

Projet de Recherche Doctoral Concours IPV 2021

Intitulé du Projet de Recherche Doctoral :

Elasticité de cellules neuronales par spectroscopie pompe sonde

Directeur de Thèse porteur du projet (titulaire d'une HDR) :

NOM : **Belliard**

Prénom : **Laurent**

Titre : **Professeur**

e-mail : **laurent.belliard@sorbonne-universite.fr**

Adresse professionnelle :

Campus Jussieu

4 place jussieu tour 22-32

Etage 3 pièce 311

Unité de Recherche :

Intitulé : **INSP**

Code : **UMR7588**

Equipe de Recherche (au sein de l'unité) : INSP

Intitulé : **Acoustique pour les NanoSciences**

Thématique de recherche : **Acoustique**

Responsable d'équipe :

NOM : **Belliard**

Prénom : **Laurent**

Ecole Doctorale de rattachement de l'équipe & d'inscription du doctorant : ED391 SMAER

Doctorants actuellement encadrés par le directeur de thèse

(préciser le nombre de doctorants, leur année de 1ere inscription et la quotité d'encadrement) :

Ronan Delalande 2018-2021 encadrement 100%

CO-DIRECTION (obligatoire)

Co-Directeur de Thèse (titulaire d'une HDR) :

NOM : **Hamraoui**

Prénom : **Ahmed**

Titre : **Maitre de Conférences**

HDR



e-mail : **ahmed.hamraoui@sorbonne-universite.fr**

Unité de Recherche :

Intitulé : **LCMCP**

Code: **UMR 7574**

Equipe de Recherche (au sein de l'unité) : LCMCP

Intitulé : **Matériaux et Biologie**

Thématique de recherche : Étude et interactions cellules-matériaux pour les matériaux pour le vivant.

Responsable d'équipe :

NOM : **Mosser**

Prénom : **Gervaise**

Ecole Doctorale de rattachement : ED397

Physique Chimie des Matériaux

Ou si ED non SU :

Doctorants actuellement encadrés par le co-directeur de thèse (préciser le nombre de doctorants, leur année de 1ere inscription et la quotité d'encadrement) :

Résumé (2 000 caractères maximum) :

Les corrélations existantes entre le guidage axonale et les propriétés élastiques des cellules neuronales sont encore mal appréhendées, ceci peut s'expliquer en grande partie par un manque cruel de mesures quantitatives d'élasticité sur ce type de cellule en condition in-vitro. L'objectif du projet de recherche doctoral vise à combler ce vide en mettant en œuvre des méthodes d'imagerie acoustique très haute résolution qui ont déjà permises de mettre en évidence des inhomogénéités mécaniques au sein de cellules neuronales (MN1 et PC12). La démarche qui sera déployée consistera d'une part à évaluer les modules élastiques des différentes parties des cellules (noyau, cytosquelette, lamellipode, neurites.) au cours des étapes de différenciation, et d'autre part d'évaluer le rôle des stimuli extérieurs sur la réponse élastique susceptible de piloter la régénération axonale. Les stimulations bioélectriques envisagées reposent sur l'application de champ électrique statique ou variable à l'aide l'électrode lithographiée quant à la stimulation acoustique elle sera obtenue par la génération d'onde de surface haute fréquence à partir de couches piézoélectriques. La prise en compte des désaccords d'impédance acoustique entre les cellules et leur substrat de croissance sera également une préoccupation dans la mesure où les méthodes acoustiques résolues en temps sont pertinentes dans des substrats biocompatibles tels que le collagène ou les cellules ostéoblastes.



Elasticité de cellules neuronales par spectroscopie pompe sonde

Suite à un traumatisme ou une pathologie, les neurones utilisent des facteurs environnementaux (biologiques, chimiques, physiques) pour guider les cônes de croissance vers des cibles appropriées, où ils reforment des connexions synaptiques. L'identification de nouvelles stratégies permettant de guider cette croissance est donc fondamentale pour restaurer les fonctions du système nerveux et ce dans un contexte de vieillissement de la population mondiale. Après une lésion nerveuse, en particulier chez les personnes âgées, la régénération est souvent incomplète, douloureuse et limitée par le faible taux de repousse nerveuse, même dans le cas des nerfs périphériques.

