



THESE



Présentée à l'Université de Lille

Ecole Doctorale Sciences de l'Ingénierie et des Systèmes

Pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Spécialité : **Electronique, Microélectronique, Nanoélectronique et micro-ondes**

Par

Dimitri HENNIQUAU

Conception d'une interface fonctionnelle permettant la communication de neurones artificiels et biologiques pour des applications dans le domaine des neurosciences

Soutenance prévue le 14 Décembre 2021 devant la Commission d'Examen :

Rapporteurs :

Mme Cécile DELACOUR

Chargée de Recherche (Institut Néel)

Mme Sylvie RENAUD

Professeure (Laboratoire IMS)

Président du jury :

Mr Jean-Pierre VILCOT

Directeur de Recherche (IEMN)

Examineurs :

Mr Serge BERNARD

Directeur de Recherche (LIRMM)

Mr Marc PANANCEAU

Maître de Conférence (NeuroPSI)

Directrices de thèse :

Mme Virginie HOEL

Professeure (IEMN)

Mme Christel VANBESIEN-MAILLIOT

Maître de Conférences (IEMN)

Co-encadrant :

Mr Alexis VLANDAS

Chargé de Recherche (IEMN)

Remerciements

La thèse n'est jamais le travail d'une personne mais un travail collégial qui ne peut aboutir sans l'investissement de multiples contributeurs. C'est grâce aux conseils, au soutien quotidien et au travail commun que je suis parvenu à rédiger cette thèse passionnante. Ce fut une expérience intense et inoubliable, tant personnellement que professionnellement.

Je tiens à remercier et exprimer ma gratitude à mes co-directrices de thèse, le Pr. Virginie Hoel et le Dr. Christel Vanbesien-Mailliot, ainsi qu'à mon co-encadrant de thèse, le Dr. Alexis Vlandas.

Je remercie vivement le Pr. Virginie Hoel, Professeure des Universités à l'Université de Lille / Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologies (IEMN) – CNRS UMR 8520, de m'avoir accompagné et orienté dans mon parcours de thèse et de m'avoir permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions. Je lui suis infiniment reconnaissant pour ses conseils, sa patience, sa disponibilité et son extrême expertise qui m'ont permis de mener à bien cette thèse.

Je remercie chaleureusement le Dr. Christel Vanbesien-Mailliot, Maître de Conférences à l'Université de Lille / IEMN – CNRS UMR 8520, de m'avoir guidé dans une démarche et un travail scientifique qui m'a permis d'explorer sereinement la culture cellulaire. J'ai bénéficié de sa grande rigueur, de sa disponibilité et de son soutien indéfectible. J'ai aussi beaucoup apprécié les nombreuses discussions, scientifiques ou non, que nous avons pu avoir.

Je remercie également le Dr. Alexis Vlandas, Chargé de Recherche à l'IEMN – CNRS UMR 8520, pour son écoute et son aide essentielle qui m'ont permis de créer des liens entre les différents concepts du sujet de thèse et avancer dans la bonne direction.

Je remercie le DR. Jean-Pierre Vilcot, Directeur de Recherche à l'Université de Lille / IEMN – CNRS UMR 8520, pour avoir accepté de présider cette commission d'examen.

J'adresse mes remerciements les plus sincères au Dr. Cécile Delacour, Chargée de Recherche à l'Institut NÉEL - CNRS UPR 2940, et au Pr. Sylvie Renaud, Professeure au Laboratoire IMS de Bordeaux – CNRS UMR 5218, qui me font l'honneur d'être rapporteurs de ce travail.

Je remercie également le Pr. Serge Bernard, Directeur de Recherche au Laboratoire d'informatique, de robotique et de microélectronique de Montpellier - UMR 5506, le Dr. Marc Pananceau, Maître de Conférences des Universités à l'Institut des Neurosciences Paris-Saclay – CNRS UMR 9197, et le Pr. Jean-Pierre Vilcot,

Directeur de Recherche à l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologies – CNRS UMR 8520, d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je remercie l'Université de Lille, le CNRS Innovation par l'intermédiaire du projet Interconnect, et la Fondation I-SITE ULNE par l'intermédiaire du projet DySiKnow d'avoir financé ma thèse.

Je remercie Dr. Thierry Mélin, Directeur de l'IEMN, Dr. Christophe Delerue, Directeur Scientifique de l'IEMN, et Dr. Christophe Lethien, Directeur de la technologie de l'IEMN, de m'avoir accueilli durant les quatre années de ma thèse au sein de l'Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologies qui offre un environnement scientifiquement épanouissant et favorable à la réalisation de travaux de recherche.

Je remercie également Dr. Christophe Loyez, Directeur de Recherches au CNRS et responsable du groupe Circuits Systèmes Applications des Micro-ondes (CSAM), de m'avoir accepté au sein de ce groupe de recherche.

Le sujet particulièrement transdisciplinaire sur lequel j'ai eu la chance et le plaisir de travailler durant ces quatre dernières années m'a permis de croiser les expertises et compétences de nombreuses personnes. Ces multiples rencontres ont été d'une grande richesse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à l'ensemble des personnes qui m'ont accompagné et aidé au long de ce parcours. Grâce à l'implication de chacune et chacun d'entre vous, ce projet auquel j'ai contribué continue d'avancer et progresser jour après jour.

Je remercie infiniment le Pr. Alain Cappy, initiateur de la thématique bio-inspirée et qui continue de guider l'ensemble de l'équipe par ses conseils avisés et son expertise mondialement reconnue.

Je remercie le Dr. Mohamed Bellaredj et Mr. Nathan Schoonjans. Mohamed, merci pour tes importantes contributions à l'évolution des neurobiohybrides. Nathan, merci de poursuivre ce travail en établissant une communication bidirectionnelle entre un neurone vivant et un neurone artificiel.

Je tiens également à remercier Mr. Rédha Kassi et Mr. David Delcroix. Rédha, un grand merci pour ton aide et ton partage d'expérience qui m'ont permis de stimuler les neurones vivants, et pour ton engagement qui permet d'envisager la poursuite du projet sous les meilleurs auspices. David, merci d'avoir conçu l'amplificateur qui nous permettra, j'en suis convaincu, de développer le banc RxTx.

Mes remerciements vont également au Dr. Aude Sivery, et à toute l'équipe du L2. Aude, je te remercie pour ton aide et tes précieux conseils de culture cellulaire. Dr. Anthony Treizebre, je te remercie pour les nombreux wafers que tu nous as prêtés et

qui nous ont permis de démarrer plus rapidement. Dr. Jérôme Follet, je te remercie pour la formation initiale que tu m'as dispensée et pour m'avoir accordé l'accès au L2.

Je remercie aussi Vanessa Avramovic, Sylvie Lepilliet et toute l'équipe du pôle Caractérisation Hyperfréquence Optique et Photonique (CHOP). Sylvie, merci d'avoir accompagné mes débuts en 'carac' et de m'avoir appris à poser les pointes. Vanessa, merci pour ton accueil, ta gentillesse, et pour m'avoir aidé au long des nombreuses caractérisations, parfois jusqu'à des heures indues. Ce fût un plaisir de travailler avec vous tous.

Je remercie Pascal Tilmant, le Dr. François Vaurette et toute l'équipe de la centrale de micro et nano-fabrication. Pascal et François, je vous remercie de m'avoir ouvert les portes de la salle blanche et formé sur l'ensemble des équipements. C'est en suivant vos conseils que j'ai pu fabriquer les neurobiohybrides.

Je remercie le Dr. Pascal Mariot, le Dr. Valério Farfariello et le Pr. Natalia Prevarskaya, de l'unité INSERM 1003. Pascal, merci de m'avoir accompagné lors de la mise en place et de l'analyse des résultats de patch clamp. Valério, merci pour ton accompagnement et le partage de ton expertise de la technique d'imagerie calcique. Je vous remercie sincèrement pour votre disponibilité, votre expertise et votre professionnalisme. Travailler avec vous fût particulièrement plaisant et enrichissant. Mes remerciements s'adressent également à Natalia Prevarskaya pour nous avoir accueillis au sein de son unité et nous avoir offert un accès aux équipements de patch-clamp et d'imagerie calcique.

Je remercie le Dr José Wojnacki de l'unité INSERM U1266 pour ses précieux conseils de culture et différenciation des cellules PC-12.

Je remercie l'ensemble du personnel administratif de l'IEMN. Mme. Nora Benbahlouli et Mr Andy Ledent, merci de m'avoir accompagné dans mes démarches administratives tout au long de ma thèse. Mme Laëtitia Debas, merci pour ton aide dans la gestion des commandes.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble de mes collègues, doctorants, post-doctorants, ingénieurs de recherches. Votre accueil chaleureux, les discussions, petites ou grandes, avec chacune et chacun d'entre vous et vos encouragements m'ont apporté l'énergie nécessaire à la réalisation de ce travail de thèse. Merci à tous pour votre accueil et votre bonne humeur.

Un grand merci à tous mes amis qui, par leurs encouragements et tous les moments passés ensemble, m'ont donné la force de réaliser ce projet.

Un grand merci spécialement à toi, Cassandre, pour ton soutien, ta patience sans fin et tes encouragements. Grâce à toi, j'ai pu mener ce travail jusqu'au bout.

Enfin, je remercie mes parents, Laurence et Thierry, mon frère, Timothée, et toute ma famille qui ont toujours cru en moi. Merci pour leur soutien sans lequel je ne serai pas arrivé où j'en suis.

