petite taille et ne possédant qu'une charge négative. Grâce à un encombrement stérique réduit, il permet une détection plus précise des groupes amines primaires (Noel et al., 2011). Son utilisation repose sur le même fonctionnement que le CBB : préparé en solution acide, il va se lier aux amines protonées présentes sur le revêtement polymérique. La lecture d'absorbance se fera à une longueur d'onde de 484 nm. Par exemple, le test colorimétrique à l'Orange II a été utilisé pour quantifier la densité surfacique de charge d'un assemblage couche par couche de polystyrène sulfonate et de polyallylamine (He et al., 2024).

Contrairement au CBB et à l'Orange II, la ninhydrine n'est pas un colorant sulfoné. Elle interagit avec les amines primaires pour former un composé appelé pourpre de Ruhemann, dont l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 570 nm (Stauß et al., 2024). La ninhydrine présente cependant quelques inconvénients. Elle est également capable de détecter les amines secondaires (qui sont présentes dans le polyéthylèneimine branché, par exemple) et la formation du pourpre de Ruhemann nécessite une destruction de l'échantillon (Jeong et al., 2023).

2.1.3.2 Spectroscopie et microscopie

Pour aller plus loin dans l'analyse des surfaces, des techniques de spectroscopie et de microscopie peuvent être employées. Elles fournissent une analyse détaillée de la composition chimique et de la topographie des surfaces modifiées.

La spectroscopie photoélectronique par rayons X (XPS) est une méthode utilisée pour analyser une surface jusqu'à une profondeur de 10 nm (Krishna & Philip, 2022). Les surfaces sont irradiées par un faisceau de rayons X, ce qui éjecte des électrons de la surface. Les électrons éjectés n'ont pas tous la même énergie selon les atomes auxquels ils appartiennent. Ainsi, les éléments composant la surface, ainsi que leur état chimique, peuvent être caractérisés. L'énergie des

électrons libérés est mesurée par un spectromètre et le pourcentage atomique de chaque élément présent à la surface du matériau est calculé. Par exemple, Milky et al. (2022) ont utilisé la technique XPS pour trouver une corrélation entre la composition de la surface et l'adhésion de cellules neuronales. Les revêtements polymériques possédant des groupes amines ont déclenché une adhésion cellulaire significativement plus grande. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est une autre technique qui permet de caractériser la composition chimique de la surface étudiée. Plus précisément, elle analyse les liaisons chimiques présentes sur la surface du matériau. Ce dernier est placé sous une lumière infrarouge, qui va faire vibrer les liaisons chimiques à des fréquences spécifiques et ainsi permettre leur identification.

Des méthodes de microscopie peuvent être employées, non pas pour déterminer la composition chimique de la surface, mais pour évaluer son homogénéité et sa rugosité. C'est notamment le cas de la microscopie à force atomique (AFM). Une sonde balaye la surface du matériau et mesure les forces d'interaction entre les atomes à la surface de l'échantillon et le sommet de la sonde pour générer une cartographie 3D.

2.1.3.3 Angle de contact

L'angle de contact est une technique utilisée pour évaluer la mouillabilité de la surface. Une goutte d'eau est déposée sur le substrat à étudier et l'angle entre le liquide et le substrat solide est mesuré par un goniomètre. Plus l'angle est petit, plus la surface est hydrophile. Un angle de contact inférieur 90° caractérise une surface hydrophile tandis qu'un angle de contact supérieur à 90° signifie que la surface est hydrophobe (Figure 2.2). Cette technique est généralement utilisée pour valider une modification de surface.

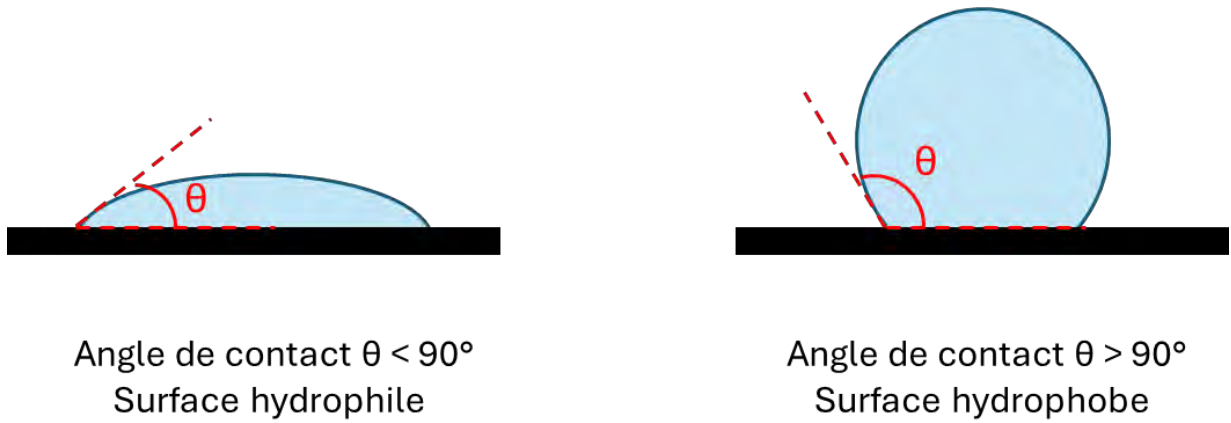


Figure 2.2 Mesure des angles de contact d'une surface hydrophile et d'une surface hydrophobe

2.2 Étude du développement de neurones corticaux primaires

2.2.1 Les neurones corticaux et leur culture

Dans cette section, plusieurs aspects concernant les neurones corticaux seront évoqués. Dans un premier temps, la structure et la fonction des neurones corticaux seront présentées. Ensuite, le développement et la maturation des neurones en culture seront abordés. Pour finir, les différentes méthodes utilisées pour cultiver des neurones corticaux seront décrites. Le vocabulaire introduit facilitera la compréhension des résultats obtenus dans le cadre de ce projet.

2.2.1.1 Structure et fonction des neurones corticaux

Les neurones constituent l'unité de base du système nerveux, qui se divise en deux grandes parties : le système nerveux central (SNC), comprenant le cerveau et la moelle épinière, et le système nerveux périphérique, formé des nerfs et des ganglions qui relient le SNC à l'ensemble de l'organisme. Un neurone est composé d'un corps cellulaire, aussi appelé soma, qui abrite le noyau et le cytoplasme, de nombreux prolongements courts appelés dendrites et d'un long prolongement appelé axone, au bout duquel se trouvent des terminaisons nerveuses (Figure 2.2). Les dendrites reçoivent les signaux provenant d'autres neurones, puis l'axone conduira l'influx nerveux jusqu'aux terminaisons synaptiques, où il sera transmis à d'autres cellules. L'axone est entouré d'une gaine de myéline, qui le protège et assure une transmission rapide et efficace du signal nerveux.

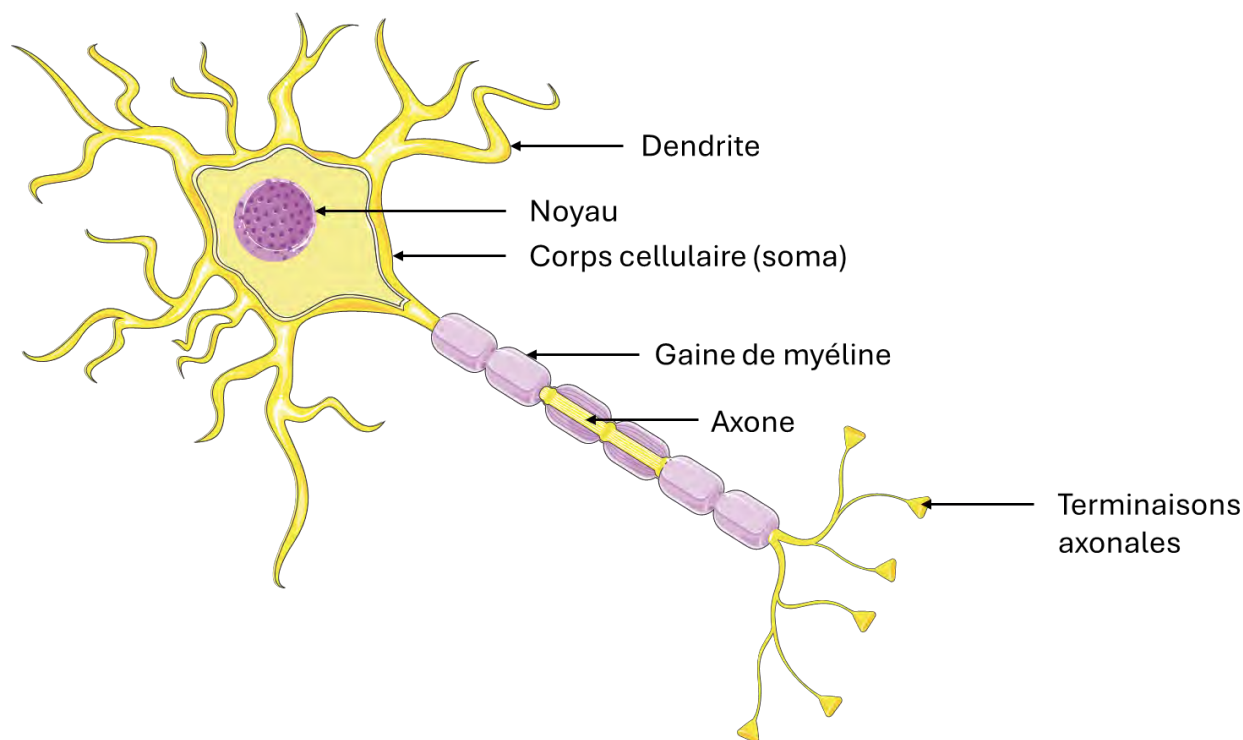


Figure 2.3 Représentation schématique d'un neurone

Image adaptée de Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>), sous la licence CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

La communication entre les neurones s'effectue au niveau des synapses, des structures spécialisées qui assurent le transfert de l'information d'un neurone présynaptique vers un neurone postsynaptique. La synapse est constituée d'une terminaison axonale du neurone émetteur, de la membrane du neurone récepteur, qui peut être une dendrite ou son corps cellulaire, et d'une fente synaptique de l'ordre du nanomètre. Il existe deux types de synapses : les synapses électriques, où le signal nerveux est transmis par le biais de jonctions communicantes, et les synapses chimiques, majoritaires, où le signal est transmis via des neurotransmetteurs. Ces derniers sont des molécules chimiques que l'on retrouve dans les vésicules du neurone présynaptique. À la suite de leur libération dans la fente synaptique, ils vont être détectés par leurs récepteurs correspondants présents sur la membrane du neurone postsynaptique. Selon la nature du transmetteur et du récepteur, la synapse peut être excitatrice ou inhibitrice (Caire et al., 2023).

Les neurones corticaux, situés dans le cortex cérébral, jouent un rôle central dans le traitement des informations au sein du cerveau (Roland et al., 2014). Ils se répartissent en deux grandes catégories : les neurones excitateurs et les neurones inhibiteurs. Les neurones excitateurs représentent environ 80 % des neurones corticaux et utilisent le glutamate comme neurotransmetteur, tandis que les neurones inhibiteurs, formant les 20 % restants, utilisent l'acide γ -aminobutyrique (Ballout et al., 2018). Les neurones excitateurs glutamatergiques sont responsables de la transmission de l'information entre différentes régions du cerveau (Mohan et al., 2023). Les synapses glutamatergiques sont dites excitatrices, car leur activation favorise la dépolarisation du neurone postsynaptique, augmentant la possibilité de transmission du signal nerveux.

Au niveau moléculaire, les récepteurs du glutamate se divisent en deux familles : les récepteurs ionotropiques, qui sont des canaux ioniques activés directement par la liaison avec le glutamate, et les récepteurs métabotropiques, qui sont séparés des canaux ioniques et les activent via une cascade de signalisation intracellulaire (Purves et al., 2001). Parmi les récepteurs ionotropiques, les récepteurs au α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate (AMPA) et ceux au N-méthyl-D-aspartate (NMDAR) sont particulièrement importants dans la transmission synaptique glutamatergique (Goncalves et al., 2020). Les récepteurs AMPA, composés de différentes sous-unités (GluR1 à GluR4), sont couplés à un canal ionique permettant l'entrée de sodium dans le neurone postsynaptique lorsque le glutamate s'y fixe. Les récepteurs NMDA, quant à eux, nécessitent la fixation du glutamate ainsi que la dépolarisation locale de la dendrite pour laisser entrer du calcium.

La transmission de l'influx nerveux débute par la propagation d'un potentiel d'action le long de l'axone, grâce à l'ouverture de canaux sodiques et potassiques voltage-dépendants. Lorsque ce potentiel atteint la terminaison axonale, il provoque l'ouverture de canaux calciques et ainsi l'entrée de Ca^{2+} . Cela entraîne l'exocytose des vésicules synaptiques, qui permet une libération des neurotransmetteurs, comme le glutamate, dans la fente synaptique (Neher & Sakaba, 2008). Le glutamate se lie ensuite aux récepteurs postsynaptiques, entraînant l'ouverture de canaux ioniques et la génération d'un potentiel postsynaptique excitateur (PPSE). Si la somme des PPSE reçus par le neurone dépasse un certain seuil, un nouveau potentiel d'action est déclenché, assurant la transmission de l'information à travers le réseau neuronal.

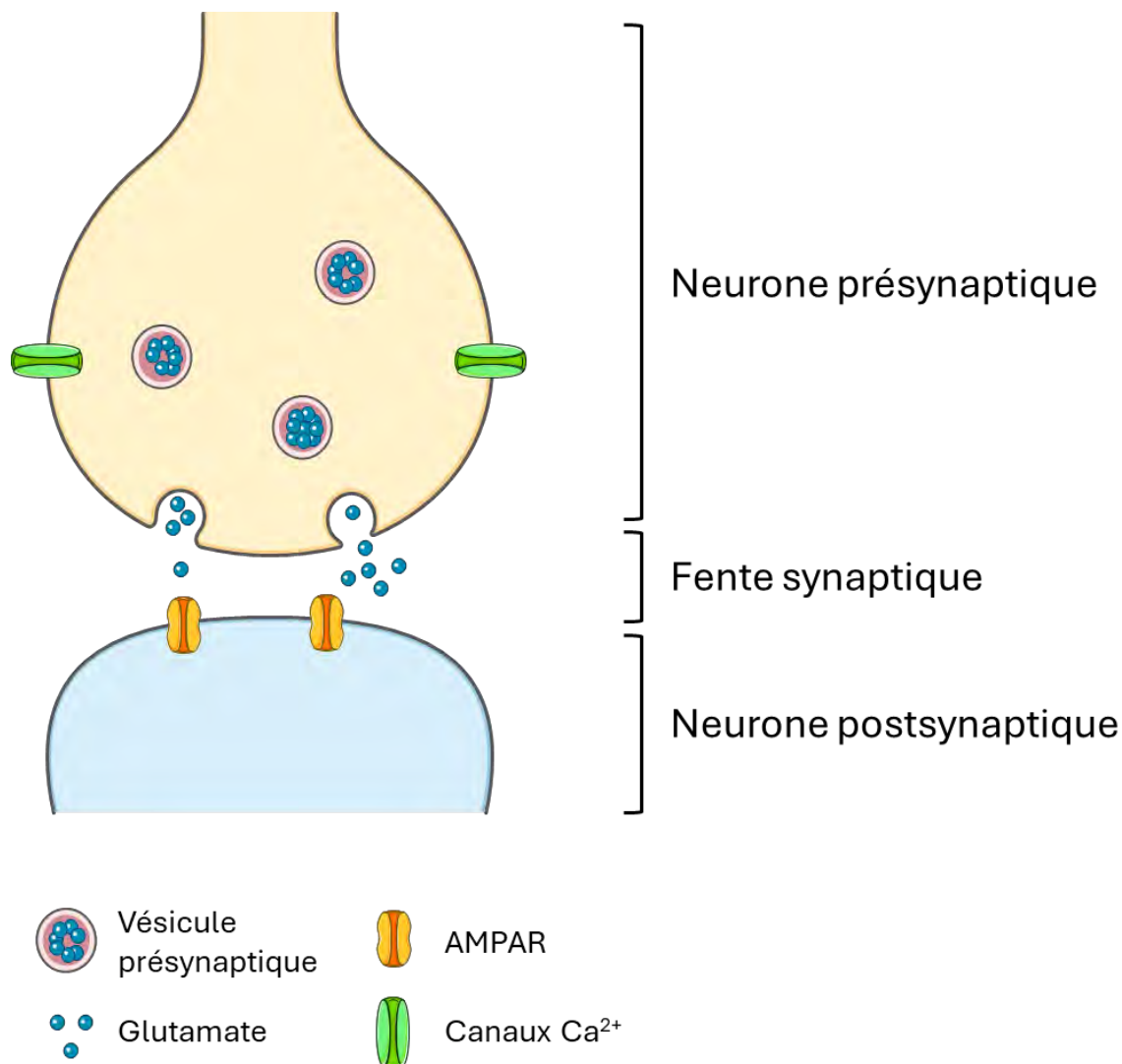


Figure 2.4 Représentation schématique d'une synapse glutamatergique

Image adaptée de Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>), sous la licence CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

2.2.1.2 Développement des neurones corticaux en culture

Les neurones corticaux primaires sont isolés à partir de cerveaux de rongeurs embryonnaires. Ils constituent un modèle essentiel pour étudier les mécanismes du développement neuronal *in vitro* (J. Zhang et al., 2022). Ces neurones post-mitotiques, incapables de se diviser, sont dissociés de manière mécanique et enzymatique en cellules individuelles. Ils sont ensuite cultivés sur des substrats fonctionnalisés, avec de la poly-D-lysine par exemple, pour favoriser leur

adhésion et leur développement. Ce dernier comprend quatre grandes phases : l'adhésion cellulaire, la croissance des neurites et synaptogénèse, l'établissement de réseaux et de l'activité synaptique, et pour finir la maturation des neurones (Dotti et al., 1988).

Après la dissociation cellulaire et la mise en culture des neurones, ces derniers s'attachent au substrat via des intégrines et des protéines d'adhésion, telles que la N-cadhérine (Kawauchi, 2011). La phase d'adhésion est primordiale afin de permettre aux neurones de se développer par la suite, et d'établir des réseaux entre eux. Au début, les neurones existent juste sous la forme de leur corps cellulaire. Autour du soma se développent ensuite des lamellipodes, qui correspondent à une extension de la membrane (Kaech et al., 2012).

Les lamellipodes se prolongent ensuite en neurites, guidés par leur cône de croissance. Ce dernier explore le milieu extracellulaire et se déplace grâce à la détection de signaux répulsifs et attractifs (Alberts et al., 2002). Les neurites ont la possibilité de se développer en dendrites ou en axones. Un des neurites va grandir jusqu'à dépasser tous les autres en longueur et ainsi devenir l'axone du neurone, tandis que les autres neurites deviendront des dendrites (Kaech et al., 2012). Les cônes de croissance continuent à naviguer dans le milieu extracellulaire dans le but de se connecter à d'autres neurones. Une fois que la cellule cible est atteinte, le cône de croissance se différencie en compartiment présynaptique. La différenciation en compartiment postsynaptique du neurone cible suivra juste après. Ce phénomène correspond à la formation de la synapse : c'est la synaptogénèse. Les neurones continuent à se connecter à de multiples autres neurones, établissant ainsi un réseau (Dotti et al., 1988).

Les synapses formées sont initialement immatures. Au cours de la maturation, leurs caractéristiques et leurs propriétés électriques vont évoluer.

À la suite de leur formation, les récepteurs glutamatergiques présents sur le neurone postsynaptique sont les NMDAR. Les synapses matures sont quant à elles caractérisées par la transmission de glutamate via les AMPAR. Une sous-unité des NMDAR, NR2B, bloque en particulier l'apparition des AMPAR. Au fil du temps, NR2B est remplacée par NR2A, ce qui permet l'insertion des AMPAR (Hall et al., 2007).

Les propriétés électrophysiologiques des synapses immatures et matures sont également différentes. Au cours de la maturation, la concentration extracellulaire en ions, médiée par les cellules gliales, est modifiée (S. Song et al., 2020). Les cellules gliales sont des cellules assurant la

protection des neurones. La variation de concentration en ions entraîne une hyperpolarisation, c'est-à-dire une diminution, du potentiel de membrane des neurones (Valiullina et al., 2016). La résistance membranaire et la constante de temps membranaire, durée nécessaire pour que le potentiel de membrane atteigne 63 % de sa valeur finale lorsqu'un courant est appliqué, vont diminuer au cours de la maturation de la synapse. La diminution de ces deux propriétés entraîne l'augmentation de l'amplitude et la fréquence des courants postsynaptiques excitateurs (Etherington & Williams, 2011).

Pour finir, l'activité calcique des neurones évolue aussi pendant la maturation des neurones. Une synapse immature sera caractérisée par la présence de canaux calciques de type T, tandis qu'une synapse mature possèdera des canaux calciques de types N ou L (Yaari et al., 1987). Le changement du type de canaux induit des changements dans la cinétique des flux de Ca^{2+} . L'activité neuronale modifie les niveaux de Ca^{2+} dans le milieu intracellulaire.