Malgré les efforts de recherche intensifs des équipes internationales pour clarifier comment on peut stimuler, accélérer, guider et enfin parvenir à une récupération complète après un traumatisme grave au nerf périphérique ou à la moelle épinière, cet objectif reste encore largement hors de portée. À ce jour, la régénération axonale guidée sur des distances au-delà de 2 cm reste un véritable défi.

Parmi les approches possibles, la stimulation bioélectrique du processus de régénération suscite un vif intérêt. En effet, l'implication des courants électriques endogènes dans la cicatrisation et la régénération des tissus a été démontrée (1), d'autre part il a été démontré que l'application de champs électriques peut stimuler et diriger la croissance des axones. Cependant, la réponse des neurones à un champ électrique exogène est encore à peine étudiée et souvent mal comprise (2).

Un autre paramètre physique majeur influant le comportement des neurones est l'élasticité du substrat et de la cellule. En effet, la réponse élastique de la cellule mais également de son substrat joue un rôle crucial dans les mécanismes de différenciation. **Ainsi, nous nous proposons de développer des dispositifs expérimentaux permettant la génération de champs électriques et de champs de déformations élastiques locaux couplés à des études mécaniques quantitatives sur des cellules neuronales en condition *in vitro*.**

De ce fait, nous envisageons d'utiliser une méthode imagerie optique mettant en œuvre des ondes acoustiques de volume de très haute fréquence. L'équipe "Acoustique pour les nanosciences" de l'INSP fût pionnière en France dans ce domaine. Depuis une dizaine d'année, l'acoustique picoseconde, inventée initialement pour aborder des problématiques en physique du solide (3) a connu un essor dans le domaine de la caractérisation élastique d'objets biologiques (4). La génération d'ondes acoustiques longitudinales, par effet thermoélastique, dans des couches de matériaux biocompatibles tel que le titane à l'aide de laser femtoseconde permet de sonder bon nombre de propriétés pertinentes dans le cas d'une cellule biologique unique.

Le coefficient de réflexion d'une onde, présentant des longueurs d'onde bien inférieures aux tailles caractéristiques des cellules, à l'interface cellule-transducteur est directement lié à la rupture d'impédance, par conséquent une cartographie de l'élasticité de la cellule devient accessible. D'autre part, il a été démontré (5), que le contenu fréquentiel des échos réfléchis permettait de remonter quantitativement à un coefficient lié à l'adhésion de la dite cellule, adhésion susceptible de varier durant les mécanismes de migration.

La réponse vibrationnelle des parties fines (épaisseur <50nm) des cellules (6) permet également de remonter à leur comportement élastique ouvrant ainsi la voie à l'étude des neurites et cône de croissance lors des mécanismes de proliférations de ces derniers. Les inhomogénéités internes des cellules, généralement optiquement transparentes, peuvent être sondées en étudiant la propagation des ondes acoustiques au sein de l'épaisseur des systèmes. Dans une telle géométrie, la réponse Brillouin stimulée exhibe une fréquence reliée au produit indice optique par vitesse du son. La viscosité dynamique peut être simultanément mesurée par le temps de vie de cette oscillation (7).

L'aspect tout optique de cette méthode d'imagerie acoustique est cruciale par rapport aux autres approches conventionnelles mettant en œuvre des approches de champ proche type AFM (8), pour au moins deux raisons : i) l'interaction pointe cellule est difficile à quantifier et peut masquer des phénomènes subtiles, ii) une approche sans contact est favorable dans le cas de cellules vivantes nécessitant la mise en œuvre d'un environnement physiologique souvent complexe (9).

Dores et déjà nous avons validé cette méthodologie sur des cellules PC12 modèle de neurones (6) et MN1 modèle de motoneurones (7) en obtenant des cartographies de module élastique et de viscosité dynamique à l'échelle du micromètre. Grâce à notre méthode d'imagerie acoustique nous pouvons quantifier les inhomogénéités élastiques existantes entre le noyau, le cytosquelette, la membrane et le lamellipode dans ces cellules fixées. Il faut maintenant transposer ces approches sur des cellules vivantes.