Résumé

L'ingénierie neuromorphique est un nouveau champ disciplinaire en plein essor qui fait appel à des compétences en électronique, mathématiques, informatique et en ingénierie biomorphique dans le but de produire des réseaux de neurones artificiels capables de traiter les informations à la manière du cerveau humain. Ainsi, les systèmes neuromorphiques offrent non seulement des solutions plus performantes et efficaces que les technologies actuelles de traitement de l'information mais permettent également d'envisager le développement de stratégies thérapeutiques inédites dans le cadre de dysfonctionnements cérébraux pathologiques. Le groupe Circuits Systèmes Applications des Micro-ondes (CSAM) de l'Institut d'Électronique, de Microélectronique et de Nanotechnologies (IEMN) dans lequel ces travaux de thèse ont été effectués a contribué à l'émergence de ces systèmes neuromorphiques en développant une boîte à outils complète de neurones et synapses artificiels. Pour intégrer l'ingénierie neuromorphique dans la prise en charge de dysfonctionnements neuronaux pathologiques, il convient d'interfacer les neurones artificiels et les neurones vivants afin d'assurer une communication réelle entre ces différents composants. Dans ce contexte, et en utilisant les outils innovants développés par le groupe CSAM, l'objectif de ce travail de thèse a été de concevoir et réaliser une interface fonctionnelle permettant d'établir une boucle de communication bidirectionnelle entre des neurones artificiels et des neurones vivants. Les neurones artificiels développés par le groupe CSAM sont réalisés en technologie CMOS et capables d'émettre des signaux électriques biomimétiques. Les neurones vivants sont issus de cellules PC12 différenciées. Une première étape de ce travail a consisté à modéliser et à simuler cette interface entre neurones artificiels et vivants ; une deuxième partie de la thèse a été dédiée à la fabrication et à la caractérisation d'interfaces neurobiohybrides, ainsi qu'à la croissance et à la caractérisation de neurones vivants, avant d'étudier leur capacité à communiquer avec des neurones artificiels. Ainsi, un modèle de membrane neuronale représentant un neurone vivant interfacé avec une électrode métallique planaire a été développé. L'exploitation de ce modèle a permis de montrer qu'il est possible de stimuler des neurones vivants en utilisant les signaux biomimétiques issus du modèle de neurones artificiels tout en conservant des tensions d'excitation faibles. L'utilisation de faibles tensions d'excitation permettrait d'améliorer l'efficacité énergétique des systèmes neurobiohybrides intégrant des neurones artificiels et d'amoindrir le risque d'endommager les tissus vivants. Ensuite, le neurobiohybride permettant d'interfacer les neurones vivants et les neurones artificiels a été conçu et réalisé. Une caractérisation expérimentale de cette interface a permis de valider l'approche consistant à exciter un neurone vivant au travers d'une électrode métallique planaire. Enfin, des cellules neuronales vivantes issues de cellules PC-12 ont été cultivées et différenciées dans les neurobiohybrides. Une preuve expérimentale de la capacité des signaux électriques biomimétiques produits par les neurones artificiels a ainsi pu être apportée par la technique d'imagerie calcique. En conclusion, les travaux présentés dans ce manuscrit établissent clairement la preuve de concept de l'excitation de neurones vivants par un signal biomimétique dans nos conditions expérimentales et étayent ainsi la première partie de la boucle de communication bidirectionnelle entre neurones artificiels et neurones vivants.

Abstract

Neuromorphic engineering is an exciting emerging new field, which combines skills in electronics, mathematics, computer sciences and biomorphic engineering with the aim of developing artificial neuronal networks capable of reproducing the brain's data processing. Thus, neuromorphic systems not only offer more effective and energy efficient solutions than current data processing technologies, but also set the bases for developing novel original therapeutic strategies in the context of pathological brain dysfunctions. The research group *Circuits Systèmes Applications des Micro-ondes* (CSAM) of the Institute for Electronics, Microelectronics and Nanotechnologies (IEMN) in Lille, in which this thesis work was carried out, has contributed to the generation of such neuromorphic systems by developing a toolbox constituted of artificial neurons and synapses. In order to implement neuromorphic engineering in the therapeutic arsenal for treating neurologic disorders, we need to interface living and artificial neurons to ensure real communication between these different components. In this context and using the original tools developed by the CSAM group, the main goal of this thesis work was to design and produce a functional interface allowing a bidirectional communication loop to be established between living and artificial neurons. These artificial neurons have been developed by the CSAM group using CMOS technology and are able to emit biomimetic electrical signals. Living neurons were obtained from differentiated PC-12 cells. A first step in this work consisted in modeling and simulating this interface between artificial and living neurons; a second part of the thesis was dedicated to the fabrication and characterization of neurobiohybrid interfaces, and to the growth and characterization of living neurons before studying their capacities to communicate with artificial neurons. First, a model of neuronal membrane representing a living neuron interfaced with a metallic planar electrode has been developed. We thus showed that it is possible to excite neurons using biomimetic signals produced by artificial neurons while maintaining a low excitation voltage. Low voltage excitation would improve energy efficiency of neurobiohybrid systems integrating artificial neurons and reduce the impact of harmful electrical signals on living neurons. Then, the neurobiohybrid interfacing living and artificial neurons has been designed and produced. The results obtained by experimental characterization of this interface validate the approach consisting in exciting living neurons through a metallic planar electrode. Finally, living neurons from PC-12 cells were grown and differentiated directly onto neurobiohybrids. Then, an experimental proof of the ability of biomimetic electrical signals to excite living neurons was obtained using calcium imaging. To conclude, the work presented in this manuscript clearly establishes a proof of concept for the excitation of living neurons using a biomimetic signal in our experimental conditions and thus substantiates the first part of the bidirectional communication loop between artificial neurons and living neurons.

TABLE DES MATIERES

Chapitre 0	Préambule.....	17
Chapitre 1	Contexte scientifique et enjeux de la thèse	19
1.1	Présentation du sujet pluridisciplinaire	20
1.2	Les défis du traitement de l'information	21
1.2.1	Génération de données, Big Data, data center et consommation énergétique	22
1.2.2	Architecture Von Neumann, consommation et échauffement des CMOS : fin de la loi de Moore	25
1.3	Une autre approche du traitement de l'information	26
1.4	Le neurone biologique et sa brève description	30
1.5	Développement de systèmes neuromorphiques pour le traitement de l'information ultra efficace en énergie	33
1.5.1	Analogie entre la membrane neuronale et une pile électrique	33
1.5.2	Le perceptron	34
1.5.3	Le neurone artificiel	35
1.6	Interface bidirectionnelle entre des neurones vivants et artificiels : Etat de l'art des solutions existantes.....	38
Chapitre 2	Modélisation et Simulations.....	43
2.1	Introduction	44
2.2	Modèle paramétrique de membrane	45
2.2.1	Présentation du modèle de neurone biomimétique	45
2.2.2	Les éléments de départ pour construire le modèle de membrane	46
2.2.3	Evolution du modèle de neurone vers un modèle de membrane neuronale.....	46
2.3	Interface entre l'électrode et l'électrolyte	51
2.3.1	Présentation de l'interface entre l'électrode et la membrane neuronale.....	51
2.3.2	Définition des 3 éléments constituant l'interface.....	52
2.3.3	Capacités et résistances de l'interface, normalisées au μm^2 : CI-EE, RI-EE et CI-MbE.....	58
2.3.4	Dimensionnement du modèle pour la simulation	60
2.3.5	Conclusion de la création de la modélisation	62
2.4	Définition d'un spike et indicateurs permettant de qualifier la réponse du modèle.....	62
2.4.1	Définition d'un spike	63
2.4.2	Indicateurs permettant de qualifier un spike.....	64

2.5	Stimulations : signaux utilisés.....	68
2.5.1	Revue des signaux utilisés <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> pour l'excitation de neurones.....	68
2.5.2	Conception et présentation des signaux d'excitation....	69
2.6	Etude de l'excitabilité du modèle et de la possibilité d'intégration des signaux d'excitation	70
2.6.1	Simulations – Premières validations.....	70
2.6.2	Différents signaux d'excitation - Premières analyses pour une excitation en spike	75
2.6.3	Les spécificités du modèle – Réponses du modèle aux excitations.....	78
2.6.4	Conclusion	86
2.7	Conclusion.....	86
2.8	Perspectives	88
2.8.1	Vecteurs d'amélioration du modèle	88
Chapitre 3	Interface fonctionnelle	91
3.1	Introduction	92
3.2	Enjeux des dispositifs à fabriquer	93
3.3	Les solutions pour la détection des potentiels d'action des neurones vivants en réponse aux stimulations	94
3.3.1	Les techniques de détection usuelles d'un potentiel d'action	94
3.3.2	Etat de l'art des MEA	96
3.4	Conception des neurobiohybrides	99
3.4.1	Protocole de culture et procédé de fabrication du système complet	100
3.4.2	Design des électrodes spécifiques IMACA et RxTx ..	102
3.5	Enchaînement et détail des étapes de fabrication des neurobiohybrides	106
3.5.1	Etapes technologiques de la fabrication des électrodes	107
3.5.2	Fabrication des puits de culture cellulaire	112
3.5.3	Assemblage des neurobiohybrides.....	112
3.6	Caractérisation des dispositifs	114
3.6.1	Mesure de la résistance des électrodes du dispositif IMACA.....	115
3.6.2	Caractérisation de l'interface entre les électrodes et l'électrolyte.....	116
3.7	Caractérisation de l'interface.....	118
3.7.1	Double-couche et élément à phase constante.....	118
3.7.2	Définition de l'élément à phase constante	119