2.2.1.3 Culture de neurones corticaux primaires

Les cultures de neurones sont un modèle clé pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires des maladies neurodégénératives, telles que les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson (Lei et al., 2020; Ng et al., 2022), ou des lésions cérébrales comme les accidents vasculaires cérébraux (Ueno et al., 2012). Leur utilisation *in vitro* permet de comprendre des processus tels que la synaptogénèse ou le guidage axonal. Cependant, cultiver des neurones pose des défis techniques, notamment liés au choix des substrats, qui influencent directement leur adhésion, leur maturation et leur fonctionnalité.

Les neurones corticaux primaires prélevés sur des rongeurs restent le modèle le plus utilisé en recherche scientifique. Leur culture est facile à mettre en place et offre un réseau de neurones rapidement mature et actif. Cependant, leur utilisation soulève des questions éthiques liées au sacrifice animal et présente des limites translationnelles, car les différences entre rongeurs et humains affectent la pertinence des résultats. Les cellules souches humaines différenciées en neurones corticaux émergent comme une alternative prometteuse, grâce à une reproduction plus fidèle des voies de signalisation humaines. Cependant, leur utilisation est onéreuse et leur culture représente un défi, car cette dernière se découpe en plusieurs étapes complexes.

Le choix du substrat de culture est crucial pour permettre l'adhésion des cellules, leur développement ainsi que leur survie. Comme mentionné en section 2.1.1., le verre reste le choix de référence en culture cellulaire, et notamment en culture neuronale. En particulier, les lamelles de verre présentent de nombreux avantages. Elles peuvent être facilement transférées pour la réalisation de tests électrophysiologiques et pour de l'imagerie, et leurs propriétés optiques permettent une observation optimale des cellules, même en fluorescence (Milky et al., 2022). Cependant, le verre n'est pas favorable à l'adhésion des cellules et nécessite une modification de surface.

Pour y remédier, le revêtement le plus utilisé en culture neuronale est la polylysine. La présence de groupes amines $-NH_2$ sur ce polymère favorise l'adhésion des neurones, dont la membrane est chargée négativement. L'utilisation de polylysine en tant que revêtement remonte aux années 1970 et continue d'être utilisée de nos jours (Patil & Kandasubramanian, 2021; Xing et al., 2012; Yavin & Yavin, 1974). Plus précisément, l'énantiomère poly-D-lysine est de plus en plus privilégié, car ses liaisons peptidiques sont plus résistantes aux dégradations enzymatiques (J. Li et al., 2008).

Différentes méthodes de dépôt existent pour obtenir un revêtement de PDL. L'adsorption reste la plus répandue, par sa simplicité à mettre en œuvre. En effet, la solution de PDL est simplement déposée sur les surfaces à fonctionnaliser, sans modification préalable. Seulement, la maturation des cultures est souvent comprise au bout d'une semaine, alors qu'une durée de dix à quatorze jours est nécessaire pour obtenir des neurones matures (M. Li et al., 2010). Les défauts liés au revêtement peuvent entraîner un regroupement des neurones sous forme d'amas cellulaires, qui finissent par induire leur mort (S. Li et al., 2025). Les neurones, incapables de s'ancrer sur le substrat, se regroupent pour survivre. Ces amas perturbent le développement des neurones et rendent les analyses quantitatives difficiles. Dans une culture optimale, les neurones se développent en cellule individuelle et interagissent par le biais de contacts synaptiques.

Pour pallier ce problème, l'attachement covalent de la PDL au verre a été exploité dans différents laboratoires. Une première étude a utilisé du (3-aminopropyl)triéthoxysilane (APTES) pour fonctionnaliser des surfaces de verre (Y. H. Kim et al., 2011). Du glutaraldéhyde a ensuite été choisi comme agent de réticulation entre les surfaces silanisées et la PDL. Des neurones corticaux de rats ont été cultivés sur les surfaces modifiées avec la PDL, simplement adsorbée ou attachée de manière covalente sous forme de motif en grille. Les neurones cultivés sur la PDL liée de

manière covalente se sont développés selon les motifs, tandis que les neurones cultivés sur la PDL adsorbée se sont développés sans aucune reproduction du motif. Cela prouve que le greffage covalent de la PDL sur le verre entraîne une adhésion significativement plus stable que la simple méthode d'absorption. Dans une autre étude, l'APTES et un autre agent de réticulation, le BS³, ont été sélectionnés pour attacher de manière covalente la PDL à des substrats de PDMS (Kamande et al., 2019). La différenciation de cellules souches humaines en neurones et la maturation de ces derniers ont été significativement améliorées sur le revêtement de PDL greffée. Les projections neuronales étaient notamment plus longues sur la PDL greffée. Pour finir, l'équipe de Stil et al. (2023) a également développé un protocole de greffage covalent sur le verre, pour éviter l'utilisation de produits toxiques tels que le glutaraldéhyde. À la place, du (3-glycidyloxypropyl)triméthoxysilane (GOPS) a été sélectionné comme agent de liaison entre des lamelles de verre et la PDL. De la même manière, les neurones corticaux de souris ont plus adhéré sur la PDL greffée que sur la PDL absorbée. Une concentration en solution de 5 µg/mL pour le greffage chimique de la PDL sur GOPS a été sélectionnée, car elle donnait les meilleurs résultats en termes de développement de réseaux. Les neurones cultivés sur la PDL greffée à 5 µg/mL (nommée PDL 5) ont également montré des signes de maturation électrophysiologique plus avancée, comme un potentiel de membrane au repos significativement plus bas et une fréquence des courants postsynaptiques excitateurs significativement plus grande.

De nombreux laboratoires ont exploré ou explorent actuellement d'autres revêtements polymériques aminés afin d'améliorer la survie et la maturation des neurones en culture, comme le polyéthylèneimine branché (Grzeczkwicz et al., 2019; Sun et al., 2012).

2.2.2 Méthodes d'évaluation de l'adhésion et de la maturation neuronale

L'évaluation du développement des neurones corticaux en culture repose sur une combinaison de méthodes morphologiques et fonctionnelles permettant d'analyser à la fois l'adhésion cellulaire, le développement des prolongements neuronaux, la formation des synapses et la maturation des neurones. Ces approches offrent une vision globale du comportement des neurones cultivés sur différents substrats.

2.2.2.1 Tests morphologiques

Les tests morphologiques constituent la première étape de l'évaluation du développement neuronal. Ils visent à examiner la forme des neurones, ainsi que la structure et l'organisation des réseaux neuronaux.

La microscopie en contraste de phase est une technique qui permet d'observer la morphologie des cellules, et ce dès la phase d'adhésion à la suite de leur mise en culture. Grâce à des systèmes d'imagerie automatisés comme l'Incucyte® S3, développé par Sartorius Inc., il est possible de suivre en temps réel l'évolution des cultures tout au long de leur développement. Cela permet de voir si les cellules se développent rapidement ou non, de détecter la formation d'amas cellulaires et d'identifier rapidement les différences entre les conditions expérimentales testées. De plus, avec un logiciel d'analyse, il est ensuite possible de quantifier la longueur de neurite totale ainsi que l'aire des cellules.

Pour aller plus loin, la technique d'immunocytochimie est utilisée afin de visualiser les contacts synaptiques et les neurones excitateurs glutamatergiques. Pour ce faire, des marqueurs spécifiques, ciblant les compartiments présynaptique et postsynaptique, sont sélectionnés. Les anticorps dirigés contre la synaptophysine, une protéine que l'on retrouve dans les compartiments des vésicules présynaptiques, permettent de détecter tous les contacts synaptiques (García-Mesa et al., 2022). La quantification de ces derniers indiquera donc si les neurones ont développé un réseau complexe ou non. Pour identifier les synapses excitatrices, responsables de la transmission de l'information nerveuse, il est nécessaire d'avoir recours à un marqueur ciblant les neurones postsynaptiques excitateurs. Les anticorps dirigés contre la sous-unité GluR1 des AMPAR remplissent exactement cette fonction (Kopeck et al., 2007). En combinant les marqueurs de la synaptophysine et de GluR1, il est possible de mettre en évidence les réseaux synaptiques, et d'approfondir cette analyse en déterminant le nombre de contacts synaptiques par neurone et la taille des synapses, par exemple.

L'évaluation de la survie cellulaire complète ces analyses morphologiques. Des tests de viabilité, tels que la coloration à l'éthidium (qui marque les cellules mortes) et à la calcéine (qui marque les cellules vivantes), sont couramment utilisés pour évaluer l'influence des substrats sur la viabilité des cellules. À l'aide d'un logiciel, il est ensuite possible de calculer le nombre de cellules mortes et de cellules vivantes, et ainsi d'estimer la biocompatibilité du matériau évalué.

2.2.2.2 Tests fonctionnels

Si l'analyse morphologique renseigne sur la structure et l'organisation des réseaux neuronaux, les tests fonctionnels permettent d'évaluer l'activité et la maturation des neurones.

La technique du patch-clamp, utilisée en électrophysiologie, consiste à enregistrer les courants ioniques à travers la membrane des neurones. Elle permet de mesurer plusieurs propriétés électrophysiologiques, comme le potentiel de membrane au repos, la fréquence et l'amplitude des potentiels d'action, ainsi que les courants postsynaptiques excitateurs. Grâce au patch-clamp, il est possible de déterminer l'état de maturation des neurones et d'évaluer leur réponse à des stimuli électriques.

L'imagerie calcique est une autre technique pour l'étude de l'activité neuronale. Elle repose sur l'utilisation de sondes fluorescentes sensibles au calcium intracellulaire, telles que le Fluo-4 ou le GCaMP, qui permettent de visualiser en temps réel les variations de concentration en calcium associées à l'activité synaptique et à la transmission de l'influx nerveux. L'imagerie calcique présente l'avantage d'offrir une analyse simultanée de l'activité de plusieurs neurones au sein d'un réseau.

CHAPITRE 3 DÉMARCHE DU TRAVAIL DE RECHERCHE

Ce projet de maîtrise fait suite à une étude réalisée par l'équipe du Pr. Bouchard, en collaboration avec le laboratoire du Pr. De Crescenzo. En 2023, Stil et al. développent une méthode d'attachement stable de la poly-D-lysine (PDL) sur du verre, dans le but de cultiver des neurones corticaux primaires. La PDL est un polymère cationique possédant des groupes amines primaires à chaque unité de répétition de sa chaîne. Jusqu'à présent, l'adsorption non spécifique de la PDL sur du verre était la méthode de dépôt la plus répandue. Seulement, la maturation des neurones sur le revêtement polymérique était souvent compromise. La méthode développée par Stil et al. (2023) permet de lier la PDL au verre de manière covalente, grâce à une silanisation préalable des surfaces de verre. La PDL greffée à une concentration de 5 µg/mL (PDL 5) a donné les meilleurs résultats en culture cellulaire, tant sur le développement des réseaux de neurones que sur leur fonctionnalité.

Dans ce projet, trois polymères aminés sont utilisés comme revêtement sur du verre : le polyvinylamine (PVAm), le polyéthylèneimine branché (PEIb) et le polyallylamine (PAAm). Deux types de PEIb seront utilisés, de différents poids moléculaires : le PEIb 25 kDa (PEIb1) et le PEIb 800 Da (PEIb2). Les quatre polymères présentent des structures différentes (Figure 1.1), leur conférant des propriétés physicochimiques différentes.

Les quatre polymères sont greffés sur du verre, suivant le protocole développé par Stil et al. (2023), et comparés au système de référence : la PDL 5. Le pH des polymères en solution est ajusté à 9.7, valeur supérieure à leur pKa (voir section 1.1). Cela permet d'avoir une majorité de groupes amines déprotonés ($-NH_2$), qui se lient de manière covalente aux groupes époxy présents sur le verre silanisé (Figure 3.1).

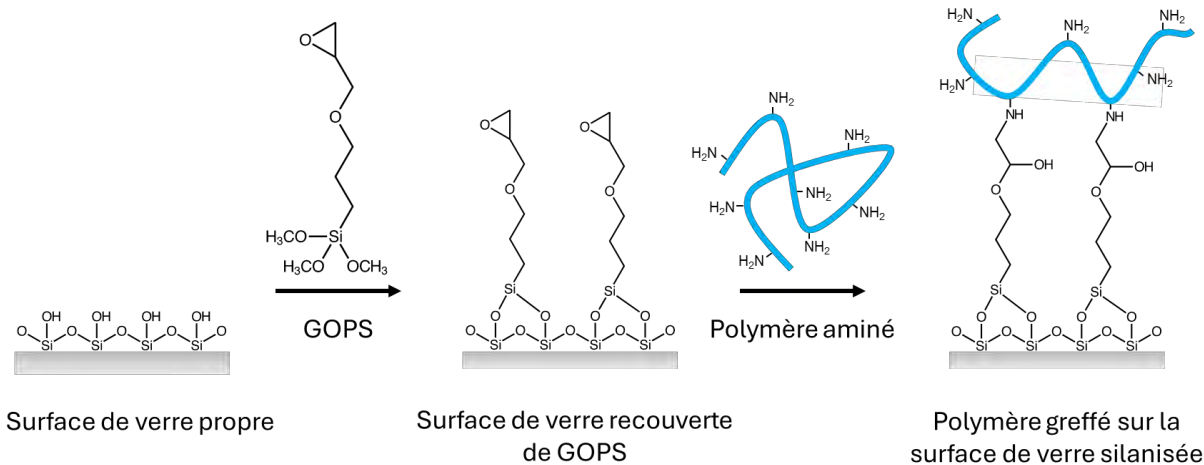


Figure 3.1 Illustration schématique de la procédure de greffage chimique, inspirée de (Stil et al., 2023)

Le GOPS est déposé sur des lamelles de verre, dans le but de préparer le greffage chimique des chaînes de polymère aminé.

L'objectif du projet est de comparer le PVAm, le PEIb1, le PEIb2 et le PAAm en tant que revêtement pour des cultures de neurones corticaux primaires. Plus précisément, l'influence de la densité surfacique d'amines sur le développement et la maturation des neurones sera étudiée. La comparaison de la PDL avec d'autres polymères permettra également de confirmer ou non son rôle de revêtement standard en culture de neurones corticaux primaires.

Le projet a été découpé en trois sous-objectifs :

- 1) Déterminer les concentrations optimales de chaque polymère permettant d'obtenir une densité de groupes amines en surface similaire à celle de la référence (PDL 5).
- 2) Comparer le développement synaptique des neurones cultivés sur chacun de ces polymères, aux concentrations déterminées au point 1).
- 3) Comparer la maturation, la survie et la fonctionnalité des neurones entre la condition optimale de développement synaptique obtenue en 2) et la condition de référence (PDL 5).

3.1 Déterminer les concentrations correspondant à une densité surfacique de groupes amines similaire à la PDL 5

La première étape du projet consiste à sélectionner, pour chaque polymère aminé, la concentration pour laquelle la densité surfacique d'amines est similaire à la PDL 5, la condition choisie comme référence. Pour ce faire, le test colorimétrique au bleu de Coomassie brillant (CBB, forme R-250) est sélectionné. Il avait également été choisi par Stil et al. (2023) pour évaluer l'influence de la concentration en PDL sur la densité surfacique de groupes amines. Ce colorant anionique se lie aux groupes amines primaires (chargés positivement en conditions acides) par le biais d'interactions électrostatiques et permet d'observer la coloration ainsi que l'homogénéité de la couche de revêtement polymérique. Les gammes de concentration ont été ajustées pour chaque polymère au cours des tests, avec l'objectif d'atteindre des concentrations permettant de dépasser la densité surfacique d'amines de la PDL5. Les concentrations finales étant comprises entre 1 µg/mL et 500 µg/mL, des solutions intermédiaires ont été utilisées pour faciliter la préparation des solutions finales. Les concentrations de ces solutions intermédiaires ont été choisies en fonction du volume et de la concentration des solutions finales.

L'utilisation d'un second colorant, le sel de sodium Orange II, a été envisagée mais la coloration des lamelles n'était pas visible à l'œil nu (voir Figure B.1). Le test colorimétrique à l'Orange II a donc été écarté.

Après la lecture de l'absorbance, la concentration en polymère durant le greffage ayant une densité de CBB, et donc d'amines, la plus proche de celle de la PDL 5 est sélectionnée pour le PVAm, le PEIb1 et le PEIb2. D'autres concentrations sont choisies afin de comparer l'influence de la densité en polymère sur le développement des neurones. Le PAAm a rapidement été écarté du reste de l'étude, car la coloration au CBB n'était pas homogène sur les lamelles de verre décorées de PAAm greffé (voir Figure A.1).

3.2 Comparer le développement synaptique des neurones sur les différents polymères

Pour comparer le développement des réseaux synaptiques sur les différentes conditions sélectionnées précédemment, la technique d'immunocytochimie a été utilisée. La synaptophysine,

protéine située dans les vésicules du compartiment présynaptique des neurones, a été utilisée pour marquer les contacts synaptiques. Le GluR1, sous-unité du récepteur glutamatergique de type AMPA, a été utilisé pour marquer les neurones excitateurs.

L'observation du marquage de la synaptophysine sur les lamelles entières permet de quantifier le développement des réseaux, mais aussi la présence d'amas cellulaires. Ces derniers indiquent une mauvaise adhésion des cellules sur le revêtement polymérique et provoquent une augmentation du signal détecté.

Une observation à plus fort grossissement permet de comparer le développement des cellules dans les différentes conditions.

La condition ayant permis aux neurones de développer des réseaux plus denses a été sélectionnée pour réaliser des tests approfondis et comparée à la condition de référence PDL 5.

3.3 Comparer la maturation, la survie et la fonctionnalité des neurones

Les tests cellulaires mentionnés dans cette section seront réalisés sur deux conditions : la condition sélectionnée précédemment et la condition de référence PDL 5.

Grâce à la méthode d'immunocytochimie, les contacts synaptiques sont analysés sur des neurones individuels. Les deux marqueurs choisis, la synaptophysine et le GluR1, permettent de quantifier les contacts synaptiques sur les neurones excitateurs exclusivement. L'aire des neurites (prolongements des neurones), ainsi que le nombre, la densité et l'aire des contacts synaptiques sont quantifiés.

Les neurones sont également observés en microscopie de phase tout au long de leur développement, de leur mise en culture au jour *in vitro* (DIV) 0 jusqu'à DIV 10 minimum. La longueur de neurite totale ainsi que l'aire cellulaire sont calculées.

Ensuite, un test de survie cellulaire est effectué pour comparer l'influence du revêtement polymérique sur la viabilité des neurones.

Enfin, pour comparer la fonctionnalité des neurones et des réseaux synaptiques entre la condition sélectionnée précédemment et la condition PDL 5, deux tests sont envisagés : l'imagerie calcique et le patch-clamp. L'imagerie calcique permet de mesurer le niveau intracellulaire de

calcium, ainsi que les flux de calcium entre les milieux intracellulaire et extracellulaire. Le patch-clamp est une méthode d'électrophysiologie qui permet de mesurer l'excitabilité de la membrane cellulaire, ainsi que d'autres propriétés telles que l'amplitude et la fréquence des courants postsynaptiques excitateurs. Cependant, ce sont deux techniques difficiles qui requièrent un apprentissage assez long. Par manque de temps, l'imagerie calcique et le patch-clamp ont été écartés de l'étude.

CHAPITRE 4 MATÉRIEL ET MÉTHODES

4.1 Réactifs

La poly-D-lysine (PDL) 70-150kDa (#P0899), le polyéthylèneimine branché 25kDa (PEIb1, #408727), le polyéthylèneimine branché 800 Da (PEIb2, #408719), le (3-glycidyloxypropyl)triméthoxysilane (GOPS, #440167), le bleu de Coomassie brillant (CBB, #B7920), la DNase, les anticorps primaires de souris anti-synaptophysine (#S5768) et les filtres Corning® (taille de pore 0.2 µm, #CLS431229) ont été achetés à Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

Les lamelles de verre circulaires, de diamètre 12 mm et d'épaisseur 0.09-0.12 mm (#633009), ainsi que celles de diamètre 12 mm et d'épaisseur 0.13-0.17 mm (#633029) ont été achetées à Merlan (Oakville, ON, Canada).

L'Alternum, un bioéquivalent éthique du sérum fœtal bovin, a été acheté à Alternativa Technologies.

L'albumine de sérum bovin (BSA, #5217) a été achetée à Tocris (Toronto, ON, Canada).

Le sérum normal de chèvre (NGS) a été acheté à Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA).