Le système moteur est une structure complexe reliant les systèmes centraux et périphériques. L'activité de ce système est responsable du mouvement des muscles squelettiques, une fonction indispensable à la vie. L'unité centrale qui reçoit les instructions du cerveau sont les motoneurones, dont les corps cellulaires sont situés dans la moelle épinière et les cibles qu'ils innervent se trouvent dans les muscles. En raison de ce rôle de transmetteur d'informations entre la moelle épinière et les fibres musculaires, les motoneurones sont soumis à une stimulation physique et à des modifications des propriétés mécaniques. Les motoneurones sont capables de détecter la stimulation mécanique, de générer et de tolérer des forces mécaniques dans leur environnement, et également de répondre aux signaux physiques par la (ré)organisation du cytosquelette. Tout changement dans l'architecture du cytosquelette peut entraîner des changements dans les propriétés mécaniques des cellules, telles que l'élasticité, l'adhésivité et la viscosité, et des défauts d'adaptation aux stimuli mécaniques peuvent résulter de mutations génétiques et d'agents pathogènes dans les composants du cytosquelette.

Le système moteur, et en particulier l'unité motrice composée du motoneurone et du muscle innervé, est la cible d'une tension élevée générée par des contractions musculaires répétées. **C'est pourquoi les propriétés mécaniques des motoneurones sont d'un grand intérêt pour comprendre le développement et la mise en place des jonctions neuromusculaires (croissance régénérescence axonale) et le comportement des motoneurones.**

La mise au point d'une enceinte, maintenant en vie nos cellules, et permettant d'appliquer des champs électriques tout en étant adaptée à la génération et détection des ondes acoustiques par ces méthodes pompe sonde est en cours de validation. L'approche qui est actuellement envisagée consiste à utiliser les électrodes, comme source de champ électrique mais également comme transducteurs acoustiques. Une optimisation des amplitudes de génération est envisageable par un choix judicieux du matériau (Al, Ti, W...). Nous envisageons dans un premier temps de placer les électrodes sur la face opposée en utilisant des substrats fins afin de ne pas induire de courants ioniques au sein du milieu de culture. Une autre alternative serait de lithographier les électrodes et ensuite de les encapsuler par une couche de SiO₂ réalisée par pulvérisation cathodique. Cette dernière géométrie aurait comme intérêt supplémentaire de réduire la distance entre la source de champ et les cellules et donc d'augmenter le module du champ ou de réduire la consommation électrique point crucial pour une future intégration en vu d'application. Une dernière alternative consiste à intercaler sous les cellules une couche isolante de silicium amorphe qui est connue pour être un bon transducteur acoustique (10). Dans cette géométrie, il sera possible d'étudier les modifications d'élasticité dans des zones où le champ électrique sera dans le plan de cellules et non pas perpendiculaire comme c'est le cas sous les électrodes.

La maîtrise de ce volet de nano et microfabrication reposera sur les fonctionnalités de la salle blanche de l'INSP.

Nous aborderons ce travail doctoral sous deux axes complémentaires :

Dans un premier temps, nous nous intéresserons à l'évolution de l'élasticité interne de la cellule, de son adhésion avec le substrat et de sa viscosité en fonction des différentes phases de différenciation avec ou sans sollicitation externe. Les différents paramètres du champ électrique seront scannés (module, direction, fréquence). Au delà de l'effet d'un champ électrique nous envisageons également de piloter la croissance axonale par l'intermédiaire de stimuli mécaniques en soumettant les cellules à la propagation d'onde de surfaces induites par des revêtements piézoélectriques de type ZnO. Outre les mécanismes de mécanotransduction qui sont ainsi visés, l'effet des champs électriques se propageant conjointement avec cette déformation de surface sera également étudié. Le contrôle des vecteurs d'onde acoustique de ces ondes de surfaces est ici assuré par la géométrie des peignes interdigités leur donnant naissance.

Dans une seconde phase, nous nous pencherons sur le rôle joué par le couple cellule-substrat sur l'élasticité et le guidage des axones. En particulier, la fonctionnalisation de surface à partir de monocouches d'alkylsiloxanes est connue pour influencer la différenciation des cellules en modifiant

localement et à l'échelle nanométrique les énergies d'adhésion (11). Nous tenterons de quantifier ce paramètre par des mesures directes d'élasticité. D'autre part la réponse des cellules envisagées est fortement dépendante de l'élasticité du substrat sur lequel elles prolifèrent. Les substrats mimant au plus près les conditions *in-vivo* sont par exemple le collagène, la Laminine pour les motoneurones. La caractérisation élastique de ces derniers revêt donc un aspect crucial. Des mesures préliminaires sur des couches fines de collagène de type I sont encourageantes et tendent à esquisser des pistes quant à la possibilité de contrôler finement leur élasticité.