3.7.3	Dispositifs de caractérisation « LiInDi »	120
3.7.4	Caractérisation du système	123
3.8	Conclusion et perspectives	128
3.8.1	Conclusion	128
3.8.2	Perspectives et vecteurs d'amélioration.....	129
Chapitre 4	Expérimentations biologiques.....	131
4.1	Introduction	132
4.2	Culture des cellules PC-12	132
4.2.1	Choix des PC-12 et description de la lignée	133
4.2.2	Maintien de la culture mère et différenciation des PC-12	134
4.2.3	<i>Coating</i> et ensemencement des neurobiohybrides.....	135
4.3	Caractérisation des cellules PC-12 au cours de la différenciation.....	137
4.3.1	Caractérisation morphologique des cellules PC-12 en microscopie optique.....	137
4.3.2	Caractérisation fonctionnelle des cellules PC-12 différenciées.....	138
4.4	Preuve de concept et démonstration d'une réponse des cellules PC-12 différenciées excitées par un signal biomimétique : analyse des résultats obtenus en imagerie calcique	153
4.4.1	Imagerie calcique - Matériel et méthodes.....	155
4.4.2	Analyse des enregistrements d'imagerie calcique	157
4.5	Conclusion et perspectives	164
4.5.1	Preuve de concept de la capacité des neurones vivants à être excités par des signaux électriques biomimétiques	164
4.5.2	Vecteurs d'amélioration et perspectives	164
4.6	Annexe 1 : Caractérisation morphologique des cellules PC-12 différenciées par immunocytochimie	167
4.7	Annexe 2 : Tableau récapitulatif des paramètres et conditions de patch-clamp	169
Chapitre 5	Conclusion	173
5.1	Conclusion générale	174
5.2	Communications.....	180
5.2.1	Diffusion de la connaissance dans les milieux socio-économique et scientifique	180
5.2.2	Rapports de contrat	180
5.2.3	Communications nationales avec actes.....	180
5.3	Déclaration d'invention.....	180
5.4	Articles dans une revue internationale avec comité de lecture ...	181

5.4.1 En cours de rédaction.....	181
5.5 Références	182

Chapitre 0

PREAMBULE

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés à l'Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologies (IEMN), au sein de l'équipe « Circuits Systèmes Applications des Microondes » (CSAM). Il a été rendu possible par l'accompagnement et l'encadrement de Virginie Hoel (Pr.), Christel Vanbesien-Mailliot (MCF-HDR) et Alexis Vlandas (CR).

Cette thèse porte sur le développement d'une interface fonctionnelle visant à établir une communication bidirectionnelle entre des neurones vivants et des neurones artificiels. Le développement d'une telle interface s'inscrit à l'intersection de trois champs disciplinaires : les neurosciences, l'électronique et les bio-MEMS (Micro Electro Mechanical Systems). Issu de l'électronique par ma formation initiale, je me suis formé aux neurosciences et aux bio-MEMS au long de mon parcours de thèse.

J'ai fait le choix de développer ce manuscrit en quatre chapitres traitant chacun d'une thématique spécifique. Cette organisation vise à faire ressortir l'interdisciplinarité des recherches présentées et faciliter le travail du lecteur. En ce sens, chaque chapitre débute par une contextualisation et une présentation des bases générales de la thématique abordée. Cela permet au lecteur moins spécialiste d'appréhender le développement du chapitre menant à des conclusions plus pointues dans le domaine. Le manuscrit fera ressortir ma contribution dans les différents axes de la thèse et les résultats que j'ai obtenus en suivant le découpage suivant :

- Chapitre 1 : Contexte scientifique et enjeux de la thèse
- Chapitre 2 : Modélisation et simulations
- Chapitre 3 : Conception, réalisation et caractérisation de l'interface fonctionnelle
- Chapitre 4 : Preuve de concept de la stimulation de neurones vivants par des signaux électriques biomimétiques

Chapitre 1

CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET ENJEUX DE LA THESE

1.1 Présentation du sujet pluridisciplinaire

Le traitement neuroinspiré de l'information, ou « ingénierie neuromorphique », est un champ en pleine émergence qui vise au développement de systèmes artificiels s'inspirant des propriétés physiques des réseaux de neurones vivants.

En s'appuyant sur les connaissances issues du traitement de l'information, de la nanoélectronique et des neurosciences, il est possible de concevoir des systèmes électroniques dits « intelligents » qui s'avèrent essentiels dans le domaine de l'intelligence artificielle. Bâties à partir de neurones et de synapses artificiels conçus pour être ultra efficaces en énergie, ces futurs systèmes permettront de développer des solutions COP21-compatibles. Dans le même temps, le domaine des « neuro-biosystèmes », visant à améliorer ou à remplacer des fonctions neuronales défaillantes à l'aide de dispositifs matériels tels que les biocapteurs, les puces multiélectrodes ou même des prothèses neuronales, est en plein essor. La convergence de ces disciplines et la particularité des neurones artificiels qui ont la même signature électrique que des neurones vivants, ouvrent de vastes perspectives pour le développement de solutions matérielles « biomimétiques » à visée thérapeutique.

Est-il alors possible de créer une boucle de communication (excitation et écoute) entre des neurones humains et des neurones artificiels pour développer des nouvelles solutions thérapeutiques pour la prise en charge des maladies neurodégénératives ?

L'objectif de cette thèse est d'étudier la communication entre des cellules neuronales vivantes et des neurones artificiels (Figure 1-1). Le travail conduit dans le cadre de cette thèse a consisté en un développement d'une interface fonctionnelle permettant la culture et la stimulation de cellules neuronales vivantes puis en l'étude de la réponse de ces cellules neuronales vivantes à des stimulations par des signaux électriques biomimétiques. Cette étude permet de démontrer puis d'optimiser la communication entre les neurones vivants et les dispositifs artificiels.

Pour cela, nous pouvons commencer par identifier les enjeux dans les trois disciplines de ce projet interdisciplinaire : micro-électronique, neurosciences et biomems. Il s'agit de présenter dans ce premier chapitre les éléments suivants : les défis du traitement de l'information, le cerveau humain, le neurone biologique et sa brève description, les neurones et synapses artificiels permettant le développement de systèmes neuromorphiques et enfin l'intérêt de pouvoir remplacer un neurone vivant par un neurone artificiel.

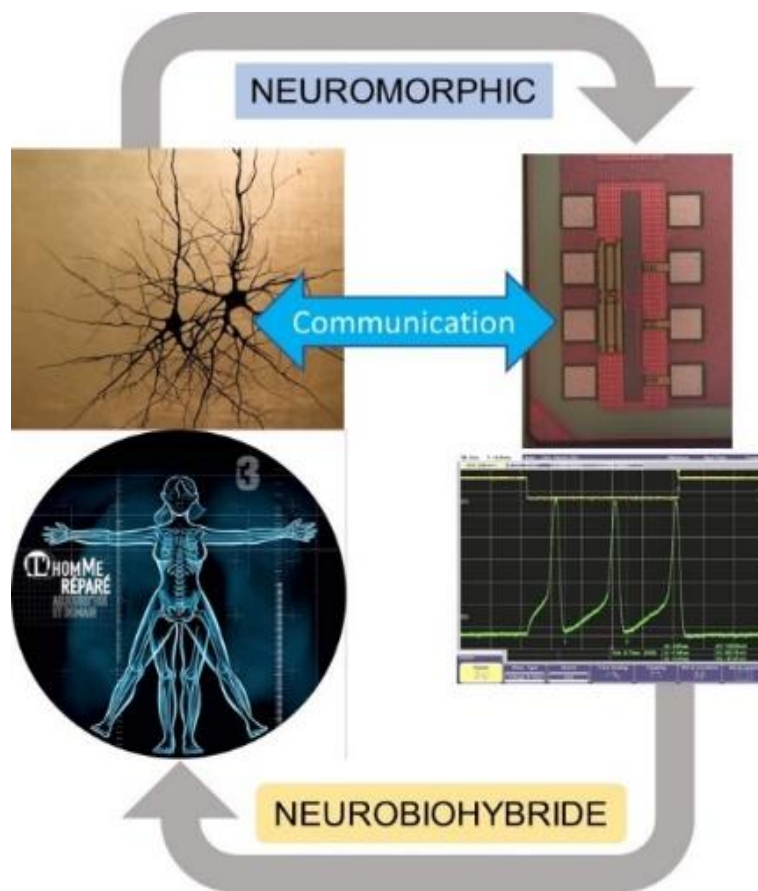


Figure 1-1 : Domaines neuromorphique & neurobiohybrides – Communication bidirectionnelle

Neuromorphique : S'inspirer de l'organisation et du fonctionnement des structures biologiques pour les reproduire et concevoir des systèmes artificiels fonctionnant selon les mêmes principes.
 Neurobiohybride : Intégrer les systèmes neuromorphiques dans leurs organes d'origine pour en restaurer des fonctions défailtantes ou augmenter leurs fonctions.

1.2 Les défis du traitement de l'information

L'explosion de la génération d'informations a entraîné ces dernières années une augmentation de la consommation électrique mondiale nécessaire à son stockage et son traitement. De plus, l'industrie de la micro-électronique doit faire face à de nombreux défis, comme celui posé par l'architecture de nos ordinateurs et la fin de la miniaturisation des dispositifs. En effet, nos ordinateurs sont très performants pour résoudre de grandes équations, mais leur vitesse de calcul sature en raison d'un

échauffement important des microprocesseurs. De plus, la solution consistant à toujours diminuer la dimension des composants a pratiquement atteint ses limites avec la fin annoncée de la loi de Moore, officialisée par M. Mitchell Waldrop dans un article du 11 février 2016 intitulé « More Than Moore » et publié dans la revue Nature. Dans ce contexte, il est apparu nécessaire pour la communauté de la micro-électronique de développer de nouvelles technologies de traitement de l'information plus efficaces en énergie que les solutions existantes.

1.2.1 Génération de données, Big Data, data center et consommation énergétique

D'immenses quantités d'informations sont produites en permanence. Elles sont issues des réseaux sociaux, des paiements en ligne, du streaming de contenu audio et vidéo, mais ce sont aussi des données de santé, des données climatiques, etc. Cela représente $2,5 \cdot 10^{18}$ octets créés chaque jour, l'ensemble de ces données formant le *Big Data* (Maetschke, 2014, Le Big Data, 2015). La génération de ces données augmente de manière exponentielle, atteignant environ $334 \cdot 10^{21}$ octets en 2025 et $19267 \cdot 10^{21}$ octets en 2035 (prédiction issues de « South-South Cooperation in a Digital World - 2018 Annual Report in South-South Cooperation, 2019 ») (Figure 1-2).