Le 2-Propanol (#A416-4), l'hydroxyde de potassium (KOH, #P246-3), le méthanol (MeOH, #A412-4), les produits Gibco™ [la solution saline équilibrée de Hanks (HBSS), le milieu essentiel minimum d'Eagle (S-MEM), la trypsine, le supplément B-27™, la pénicilline-streptomycine et le supplément GlutaMAX™], le chlorure de sodium (NaCl), le sulfate de magnésium (MgSO₄), le bicarbonate de sodium (NaHCO₃), le dextrose, la paraformaldéhyde (PFA), le Tween 20 (#BP337-500), les anticorps secondaires de chèvre anti-souris Alexa Fluor™ 546 (#A11003), les anticorps secondaires de chèvre anti-lapin Alexa Fluor™ 488 (#A11008), le milieu de montage Immu-Mount (#9990402) de la marque Eppredia™ et les lames de microscope Superfrost™ ont été achetés à Fisher Scientific (Edmonton, AB, Canada).

L'éthanol anhydre (#P016EAAN) a été acheté à Les Alcools de Commerce (Mississauga, ON, Canada).

Le polyvinylamine (PVAm) 25kDa (#23965) et le polyallylamine (PAAm) 15kDa (#24826) ont été achetés à Polysciences (Warrington, PA, USA).

Le carbonate de sodium (Na_2CO_3 , #3602-01), l'acide acétique (#9522-05), le chlorure de potassium (KCl), et le phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4) ont été achetés à J.T.Baker® (Philipsburg, NJ, USA).

L'acide chlorhydrique (HCl, #HX0603-53) et les anticorps primaires de lapin anti-GluR1 (#AB1504) ont été achetés à Millipore.

Le chlorure de calcium (CaCl_2) a été acheté à EMD Chemicals (Gibbstown, NJ, USA).

Le virus AAV2/php.eB-hSyn-GCaMP6s a été acheté à la plateforme canadienne de neurophotonique, au centre CERVO de l'université Laval à Québec.

4.2 Animaux

Les souris C57BL/6J de type sauvage proviennent de Jackson Laboratory et sont maintenues en colonies à l'animalerie de l'Université de Montréal. Elles sont hébergées dans une pièce contrôlée à une température de 22°C, avec un cycle alternant 12h de jour et 12h de nuit. L'eau et la nourriture sont fournies sans restriction.

Les protocoles ont été exécutés selon les normes du Conseil Canadien de Protection des Animaux et ont été approuvés par le Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux de l'Université de Montréal (CDEA; protocoles #23-057, #23-058).

4.3 Préparation des surfaces

4.3.1 Solutions de polymères aminés

Pour préparer les solutions de PVAm, PEIb1 et PEIb2, nous procédons en 3 étapes.

Une première solution mère, de concentration 10 mg/mL, est préparée dans de l'eau Milli-Q. Ensuite, une solution intermédiaire dont la concentration est déterminée en fonction des concentrations finales est préparée dans de l'eau Milli-Q (Tableau 4.1). Toutes ces solutions sont conservées à 4°C et refaites toutes les deux semaines. Enfin, les solutions finales sont préparées en

diluant la solution intermédiaire dans un tampon Na_2CO_3 (100 mM, pH 9.7), à la concentration choisie.

Pour préparer la solution de PDL, nous procédons en 2 étapes.

Une première solution mère, de concentration 40 $\mu\text{g/mL}$, est préparée dans de l'eau Milli-Q. Cette solution est réutilisée pendant plusieurs mois. Elle se conserve à 4°C. Ensuite, la solution finale, de concentration 5 $\mu\text{g/mL}$, est préparée en diluant la solution mère dans un tampon Na_2CO_3 (100 mM, pH 9.7).

Toutes les solutions finales sont filtrées (0.2 μm) avant d'être utilisées pour les cultures cellulaires.

Tableau 4.1 Concentrations utilisées pour les différentes solutions de polymères

Polymère	Concentration de la solution mère	Concentration de la solution intermédiaire	Concentration de la solution finale
PDL	40 $\mu\text{g/mL}$		5 $\mu\text{g/mL}$
PVAm	10 mg/mL	40-500 $\mu\text{g/mL}$	1-100 $\mu\text{g/mL}$
PEIb1	10 mg/mL	50-500 $\mu\text{g/mL}$	1-100 $\mu\text{g/mL}$
PEIb2	10 mg/mL	0.5-1 mg/mL	5-500 $\mu\text{g/mL}$

4.3.2 Silanisation des lamelles

Cette méthodologie est inspirée du protocole de silanisation décrit dans les travaux de Stil et al. (2023).

Des bains de base sont préparés dans des fioles de verre de 20 mL, en remplissant le fond de granules de KOH, puis en complétant avec de l'isopropanol jusqu'aux trois quarts de hauteur. À l'aide d'une pince, les lamelles de verre sont placées dans ces bains de base, inclinées contre la paroi, à raison de quatre lamelles par fiole et y restent pendant une nuit. Les bains de base peuvent être gardés et réutilisés pendant un mois, tant que les granules ne sont pas entièrement fondus.

Le lendemain, les lamelles sont récupérées puis rincées à trois reprises dans des Falcon de 50 mL remplis d'eau Milli-Q. Pour cela, les surfaces maintenues par une pince sont trempées puis agitées pendant quelques secondes verticalement et horizontalement, jusqu'à ce que la surface soit propre. Après cette étape, les surfaces doivent être complètement hydrophiles, sinon, elles sont éliminées. Les surfaces sont ensuite séchées sous un courant d'azote. Cela permet de déplacer la goutte d'eau vers la pince, puis d'absorber cette goutte par capillarité à l'aide d'un essuie-tout de laboratoire, et ceci, sans toucher la surface de la lamelle. Aucune trace visible ne doit rester sur cette dernière.

Par la suite, quelques gouttes de GOPS sont déposées dans le fond de tubes Falcon 50 mL. En tenant le Falcon horizontalement sur la table, trois lamelles de verre fraîchement nettoyées et sèches y sont transférées. Le tube Falcon contenant les surfaces est fermé pendant une nuit, afin que le GOPS se dépose en phase gazeuse sur les lamelles. Ces dernières ne doivent pas rentrer en contact avec le GOPS et ne doivent pas se superposer entre elles.

Enfin, le lendemain, les lamelles sont récupérées et déposées dans une boîte de Petri en verre, recouverte ensuite d'aluminium. La boîte est mise dans un four chauffé à 110°C, pendant 2h30. Les lamelles sont ensuite rincées une fois à l'éthanol anhydre, puis deux fois à l'eau Milli-Q stérile. Les surfaces doivent être totalement hydrophobes, si des petites gouttes sont présentes, il est préférable de se séparer des lamelles. Elles sont ensuite stockées dans des plaques 24 puits, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Si les lamelles sont destinées à une utilisation en culture cellulaire, cette dernière étape de rinçage s'effectue sous hotte biologique.

4.3.3 Greffage

Sous hotte biologique, une goutte de 200 μ L de polymère (solution finale de PVAm/PEIb1/PEIb2/PDL) est déposée sur chaque lamelle silanisée, en s'assurant que toute la surface est recouverte. Le temps de pose est de 100 minutes. Il est important de veiller à ce que la goutte ne s'évapore pas complètement. Ensuite, les lamelles sont rincées à deux reprises dans des Falcon de 50 mL remplis d'eau Milli-Q, en les remuant pendant quelques secondes verticalement et horizontalement, jusqu'à ce que la surface soit propre.

Après cette étape, les lamelles seront utilisées soit pour le test colorimétrique au CBB, soit pour la mise en culture des cellules.

4.4 Test colorimétrique au bleu de Coomassie brillant

Une goutte de 200 μ L de solution de CBB (0.05 % m/v, dans une solution acide eau Milli-Q/MeOH/acide acétique (85:10:5 v/v)) est déposée sur chaque lamelle, pour une durée de 5 minutes. Les lamelles sont ensuite rincées à trois reprises dans la solution eau Milli-Q/MeOH/acide acétique (85:10:5 v/v) afin de retirer le colorant non lié. Elles peuvent sécher à l'air libre avant que la coloration soit observée.

Les lamelles sont ensuite placées dans une plaque 24 puits. Dans ces derniers, on dépose 250 μ L de solution de désorption (1.325 % m/v Na_2CO_3 dans 50:50 v/v eau Milli-Q/MeOH ; pH 11.25), puis on agite la plaque horizontalement pour que le colorant se détache. 200 μ L sont prélevés et récupérés dans un Eppendorf. Le pH de cet échantillon est ajusté en ajoutant 5 μ L d'HCl 12 M, puis 100 μ L sont transférés dans une plaque 96 puits pour une lecture d'absorbance. L'absorbance est ensuite mesurée à 630 nm sur un lecteur de plaques et les valeurs obtenues sont normalisées par celles de la référence PDL 5.

4.5 Cultures de neurones corticaux primaires

Des embryons, âgés d'entre 15.5 et 17 jours, sont prélevés sur des souris C57BL/6J (type sauvage) gestantes.

Les cerveaux sont prélevés sur les embryons dans une solution HBSS, puis les cortex sont isolés et transférés dans 2 mL de S-MEM (37°C, 2.5 % de trypsine, 2 mg/mL de DNase) pendant 15 minutes. Le culot de cellules est ensuite immergé dans 10 mL de S-MEM (avec 10 % d'Alternum), sur glace, avant d'être transféré dans 2 mL de S-MEM (10 % d'Alternum) pour dissocier les cellules. Le surnageant est transféré dans 5 mL de milieu Neurobasal (supplémenté avec 2 % de B27, de 100 U/mL pénicilline, de 100 μ g/mL streptomycine et 0.5 mM de GlutaMAX), puis la suspension de cellules est filtrée (40 μ m). Pour finir, les cellules sont comptées puisensemencées à un nombre de 75 000 cellules/puits sur les lamelles préalablement traitées avec les polymères cationiques. Les cultures sont ensuite mises dans l'incubateur (37°C, 5% de CO_2).

4.6 Immunocytochimie et microscopie confocale

Les cellules sont fixées au dixième jour *in vitro* (DIV 10) ou au quatorzième jour *in vitro* (DIV14). Le milieu de culture est retiré puis remplacé par 1 mL de PBS (0.1 M, pH 7.4). Les cultures sont fixées dans 500 μ L de MeOH, pendant 5 minutes à -20°C. Elles sont de nouveau rincées dans 1mL de PBS pendant 10 minutes, sous agitation lente, à trois reprises.

Après la fixation, les cellules sont immergées dans 500 μ L de solution de saturation (2 % de NGS, 2 % de BSA et 0.05 % de Tween 20 dans du PBS) pendant 30 minutes, sous agitation lente.

Les cellules sont ensuite immergées dans 300 μ L de solution de saturation contenant les anticorps primaires de souris anti-synaptophysine (1:500) et de lapin anti-GluR1 (1:500). La synaptophysine est une protéine synaptique et permet de visualiser les contacts synaptiques. GluR1 est une sous-unité du récepteur au glutamate de type AMPA et permet de visualiser les neurones excitateurs de type glutamatergique. Les lamelles restent dans cette solution à 4°C, pendant 48h.

Les anticorps primaires sont ensuite récupérés et les cultures sont rincées dans 500 μ L de PBST (0.05 % Tween 20 dans du PBS 0.1 M) pendant 5 minutes, sous agitation lente. S'ensuivent 3 nouveaux rinçages au PBST pendant 15 minutes, sous agitation lente. Ensuite, les cultures sont immergées dans 300 μ L de solution de saturation contenant les anticorps secondaires de chèvre anti-souris Alexa Fluor™ 546 (1:1000) et les anticorps secondaires de chèvre anti-lapin Alexa Fluor™ 488 (1:1000) pendant 2 heures, sous agitation lente. À partir de cette étape, les cultures devront être à l'abri de la lumière. Les cultures sont rincées dans 500 μ L de PBST pendant 15 minutes, à trois reprises.

Après les rinçages, les lamelles sont montées sur lames Superfrost avec du milieu de montage Immu-Mount. Elles sont laissées sécher pendant 24 heures à température ambiante, toujours à l'abri de la lumière, puis sont conservées à 4°C.

La prise d'images se fait à l'aide du microscope confocal FV300 (Evident Canada, Québec, QC, Canada). Pour l'acquisition des lamelles entières, une centaine d'images sont prises à un grossissement 8 $\times$, puis assemblées avec le logiciel Fluoview. Les détails des réseaux neuronaux sont visualisés à un grossissement de 40 $\times$, et les neurones individuels à un grossissement de 100 $\times$.

4.7 Quantification des réseaux synaptiques – Analyse de densité de pixels

Pour quantifier la densité des réseaux synaptiques, les images du marquage de la synaptophysine sur les lamelles entières individuelles à grossissement 8× sont utilisées. À l'aide du logiciel Fiji, les coupes optiques obtenues pour chaque lamelle sont combinées en une seule image. Un seuil de détection du signal est ensuite appliqué. Puis, en délimitant la surface de la lamelle, le logiciel calcule, en pourcentage de surface, la quantité de pixels dont la valeur d'intensité est supérieure au seuil défini. Les mesures seront rapportées en pourcentage de la PDL 5.

Pour quantifier les amas cellulaires, une démarche similaire est appliquée. Il a précédemment été observé que l'intensité du signal est généralement plus élevée au niveau des amas (Stil et al., 2023). Pour chacune des lamelles, nous déterminons donc un seuil permettant la détection des amas uniquement. De la même manière, le logiciel détermine, en pourcentage de surface, la quantité de pixels correspondant aux amas. Les mesures seront également rapportées en pourcentage de la PDL 5.

Après avoir obtenu ces deux valeurs, il est possible de calculer le ratio de réseaux par rapport aux amas. Ces valeurs seront également rapportées en pourcentage de la PDL 5.

4.8 Analyse des contacts synaptiques

À DIV 10 et DIV 14, les contacts synaptiques sur les neurones individuels sont détectés et quantifiés grâce au code source libre d'accès Intellicount utilisé précédemment (Fantuzzo et al., 2017). Les neurones positifs à GluR1 (marquage vert) sont délimités par un contour vert, les corps cellulaires apparaissent en bleu et la synaptophysine (marquage rouge) est représentée par des points rouges. Le logiciel extrait ensuite l'aire des neurites et le nombre de contacts synaptiques (à partir desquels on calcule la densité de contacts synaptiques), ainsi que l'aire des contacts synaptiques. Les valeurs seront exprimées en variation de pourcentage par rapport à la PDL 5 à DIV 10.

4.9 Imagerie des cellules vivantes

Après la mise en culture, certaines plaques de cellules sont placées dans l'Incucyte® S3 (Sartorius Inc.). Ce microscope se trouve à l'intérieur de l'incubateur et il acquiert des images des cellules vivantes pendant leur développement, à intervalles réguliers et prédéfinis, toutes les 8 h. Le logiciel analyse de manière automatisée les images générées et l'on extrait ensuite la longueur totale des neurites ainsi que les surfaces cellulaires. Les résultats sont présentés sous forme de courbes, pour chacune des conditions et pour chaque point analysé.

4.10 Test de viabilité LIVE/DEAD

Ce test va permettre de détecter et de quantifier le nombre de cellules mortes et le nombre de cellules vivantes.

À DIV 10, les cultures sont retirées de l'incubateur. Dans chaque puits, le milieu de culture est retiré puis les lamelles sont rincées dans 1 mL de PBS filtré (0.1 M, pH 7.4, 37°C). Elles sont ensuite immergées dans 200 µL de solution Live/Dead (0.2 % éthidium, 0.03 % calcéine, dans du PBS 0.1 M) puis incubées dans l'Incucyte® S3 pendant 20 minutes. La calcéine marque les cellules vivantes en vert et l'éthidium marque les cellules mortes en rouge. Ensuite, des images à grossissement 10× sont prises (exposition 100 ms pour le vert, 300 ms pour le rouge). Le logiciel détecte le nombre de cellules vivantes et de cellules mortes, ce qui permet de calculer le ratio de cellules mortes sur le nombre de cellules total.

4.11 Analyse statistique

Les valeurs d'absorbance et les valeurs de densité de pixels de synaptophysine (réseaux, clusters et réseaux/clusters) sont exprimées comme un pourcentage de la référence PDL 5 et sont rapportées sous la forme d'une moyenne $\pm$ erreur type.

Les valeurs d'aire de neurite, de densité de contacts synaptiques et d'aire des contacts synaptiques (immunocytochimie) sont exprimées comme une variation de pourcentage ($\Delta\%$) de la référence PDL 5 à DIV 10 et sont rapportées sous la forme d'une moyenne $\pm$ erreur type.

Les valeurs de longueur de neurite et d'aire cellulaire (microscopie en temps réel) sont présentées sous la forme de moyennes $\pm$ erreur type.

Les valeurs du rapport de nombre de cellules mortes/nombre de cellules total sont exprimées comme une variation de pourcentage ($\Delta\%$) de la référence PDL 5 et sont rapportées sous la forme d'une moyenne $\pm$ erreur type.

Les données ont été analysées dans le logiciel GraphPad Prism 9. Leur normalité a été évaluée avec le test d'Agostino-Pearson. Les différences statistiques entre les conditions ont été évaluées avec un test de Kruskal-Wallis (et test de comparaisons multiples de Dunn), une ANOVA à deux facteurs (et test de comparaisons multiples de Tukey), une ANOVA à un facteur (et test de comparaisons multiples de Šidák) ou un test de Mann-Whitney en fonction de la distribution des données. Différents seuils de signification ont été sélectionnés : (*) si $p < 0.05$, (**) si $p < 0.01$, (***) si $p < 0.001$ et (****) si $p < 0.0001$.

CHAPITRE 5 RÉSULTATS

5.1 Estimation de la densité de groupes amines en surface

Quatre polymères aminés ont été sélectionnés pour comparer leur influence sur le développement de neurones corticaux primaires : le polyvinylamine (PVAm), le polyéthylèneimine branché de poids moléculaire 25 kDa (PEIb1), le polyéthylèneimine branché de poids moléculaire 800 Da (PEIb2) et le polyallylamine (PAAm). Pour obtenir les surfaces destinées à la culture cellulaire, les polymères aminés sont greffés sur des lamelles de verre selon le protocole établi par Stil et al. (2023). Cette méthode repose sur la silanisation préalable du verre, à l'aide du (3-glycidyloxypropyl)triméthoxysilane (GOPS), permettant l'ajout de groupes époxy à la surface du verre. Les polymères aminés, préparés dans un tampon à pH 9.7, sont ensuite déposés sous forme de goutte sur les lamelles de verre silanisées. Le pH sélectionné, supérieur aux pKa des polymères choisis (voir section 1.1), assure d'avoir un nombre suffisant d'amines déprotonées et permet l'établissement d'un lien covalent entre le polymère et le verre silanisé (voir Figure 3.1). Les surfaces sont ensuite rincées pour retirer l'excédent de polymère non greffé.

Après l'étape de greffage des polymères aminés sur les lamelles de verre silanisées, la présence et l'homogénéité de la couche de polymère sont évaluées par un test colorimétrique au bleu de Coomassie brillant (CBB). Ce colorant (anionique) se lie de manière spécifique aux groupes amines (cationiques en conditions acides). L'interaction électrostatique, entre l'amine et le colorant, permet une évaluation qualitative de l'homogénéité de la couche de polymère et sur la quantité d'amines exposées en surface.

Pour évaluer l'impact de la concentration en polymère sur la densité de groupes amines en surface, plusieurs concentrations ont été testées pour chaque polymère. Trois polymères linéaires (PDL, PVAm et PAAm) et un polymère branché (PEIb1 et PEIb2, de fort et faible poids moléculaires, respectivement) greffés sur les surfaces silanisées ont été caractérisés (Figure 1.1). Les plages de concentration s'étendent de 1 à 100 $\mu\text{g/mL}$ pour le PVAm et le PEIb1, de 5 à 500 $\mu\text{g/mL}$ pour le PEIb2 et de 1 à 250 $\mu\text{g/mL}$ pour le PAAm. La PDL à 5 $\mu\text{g/mL}$ (PDL 5), ayant donné les meilleurs résultats en culture cellulaire dans une publication récente (Stil et al., 2023), a été utilisée comme référence dans chaque expérience. À titre d'exemple, la figure 5.1 présente le gradient de coloration en fonction de la concentration de PEIb1 greffé sur des lamelles silanisées. La PDL 5 a été utilisée comme contrôle positif et des lamelles de verre non modifiées ont été

utilisées comme contrôle négatif. La coloration des lamelles de PEIb1 et de PDL 5 montre que les polymères sont bien présents sur les lamelles (contrôle négatif transparent). De plus, la coloration est homogène et l'intensité augmente avec la concentration en polymère.