Partenariat: Ce projet s'inscrit dans une collaboration entre l'INSP et le LCMCP, elle regroupe les activités d'Ahmed Hamraoui dans le groupe "Matériaux et Biologie" au LCMCP (SU) qui portent sur l'étude de la croissance axonale en relation avec les propriétés physico-chimiques de l'environnement neuronale, et les activités de Laurent Belliard sur l'élasticité aux petites échelles au sein de l'équipe "Acoustique pour les nanosciences" à l'INSP (SU). Deux publications récentes (6-7) attestent de la synergie entre ces deux équipes. Le LCMCP aura en charge l'élaboration de nouveaux substrats d'adhésion et la (bio)fonctionnalisations des interfaces ainsi que la mise au point des aspects culture de cellules. Les compétences en termes de culture cellulaires nous permettront de concevoir un enivrement *in-vitro* compatible avec les exigences des méthodes pompe sonde mise en œuvre. Les caractérisations élastiques seront réalisées sur les dispositifs pompe sonde de l'INSP. Les paramètres pertinents sur le champ électrique (géométrie direction fréquence module) sur la croissance axonale sont actuellement à l'étude au LCMCP. Ainsi le futur doctorant pourra bénéficier de ce travail exploratoire ainsi que des résultats préliminaires pour débiter efficacement son travail sur l'élasticité.

Profil: Le projet étant pluridisciplinaire un profil mixte biologie-physique sera privilégié. D'autre part un candidat avec un gout prononcé pour l'expérimentation serait un atout.

Cette formation doctorale intégrant des notions de cultures cellulaires, fonctionnalisation de surface à des outils pointus de caractérisation élastiques, le tout soutenu par des technologies de type salle blanche devrait fournir des atouts valorisables par le futur impétrant pour un projet professionnel aussi bien académique qu'industriel.

Références:

- 1) Borgens RB, (1982). Int Rev Cytol 76, 245
- 2) McCaig CD, et al. (2002), Trends Neurosci 25, 354 ; (2005), Physiol Rev 85, 943 ; (2009), J. Cell Sci. 122, 4267.
- 3) C. Thomsen, H. T. Grahn, H. J. Maris, and J. Tauc. Surface generation and detection of phonons by picosecond light pulses. Phys. Rev. B, 34:4129–4138, Sep 1986.
- 4) C. Rossignol, N. Chigarev, M. Ducouso, B. Audoin, G. Forget, F. Guillemot, and M. C. Durrieu. In vitro picosecond ultrasonics in a single cell. Applied Physics Letters, 93(12):123901, 2008.
- 5) T. Dehoux, M. Abi Ghanem, O. F. Zouani, J.-M. Rampnoux, Y. Guillet, S. Dilhaire, M.-C. Durrieu, and B. Audoin. All-optical broadband ultrasonography of single cells. Scientific reports, 5, 2015.
- 6) **A. Hamraoui**, O. Sénépart, M. Schneider, S. Malaquin, E. Péronne, L. Becerra, F. Semprez, C. Legay, **L. Belliard**. Biophys. J. (2021), <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.12.021>
- 7) A. Viel, E. Péronne, O. Sénépart, L. Becerra, C. Legay, F. Semprez, L. Trichet, T. Coradin, **A. Hamraoui**, and **L. Belliard**. Picosecond ultrasounds as elasticity probes in neuron-like cells models. Applied Physics Letters, 115(21):213701, 2019.
- 8) Deok-Ho Kim, Pak Kin Wong, Jungyul Park, Andre Levchenko, and Yu Sun. Microengineered platforms for cell mechanobiology. Annual Review of Biomedical Engineering, 11:203–233, 2009.
- 9) Fernando Pérez-Cota, Richard J. Smith, Emilia Moradi, Leonel Marques, Kevin F. Webb, and Matt Clark. High resolution 3d imaging of living cells with sub-optical wavelength phonons. Scientific Reports, 6, 2016.
- 10) L. Belliard, A. Huynh, B. Perrin, A. Michel, G. Abadias, C. Jaouen, Elastic properties and phonon generation in Mo/Si superlattices Phys. Rev. B 80, 155424, (2009)
- 11) G. Lamour, S. Souès, and **A. Hamraoui**, Interplay between long- and short-range interactions drives neuritogenesis on stiff surfaces, J. Biomed. Mater. Res., Part A **99**(4), 598–606 (2011).