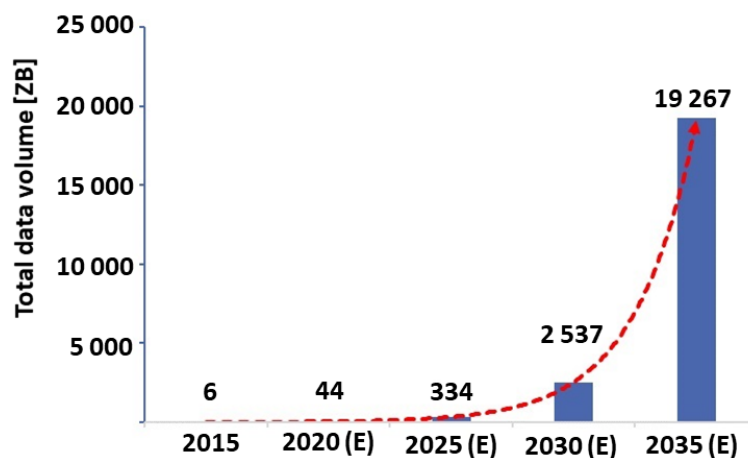


Figure 1-2 : Evolution exponentielle de la production d'information. (Adapté de *South-South Cooperation in a Digital World - 2018 Annual Report in South-South Cooperation*, 2019)

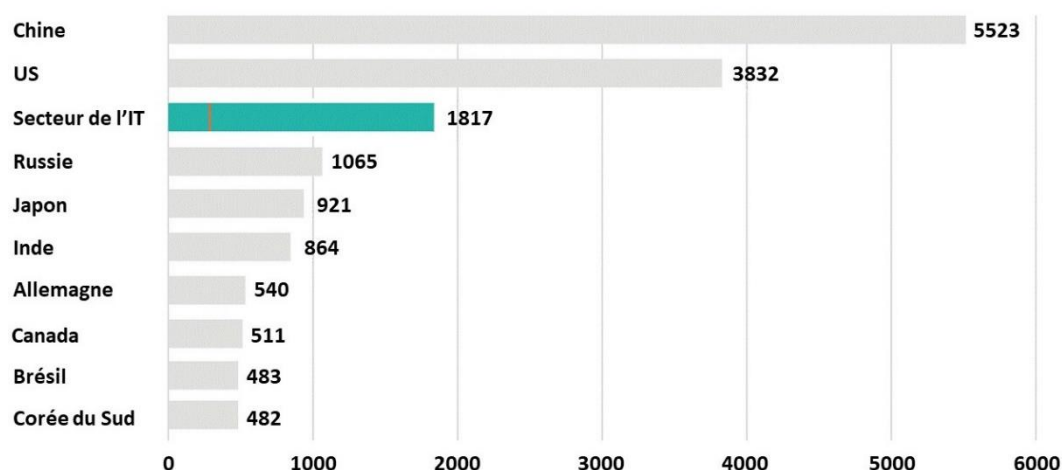
L'augmentation de la production de données au niveau mondiale suit une courbe exponentielle. Nous comprenons aisément qu'il est nécessaire d'anticiper cette évolution afin d'y adapter les infrastructures, qui doivent d'une part être plus performantes pour traiter les informations, et d'autre part plus efficaces en énergie pour traiter la même quantité d'informations.

Le secteur des nouvelles technologies regroupe les *data center*, les réseaux de communication, les outils informatiques utilisateurs ainsi que la production de l'ensemble des équipements indispensables au fonctionnement de ce secteur pour lequel la consommation électrique atteignait 1817 TWh en 2012 (Cook *et al.*, 2017),

soit 6 à 10% de la consommation mondiale d'électricité (Cailloce, 2018). Ramené à l'échelle d'un pays, elle représente le troisième consommateur mondial d'électricité, derrière la Chine et les Etats-Unis (Figure 1-2). Plus spécifiquement, la consommation électrique des *data center* a explosé entre 2005 et 2010, passant de 153 TWh à 194 TWh, avant de se stabiliser pour atteindre 205 TWh en 2018 (Figure 1-3), ce qui représente 1% de la consommation mondiale d'électricité (Masanet *et al.*, 2020).

Ces données soulignent la nécessité de trouver de nouvelles solutions pour le traitement de l'information présentant une meilleure efficacité énergétique.

Consommation d'électricité (2012); Pays comparés au secteur de l'IT, en milliard de kWh



Occurrences de demandes de calcul dans les data-center

Secteur final d'utilisation

- Serveurs
- Stockage
- Réseaux
- Infrastructure

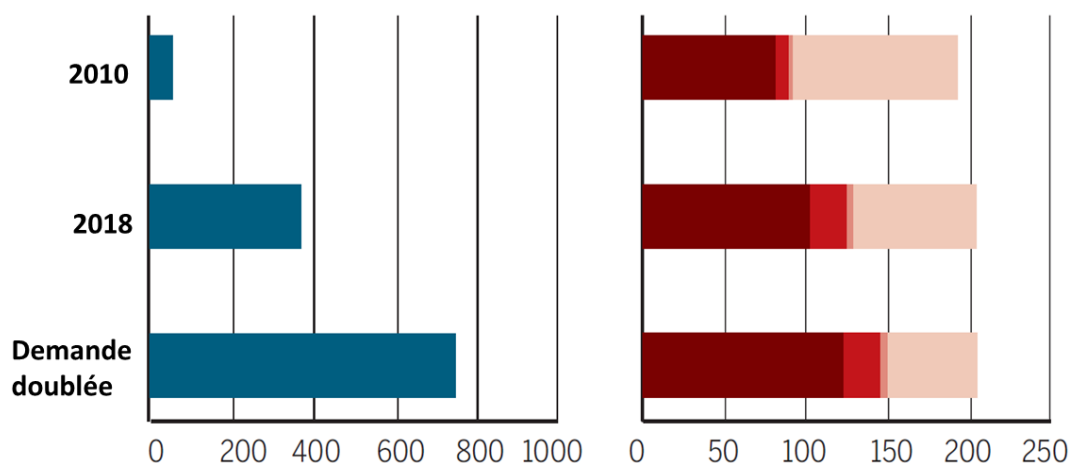


Figure 1-3 : A : Consommation électrique comparée du secteur des nouvelles technologies et des Etats, en milliards de kWh. (Adapté de Cook *et al.*, 2017). B : Utilisation des data center et consommation d'énergie entre 2010 et 2018 par rapport au nombre d'occurrence de demandes de calcul dans les data-center et projection pour une doublement de la demande (Adapté de Masanet *et al.*, 2020)

A : En 2012, la consommation électrique du secteur des nouvelles technologies (*data center*, les réseaux de communication, les outils informatiques utilisateurs, production de l'ensemble des équipements indispensables au fonctionnement de ce secteur) était de 1817 milliards de kWh et pouvait être comparée à celle d'un état, atteignant alors la troisième place, derrière la Chine et les Etats-Unis. **B :** L'utilisation des *data center* est mesurée par le nombre d'occurrences de demandes de calcul. Cette demande a très fortement augmenté entre 2010 et 2018, sans entraîner d'augmentation aussi importante de la consommation d'électricité. Les projections montrent qu'il est possible de doubler la demande sans entraîner d'explosion de la consommation d'électricité. Cependant, compte tenu de l'augmentation exponentielle de production d'information (Figure 1-2), cette situation ne pourra être maintenue sans une évolution des systèmes de traitement de l'information vers des technologies plus efficaces.

1.2.2 Architecture Von Neumann, consommation et échauffement des CMOS : fin de la loi de Moore

L'élément primordial de l'architecture des ordinateurs proposée par Von Neumann (1945) est la séparation de l'ordinateur en un ensemble d'éléments distincts (Nowicki, 2011), notamment les unités de stockage et de traitement de l'information. Ces unités sont interconnectées par un système de bus (Figure 1-4).

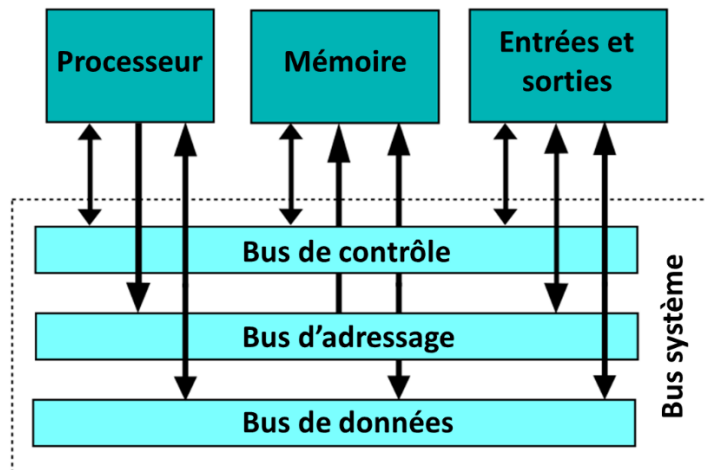


Figure 1-4 : Architecture générale « Von Neumann » d'un ordinateur. (Adapté de Nowicki, 2011)

L'ordinateur est séparé en un ensemble d'éléments distincts : le processeur, qui effectue les opérations, la mémoire, qui stocke les données, et les entrées et sorties permettant d'établir une interface entre l'ordinateur et l'utilisateur. Ces éléments sont reliés par un système de bus, par lesquels transitent les informations.

La vitesse de transfert est limitée par les processus d'adressage et d'encapsulation, par la distance entre les unités (Waldrop, 2016) et par la faible largeur des bus comparée à la mémoire, processus ne pouvant pas être améliorés. Le traitement des informations par le processeur est effectué plus rapidement qu'elles ne sont échangées. Ce système de bus est donc un véritable goulet d'étranglement, appelé « *Von Neumann Bottleneck* ».

L'amélioration des performances des systèmes reposait alors sur la poursuite de la loi de Moore, c'est-à-dire la réduction d'échelle des transistors et l'augmentation de leur fréquence d'horloge. La fin de cette loi a été annoncée en 2016 par M. Waldrop (2016). En effet, la taille minimale des transistors est estimée à 2 – 3 nm, limite en-deçà de laquelle l'apparition de phénomènes quantiques les rend inopérants (Waldrop, 2016). L'augmentation de la fréquence d'horloge entraîne un échauffement des circuits. A tel point qu'à partir de 2004, ces dernières ont été limitées pour garder une dissipation de puissance à 100W/cm² (Merolla *et al.*, 2014), (Figure 1-5 et Figure 1-8).