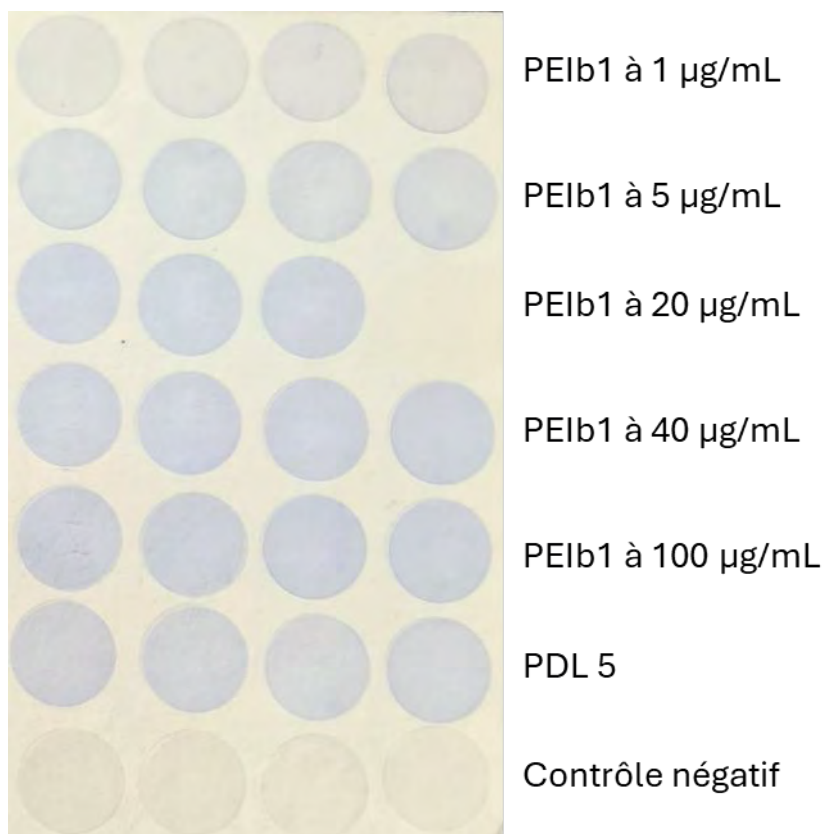


Figure 5.1 Test colorimétrique au bleu de Coomassie brillant réalisé sur des lamelles fonctionnalisées avec du PEIb1

Une fois l'homogénéité de la coloration observée, les lamelles colorées ont été immergées dans une solution de désorption alcaline permettant de récolter les molécules de CBB en solution. L'absorbance de la solution contenant le CBB désorbé est mesurée à 630 nm. Les valeurs obtenues ont ensuite été normalisées par celles de la PDL 5 et sont représentées comme un % de la PDL 5 (Figure 5.2).

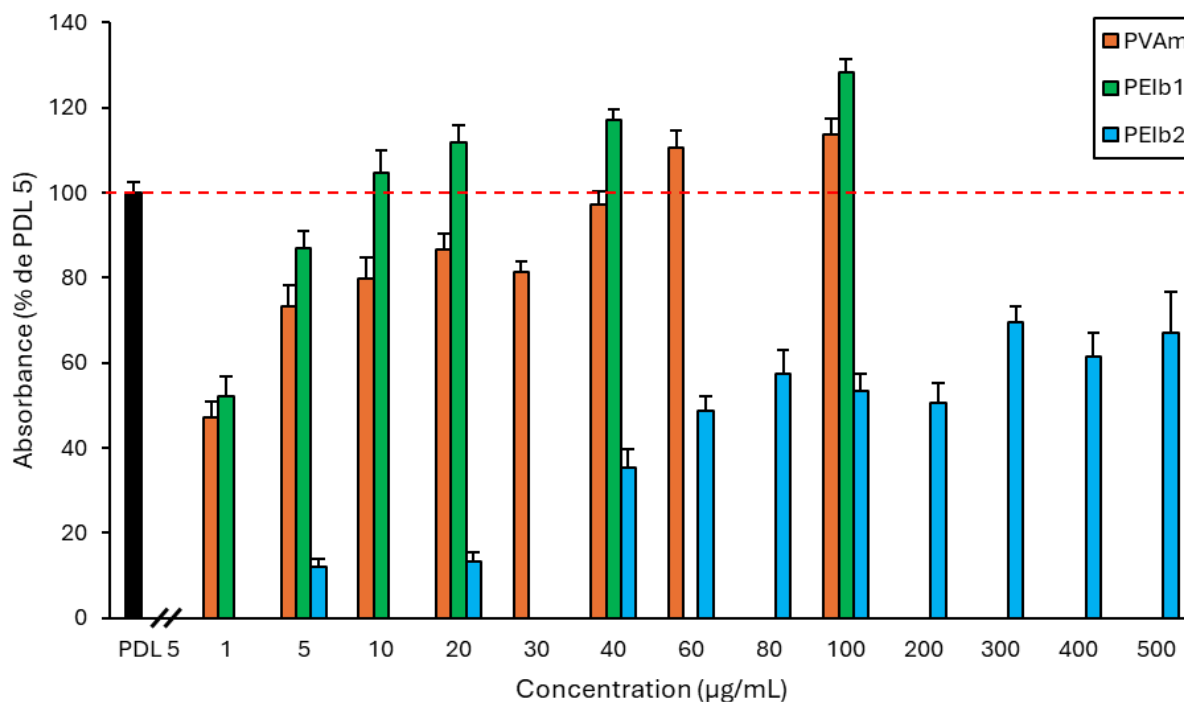


Figure 5.2 Impact de la concentration du polymère sur la densité surfacique de groupes aminés disponibles.

Densité évaluée par le bleu de Coomassie brillant pour la PDL 5 (noir), le PVAm (orange), le PEIb1 (vert) et le PEIb2 (bleu). Les résultats sont normalisés par les valeurs obtenues pour la PDL greffée à 5 µg/mL (PDL 5), prise pour référence. La ligne pointillée rouge indique les valeurs obtenues pour la PDL 5 soit 100%. Les barres d'erreur représentent les erreurs types. Les trois polymères présentent des valeurs d'absorbance significativement différentes les unes des autres (ANOVA à deux facteurs et test de comparaisons multiples de Tukey ; PVAm et PEIb1 : **** $p < 0.0001$; PVAm et PEIb2 : **** $p < 0.0001$; PEIb1 vs PEIb2 : **** $p < 0.0001$). n = nombre d'échantillons, N = nombre d'essais. PVAm (par condition) : $n=4-12$, $N=1-3$; PEIb1 (par condition) : $n=11-23$, $N=3-6$; PEIb2 (par condition) : $n=3-12$, $N=1-4$; PDL 5 : $n=20$, $N=5$.

Pour chaque polymère, une tendance similaire est observée : l'absorbance normalisée augmente avec la concentration en polymère. Certaines concentrations en PVAm et en PEIb1 présentent des valeurs d'absorbance dépassant les valeurs de la PDL 5 alors que celles du PEIb2

atteignent un plateau à partir de 80 µg/mL (50-70 % par rapport à PDL), ne dépassant pas les valeurs de la PDL 5. Ces résultats indiquent que la densité de groupes amines en surface augmente avec la concentration de polymère déposé, comme précédemment observé (Hopp et al., 2019; Stil et al., 2023).

Cette étude nous permet également de sélectionner des concentrations pour les prochaines expérimentations. Comme point de départ, des densités surfaciques en amine équivalentes à la PDL 5 sont sélectionnées. Concernant le PVAm, la concentration de 40 µg/mL se rapproche des valeurs obtenues pour la PDL 5, faisant d'elle la concentration potentiellement idéale. D'autres concentrations sont choisies pour PVAm (10, 60 et 100 µg/mL) afin d'évaluer l'influence de la densité en polymère sur le développement des neurones. Pour le PEIb1, une densité d'amines similaire à celle de la PDL 5 est obtenue pour une concentration de 5 µg/mL. Les autres concentrations retenues sont 1, 10 et 20 µg/mL. Cependant, aucune concentration en PEIb2 ne permet d'atteindre des valeurs d'absorbance proches de celles de la PDL 5. Les concentrations choisies sont 40, 80, 100 et 300 µg/mL. Pour finir, un problème d'homogénéité de la coloration de la surface a été observé à la suite du test colorimétrique sur les lamelles de PAAm (Figure A.1). Le PAAm a donc été écarté pour le reste de l'étude.

Pour finir, des tests statistiques ont été réalisés afin de valider ces observations. Le type du polymère ainsi que sa concentration ont tous les deux un effet significatif sur l'absorbance mesurée (ANOVA à deux facteurs; **** $p < 0.0001$). De plus, le PVAm, le PEIb1 et le PEIb2 sont significativement différents les uns des autres en termes d'absorbance (test de Tukey; PVAm et PEIb1 : **** $p < 0.0001$; PVAm et PEIb2 : **** $p < 0.0001$; PEIb1 vs PEIb2 : **** $p < 0.0001$).

5.2 Développement des réseaux synaptiques

L'étude précédente a permis de sélectionner quatre concentrations de greffage pour chacun des trois polymères : PVAm à 10, 40, 60 et 100 µg/mL (respectivement appelées PVAm 10, PVAm 40, PVAm 60 et PVAm 100), PEIb1 à 1, 5, 10 et 20 µg/mL (respectivement appelées PEIb1 1, PEIb1 5, PEIb1 10 et PEIb1 20) et PEIb2 à 40, 80, 100 et 300 µg/mL (respectivement appelées PEIb2 40, PEIb2 80, PEIb2 100 et PEIb2 300). Le comportement cellulaire des neurones a été évalué sur ces 12 conditions avec la PDL à 5 µg/mL (appelée PDL 5) comme référence.

Afin d'observer les réseaux de neurones, les cultures ont été marquées pour la synaptophysine, une protéine que l'on retrouve dans les vésicules présynaptiques. Pour quantifier la densité des réseaux synaptiques, des images du marquage de la synaptophysine sur les lamelles entières individuelles sont prises au microscope confocal, à grossissement 8×. La densité de synaptophysine apparaît en niveaux de gris, le niveau 0 correspondant au noir et le niveau 255 correspondant au blanc (Figure 5.3 A)

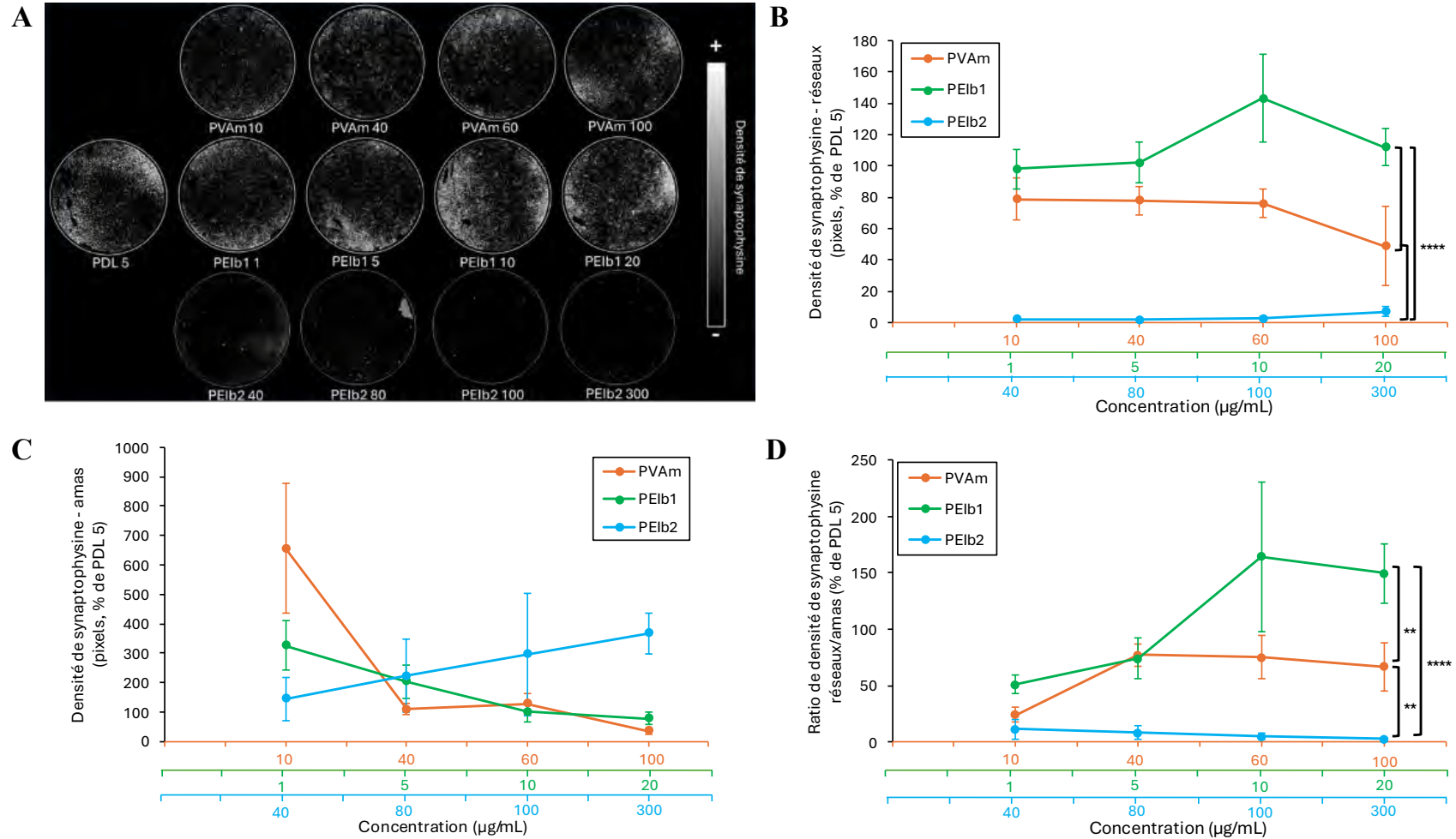


Figure 5.3 Quantification des densités de pixels de la synaptophysine, une protéine présynaptique

(A) Densité de synaptophysine obtenue après 10 jours *in vitro*. Les cellules sont cultivées sur du PVAm (ligne supérieure) à 10, 40, 60 et 100 µg/mL (nommés respectivement PVAm 10, PVAm 40, PVAm 60, PVAm 100), du PEIb1 (ligne du milieu) à 1, 5, 10 et 20 µg/mL

(nommés respectivement PEIb1 1, PEIb1 5, PEIb1 10, PEIb1 20), du PEIb2 (ligne inférieure) à 40, 80, 100 et 300 $\mu\text{g/mL}$ (nommés respectivement PEIb2 40, PEIb2 80, PEIb2 100, PEIb2 300) et sur de la PDL greffée à 5 $\mu\text{g/mL}$ (PDL 5, ligne du milieu, gauche) comme référence. Les images sont acquises sur des lamelles entières (12 mm de diamètre). **(B) et (C) et (D)** Quantification des densités de pixels de synaptophysine pour le PVAm (orange), le PEIb1 (vert), le PEIb2 (bleu). Les résultats sont normalisés par les valeurs obtenues pour PDL 5, prise pour référence et exprimés sous la forme d'un pourcentage $\pm$ erreur type. n = nombre d'échantillons, N = nombre de cultures. **(B)** Quantification des réseaux synaptiques. Les valeurs obtenues pour le PVAm, le PEIb1 et le PEIb2 sont significativement différentes (ANOVA à deux facteurs et test de Tukey; **** $p < 0.0001$). $n=4-16$, $N=2-6$ par condition. **(C)** Quantification des clusters. $n=3-9$, $N=2-4$ par condition. **(D)** Quantification du rapport entre les réseaux et les clusters. Les valeurs obtenues pour le PVAm, le PEIb1 et le PEIb2 sont significativement différentes (ANOVA à deux facteurs et test de Tukey; ** $p < 0.01$ et **** $p < 0.0001$). $n=3-9$, $N=2-4$ par condition.

De façon qualitative, la figure 5.3 A nous indique la présence de contacts synaptiques. Pour le PEIb2, très peu de contacts synaptiques apparaissent pour les 4 concentrations choisies (Figure 5.3 A, ligne inférieure). Cela peut être mis en lien avec la coloration très faible observée précédemment lors du test colorimétrique au CBB, suggérant une densité surfacique de groupes amines également faible, quelle que soit la concentration en solution choisie. Ces résultats concordent avec ceux obtenus dans l'étude précédente (Stil et al., 2023), où les cellules avaient peu adhéré sur des surfaces très faiblement aminées (condition PDL à 1 $\mu\text{g/mL}$). En revanche, pour le PVAm et le PEIb1 (Figure 5.3 A, ligne supérieure et ligne du milieu, respectivement), de nombreux contacts synaptiques sont observés sur toute la surface, avec des zones plus ou moins denses en synaptophysine. Par ailleurs, une nette différence dans le développement des neurones est observée entre les conditions PEIb1 1 et PEIb2 300, alors que leurs densités surfaciques d'amines sont proches (Figure 5.2). Cela indique que la quantité d'amines présentes à la surface des lamelles fonctionnalisées n'est pas la seule propriété influençant le développement des cellules.

Pour quantifier la densité des réseaux synaptiques, un seuil de détection du signal est appliqué sur les images des lamelles entières (Figure 5.3 A). La quantité de pixels, dont la valeur d'intensité est supérieure au seuil défini, est ensuite calculée et exprimée en pourcentage de surface.

Les valeurs obtenues ont ensuite été normalisées par celles correspondant à la PDL 5, puis exprimées comme un % par rapport à la PDL 5 (Figure 5.3 B). Le signal est généralement plus élevé au niveau des amas cellulaires (Stil et al., 2023), c'est pourquoi un second seuil détectant uniquement les amas est appliqué. De la même manière, les pixels, dont la valeur d'intensité est supérieure au seuil défini, sont détectés puis cette valeur est exprimée en pourcentage de surface. Les valeurs obtenues ont ensuite été normalisées par celles correspondant à la PDL 5, puis exprimées comme un % par rapport à la PDL 5 (Figure 5.3 C).

De façon quantitative, la figure 5.3 B montre l'évolution des réseaux synaptiques (indiquant le développement recherché des neurones) en fonction de la concentration de polymère. Pour le PEIb2, les valeurs de densité de pixels de synaptophysine sont très faibles, ce qui indique un très faible développement de réseaux synaptiques, en adéquation avec les observations faites sur les images de la Figure 5.3 A. Ces résultats permettent donc d'éliminer le PEIb2 pour les tests cellulaires ultérieurs. Concernant le PEIb1, les réseaux sont plus développés, avec des valeurs de densité de pixels de synaptophysine aux alentours de celles de la PDL 5 pour les conditions PEIb1 1, PEIb1 5 et PEIb1 20 et une valeur de 143 ± 63 % pour la condition PEIb1 10. Les conditions PVAm 10, PVAm 40 et PVAm 60 présentent des valeurs de l'ordre de 78 %, indiquant un développement des réseaux synaptiques un peu plus faible que sur la PDL 5. Ce pourcentage chute à 49 % pour PVAm 100, nous écarterons donc cette condition pour les tests ultérieurs, le développement des réseaux synaptiques n'étant pas assez important. Par ailleurs, une ANOVA à deux facteurs confirme l'effet des polymères sur la densité de réseaux synaptiques (**** $p < 0.0001$) et les tests de Tukey ont montré que les polymères étaient significativement différents les uns des autres en termes de densité de réseaux (**** $p < 0.0001$).

De façon quantitative, la figure 5.3 C montre l'évolution du nombre d'amas cellulaires en fonction de la concentration de polymère. Pour rappel, la présence d'amas signale un mauvais attachement des cellules sur le substrat polymérique provoquant un regroupement cellulaire. PVAm 10 présente une valeur énorme d'amas, dépassant les 600 % comparé à la PDL 5. PVAm 40 et PVAm 60 restent de potentiels candidats, avec des valeurs d'amas de 110 ± 48 % et 128 ± 79 % respectivement. PEIb1 1 et PEIb1 5 présentent des valeurs d'amas trop grandes par rapport à la PDL 5 (327 ± 234 % et 204 ± 162 %, respectivement), ces conditions ne seront donc pas retenues pour de futurs tests. En revanche, PEIb1 10 et PEIb1 20 ont des valeurs d'amas de 101 ± 47 % et 79 ± 55 % respectivement, se rapprochant donc des valeurs atteintes pour la PDL 5. Une ANOVA

à deux facteurs confirme qu'une concentration en polymère trop faible provoque l'apparition d'amas (* $p < 0.05$).

De façon quantitative, la figure 5.3 D montre le ratio réseaux/amas, calculé à partir des densités de réseaux et d'amas et permettant de peaufiner la sélection des candidats potentiels. Une haute valeur de ce ratio réseaux/amas est souhaitée, car elle signifie la présence d'une grande quantité de réseaux et une quantité d'amas minime. Le polymère donnant le plus grand ratio est le PEIb1, qui atteint une valeur de 165 ± 94 % pour le PEIb1 10, et une valeur de 150 ± 70 % pour le PEIb1 20. L'écart-type étant plus faible pour la condition PEIb1 20, c'est cette condition qui est sélectionnée comme candidat potentiel et sera utilisée lors des tests fonctionnels. Concernant le PVAm, les conditions PVAm 40 et PVAm 60 donnent des valeurs de ratio réseaux/amas similaires, aux alentours de 75 % par rapport à la PDL 5. Ces valeurs étant plus basses que la PDL 5, les conditions ne seront pas utilisées pour les tests cellulaires fonctionnels. Enfin, une ANOVA à deux facteurs confirme l'influence du type de polymère (**** $p < 0.0001$) et de leurs concentrations (* $p < 0.05$) sur le ratio calculé. De plus, les valeurs des différents polymères sont significativement différentes les uns des autres (Test de Tukey ; PVAm et PEIb1, ** $p < 0.01$; PEIb1 et PEIb2, **** $p < 0.0001$; PVAm et PEIb2, ** $p < 0.01$).

Un plus fort grossissement a permis de mettre en valeur les différences dans le développement des cellules pour PVAm 40, PEIb1 20 et PDL 5. Plus particulièrement, la synaptophysine et la sous-unité GluR1 du récepteur au glutamate de type AMPA seront marquées par fluorescence afin de mettre en relief les contacts synaptiques nécessaires à la transmission d'influx nerveux. Sur la figure 5.4, la synaptophysine est marquée en rouge et les neurones positifs au GluR1 (neurones excitateurs de type glutamatergique) sont marqués en vert. Pour les trois conditions observées, à savoir PVAm 40, PEIb1 20 et PDL 5, les cellules positives au GluR1 apparaissent comme des neurones individuels. Sur le PVAm 40 la synaptophysine est moins homogène, présentant des zones plus denses et donc plus colorées en rouge (Figure 5.4 A). À l'inverse, pour PEIb1 20 (Figure 5.4 C) et PDL 5 (Figure 5.4 B), la synaptophysine est répartie de façon plus homogène.

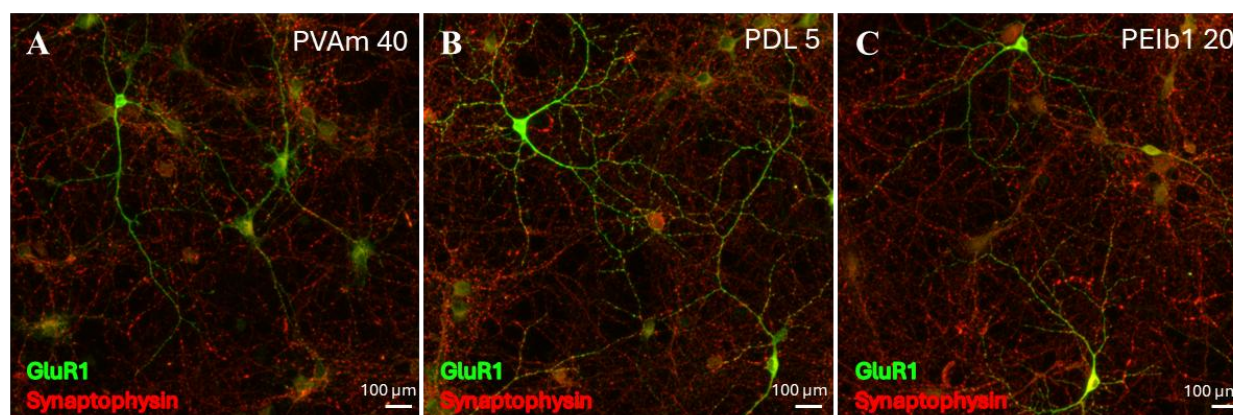


Figure 5.4 Effet des différents polymères sur le développement des réseaux synaptiques, en fluorescence

Les images sont prises sur des cultures après 10 jours in vitro, avec un grossissement 40×. La synaptophysine est marquée en rouge et les cellules positives au GluR1 sont marquées en vert. Les cellules sont cultivées sur du PVA 40 (A), de la PDL 5 (B) et du PEIb1 20 (C). L'échelle correspond à 100 µm.

Seul le PEIb1 a été retenu après les tests sur le développement de réseaux synaptiques, et la condition PEIb1 20 semble être la condition se rapprochant le plus de la PDL 5 quant au développement des réseaux neuronaux. En effet, pour PEIb1 20, les réseaux synaptiques suivent un développement similaire comparé à la PDL 5, tout en montrant une grande densité de réseaux et un faible taux d'apparition d'amas. Pour les tests cellulaires suivants, les deux conditions qui seront évaluées pour le comportement des cellules sont PEIb1 20 et PDL 5.

5.3 Analyse des contacts synaptiques

Pour évaluer la maturation des neurones sur les revêtements de PEIb1 20 et de PDL 5, l'identification et la quantification des contacts synaptiques est réalisée par immunocytochimie. Les contacts synaptiques sont détectés par le biais de deux marqueurs. Le premier marqueur cible la synaptophysine, une protéine présente dans les vésicules du compartiment présynaptique, tandis

que le second marqueur vise la sous-unité GluR1 du récepteur glutamatergique AMPA, située sur le neurone postsynaptique. Pour rappel, le glutamate est un neurotransmetteur utilisé par les neurones excitateurs (Mohan et al., 2023). Ainsi, le marquage du récepteur AMPA permet de cibler uniquement les contacts synaptiques sur les neurones excitateurs. L'analyse a été effectuée sur l'ensemble des neurites, à l'aide du logiciel Intellicount. Plusieurs données sont extraites, telles que l'aire du marquage de GluR1 (représentant l'aire des neurites), la densité de contacts synaptiques et l'aire des contacts synaptiques (indiquant la maturation synaptique). Ces trois données ont donc été comparées sur des lamelles fonctionnalisées avec du PEIb1 20 et de la PDL 5, à DIV 10 et à DIV 14. Ces deux temps sont choisis car la synaptogénèse démarre aux alentours DIV 10 et le nombre de contacts synaptiques augmente rapidement entre DIV 10 et DIV 14. Cette période est donc importante pour observer la mise en place des synapses, ainsi que leur maturation. Pour chaque caractéristique, les valeurs sont rapportées à celles de la PDL 5 à DIV 10 et exprimées en variation de pourcentage $\pm$ erreur type. Les résultats présentés ont été obtenus sur une culture et constituent donc des résultats préliminaires.

La figure 5.5 B montre l'aire des neurites, calculée à DIV 10 et DIV 14 pour les conditions PDL 5 et PEIb1 20. L'aire des neurites augmente significativement entre DIV 10 et DIV 14 pour la condition PEIb1 20 (ANOVA à un facteur puis test de comparaisons multiples de Šidák : *** $p < 0.001$), indiquant que les neurites continuent de croître pendant cette période, contrairement à la PDL 5, pour laquelle la croissance semble s'être fortement ralentie. De plus, à DIV 14, il est à noter que l'aire des neurites est significativement plus grande pour la condition PEIb1 20 que pour la condition PDL 5, ce qui laisse supposer que les neurones cultivés sur du PEIb1 20 ont une plus grande capacité d'extension que ceux cultivés sur la PDL 5.

La figure 5.5 C montre la densité de contacts synaptiques, calculée à DIV 10 et DIV 14 pour les conditions PDL 5 et PEIb1 20. Une différence significative est observée entre DIV 10 et DIV 14, à la fois pour la condition PDL 5 et pour la condition PEIb1 20 (test de Kruskal-Wallis puis test de comparaisons multiples de Dunn : ** $p < 0.01$ et **** $p < 0.0001$, respectivement). Ce résultat confirme que la synaptogénèse intervient entre DIV 10 et DIV 14. À DIV 10, la tendance observée laisse penser que la densité de contacts synaptiques est plus faible sur le PEIb1 20 que sur la PDL 5, tandis qu'à DIV 14, c'est l'inverse qui se produit. Il est donc possible que la synaptogénèse soit plus lente en début de culture sur le PEIb1 20, puis accélère rapidement entre DIV 10 et DIV 14, jusqu'à dépasser les résultats obtenus sur la PDL 5.

Pour finir, la figure 5.5 D montre l'aire des contacts synaptiques, calculée à DIV 10 et DIV 14 pour les conditions PDL 5 et PEIb1 20. Pour les deux conditions, l'aire des contacts synaptiques est significativement plus grande à DIV 14 qu'à DIV 10 (test de Kruskal-Wallis puis test de comparaisons multiples de Dunn : **** $p < 0.0001$). Cela confirme que les synapses des neurones cultivés sur les deux polymères deviennent plus matures entre DIV 10 et DIV 14, ce qui était attendu. Par ailleurs, les résultats indiquent que les synapses sont significativement plus petites sur les neurones cultivés sur le PEIb1 20, à la fois à DIV 10 et DIV 14 (test de Kruskal-Wallis puis test de comparaisons multiples de Dunn : **** $p < 0.0001$). Ainsi, il peut en être conclu que la maturation est plus lente sur le PEIb1 20 que sur la PDL 5.

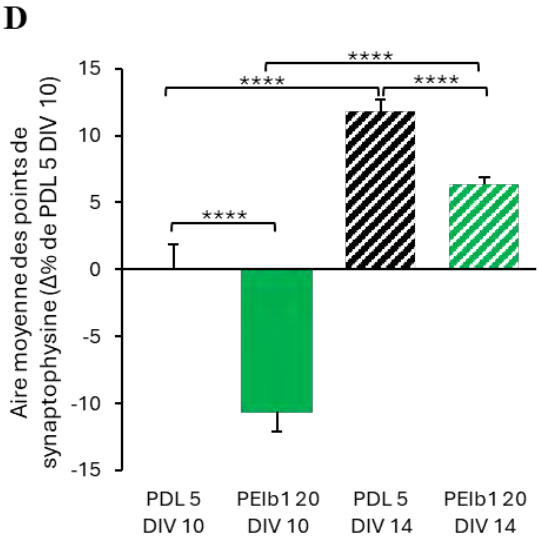
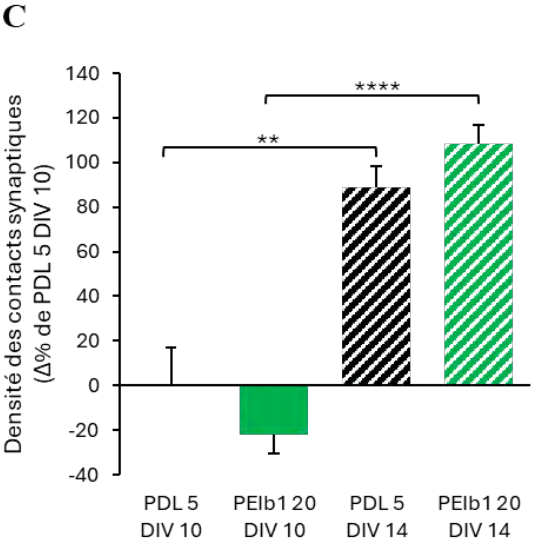
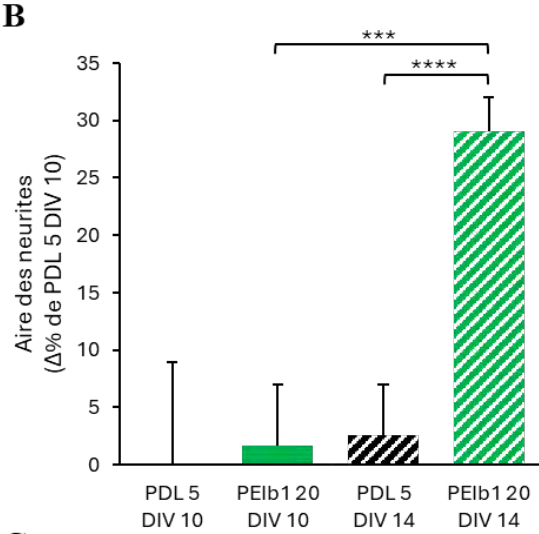
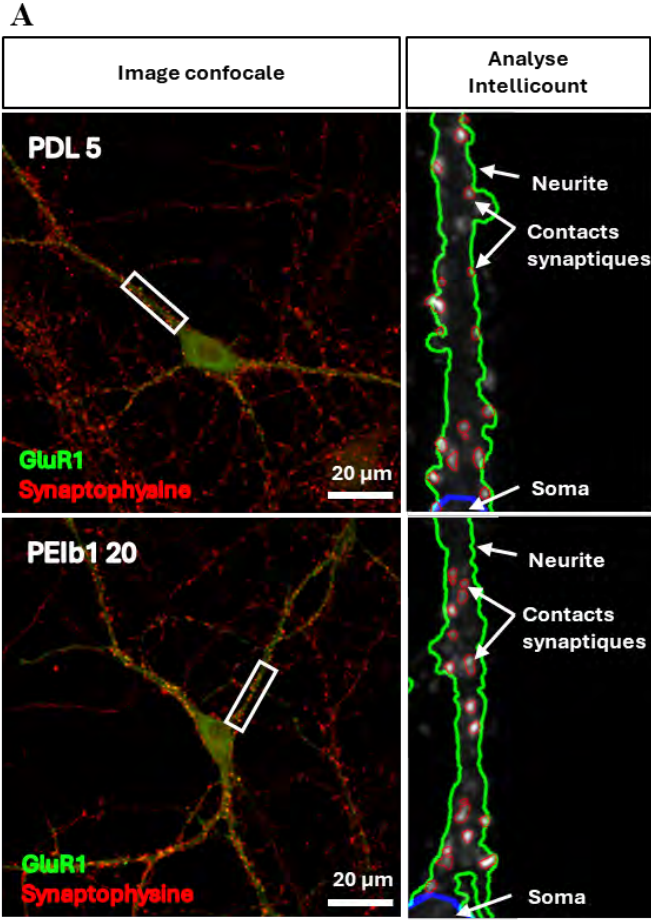


Figure 5.5 Influence du type de polymère sur la maturation synaptique des neurones corticaux

*L'analyse des contacts synaptiques à DIV 10 et DIV 14 pour les conditions PEIb1 20 et PDL 5 est réalisée grâce à la technique d'immunocytochimie. Les vésicules présynaptiques sont marquées avec un anticorps dirigé contre la synaptophysine (rouge) et les neurones excitateurs avec un anticorps dirigé contre la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA (vert). Les images sont acquises au microscope confocal, avec un grossissement de 100× et sont analysées avec le logiciel Intellicount. (A) Images représentatives de neurones cultivés sur de la PDL 5 (ligne du haut, gauche) et du PEIb1 20 (ligne du bas, gauche), avec un agrandissement sur un neurite (colonne de droite). La synaptophysine est marquée en rouge, le GluR1 en vert. L'échelle correspond à 20 µm. (B) Aire des neurites calculée à DIV 10 et DIV 14 pour la PDL 5 et le PEIb1 20. Les données sont exprimées en ($\Delta\% \pm$ erreur type) de PDL 5 DIV 10. Pour PEIb1 20, l'aire augmente significativement entre DIV 10 et DIV 14, et à DIV 14, PEIb1 20 et PDL 5 sont significativement différents (ANOVA 1 facteur puis test de comparaisons multiples de Šidák : *** $p < 0.001$ et **** $p < 0.0001$, respectivement). n = nombre de cellules = 13-77 par condition. (C) Densité de contacts synaptiques calculée à DIV 10 et DIV 14 pour la PDL 5 et le PEIb1 20. Les données sont exprimées en ($\Delta\% \pm$ erreur type) de PDL 5 DIV 10. La densité de contacts synaptiques augmente significativement entre DIV 10 et DIV 14 pour PDL 5 et PEIb1 20 (test de Kruskal-Wallis puis test de comparaisons multiples de Dunn : ** $p < 0.01$ et **** $p < 0.0001$, respectivement). n = nombre de cellules = 13-77 par condition (D) Aire moyenne des contacts synaptiques calculée à DIV 10 et DIV 14 pour la PDL 5 et le PEIb1 20. Les données sont exprimées en ($\Delta\% \pm$ erreur type) de PDL 5 DIV 10. L'aire des contacts synaptiques est significativement différente entre PDL 5 et PEIb1 20 à DIV 10 et à DIV 14, et l'aire des contacts synaptiques augmente significativement entre DIV 10 et DIV 14 pour PDL 5 et PEIb1 20 (test de Kruskal-Wallis puis test de comparaisons multiples de Dunn : **** $p < 0.0001$). n = nombre de contacts = 1921-28935 par condition.*

5.4 Microscopie en temps réel : longueur des neurites et aire cellulaire

Le comportement cellulaire a été observé en microscopie en temps réel, avec l'appareil Incucyte® S3 qui permet de suivre l'évolution des cultures dans le temps. Cette observation s'est

faite dès la mise en culture des cellules (DIV 0) jusqu'au dixième jour de culture (DIV 10) au minimum. La longueur de neurite totale et l'aire cellulaire des neurones ont été calculées grâce à l'appareil, sur quatre cultures indépendantes, pour chaque jour de culture. Les données sont exprimées sous la forme d'une moyenne $\pm$ erreur type.

Pour quatre cultures indépendantes (Figure 5.6), la longueur de neurite augmente au fil des jours, sur les deux recouvrements de polymère (PEIb1 20 et PDL 5), indiquant que les réseaux synaptiques se développent, ce qui était attendu. Une différence significative (**** $p < 0.0001$) entre les valeurs obtenues pour le PEIb1 20 (courbe verte) et la PDL 5 (courbe noire) a été mise en évidence par une ANOVA à deux facteurs. Ainsi, la tendance observée sur ces quatre cultures est une longueur plus grande des neurites pour les neurones cultivés sur du PEIb1 20. Ces résultats sont en accord avec les observations faites à DIV 14 en immunocytochimie (Figure 5.5 B), et mettent en avant la capacité des neurones à émettre de plus longs prolongements sur le PEIb1 20.

En revanche, on ne peut pas établir de lien évident entre le type de polymère utilisé et l'aire cellulaire des neurones calculée (Figure 5.7). En effet, sur deux cultures, l'aire cellulaire est significativement plus grande pour les neurones cultivés sur du PEIb1 20 (ANOVA deux facteurs; ** $p < 0.01$ et **** $p < 0.0001$), sur une autre, l'aire est significativement plus grande pour les neurones cultivés sur la PDL 5 (ANOVA deux facteurs; **** $p < 0.0001$) et enfin sur la dernière, les valeurs ne présentent pas de différence significative. Ceci indique également que l'augmentation de la longueur totale des neurites avec la PEIb1 20 est indépendante de la surface cellulaire totale.

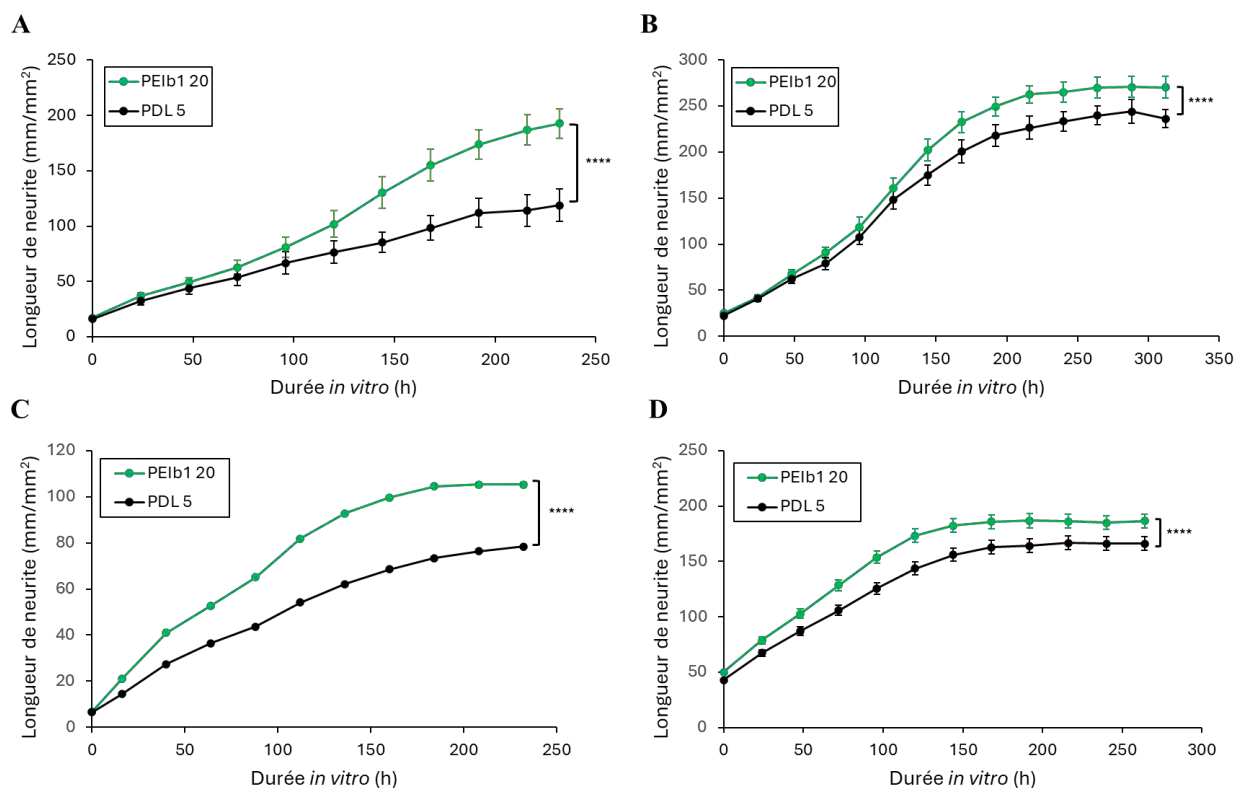


Figure 5.6 Influence du type de polymère sur la longueur des neurites, évaluée sur quatre cultures indépendantes

Longueur de neurites calculée sur des neurones cultivés sur du PEIb1 20 (courbe verte) et de la PDL 5 (courbe noire) lors de quatre cultures différentes : **(A)** C349, **(B)** C351, **(C)** C353, **(D)** C354. Les barres d'erreur représentent les erreurs types. La signification statistique à **** $p < 0.0001$ des différences observées entre les deux conditions a été évaluée par une ANOVA à deux facteurs. n = nombre d'échantillons. $n = 9-64$ par condition.