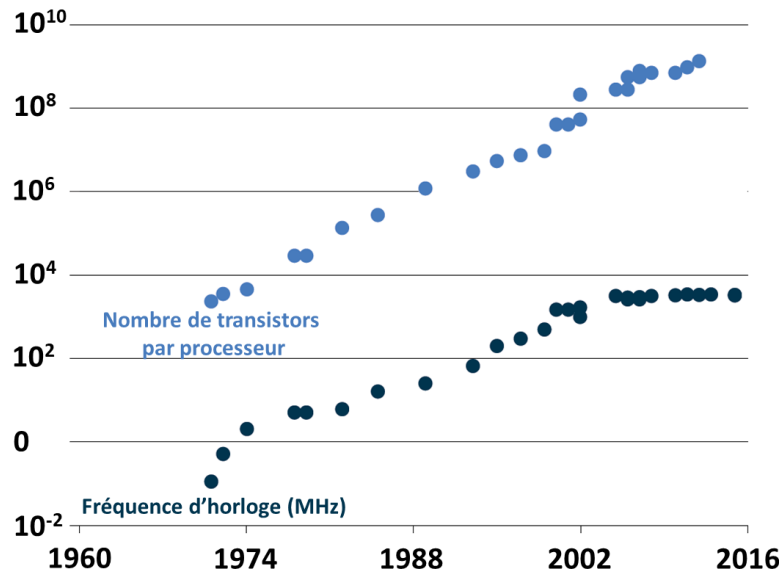


Figure 1-5: Limitation de la fréquence de travail des transistors à partir des années 2000 – Adapté de Waldrop, (2016)

« Au cours des cinq dernières décades, le nombre de transistors par microprocesseur, une mesure grossière de la puissance de calcul, est doublé environ tous les deux ans, suivant la loi de Moore. La dissipation thermique excessive a nécessité de limiter la vitesse d’horloge des processeurs à partir de 2004. »

Deux autres problèmes s’ajoutent à cette surchauffe. Selon Carver Mead, (1990), 10000 transistors sont commutés au niveau du microprocesseur pour réaliser une seule opération. De plus, au sein de ce circuit, la capacitance des fils est supérieure à la capacitance des grilles des transistors. La plus grande partie de l’énergie est par conséquent utilisée à charger les fils plutôt que la grille des transistors. Ce problème de surchauffe a été nommé « *Heath Death* » (Waldrop, 2016).

Pour répondre à ces contraintes et respecter les contraintes écologiques de plus en plus saillantes dans notre société, il est urgent de proposer un nouveau paradigme pour le traitement de l’information. Pour cela, il est intéressant d’investiguer les systèmes inspirés du cerveau humain, dont nous savons qu’il est très efficace pour traiter de l’information.

1.3 Une autre approche du traitement de l’information

Dans ce contexte, il faut investiguer d’autres champs pour le traitement des données et éviter les *blackouts* énergétiques. La question fondamentale qui se pose à nous est celle de la solution la plus adaptée – à la fois efficace et efficiente - pour un traitement de l’information efficace en énergie ? Pour cela, il existe un système très performant qui mérite toute notre attention : le cerveau humain. C’est un organe fascinant et puissant qui possède des performances remarquables dans des domaines aussi variés que la complexité des informations traitées, la tolérance aux fautes, l’apprentissage, la consommation énergétique et la régénération du signal. Ce dernier, représentant 2% du poids corporel humain et consommant 20 % de l’énergie globale,

se révèle être le système de traitement de l'information le plus complexe connu à ce jour avec un niveau de densité d'intégration extrêmement important. Tandis qu'un microprocesseur est constitué de quelques milliards de transistors, le cerveau humain compte environ 84.10^9 neurones (Azevedo *et al.*, 2009). Possédant en moyenne 2000 synapses chacun, ils forment un réseau d'une densité de 300 millions de connexions synaptiques par cm^3 . Cette architecture massivement parallèle et intégrée permet au cerveau humain d'être très puissant dans le traitement de l'information, tout en étant très efficace en énergie. En plus de traiter les informations, les neurones les transmettent et le stockage de l'information se fait entre les neurones (Figure 1-6). Ce stockage se situe au niveau des synapses activées simultanément au sein d'un réseau lors de l'échange d'informations (Versace & Chandler, 2010). Ces éléments seront détaillés plus loin dans ce chapitre.

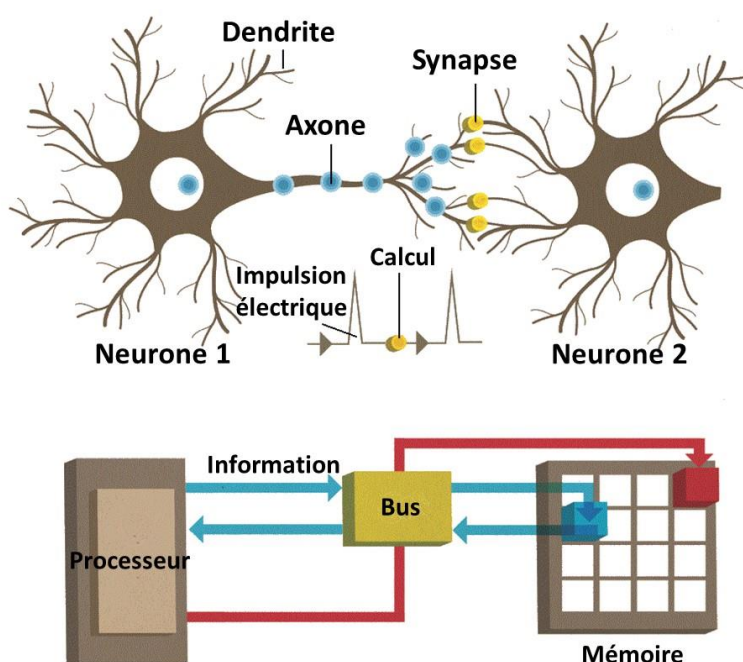


Figure 1-6 : Traitement de l'information d'un neurone et d'un ordinateur (Versace & Chandler, 2010)

Dans le cerveau humain, le traitement et le stockage de l'information ont lieu en même temps et au même endroit : dans la synapse lors du transfert de l'information d'un neurone vers un autre neurone. Plus une synapse connectant deux neurones est activée, plus la connexion se renforce, créant une mémoire du transfert d'information et rendant préférentiel l'usage de cette connexion. Au contraire, moins une synapse est activée, plus la connexion s'affaiblit. La fente synaptique est d'une épaisseur de 2 à 10 nm. Dans un ordinateur d'architecture Von Neumann, la mémoire est stockée en dehors du processeur. Brièvement, pour traiter de l'information, une instruction est envoyée par le processeur vers un bus, qui va chercher l'information stockée dans un emplacement mémoire, information qui est envoyée par le bus vers le processeur, qui traite l'information. Le résultat est renvoyé vers le bus, qui stocke l'information dans un emplacement mémoire. Chaque information parcourt ainsi 2 à 10cm entre le processeur et la mémoire physique. De plus, le nombre de connexions disponibles dans le bus est limité, créant un goulet d'étranglement.

De plus, système est dynamique, le rendant capable d'apprentissage et robuste. Ainsi, il est possible d'établir une comparaison le cerveau humain et un ordinateur construit autour d'une architecture Von Neumann :

- le traitement de l'information : massivement parallèle et distribué pour le cerveau, alors qu'il est d'abord séquentiel dans les microprocesseurs ;
- la mémoire : distribuée pour le cerveau, il n'est pas possible de localiser précisément un seul type de souvenir ou schéma sensori-moteur, alors que dans un microprocesseur, chaque élément mémoire possède une seule adresse permettant de retrouver l'information emmagasinée ;
- le nombre total de neurones est d'environ $8,4 \cdot 10^{10}$ pour 2000 à 20000 synapses par neurones, soit un nombre total de synapses de 10^{14} à 10^{16} , tandis que le nombre de transistors par microprocesseurs est de l'ordre du milliard (10^9) ;
- la fréquence de travail est de l'ordre de quelque Hz à la centaine de Hz pour le cerveau alors qu'elle est de 10^9 Hz pour les microprocesseurs.
- le cerveau est un système dynamique qui apprend du fait de la plasticité synaptique (cette capacité d'apprentissage s'appuie sur la propriété des connexions synaptiques qui peuvent se renforcer ou s'affaiblir en fonction de l'usage qui en est fait). Une des règles d'apprentissage faisant l'objet de modélisation est la loi de Hebb ;
- la tolérance aux fautes : perdre un seul transistor peut détruire un microprocesseur tandis que le cerveau perd constamment des neurones (perte essentielle au fonctionnement physiologique du cerveau) ;
- Pour le cerveau, le codage de l'information se fait par le biais d'impulsions (codage temporel et fréquentiel) tandis qu'il est de type binaire pour les microprocesseurs.

Pour l'aspect énergétique, Cavin *et al* (2008) compare la puissance consommée par un ordinateur Dell 8250 (processeur Pentium® 4) et par le cerveau humain : 200W contre 30W. De même, la quantité d'énergie nécessaire au traitement d'un bit d'information est de $5 \cdot 10^6$ k_B.T/bit pour le processeur contre 700 k_B.T/bit pour le cerveau, comme l'illustre la Figure 1-7. Ainsi, en se référant à ces travaux, pour le même travail, le cerveau humain est 700 fois plus efficace que le processeur Pentium® 4. Ces éléments viennent s'ajouter à ceux vus précédemment et confirment l'intérêt de cette approche. La loi de Moore n'est plus viable technologiquement (Figure 1-8).