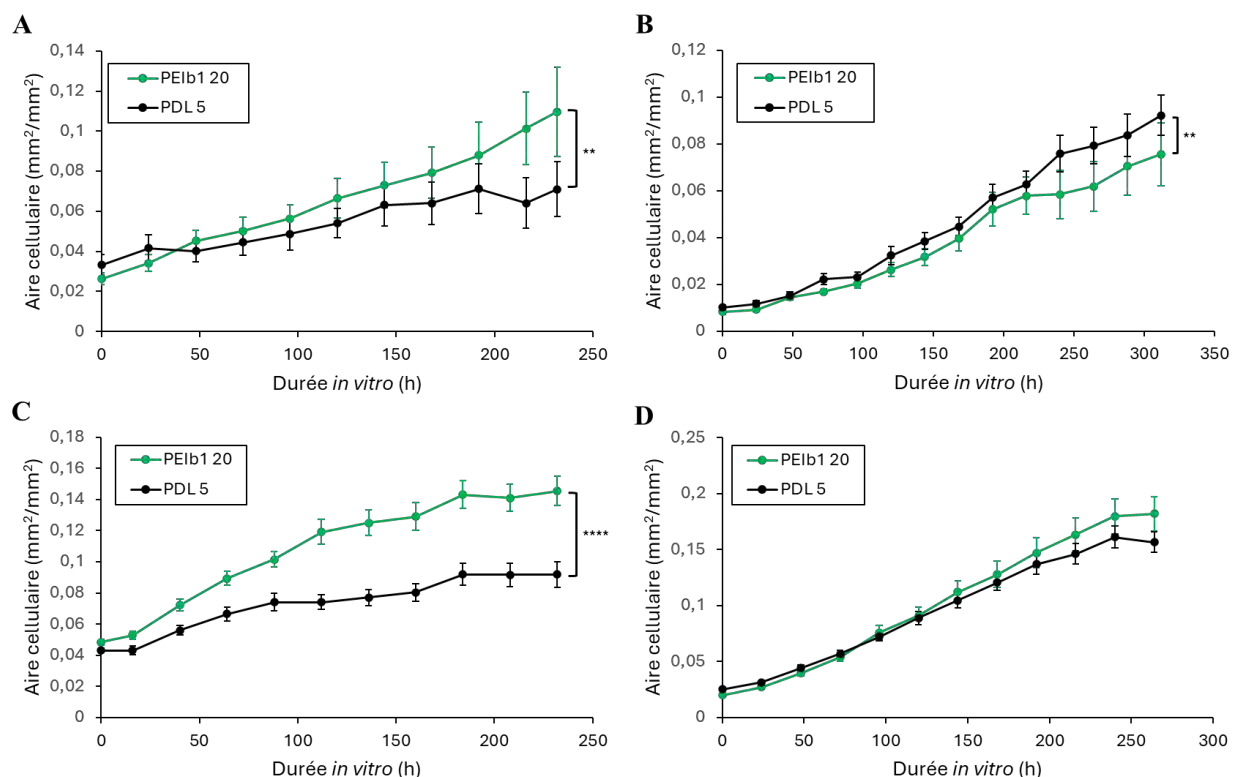


Figure 5.7 Influence du type de polymère sur l'aire cellulaire, évaluée sur quatre cultures indépendantes

Aire cellulaire calculée sur des neurones cultivés sur du PEIb1 20 (courbe verte) et de la PDL 5 (courbe noire) lors de quatre cultures différentes : **(A)** C349, **(B)** C351, **(C)** C353, **(D)** C354. Les barres d'erreur représentent les erreurs types. Les significations statistiques à ** $p < 0.01$ et **** $p < 0.0001$ des différences observées entre les deux conditions ont été évaluées par une ANOVA à deux facteurs. n = nombre d'échantillons. $n = 9-64$ par condition.

5.5 Test de survie cellulaire

Pour déterminer si les revêtements de PEIb1 20 et de PDL 5 ont une influence sur la survie des cellules, un test de viabilité cellulaire a été réalisé sur trois différentes cultures. À DIV 10, les cellules ont été incubées avec de la calcéine et de l'éthidium, marqueurs pour les cellules vivantes et les cellules mortes respectivement (Figure 5.8 A). Avec l'appareil Incucyte® S3, il a ensuite été possible de détecter le nombre des deux types de cellules. À partir de ces données, nous avons ensuite calculé le rapport entre le nombre de cellules mortes et le nombre de cellules total

(Figure 5.8 B). Ces données sont exprimées comme une variation de pourcentage de la PDL 5 puis rapportées sous la forme d'une moyenne $\pm$ erreur type. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre le rapport calculé pour les cellules cultivées sur du PEIb1 et celui pour les cellules cultivées sur de la PDL 5. Le PEIb1 20 n'est donc pas plus cytotoxique que la PDL 5, ce qui renforce l'idée que le PEIb1 20 pourrait être une alternative de revêtement utilisé en culture cellulaire.

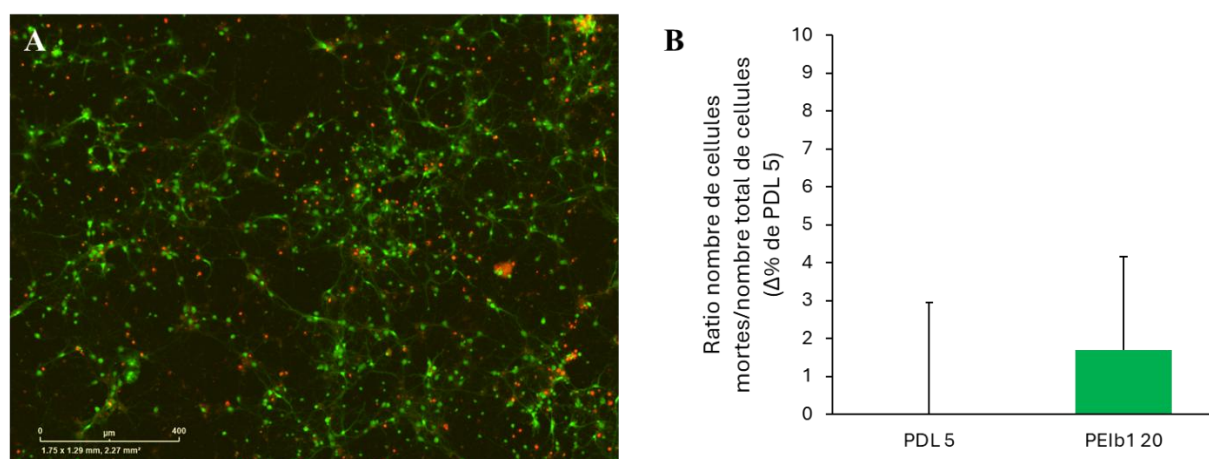


Figure 5.8 Influence du revêtement sur le taux de survie cellulaire

(A) Détection des cellules vivantes (vert), marquées à la calcéïne et des cellules mortes (rouge), marquées à l'éthidium, cultivées sur du PEIb1 20 à DIV 10. L'échelle correspond à 400 μ m.

(B) Quantification du rapport entre le nombre de cellules mortes et le nombre total de cellules, cultivées sur du PEIb1 20 (vert) et de la PDL 5 (noir) à DIV 10. Les barres d'erreur représentent les erreurs types. n = nombre d'échantillons, N = nombre d'essais. $n = 10$, $N = 3$ par condition.

CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce projet visait à comparer l'influence de revêtements de polyvinylamine (PVAm), de polyéthylèneimine branché 25kDa (PEIb1), de polyéthylèneimine branché 800 Da et de polyallylamine (PAAm) sur le développement de neurones corticaux primaires. Pour réaliser ce projet, trois sous-objectifs avaient été définis. Les résultats présentés au Chapitre 5 seront discutés selon ces trois axes.

6.1 Déterminer les concentrations correspondant à une densité surfacique de groupes amines similaire à la PDL 5

Dans une précédente collaboration entre les laboratoires du Pr. Bouchard et du Pr. De Crescenzo, une nouvelle méthode d'attachement covalent de la poly-D-lysine (PDL) sur des surfaces de verre silanisées a été développée. Il a été montré que la condition PDL à 5 µg/mL (PDL 5) permettait d'obtenir des réseaux neuronaux denses et matures (Stil et al., 2023). Dans ce projet, une étude similaire est menée avec d'autres polymères : le PVAm, le PEIb1, le PEIb2 et le PAAm. La première étape consistait à déterminer, pour chacun, la concentration optimale permettant d'atteindre une densité surfacique d'amines équivalente à la PDL 5. Pour cela, le test colorimétrique au bleu de Coomassie brillant (CBB) est utilisé, permettant de vérifier à la fois la présence et l'homogénéité de la couche de polymère sur le verre. Le colorant est ensuite libéré dans une solution de désorption dont l'absorbance est mesurée. Plus l'intensité de la coloration est grande, plus la densité surfacique de groupes amines est grande. Les résultats montrent que le PVAm et le PEIb1 atteignent, voire dépassent, la densité de groupes amines obtenue avec la PDL 5. En revanche, le PEIb2, malgré l'augmentation de la concentration, présente une densité surfacique plafonnant à 70 % de la valeur de référence. Par ailleurs, le PAAm, a dû être exclu en raison d'un greffage peu homogène. Le temps et les conditions de tests étant limités par les conditions de culture cellulaire (récolte de cellules sur des embryons de souris), le PVAm, le PEIb1 et le PEIb2 ont été privilégiés pour l'analyse cellulaire. Cependant, l'origine de l'inhomogénéité de la couche de PAAm n'est pas claire et pourrait provenir des conditions de travail dans le laboratoire. Il pourrait donc être intéressant de refaire le test colorimétrique au CBB avec le PAAm et d'inclure éventuellement ce polymère dans l'étude cellulaire.

Plusieurs concentrations ont finalement été sélectionnées pour le PVAm, le PEIb1 et le PEIb2 :

- PVAm : 10, 40, 60 et 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivement nommées PVAm 10, PVAm 40, PVAm 60 et PVAm 100
- PEIb1 : 1, 5, 10 et 20 $\mu\text{g/mL}$, respectivement nommées PEIb1 1, PEIb1 5, PEIb1 10 et PEIb1 20
- PEIb2 : 40, 80, 100 et 300 $\mu\text{g/mL}$, respectivement nommées PEIb2 40, PEIb2 80, PEIb2 100 et PEIb2 300

Utiliser une gamme de concentrations permettra d'évaluer l'influence de la concentration en polymère sur le développement des neurones.

Il serait également pertinent de regarder d'autres propriétés de surface, comme la mouillabilité (mesure de l'angle de contact), car la réponse cellulaire dépend aussi du caractère hydrophile ou hydrophobe du substrat (Milky et al., 2022). Ce test n'a pas été inclus dans ce projet car l'objectif principal était de regarder, en premier lieu, comment la densité surfacique d'amines influence le développement des neurones en culture. Il serait néanmoins pertinent d'aller plus loin dans l'analyse des polymères, afin de comprendre les différentes propriétés physicochimiques ayant un impact sur le développement cellulaire.

6.2 Comparer le développement synaptique des neurones sur les différents polymères

Les concentrations sélectionnées à l'étape précédente ont servi à étudier le comportement des neurones en fonction de la quantité d'amines disponibles. Les résultats mettent en évidence que la nature et la concentration en solution du polymère greffé ont un impact majeur sur la formation de réseaux synaptiques. Le PEIb2, qui présente une faible densité de groupes amines, se distingue par une quasi-absence de contacts synaptiques, confirmant que la densité surfacique en amines est un paramètre déterminant pour l'adhésion et la maturation des neurones corticaux. Cette observation rejoint les conclusions de Stil et al. (2023), qui montraient déjà une faible adhésion cellulaire sur des surfaces peu aminées. À l'inverse, le PVAm et le PEIb1 favorisent la formation de nombreux contacts synaptiques, mais l'analyse quantitative révèle des différences selon la

concentration utilisée. À faibles concentrations (PVAm 10, PEIb1 1 et PEIb1 5), la formation d'amas cellulaires est observée, signe d'un attachement cellulaire sous-optimal qui peut compromettre la maturation fonctionnelle des neurones. En revanche, les conditions PEIb1 10 et PEIb1 20 permettent d'obtenir une densité de réseaux synaptiques similaire à la PDL 5. Par ailleurs, l'analyse du ratio réseaux/amas met en avant la supériorité du PEIb1 20, qui combine une forte densité de réseaux synaptiques et une faible formation d'amas cellulaires, deux critères essentiels pour la sélection d'un substrat optimal pour des applications fonctionnelles. Ces résultats soulignent ainsi l'importance d'un ajustement de la concentration et du choix de polymère pour optimiser la qualité des cultures neuronales, et désignent le PEIb1 20 comme candidat privilégié pour les tests fonctionnels ultérieurs.

Cependant, il est à noter que la densité surfacique d'amines n'est pas le seul paramètre influençant le développement des neurones. En effet, pour les conditions PEIb1 1 et PEIb2 300, la coloration au CBB donnait des valeurs d'absorbance similaires tandis que les neurones se sont développés de manière totalement différente sur ces deux conditions. Sur le PEIb1 1, des réseaux de neurones se sont formés tandis que sur le PEIb2 300, très peu de neurones se sont développés. Ces résultats mettent donc en évidence le rôle potentiel d'autres propriétés des polymères dans le développement cellulaire, telles que la structure du polymère ou la longueur des chaînes carbonées.

6.3 Comparer la survie, la maturation et la fonctionnalité des neurones

Pour aller plus loin dans la comparaison entre la PDL 5 et le PEIb1 20, la survie et la maturation des neurones cultivés sur ces revêtements ont été évaluées.

La survie cellulaire est mesurée à DIV 10 à l'aide de marqueurs spécifiques. Le rapport entre le nombre de cellules mortes et le nombre total de cellules ne montre pas de différence significative entre le PEIb1 20 et la PDL 5, ce qui indique que le revêtement n'influence donc pas la viabilité des cellules. Il serait intéressant de regarder le taux de survie cellulaire à DIV 14 et DIV 18 également, pour s'assurer que le PEIb1 20 n'engendre pas une mort cellulaire à plus long terme.

Concernant la maturation, l'analyse des contacts synaptiques met en lumière les différences dans le développement neuronal. À DIV 10, les neurones cultivés sur le PEIb1 20 présentent un nombre et une densité de contacts synaptiques, ainsi qu'une aire moyenne de contacts inférieurs à

ceux observés sur la PDL 5. Cette observation suggère que la maturation synaptique est plus avancée sur la PDL 5 à ce stade. Cependant, à DIV 14, une augmentation marquée du nombre et de la densité de contacts synaptiques, ainsi que de l'aire des neurites est observée sur le PEIb1 20, dépassant même les valeurs de la PDL 5. Cela indique que la maturation accélère entre DIV 10 et DIV 14 sur le PEIb1 20, permettant aux neurones de rattraper, voire de dépasser, ceux cultivés sur la PDL 5 en termes de connectivité. Cependant, l'aire moyenne des contacts synaptiques reste légèrement inférieure sur PEIb1 20, traduisant une maturation synaptique un peu moins avancée à ce stade. De plus, le suivi des cultures en microscopie en temps réel montre que la longueur totale des neurites augmente de façon significative sur le PEIb1 20 par rapport à la PDL 5, ce qui peut refléter une plus grande capacité d'extension des réseaux neuronaux sur le PEIb1 20. En revanche, aucune tendance claire n'est observée concernant l'aire cellulaire, qui ne semble pas dépendre du type de revêtement. Cela indique également que l'augmentation de la longueur de neurites n'est pas due à une augmentation du nombre de cellules. Ces résultats suggèrent que le PEIb1 20 favorise la croissance des neurites et un développement synaptique progressif, bien que la maturation puisse être légèrement retardée par rapport à la PDL 5.

Des difficultés techniques liées à la disponibilité variable des embryons ont réduit le nombre de conditions testées et retardé certaines expériences. Ainsi, les résultats relatifs à la maturation restent préliminaires, car obtenus sur une seule culture. Il sera donc nécessaire de répéter ces expériences pour confirmer et consolider les résultats observés. De plus, l'étude des contacts synaptiques pourra également être réalisée à DIV 18, afin de regarder si la maturation des synapses sur le PEIb1 20 atteint celle observée sur la PDL 5, ou si les synapses restent plus immatures à long terme sur le PEIb1 20.

L'étude de la fonctionnalité des neurones par imagerie calcique et par patch-clamp a également été retardée en raison de limitations du matériel. Ces deux techniques étant complexes et longues à mettre en place, l'étude de la fonctionnalité n'a pas pu être réalisée. Cet aspect reste néanmoins essentiel pour une étude complète des réseaux neuronaux.

Ainsi, en observant l'ensemble des résultats, la PDL semble conserver son statut de revêtement standard en culture de neurones corticaux primaires, en permettant une maturation plus avancée des neurones. Par ailleurs, le PEIb1 se présente sous forme visqueuse, ce qui rend sa préparation en solution plus compliquée que la PDL, qui se présente sous forme de poudre. Enfin,

il est à noter que le PEIb1 est plus toxique et dangereux que la PDL, ce qui nécessite la prise de précautions supplémentaires concernant sa manipulation et son élimination.

Une autre piste intéressante à envisager serait la combinaison de PEIb1 et de PDL. Cela permettrait peut-être d'atteindre un stade de maturation plus avancé et d'obtenir des réseaux de neurones plus denses.

CHAPITRE 7 CONCLUSION

L'ensemble des résultats obtenus dans ce projet met en évidence l'importance du choix du polymère aminé et de sa concentration pour la fonctionnalisation de surfaces destinées à la culture de neurones corticaux primaires. Parmi les polymères testés, le PEIb1 à une concentration en solution de 20 $\mu\text{g/mL}$ (PEIb1 20) s'est distingué par sa capacité à favoriser un développement marqué des neurites et des réseaux synaptiques, tout en limitant la formation d'amas cellulaires. En comparaison avec la référence PDL 5, le PEIb1 20 favorise une augmentation notable de la densité de contacts synaptiques et de la longueur totale de neurites après deux semaines de culture. Toutefois, la taille moyenne des synapses reste légèrement inférieure, ce qui suggère que la maturation synaptique pourrait être moins avancée à ce stade. Le PVAm, utilisé à des concentrations de 40 et 60 $\mu\text{g/mL}$, montre aussi un effet positif sur le développement neuronal, mais les réseaux obtenus sont moins homogènes et moins denses que ceux observés avec le PEIb1 20. Le PEIb2, quant à lui, caractérisé par une faible densité de groupes amines, ne parvient pas à soutenir efficacement développement des neurones. Les résultats obtenus montrent l'importance de la quantité d'amines disponible sur le développement des neurones, mais suggèrent que d'autres paramètres interviennent également.

Ces observations confirment la nécessité d'une optimisation des propriétés de surface, non seulement pour favoriser l'adhésion et la survie cellulaire, mais aussi pour permettre la maturation synaptique de réseaux neuronaux. Au vu des résultats obtenus, la PDL conserve son statut de revêtement standard. Cependant, des tests complémentaires concernant la maturation des neurones sur le PEIb1 20 permettraient de confirmer que la PDL reste la meilleure option.

Néanmoins, il reste essentiel de poursuivre des expériences complémentaires pour affiner les conditions de culture, évaluer la stabilité des réseaux neuronaux à long terme et caractériser la fonctionnalité des synapses générées. La répétition et l'élargissement des expériences permettront de valider et d'étendre les conclusions de ce travail. Ainsi, cette étude contribue à l'avancement des connaissances sur l'ingénierie des supports de culture neuronale et ouvre de nouvelles voies pour l'amélioration des modèles *in vitro* en neurosciences. Ce travail a mis en évidence que le développement cellulaire n'est pas seulement dû à la charge de la surface. Cela ouvre la voie vers

d'autres pistes de recherche, en étudiant d'autres propriétés des polymères ayant un impact sur le développement et la maturation des neurones.

L'optimisation de cultures de neurones corticaux primaires permettra d'étudier plus précisément les mécanismes de synaptogénèse. Par exemple, dans le laboratoire du Pr. Bouchard, plusieurs projets étudient le rôle de certaines molécules et récepteurs dans la synaptogénèse. Cela permettrait éventuellement de trouver des traitements contre certaines maladies dégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer.

RÉFÉRENCES

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Neural development. Dans *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26814/>
- Asadian, M., Chan, K. V., Norouzi, M., Grande, S., Cools, P., Morent, R., & De Geyter, N. (2020). Fabrication and plasma modification of nanofibrous tissue engineering scaffolds. *Nanomaterials*, 10(1), 119. 10.3390/nano10010119
- Ballout, N., Péron, S., & Gaillard, A. (2018). Restauration des voies corticales lésées par greffe de neurones. *Médecine/sciences*, 34(8-9), 678-684. 10.1051/medsci/20183408014
- Bledi, Y., Domb, A. J., & Linial, M. (2000). Culturing neuronal cells on surfaces coated by a novel polyethyleneimine-based polymer. *Brain Research Protocols*, 5(3), 282-289. 10.1016/S1385-299X(00)00024-6
- Boucher, C., Ruiz, J.-C., Thibault, M., Buschmann, M. D., Wertheimer, M. R., Jolicoeur, M., ... De Crescenzo, G. (2010). Human corneal epithelial cell response to epidermal growth factor tethered via coiled-coil interactions. *Biomaterials*, 31(27), 7021-7031. 10.1016/j.biomaterials.2010.05.072
- Bourne, R., Steinmetz, J. D., Flaxman, S., Briant, P. S., Taylor, H. R., Resnikoff, S., ... Vos, T. (2021). Trends in prevalence of blindness and distance and near vision impairment over 30 years: an analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet Global Health*, 9(2), e130-e143. 10.1016/S2214-109X(20)30425-3
- Caire, M. J., Reddy, V., & Varacallo, M. A. (2023). Physiology, synapse. Dans *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526047/>
- Chausse, V., Mas-Moruno, C., Martin-Gómez, H., Pino, M., Díaz-Ricart, M., Escolar, G., ... Pegueroles, M. (2023). Functionalization of 3D printed polymeric bioresorbable stents with a dual cell-adhesive peptidic platform combining RGDS and YIGSR sequences. *Biomaterials Science*, 11(13), 4602-4615. 10.1039/D3BM00458A
- Chen, Z., Du, C., Liu, S., Liu, J., Yang, Y., Dong, L., ... Lei, Y. (2024). Progress in biomaterials inspired by the extracellular matrix. *Giant*, 19, 100323. 10.1016/j.giant.2024.100323

- Choosakoonkriang, S., Lobo, B. A., Koe, G. S., Koe, J. G., & Middaugh, C. R. (2003). Biophysical characterization of PEI/DNA complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(8), 1710-1722. 10.1002/jps.10437
- Clément, J.-P., Al-Alwan, L., Glasgow, S. D., Stolow, A., Ding, Y., Quevedo Melo, T., ... Kennedy, T. E. (2022). Dendritic polyglycerol amine: an enhanced substrate to support long-term neural cell culture. *ASN Neuro*, 14(1). 10.1177/17590914211073276
- Coussot, G., Faye, C., Ibrahim, A., Ramonda, M., Dobrijevic, M., Le Postollec, A., ... Vandenabeele-Trambouze, O. (2011). Aminated dendritic surfaces characterization: a rapid and versatile colorimetric assay for estimating the amine density and coating stability. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 2295-2302. 10.1007/s00216-010-4612-9
- Croisier, F., & Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780-792. 10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009
- Di Lisa, D., Muzzi, L., Pepe, S., Dellacasa, E., Frega, M., Fassio, A., ... Pastorino, L. (2022). On the way back from 3D to 2D: Chitosan promotes adhesion and development of neuronal networks onto culture supports. *Carbohydrate Polymers*, 297, 120049. 10.1016/j.carbpol.2022.120049
- Dotti, C., Sullivan, C., & Banker, G. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of Neuroscience*, 8(4), 1454-1468. 10.1523/JNEUROSCI.08-04-01454.1988
- El-Ashram, S., Yin, Q., Barta, J. R., Khan, J., Liu, X., & Suo, X. (2015). Immunoproteomic technology offers an extraordinary diagnostic approach for *Toxoplasma gondii* infection. *Journal of Microbiological Methods*, 119, 18-30. 10.1016/j.mimet.2015.09.011
- Elsayed, R., & Teow, Y. H. (2025). Advanced functional polymer materials for biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 142(3), e56391. 10.1002/app.56391
- Etherington, S. J., & Williams, S. R. (2011). Postnatal development of intrinsic and synaptic properties transforms signaling in the layer 5 excitatory neural network of the visual cortex. *Journal of Neuroscience*, 31(26), 9526-9537. 10.1523/JNEUROSCI.0458-11.2011
- Fantuzzo, J. A., Mirabella, V. R., Hamod, A. H., Hart, R. P., Zahn, J. D., & Pang, Z. P. (2017). Intellicount: high-throughput quantification of fluorescent synaptic protein puncta by machine learning. *eNeuro*, 4(6). 10.1523/ENEURO.0219-17.2017

- Ferrari, M., Cirisano, F., & Morán, M. C. (2019). Mammalian cell behavior on hydrophobic substrates: influence of surface properties. *Colloids and Interfaces*, 3(2), 48. 10.3390/colloids3020048
- Flaxman, S. R., Bourne, R. R. A., Resnikoff, S., Ackland, P., Braithwaite, T., Cicinelli, M. V., ... Zheng, Y. (2017). Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*, 5(12), e1221-e1234. 10.1016/S2214-109X(17)30393-5
- Fortier, C., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2013). A versatile coiled-coil tethering system for the oriented display of ligands on nanocarriers for targeted gene delivery. *Biomaterials*, 34(4), 1344-1353. 10.1016/j.biomaterials.2012.10.047
- Franzin, C. M., & Macdonald, P. M. (2001). Polylysine-induced ²H NMR-observable domains in phosphatidylserine/phosphatidylcholine lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 81(6), 3346-3362. 10.1016/S0006-3495(01)75968-1
- García-Mesa, Y., García-Piqueras, J., Cuendias, P., Cobo, R., Martín-Cruces, J., Feito, J., ... Vega, J. A. (2022). Synaptophysin is a selective marker for axons in human cutaneous end organ complexes. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 243, 151955. 10.1016/j.aanat.2022.151955
- Ghollasi, M., & Poormoghadam, D. (2022). Enhanced neural differentiation of human-induced pluripotent stem cells on aligned laminin-functionalized polyethersulfone nanofibers; a comparison between aligned and random fibers on neurogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 110(3), 672-683. 10.1002/jbm.a.37320
- Goncalves, J., Bartol, T. M., Camus, C., Levet, F., Menegolla, A. P., Sejnowski, T. J., ... Hosy, E. (2020). Nanoscale co-organization and coactivation of AMPAR, NMDAR, and mGluR at excitatory synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(25), 14503-14511. 10.1073/pnas.1922563117
- Grzeczkwicz, A., Gruszczynska-Biegala, J., Czeredys, M., Kwiatkowska, A., Strawski, M., Szklarczyk, M., ... Granicka, L. H. (2019). Polyelectrolyte membrane scaffold sustains growth of neuronal cells. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 107(4), 839-850. 10.1002/jbm.a.36599

- Haddad, T., Noel, S., Liberelle, B., El Ayoubi, R., Ajji, A., & De Crescenzo, G. (2016). Fabrication and surface modification of poly lactic acid (PLA) scaffolds with epidermal growth factor for neural tissue engineering. *Biomatter*, 6(1), e1231276. 10.1080/21592535.2016.1231276
- Hall, B. J., Ripley, B., & Ghosh, A. (2007). NR2B signaling regulates the development of synaptic AMPA receptor current. *Journal of Neuroscience*, 27(49), 13446-13456. 10.1523/JNEUROSCI.3793-07.2007
- He, R., Chen, J., Zhang, C., Lu, D., Zhang, L., & He, T. (2024). Quantification of overcompensated cations in layer-by-layer membrane by Orange yellow II. *Separation and Purification Technology*, 331, 125637. 10.1016/j.seppur.2023.125637
- Hetemi, D., & Pinson, J. (2019). Functionalization of polymers by hydrolysis, aminolysis, reduction, oxidation, and some related reactions. Dans *Surface Modification of Polymers* (p. 211-240). John Wiley & Sons, Ltd. 10.1002/9783527819249.ch8
- Hopp, I., MacGregor, M. N., Doherty, K., Visalakshan, R. M., Vasilev, K., Williams, R. L., & Murray, P. (2019). Plasma polymer coatings to direct the differentiation of mouse kidney-derived stem cells into podocyte and proximal tubule-like cells. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(6), 2834-2845. 10.1021/acsbiomaterials.9b00299
- Hu, H., Ni, Y., Mandal, S. K., Montana, V., Zhao, B., Haddon, R. C., & Parpura, V. (2005). Polyethyleneimine functionalized single-walled carbon nanotubes as a substrate for neuronal growth. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(10), 4285-4289. 10.1021/jp0441137
- Iqbal, M., Dinh, D. K., Abbas, Q., Imran, M., Sattar, H., & Ul Ahmad, A. (2019). Controlled surface wettability by plasma polymer surface modification. *Surfaces*, 2(2), 349-371. 10.3390/surfaces2020026
- Jeong, S., Jeon, Y., Mun, J., Jeong, S. M., Liang, H., Chung, K., ... Seo, S. (2023). Ninhydrin loaded microcapsules for detection of natural free amino acid. *Chemosensors*, 11(1), 49. 10.3390/chemosensors11010049
- Kaech, S., Huang, C.-F., & Banker, G. (2012). General considerations for live imaging of developing hippocampal neurons in culture. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2012(3). 10.1101/pdb.ip068221

- Kamande, J. W., Nagendran, T., Harris, J., & Taylor, A. M. (2019). Multi-compartment microfluidic device geometry and covalently bound poly-D-lysine influence neuronal maturation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. 10.3389/fbioe.2019.00084
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., ... Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, 14(4), 910-919. 10.5114/aoms.2016.63743
- Katchalsky, A., Mazur, J., & Spitnik, P. (1957). SECTION II: Polybase properties of polyvinylamine. *Journal of Polymer Science*, 23(104), 513-532. 10.1002/pol.1957.1202310401
- Kawauchi, T. (2011). Regulation of cell adhesion and migration in cortical neurons: not only Rho but also Rab family small GTPases. *Small GTPases*, 2(1), 36-40. 10.4161/sgtp.2.1.15001
- Kim, W., Gwon, Y., Kim, Y.-K., Park, S., Kang, S.-J., Park, H.-K., ... Kim, J. (2021). Plasma-assisted multiscale topographic scaffolds for soft and hard tissue regeneration. *Npj Regenerative Medicine*, 6(52). 10.1038/s41536-021-00162-y
- Kim, Y. H., Baek, N. S., Han, Y. H., Chung, M.-A., & Jung, S.-D. (2011). Enhancement of neuronal cell adhesion by covalent binding of poly-d-lysine. *Journal of Neuroscience Methods*, 202(1), 38-44. 10.1016/j.jneumeth.2011.08.036
- Kondinskaia, D. A., & Gurtovenko, A. A. (2018). Supramolecular complexes of DNA with cationic polymers: the effect of polymer concentration. *Polymer*, 142, 277-284. 10.1016/j.polymer.2018.03.048
- Kopec, C. D., Real, E., Kessels, H. W., & Malinow, R. (2007). GluR1 links structural and functional plasticity at excitatory synapses. *Journal of Neuroscience*, 27(50), 13706-13718. 10.1523/JNEUROSCI.3503-07.2007
- Krishna, D. N. G., & Philip, J. (2022). Review on surface-characterization applications of X-ray photoelectron spectroscopy (XPS): Recent developments and challenges. *Applied Surface Science Advances*, 12, 100332. 10.1016/j.apsadv.2022.100332
- Krutty, J. D., Schmitt, S. K., Gopalan, P., & Murphy, W. L. (2016). Surface functionalization and dynamics of polymeric cell culture substrates. *Current Opinion in Biotechnology*, 40, 164-169. 10.1016/j.copbio.2016.05.006

- Lakard, S., Herlem, G., Valles-Villareal, N., Michel, G., Propper, A., Gharbi, T., & Fahys, B. (2005). Culture of neural cells on polymers coated surfaces for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(10), 1946-1954. 10.1016/j.bios.2004.09.001
- Lei, H., Ren, R., Sun, Y., Zhang, K., Zhao, X., Ablat, N., & Pu, X. (2020). Neuroprotective effects of safflower flavonoid extract in 6-hydroxydopamine-induced model of Parkinson's disease may be related to its anti-inflammatory action. *Molecules*, 25(21), 5206. 10.3390/molecules25215206
- Lerman, M. J., Lembong, J., Muramoto, S., Gillen, G., & Fisher, J. P. (2018). The evolution of polystyrene as a cell culture material. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 24(5), 359-372. 10.1089/ten.teb.2018.0056
- Li, J., & Yeung, E. S. (2008). Real-Time Single-Molecule Kinetics of Trypsin Proteolysis. *Analytical Chemistry*, 80(22), 8509-8513. 10.1021/ac801365c
- Li, M., Cui, Z., Niu, Y., Liu, B., Fan, W., Yu, D., & Deng, J. (2010). Synaptogenesis in the developing mouse visual cortex. *Brain Research Bulletin*, 81(1), 107-113. 10.1016/j.brainresbull.2009.08.028
- Li, S., Liu, Y., Luo, X., & Hong, W. (2025). Systematic evaluation of extracellular coating matrix on the differentiation of human-induced pluripotent stem cells to cortical neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(1), 230. 10.3390/ijms26010230
- Li, X., Liu, C., & Bruggen, B. V. der. (2020). Polyelectrolytes self-assembly: versatile membrane fabrication strategy. *Journal of Materials Chemistry A*, 8(40), 20870-20896. 10.1039/D0TA07154D
- Li, Y., & Kilian, K. A. (2015). Bridging the gap: from 2D cell culture to 3D microengineered extracellular matrices. *Advanced healthcare materials*, 4(18), 2780-2796. 10.1002/adhm.201500427
- Liu, W., Han, K., Sun, M., & Wang, J. (2019). Enhancement and control of neuron adhesion on polydimethylsiloxane for cell microengineering using a functionalized triblock polymer. *Lab on a Chip*, 19(19), 3162-3167. 10.1039/C9LC00736A
- Martin, A. D., Wojciechowski, J. P., Du, E. Y., Rawal, A., Stefen, H., Au, C. G., ... Thordarson, P. (2020). Decoupling the effects of hydrophilic and hydrophobic moieties at the neuron–nanofibre interface. *Chemical Science*, 11(5), 1375-1382. 10.1039/C9SC05686F

- Martocq, L., & Douglas, T. E. L. (2021). Amine-rich coatings to potentially promote cell adhesion, proliferation and differentiation, and reduce microbial colonization: strategies for generation and characterization. *Coatings*, 11(8), 983. 10.3390/coatings11080983
- Mazia, D., Schatten, G., & Sale, W. (1975). Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 66(1), 198-200. 10.1083/jcb.66.1.198
- Mieszkowska, A., Beaumont, H., Martocq, L., Koptug, A., Surmeneva, M. A., Surmenev, R. A., ... Gurzawska-Comis, K. A. (2020). Phenolic-enriched collagen fibrillar coatings on titanium alloy to promote osteogenic differentiation and reduce inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6406. 10.3390/ijms21176406
- Milky, B., Zabolocki, M., Al-Bataineh, S. A., van den Hurk, M., Greenberg, Z., Turner, L., ... Bardy, C. (2022). Long-term adherence of human brain cells in vitro is enhanced by charged amine-based plasma polymer coatings. *Stem Cell Reports*, 17(3), 489-506. 10.1016/j.stemcr.2022.01.013
- Mohan, H., An, X., Xu, X. H., Kondo, H., Zhao, S., Matho, K. S., ... Huang, Z. J. (2023). Cortical glutamatergic projection neuron types contribute to distinct functional subnetworks. *Nature Neuroscience*, 26, 481-494. 10.1038/s41593-022-01244-w
- Moysidou, C.-M., Barberio, C., & Owens, R. M. (2021). Advances in engineering human tissue models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. 10.3389/fbioe.2020.620962
- Ng, B., Rowland, H. A., Wei, T., Arunasalam, K., Hayes, E. M., Koychev, I., ... Wade-Martins, R. (2022). Neurons derived from individual early Alzheimer's disease patients reflect their clinical vulnerability. *Brain Communications*, 4(6), fcac267. 10.1093/braincomms/fcac267
- Noel, S., Fortier, C., Murschel, F., Belzil, A., Gaudet, G., Jolicœur, M., & De Crescenzo, G. (2016). Co-immobilization of adhesive peptides and VEGF within a dextran-based coating for vascular applications. *Acta Biomaterialia*, 37, 69-82. 10.1016/j.actbio.2016.03.043
- Noel, S., Hachem, A., Merhi, Y., & De Crescenzo, G. (2015). Development of a polyester coating combining antithrombogenic and cell adhesive properties: influence of sequence and surface density of adhesion peptides. *Biomacromolecules*, 16(6), 1682-1694. 10.1021/acs.biomac.5b00219

- Noel, S., Liberelle, B., Robitaille, L., & De Crescenzo, G. (2011). Quantification of primary amine groups available for subsequent biofunctionalization of polymer surfaces. *Bioconjugate Chemistry*, 22(8), 1690-1699. 10.1021/bc200259c
- Noel, S., Liberelle, B., Yogi, A., Moreno, M. J., Bureau, M. N., Robitaille, L., & De Crescenzo, G. (2013). A non-damaging chemical amination protocol for poly(ethylene terephthalate) – application to the design of functionalized compliant vascular grafts. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(2), 230-238. 10.1039/C2TB00082B
- Pachpinde, S., & Natarajan, U. (2021). Conformations, inter-molecular structure and hydrogen bond dynamics of neutral and cationic poly(vinyl amine) in aqueous solution. *Molecular Simulation*, 47(16), 1299-1312. 10.1080/08927022.2021.1968389
- Patil, N. A., & Kandasubramanian, B. (2021). Functionalized polylysine biomaterials for advanced medical applications: A review. *European Polymer Journal*, 146, 110248. 10.1016/j.eurpolymj.2020.110248
- Pelton, R. (2014). Polyvinylamine: a tool for engineering interfaces. *Langmuir*, 30(51), 15373-15382. 10.1021/la5017214
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., & Williams, S. M. (2001). Two families of postsynaptic receptors. Dans *Neuroscience. 2nd edition*. Sinauer Associates. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10855/>
- Rana, D., Ramasamy, K., Leena, M., Jiménez, C., Campos, J., Ibarra, P., ... Ramalingam, M. (2016). Surface functionalization of nanobiomaterials for application in stem cell culture, tissue engineering, and regenerative medicine. *Biotechnology Progress*, 32(3), 554-567. 10.1002/btpr.2262
- Riahi, N., Murschel, F., Lerouge, S., Durocher, Y., Henry, O., & De Crescenzo, G. (2017). Bioavailability of immobilized epidermal growth factor: covalent versus noncovalent grafting. *Biointerphases*, 12(1), 010501. 10.1116/1.4978871
- Roland, P. E., Hilgetag, C. C., & Deco, G. (2014). Cortico-cortical communication dynamics. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8. 10.3389/fnsys.2014.00019

- Segeritz, C.-P., & Vallier, L. (2017). Chapter 9 - Cell culture: growing cells as model systems in vitro. Dans M. Jalali, F. Y. L. Saldanha, & M. Jalali (édit.), *Basic Science Methods for Clinical Researchers* (p. 151-172). Academic Press. 10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6
- Song, J., Wang, D., Wang, J., Shen, Q., Xie, C., Lu, W., ... Liu, M. (2020). Low molecular weight polyethyleneimine modified by 2-aminoimidazole achieving excellent gene transfection efficiency. *European Polymer Journal*, 140, 110017. 10.1016/j.eurpolymj.2020.110017
- Song, S., Luo, L., Sun, B., & Sun, D. (2020). Roles of glial ion transporters in brain diseases. *Glia*, 68(3), 472-494. 10.1002/glia.23699
- Stauß, A. C., Fuchs, C., Jansen, P., Repert, S., Alcock, K., Ludewig, S., & Rozhon, W. (2024). The ninhydrin reaction revisited: optimisation and application for quantification of free amino acids. *Molecules*, 29(14), 3262. 10.3390/molecules29143262
- Stil, A., Liberelle, B., Guadarrama Bello, D., Lacomme, L., Arpin, L., Parent, P., ... Bouchard, J.-F. (2023). A simple method for poly-D-lysine coating to enhance adhesion and maturation of primary cortical neuron cultures in vitro. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 17. 10.3389/fncel.2023.1212097
- Sun, Y., Huang, Z., Liu, W., Yang, K., Sun, K., Xing, S., ... Jiang, X. (2012). Surface coating as a key parameter in engineering neuronal network structures in vitro. *Biointerphases*, 7(1), 29. 10.1007/s13758-012-0029-7
- Taltec, G., Loh, C., Liberelle, B., Garcia-Ac, A., Duy, S. V., Sauvé, S., ... De Crescenzo, G. (2018). Adequate reducing conditions enable conjugation of oxidized peptides to polymers by one-pot thiol click chemistry. *Bioconjugate Chemistry*, 29(11), 3866-3876. 10.1021/acs.bioconjchem.8b00684
- Tang-Schomer, M. D., White, J. D., Tien, L. W., Schmitt, L. I., Valentin, T. M., Graziano, D. J., ... Kaplan, D. L. (2014). Bioengineered functional brain-like cortical tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(38), 13811-13816. 10.1073/pnas.1324214111
- Teimouri, R., Abnous, K., Taghdisi, S. M., Ramezani, M., & Alibolandi, M. (2023). Surface modifications of scaffolds for bone regeneration. *Journal of Materials Research and Technology*, 24, 7938-7973. 10.1016/j.jmrt.2023.05.076