Figure 1-7 : Consommation énergétique d'un ordinateur et du cerveau humain. Adapté de Cavin *et al.*, (2008)

La quantité d'énergie nécessaire au traitement d'un bit d'information est de 5.10^6 k_B.T/bit pour le processeur contre 700 k_B.T/bit pour le cerveau. Le cerveau est donc 700 fois plus efficace en énergie, tout en étant beaucoup plus compact et léger.

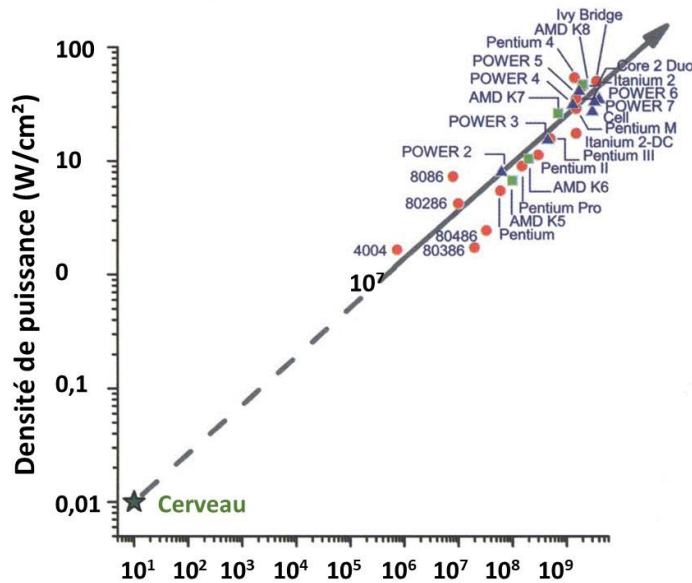


Figure 1-8 : Puissance dissipée en fonction de la fréquence d'horloge (Adapté de Merolla *et al.*, 2014)

Le cerveau humain fonctionne à une faible fréquence et présente une faible densité de puissance. La poursuite de la loi de Moore, consistant à intégrer toujours plus de transistors sur une même surface, éloigne les processeurs du fonctionnement du cerveau. En outre, nous avons vu que le cerveau est 700 fois plus efficace en énergie qu'un processeur. Nous comprenons alors aisément la nécessité de concevoir de nouveaux systèmes de traitement de l'information, plus efficaces et reproduisant la biologie : les systèmes neuroinspirés.

Ainsi, nous comprenons aisément que nous n'avons pas intérêt à continuer dans la direction de la miniaturisation, que nous savons très consommatrice en énergie. Il convient dès lors de s'orienter vers des systèmes reproduisant la biologie : les systèmes neuromorphiques ou encore neuroinspirés.

1.4 Le neurone biologique et sa brève description¹

Un neurone est une cellule excitable constituée d'un corps cellulaire, aussi appelé soma, et d'un ensemble d'extensions : un axone unique et de nombreuses dendrites (Figure 1-9). L'axone est généralement unique, ramifié à sa terminaison et peut atteindre 1m de longueur. Son point d'émergence au niveau du soma est appelé cône axonal. Il est capable de conduire les informations sous forme de potentiels d'action. Les dendrites, courtes et arborescentes, conduisent les potentiels électriques reçus vers le soma. La synapse constitue l'interface entre l'élément présynaptique, généralement un axone, et l'élément post-synaptique, généralement une dendrite.

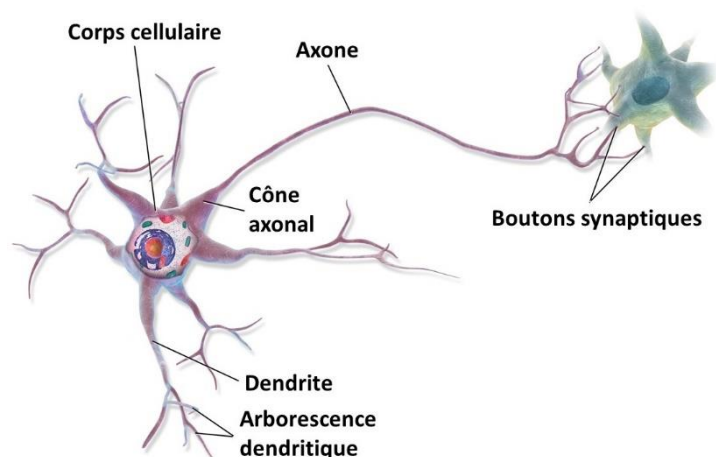


Figure 1-9 : Schéma simplifié d'un neurone. Adapté de Blausen.com staff, (2014)

Le neurone est constitué d'un corps cellulaire à partir duquel sont lancés des prolongements : un axone et des dendrites. L'axone est généralement unique et arborescent à sa terminaison. Il conduit les informations sous forme de potentiel d'action. Le point d'émergence de l'axone est appelé cône axonal. Les dendrites sont plus courtes et très ramifiées. Elles conduisent les potentiels d'actions reçus vers le soma.

Le neurone est délimité par la membrane neuronale. Il s'agit d'une double couche phospholipidique épaisse de 6 à 8 nm, traversée par un ensemble de protéines (Richard *et al.*, 2013) (Figure 1-10). Les milieux intracellulaire et extracellulaire sont aqueux et ioniques. Les espèces majoritairement présentes sont les ions sodium (Na^+), potassium (K^+), calcium (Ca^{++}), et chlorure (Cl^-), dont les concentrations sont différentes de part et d'autre de cette membrane (Tableau 1-1). Parmi l'ensemble de protéines transmembranaires se trouvent des canaux ioniques permettant une diffusion passive d'ions sodium et potassium, ainsi que des pompes sodium/potassium (pompes Na/K) permettant le transport actif des ions sodium et potassium contre leur gradient de concentration.

¹ Les éléments discutés dans ce chapitre n'ont pas vocation à décrire de façon exhaustive le fonctionnement de la membrane neuronale (pour cela, voir Purves *et al.*, (2019)). Ils sont simplement destinés à donner au lecteur les éléments nécessaires et suffisants pour aborder la suite du propos

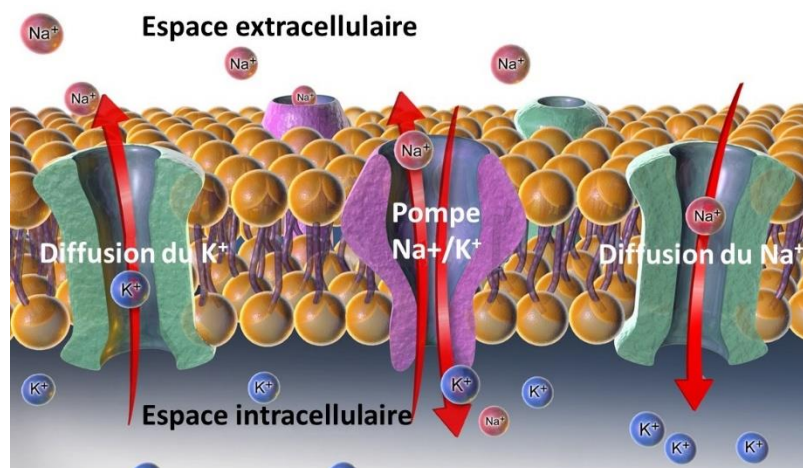


Figure 1-10 : Vue d'artiste des canaux et pompes ioniques transmembranaires. Adapté de Blausen.com staff, (2014)

Canaux transmembranaires sodiques et potassiques voltage-dépendants permettant une diffusion passive des ions Na^+ et K^+ . Lors d'une dépolarisation, ces canaux s'ouvrent successivement, permettant l'entrée massive des ions Na^+ et la sortie massive des ions K^+ . Pompe sodium-potassium permettant le maintien du gradient des concentrations intracellulaire et extracellulaire.

Espèce ionique	Concentration Intracellulaire (mM)	Concentration Extracellulaire (mM)
Na^+	10	145
K^+	140	5
Mg^{2+}	0.5	2
Ca^{2+}	10^{-4}	2
Cl^-	10	110

Tableau 1-1 : Concentration des principaux ions présents dans les milieux intracellulaire et extracellulaire. Adapté de Wu *et al.*, (2019)

Ce gradient de concentration d'espèces ioniques chargées permet de créer une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane neuronale. Cette différence de potentiel confère au neurone son activité électrique.

Le gradient de concentration d'espèces ioniques, électriquement chargées, crée une différence de potentiel (DDP) électrique de part et d'autre de la membrane neuronale, ce qui fait du neurone une cellule électriquement active et excitable. Dans un neurone au repos les ions sodium sont quasi-exclusivement extracellulaires et les ions potassium intracellulaires. La somme des DDP associées aux différents ions est de -60mV . Ce potentiel est appelé « potentiel de repos membranaire ».

Lorsque le neurone est excité, le potentiel transmembranaire augmente jusqu'à atteindre le seuil de dépolarisation, qui se situe à environ -50mV . Ce seuil atteint, les canaux sodiques voltage-dépendants s'ouvrent, provoquant une entrée massive d'ions sodium dans le neurone. Le potentiel transmembranaire augmente jusqu'à atteindre environ 40mV , seuil de fermeture des canaux sodiques voltage-dépendants et d'ouverture des canaux potassiques voltage-dépendants. Il s'agit de la phase de dépolarisation de la membrane. Une fois ces canaux potassiques ouverts, le potassium sort massivement de la cellule, entraînant une chute du potentiel transmembranaire

jusqu'à une valeur d'environ -70mV , inférieure au potentiel de repos. Ce sont les phases de repolarisation puis d'hyperpolarisation. Les canaux potassiques voltage-dépendants se ferment alors, puis les pompes Na/K rétablissent le potentiel de repos. Ce cycle d'ouverture et fermeture de canaux ioniques voltage-dépendants donne au PA son allure générale très identifiable (Figure 1-11) (Canon, 2016).