- Tian, Y., Zhao, Y., Yin, C., Tan, S., Wang, X., Yang, C., ... Deng, X. (2022). Polyvinylamine with moderate binding affinity as a highly effective vehicle for RNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 345, 20-37. 10.1016/j.jconrel.2022.03.003
- Tsai, H.-C., Wang, J.-H., Chen, Y.-A., Tsai, L.-K., Young, T.-H., & Ethan Li, Y.-C. (2020). A self-assembled layer-by-layer surface modification to fabricate the neuron-rich model from neural stem/precursor cells. *Journal of the Formosan Medical Association*, 119(1, Part 3), 430-438. 10.1016/j.jfma.2019.08.004
- Ueno, Y., Chopp, M., Zhang, L., Buller, B., Liu, Z., Lehman, N. L., ... Zhang, Z. G. (2012). Axonal outgrowth and dendritic plasticity in the cortical peri-infarct area after experimental stroke. *Stroke*, 43(8), 2221-2228. 10.1161/STROKEAHA.111.646224
- Valiullina, F., Akhmetshina, D., Nasretudinov, A., Mukhtarov, M., Valeeva, G., Khazipov, R., & Rozov, A. (2016). Developmental changes in electrophysiological properties and a transition from electrical to chemical coupling between excitatory layer 4 neurons in the rat barrel cortex. *Frontiers in Neural Circuits*, 10. 10.3389/fncir.2016.00001
- Vancha, A. R., Govindaraju, S., Parsa, K. V., Jasti, M., González-García, M., & Ballesteros, R. P. (2004). Use of polyethyleneimine polymer in cell culture as attachment factor and lipofection enhancer. *BMC Biotechnology*, 4(1), 23. 10.1186/1472-6750-4-23
- Visser, R., Rico-Llanos, G. A., Pulkkinen, H., & Becerra, J. (2016). Peptides for bone tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 244, 122-135. 10.1016/j.jconrel.2016.10.024
- von Harpe, A., Petersen, H., Li, Y., & Kissel, T. (2000). Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 69(2), 309-322. 10.1016/S0168-3659(00)00317-5
- Wu, H., Feng, E., Yin, H., Zhang, Y., Chen, G., Zhu, B., ... Xiong, L. (2025). Biomaterials for neuroengineering: applications and challenges. *Regenerative Biomaterials*, 12, rbae137. 10.1093/rb/rbae137
- Xing, G.-W., Xiang, S., Xue, W., Aodeng, G.-W., Liu, Y., Zhang, J.-H., & Lin, J.-M. (2012). Capture of cervical exfoliative cells on a glass slide coated by 3-glycidyloxypopyl trimethoxysilane and poly-L-lysine. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2(3), 174-179. 10.1016/j.jpha.2012.02.008

- Yaari, Y., Hamon, B., & Lux, H. D. (1987). Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science*, 235(4789), 680-682. 10.1126/science.2433765
- Yang, M., You, D., Liu, G., Lu, Y., Yang, G., O'Brien, T., ... Shen, S. (2024). Polyethyleneimine facilitates the growth and electrophysiological characterization of iPSC-derived motor neurons. *Scientific Reports*, 14(1), 26106. 10.1038/s41598-024-77710-1
- Yaseri, R., Fadaie, M., Mirzaei, E., Samadian, H., & Ebrahimezhad, A. (2023). Surface modification of polycaprolactone nanofibers through hydrolysis and aminolysis: a comparative study on structural characteristics, mechanical properties, and cellular performance. *Scientific Reports*, 13, 9434. 10.1038/s41598-023-36563-w
- Yavin, E., & Yavin, Z. (1974). Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on polylysine-coated surface. *Journal of Cell Biology*, 62(2), 540-546. 10.1083/jcb.62.2.540
- Zhang, J., Yang, H., Wu, J., Zhang, D., Wang, Y., & Zhai, J. (2022). Recent progresses in novel in vitro models of primary neurons: A biomaterial perspective. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. 10.3389/fbioe.2022.953031
- Zhang, T.-D., Deng, X., Wang, Y.-F., Wang, X.-T., Zhang, X., Chen, L.-L., ... Yin, D.-C. (2020). Layer-by-layer coating of polyvinylamine and dopamine-modified hyaluronic acid inhibits the growth of bacteria and tumor cell lines on the surface of materials. *Applied Surface Science*, 530, 147197. 10.1016/j.apsusc.2020.147197
- Zhao, J., Guo, Y., Lan, A., Luo, W., Wang, X., Fu, L., ... Zhou, Y. (2018). The effect of amino plasma-enhanced chemical vapor deposition-treated titanium surface on Schwann cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106(1), 265-271. 10.1002/jbm.a.36167
- Zhong, X., Lu, Z., Valtchev, P., Wei, H., Zreiqat, H., & Dehghani, F. (2012). Surface modification of poly(propylene carbonate) by aminolysis and layer-by-layer assembly for enhanced cytocompatibility. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 93, 75-84. 10.1016/j.colsurfb.2011.12.016

ANNEXE A MOTIVATIONS POUR L'ABANDON DE L'UTILISATION DU POLYALLYLAMINE À LA SUITE DU TEST COLORIMÉTRIQUE AU BLEU DE COOMASSIE BRILLANT

A.1 Contextualisation

Le bleu de Coomassie brillant (CBB) est un colorant anionique permettant la détection de groupes amines primaires sur la surface de substrats fonctionnalisés avec un revêtement polymérique aminé (Coussot et al., 2011). Le marquage des amines se fait grâce à une interaction électrostatique entre les groupes sulfonés, chargés négativement, du colorant et les amines primaires, chargées positivement en milieu acide, du polymère aminé. Dans cette partie, le polymère étudié est le polyallylamine (PAAm). Il est greffé de manière covalente sur des lamelles de verre. Le test colorimétrique indiquera la présence du revêtement et révélera son homogénéité.

A.2 Matériel et méthodes expérimentales

A.2.1 Réactifs chimiques

La provenance des lamelles de verre, de la poly-D-lysine (PDL), du CBB, du Na_2CO_3 , du MeOH, de l'acide acétique et du HCl utilisés dans ce test est détaillée dans la section 4.1 de ce mémoire. Le polyallylamine (PAAm) 15kDa (#24826) a été acheté à Polysciences (Warrington, PA, USA).

A.2.2 Préparation des surfaces de PAAm

Le protocole pour la préparation de surfaces de PAAm est détaillé dans la section 4.3 de ce mémoire. En résumé, plusieurs solutions de PAAm et de PDL ont été préparées, dont les concentrations sont présentées dans le Tableau A.1. Les solutions mères et intermédiaires sont préparées dans de l'eau Milli-Q et les solutions finales sont préparées en diluant les solutions mères ou intermédiaires dans une solution tampon Na_2CO_3 (100 mM, pH 9.7).

Tableau A.1 Concentrations utilisées pour les solutions de PAAm et de PDL

Polymère	Concentration de la solution mère	Concentration de la solution intermédiaire	Concentration de la solution finale
PDL	40 µg/mL		5 µg/mL
PAAm	10 mg/mL	50-500 µg/mL	1-250 µg/mL

Une goutte de 200 µL de solution finale (PAAm et PDL) est déposée sur des lamelles de verre silanisées, pendant 100 min. Les lamelles sont ensuite rincées à deux reprises dans de l'eau Milli-Q afin de retirer l'excédent de polymère non greffé.

A.2.3 Test colorimétrique au CBB

Le protocole pour déterminer la présence de groupes amines sur les surfaces de verre recouvertes de polymère est détaillé dans la section 4.4 de ce mémoire. En résumé, une goutte de 200 µL de solution de CBB ((0.05 % m/v), dans une solution acide eau Milli-Q/MeOH/acide acétique (85:10:5 v/v)) est déposée sur chaque lamelle, pour une durée de 5 minutes. Les lamelles sont ensuite rincées à trois reprises dans la solution eau Milli-Q/MeOH/acide acétique afin de retirer le colorant non lié. Les lamelles sont ensuite immergées dans 250 µL de solution de désorption (1.325 %(m/v) Na₂CO₃ dans 50:50 v/v eau Milli-Q/MeOH ; pH 11.25). Le pH de la solution contenant le colorant désorbé est ajusté en ajoutant 2.5 % d'HCl 12 M. L'absorbance est ensuite mesurée à 630 nm et les valeurs obtenues sont normalisées par celles de la référence PDL 5. Les valeurs sont exprimées comme un pourcentage de la PDL 5, puis rapportées sous la forme d'une moyenne ± erreur type. Un contrôle négatif est réalisé sur des lamelles de verre brut.

A.3 Résultats

Les résultats obtenus après le test colorimétrique au CBB sont présentés sur la Figure A.1. Tout d'abord, les lamelles modifiées avec le PAAm et la PDL sont colorées en bleu, contrairement aux lamelles de verre brut (contrôle négatif) qui sont transparentes (Figure A.1 A). Cela confirme

la présence du revêtement polymérique sur les lamelles de PAAm et de PDL. Cependant, la coloration des lamelles fonctionnalisées avec le revêtement de PAAm est inhomogène. Par exemple, pour le PAAm greffé à 80 $\mu\text{g/mL}$ (2^{ème} ligne), le centre de la quatrième lamelle paraît moins coloré que les bords. Pour le PAAm greffé à 250 $\mu\text{g/mL}$ (3^{ème} ligne), des zones plus foncées apparaissent sur la 2^{ème} et la 4^{ème} lamelle. En revanche, sur la 3^{ème} lamelle, une petite zone de décoloration est présente sur le bas. La coloration des lamelles revêtues de PDL est quant à elle plus homogène.

Après le test colorimétrique, les valeurs d'absorbance ont été mesurées. La plage de concentration évaluée pour le PAAm durant le greffage s'étend de 1 à 250 $\mu\text{g/mL}$. L'absorbance augmente avec la concentration en polymère, traduisant une augmentation de la densité surfacique d'amines primaires. Ces résultats suivent la même tendance que ceux correspondants au polyvinylamine et au polyéthylèneimine branché, présentés dans la section 5.1.

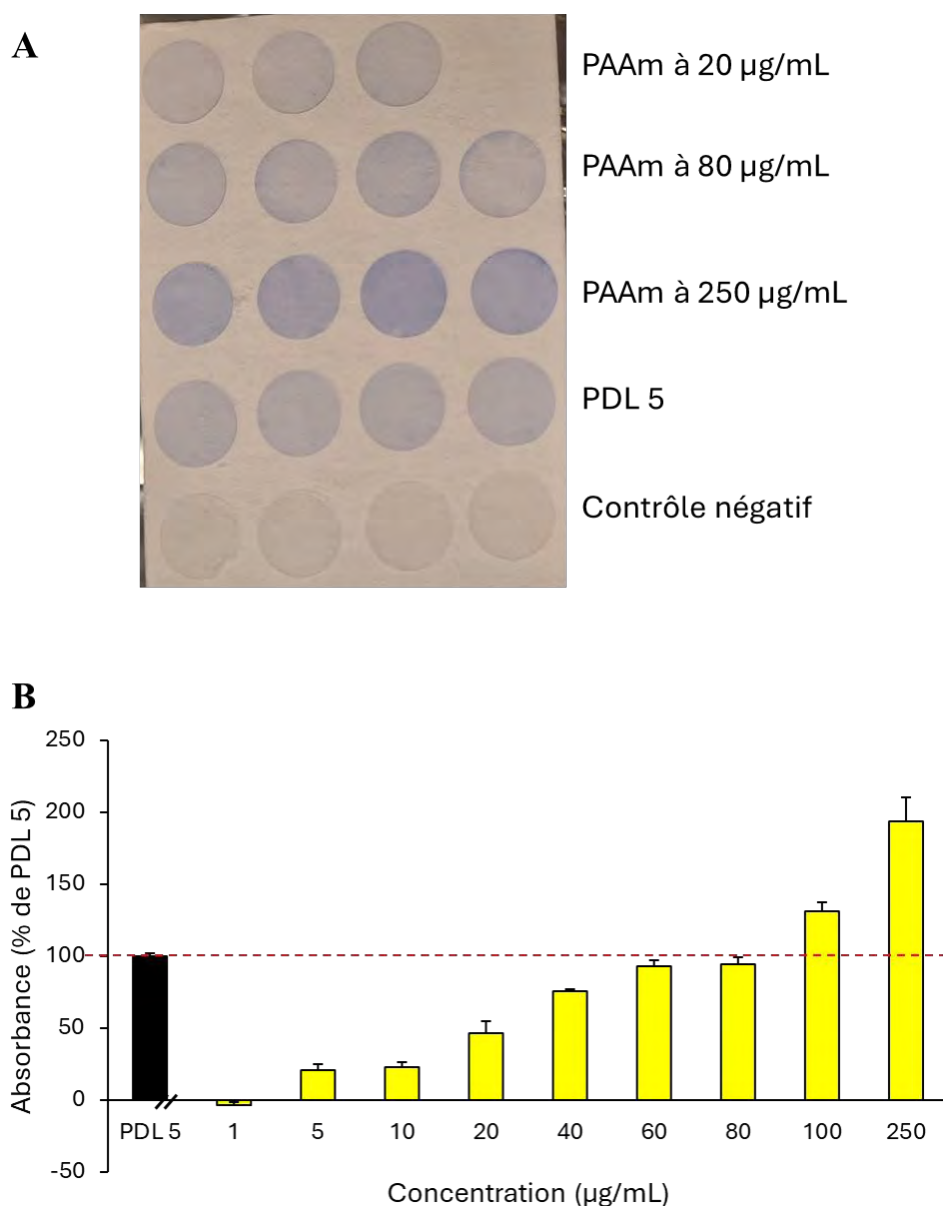


Figure A.1 Résultats du test colorimétrique au CBB, effectué sur des lamelles de verre fonctionnalisées avec du PAAm

(A) Coloration des lamelles avec le CBB. **(B)** Mesure d'absorbance après désorption des lamelles. Densité évaluée par le CBB pour la PDL 5 (noir) et le PAAm (jaune). Les résultats sont normalisés par les valeurs obtenues pour la PDL greffée à 5 µg/mL (PDL 5), prise pour référence. La ligne pointillée rouge indique les valeurs obtenues pour la PDL 5, soit 100%. Les barres d'erreur représentent les erreurs types. n = nombre d'échantillons, N = nombre d'essais. PAAm (par condition) : $n=8-36$, $N= 2-9$; PDL 5 : $n=43$, $N=11$.

A.4 Conclusion

La difficulté à obtenir une coloration homogène de CBB sur plusieurs concentrations de PAAm en fait un choix peu certain comme revêtement de culture cellulaire. Cela traduit potentiellement une répartition inhomogène du revêtement polymérique. De plus, le nombre de conditions à tester avec les cultures cellulaires était restreint. En effet, le nombre de cellules disponibles dépendait du nombre d'embryons dans la souris, ce qui était impossible à prévoir. Le PAAm a donc été écarté afin de se concentrer sur le PVAm, le PEIb1 et le PEIb2, dont la coloration des surfaces au CBB était homogène.

ANNEXE B MOTIVATIONS POUR L'ABANDON DU TEST COLORIMÉTRIQUE AU SEL DE SODIUM ORANGE II

B.1 Contextualisation

Le sel de sodium Orange II (ou « Orange II ») est un colorant anionique permettant la détection de groupes amines primaires sur la surface de substrats fonctionnalisés avec un revêtement polymérique aminé (Noel et al., 2011). Le marquage des amines se fait grâce à une interaction électrostatique entre le groupe sulfoné, chargé négativement, du colorant et les amines primaires, chargées positivement en milieu acide, du polymère aminé. Dans cette partie, le polymère sélectionné est la poly-D-lysine (PDL). Elle est greffée de manière covalente sur des lamelles de verre. Le test colorimétrique indiquera la présence du revêtement et révélera son homogénéité.

B.2 Matériel et méthodes expérimentales

B.2.1 Réactifs

La provenance des lamelles de verre, de la poly-D-lysine (PDL), du Na_2CO_3 et du HCl utilisés dans ce test est détaillée dans la section 4.1 de ce mémoire. L'hydroxyde de sodium (NaOH , #BDH9292) a été acheté à VWR et le sel de sodium Orange II (#195235) a été acheté à Sigma Aldrich.

B.2.2 Préparation des surfaces de PDL

Le protocole pour la préparation de surfaces de PDL est détaillé dans la section 4.3 de ce mémoire. En résumé, une première solution mère de PDL de concentration 40 $\mu\text{g/mL}$ est préparée dans de l'eau MQ. Deux autres solutions, de concentration 5 $\mu\text{g/mL}$ et 20 $\mu\text{g/mL}$, sont ensuite préparées en diluant la solution mère dans une solution tampon Na_2CO_3 (100 mM, pH 10.5).

Une goutte de 200 μL de solution finale (PDL 5 $\mu\text{g/mL}$ et 20 $\mu\text{g/mL}$, pH 10.5) est déposée sur des lamelles de verre silanisées, pendant 100 min. Les lamelles sont ensuite rincées à deux reprises dans de l'eau Milli-Q afin de retirer l'excédent de polymère non greffé.

B.2.3 Test colorimétrique à l'Orange II

Les lamelles sont immergées dans 400 μL de solution d'Orange II (14 mg/mL), dissous dans une solution acide (HCl 5 mM), pendant 30 minutes à 40°C. Elles sont ensuite rincées à trois reprises dans la solution acide (HCl 5 mM) afin de retirer le colorant non lié puis sèchent à l'air libre. Une fois sèches, les lamelles sont immergées dans 150 μL de solution basique (NaOH 5 mM). 100 μL sont prélevés et le pH de cette solution est ajusté en ajoutant 3 μL d'HCl 12 M. L'absorbance de cette dernière est mesurée à 484 nm. Un contrôle négatif est réalisé sur des lamelles de verre brut.

B.3 Résultats

Les résultats obtenus après le test colorimétrique à l'Orange II sont présentés sur la Figure B.1. Peu importe la concentration de la PDL, la coloration n'est pas visible à l'œil nu. Il est donc impossible de déterminer si le revêtement polymérique est présent, et encore moins s'il est homogène. Par ailleurs, les deux conditions de PDL testées ont été préparées dans un tampon à pH 10.5. Cela signifie que les groupes amines déprotonés sont plus nombreux que lorsque les solutions sont préparées dans un tampon à pH 9.7, comme celui utilisé dans ce projet de maîtrise. Ainsi, la coloration obtenue pour la PDL à 5 $\mu\text{g/mL}$, pH 10.5 est censée être plus grande que pour la PDL à 5 $\mu\text{g/mL}$, pH 9.7 (Noel et al., 2011). La PDL à 5 $\mu\text{g/mL}$, pH 9.7, étant la condition référence du projet, le colorant Orange II semble donc peu adapté pour la comparer à d'autres polymères.

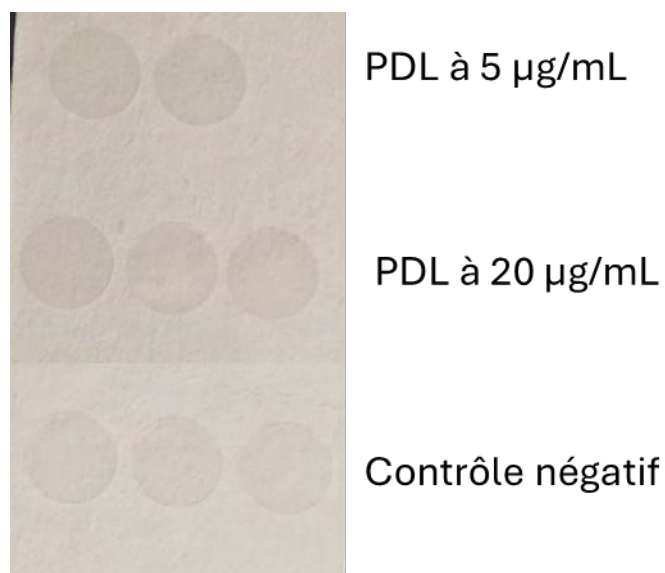


Figure B.1 Résultats du test colorimétrique à l'Orange II, effectué sur des lamelles de verre fonctionnalisées avec de la PDL

B.4 Conclusion

La difficulté à observer une coloration d'Orange II sur deux concentrations de PDL, préparées dans des solutions de pH 10.5, fait de ce colorant un choix non idéal pour l'évaluation de l'homogénéité des revêtements polymériques. Il n'est pas possible de déterminer, à l'œil nu, si le greffage de la PDL est réussi. Ce test colorimétrique est donc écarté.