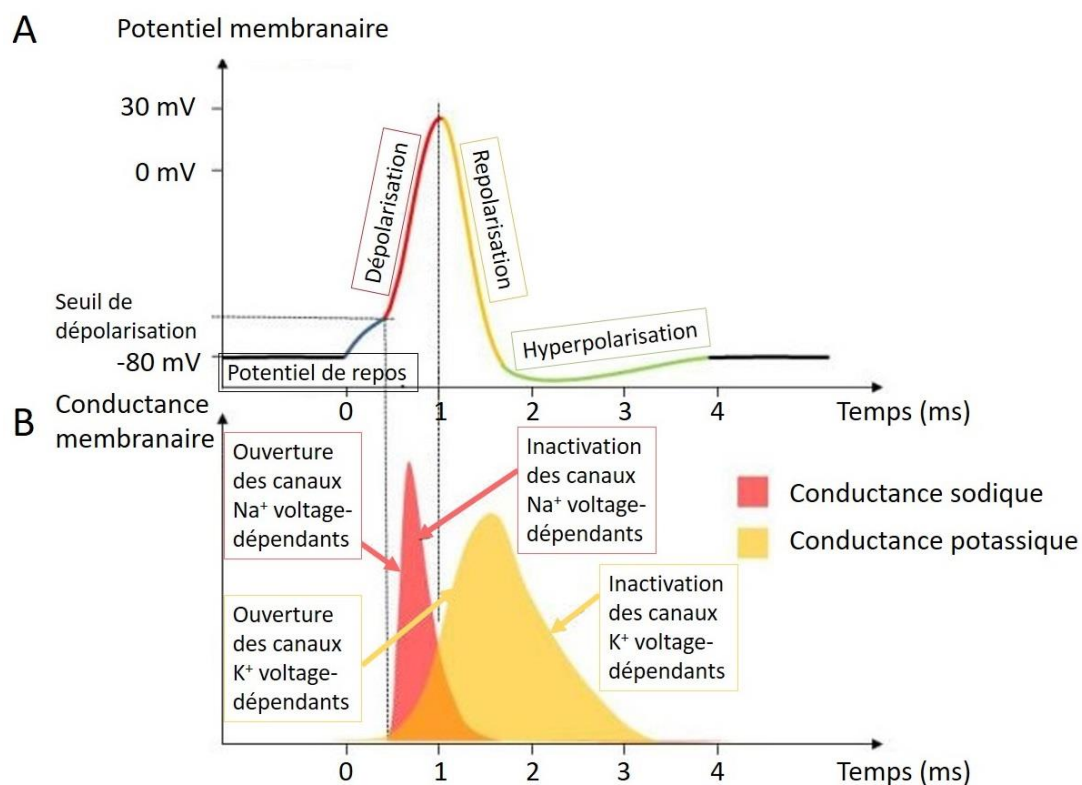


Figure 1-11 : Potentiel d'action et ouverture synchrone des canaux ioniques. Adapté de Canon, (2016)

A : Phases du potentiel d'action. Les phases de repolarisation et d'hyperpolarisation sont qualifiées de période réfractaire, période pendant laquelle le neurone ne peut pas être stimulé. **B** : Cycles d'ouverture et de fermeture des canaux sodiques et potassiques voltages-dépendants.

Le potentiel d'action trouve son origine au niveau du cône axonal, zone de concentration majoritaire des canaux ioniques dans la membrane neuronale avec les nœuds de Ranvier. Ce potentiel d'action est conduit de nœud de Ranvier en nœud de Ranvier le long de l'axone dans les fibres rapides², si bien qu'il est en permanence régénéré et ne s'atténue pas (Figure 1-12). Cette conduction est appelée « conduction saltatoire ». Arrivé au bouton axonal, le PA entraîne l'entrée massive d'ions calcium dans le neurone, provoquant la fusion de vésicules synaptiques avec la membrane. Ces vésicules libèrent alors des neuromédiateurs dans la fente synaptique, permettant de

²Les fibres dites rapides sont myélinisées – recouvertes d'une gaine de myéline – et permettent une conduction rapide des potentiels d'action, qui sautent de nœud de Ranvier en nœud de Ranvier. Ces fibres sont majoritaires chez l'homme et les mammifères. Les fibres dites lentes ne sont pas myélinisées. Les potentiels d'action s'y propagent de proche en proche. Apparues bien plus tôt au cours de l'évolution des espèces, ces fibres existent encore chez l'humain au niveau du système nerveux autonome.

transmettre et moduler l'information vers le neurone suivant. Ces principes de propagation d'un signal électrique au sein d'un neurone sont une source d'inspiration pour la création d'outils les répliquant par la simulation, avec le perceptron par exemple, ou matériellement, par la création de neurones artificiels.

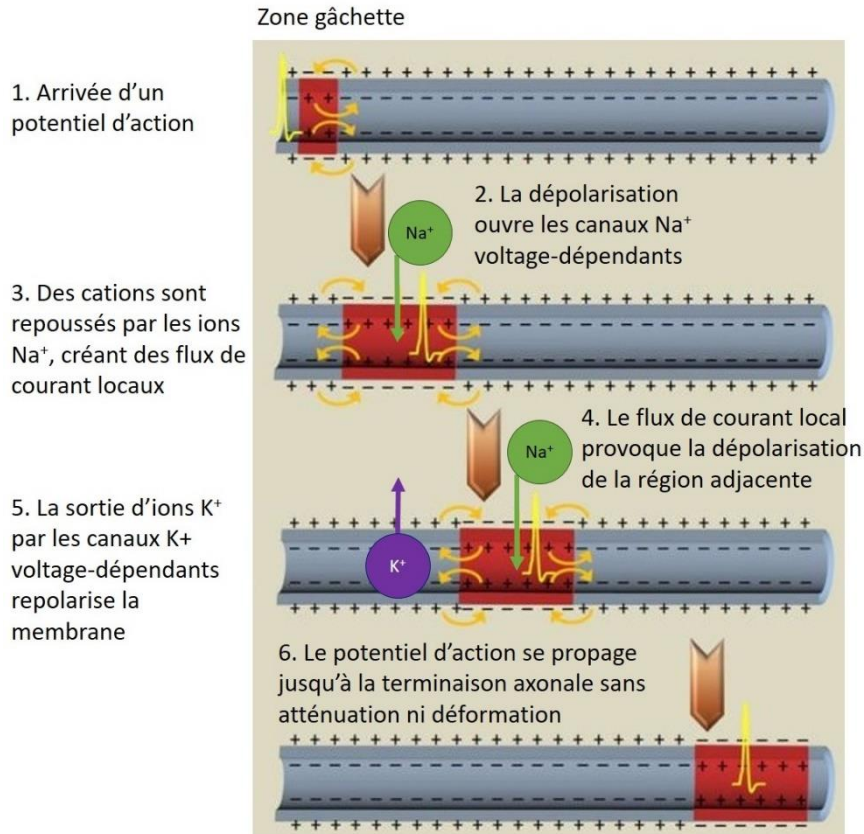


Figure 1-12 : Propagation d'un potentiel d'action le long d'un axone. Adapté de Canon, (2016).

1.5 Développement de systèmes neuromorphiques pour le traitement de l'information ultra efficace en énergie

Les analogies possibles entre les propriétés électriques de la membrane neuronale biologique et les principes de propagation d'un signal électrique avec des éléments électriques et électroniques (résistances, capacités, piles et transistors) permettent la création d'outils visant à simuler ou répliquer le neurone et son fonctionnement.

1.5.1 Analogie entre la membrane neuronale et une pile électrique

D'un point de vue électrique et au tout premier ordre, la membrane neuronale au repos peut être considérée comme une pile électrique dont le pôle négatif serait situé à l'intérieur de la cellule et le pôle positif à l'extérieur, comme le montre la Figure 1-13. La bicouche lipidique est constituée de phospholipides non conducteurs, donnant à la

membrane des propriétés capacitives, qui peuvent être représentées par un condensateur (deux éléments conducteurs séparés par un isolant) de capacité C_m . Les canaux ioniques transmembranaires peuvent laisser passer des ions chargés lorsqu'ils sont ouverts, propriété pouvant être assimilée à la conduction d'un courant électrique ; ils sont alors représentés par une résistance membranaire R_m (Richard *et al.*, 2013).

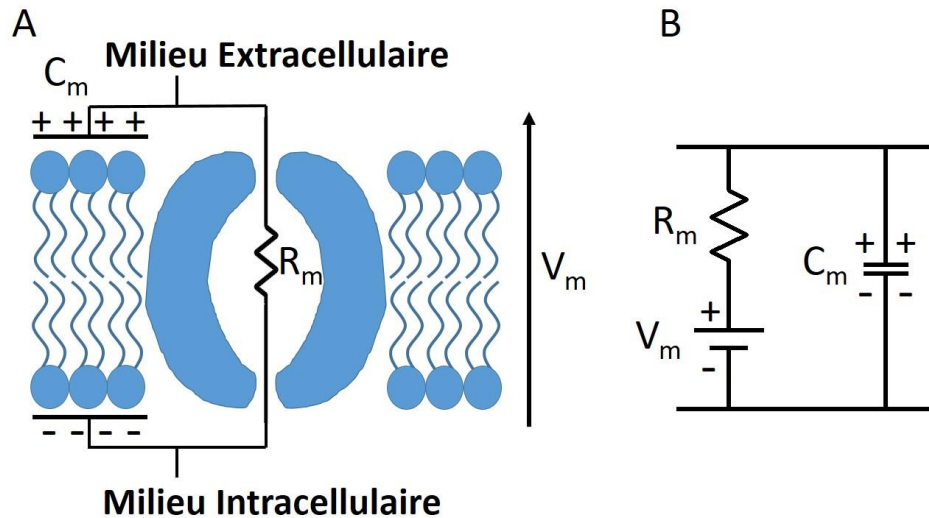


Figure 1-13 : A : Représentation schématique de la membrane neuronale et B : son schéma électrique équivalent simplifié

Constituée d'une double-couche de phospholipides électriquement isolants et traversée de canaux ioniques, elle peut être électriquement approximée par une capacité électrique (C_m) en série d'une résistance électrique (R_m). La différence de potentiel électrique de part et d'autre de la membrane peut être représentée par une pile (V_m).

1.5.2 Le perceptron

Développé par Frank Rosenblatt, (1958), le perceptron est considéré comme le premier réseau apprenant qui s'inspire du fonctionnement du cerveau. Il illustre de façon simple la possibilité de traiter de l'information et des données en implémentant des neurones et des synapses artificielles sous une forme matérielle ou computationnelle. Pour traiter de façon massive des données, il convient d'utiliser un ensemble de neurones artificiels mathématiques comme le montre la Figure 1-14. Chaque neurone possède plusieurs entrées et une seule sortie. Chaque entrée correspond à une synapse et chaque entrée est pondérée par un poids synaptique. Le neurone calcule la somme des entrées pondérées par les poids synaptiques puis émet un signal de sortie au travers d'une fonction seuil. Le perceptron est un ensemble de ces neurones connectés entre eux et dont la force de connexion dépend du poids synaptique. Plus il est élevé, plus la connexion est forte, et inversement. Lors de l'apprentissage, le réseau de neurones est soumis à une excitation. S'agissant d'apprentissage supervisé, le résultat à obtenir est connu et le réseau de neurones est entraîné jusqu'à donner le résultat attendu pour 100% des essais. Pour chaque

excitation, si le résultat est conforme, le poids synaptique des connexions utilisées est augmenté et celui des connexions non utilisées est diminué. Au terme de l'apprentissage, seules les connexions présentant les poids synaptiques les plus élevés subsistent et le réseau de neurones a appris à reconnaître une excitation spécifique. Il s'agit là d'une application de la loi de Hebb (Hebb, D.O., 1949) : le poids synaptique entre deux neurones est renforcé quand les deux neurones sont actifs simultanément.

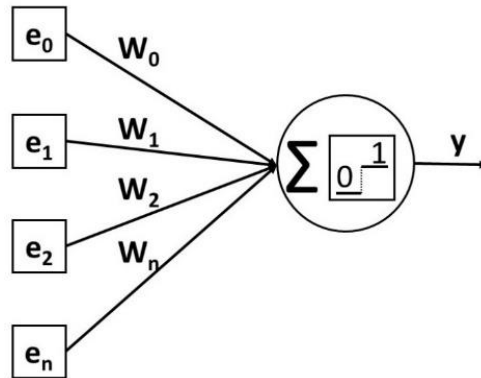


Figure 1-14 : Schéma descriptif du Perceptron

Le perceptron est un algorithme d'apprentissage supervisé. Le résultat final est déjà connu, l'apprentissage de l'algorithme consistant à classifier des données de façon autonome. Concrètement, les entrées de valeur « e » sont multipliées par un poids synaptique « w » et les résultats sont sommés, produisant une valeur. Si cette valeur est supérieure 1, le neurone est activé. La valeur obtenue est comparée avec la valeur connue. Si la valeur connue est différente du résultat, les poids synaptiques sont ajustés en conséquence.

Ce type de réseau permet d'effectuer de la détection et de la reconnaissance de motifs, du tri et de la classification. Il peut être utilisé pour des applications dans des systèmes de vision, d'écoute ou d'odorat artificiels. Ce principe a été repris du fonctionnement du cerveau humain lorsqu'il apprend à reconnaître un signal sensoriel (vision, son, odorat, goût, etc.) ou à effectuer des classifications.

Le modèle du perceptron permet ainsi de montrer qu'il est possible de reproduire le fonctionnement du cerveau en utilisant des neurones artificiels mis en réseaux. Ce modèle peut être réalisé avec des neurones artificiels mathématiques, mais aussi de façon plus tangible avec des neurones artificiels électroniques.

1.5.3 Le neurone artificiel

Carver Mead, (1990) a été le premier à proposer une analogie entre un canal ionique voltage-dépendant et un transistor comme le montre la Figure 1-15. En effet, le transport d'ions dans les canaux ioniques peut être contrôlé par la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane neuronale. A l'instar d'un transistor contrôlant le passage d'électrons par une tension appliquée à une grille, les canaux sodium et potassium voltage-dépendants contrôlent le passage de ces mêmes ions au travers de la membrane au moyen d'une tension.

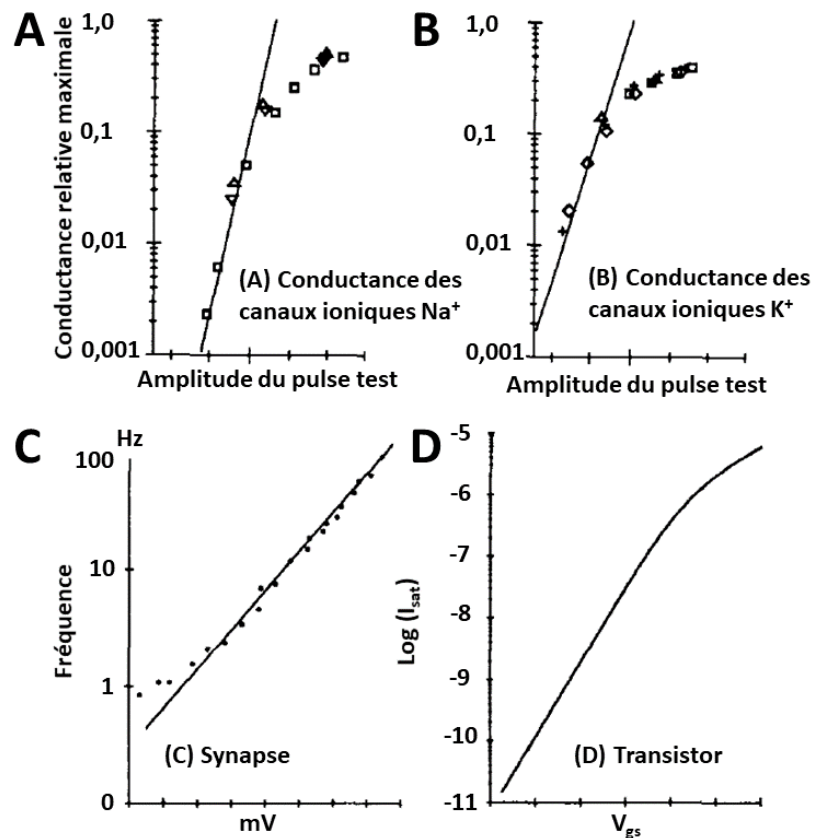


Figure 1-15: analogie entre les caractéristiques courant-tension d'un transistor CMOS et les caractéristiques conductance-tension des canaux ioniques. Adapté de Mead, (1990)

A : conductance des canaux sodiques. **B :** conductance des canaux potassiques. **C :** taux d'arrivée des paquets de neurotransmetteurs vers la membrane post-synaptique en fonction de la tension de la membrane présynaptique. **D :** Caractéristique courant-tension d'un transistor CMOS.

L'approche neuroinspirée suivie par l'équipe SPINE pour développer la boîte à outils complète de neurones et de synapses artificiels est celle illustrée par Gert Cauwenberghs, (2013) de l'Institute for Neural Computation UC San Diego (Figure 1-16). Cette analogie faite, il a été possible de créer un circuit basé sur un ensemble de transistors CMOS implémentés sous la forme d'inverseurs reproduisant le comportement d'un neurone vivant (Sourikopoulos *et al.*, 2017).

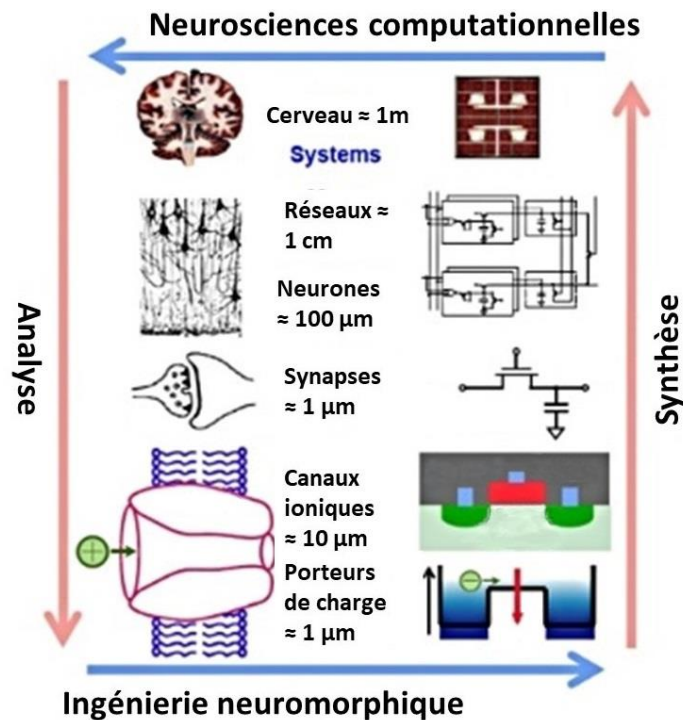


Figure 1-16 : Ingénierie neuromorphique et neurosciences computationnelles. Adapté de Cauwenberghs, (2013)

Les structures biologiques permettant le traitement de l'information sont analysées de l'échelle macroscopique (cerveau et structures neuronales) vers les niveaux plus élémentaires (neurones, synapses, canaux ioniques et porteurs de charges (ions)). L'ingénierie des systèmes neuromorphiques permet ensuite de reproduire ces constituants élémentaires et leurs fonctions, pour synthétiser un système neuromorphique complet reproduisant le fonctionnement du cerveau. L'étude du fonctionnement de ces systèmes neuromorphiques permet une meilleure compréhension des systèmes biologiques du traitement de l'information, au travers des neurosciences computationnelles ; l'ensemble formant un cercle vertueux d'analyse des systèmes biologiques et de conception de systèmes neuromorphiques plus performants.

Nous disposons pour démarrer ce travail de thèse d'un neurone artificiel original basé sur une technologie standard CMOS 65nm (fondeur : Taiwan Semiconductor Manufacturing Company [TSMC]) facilement intégrable et affichant une très bonne efficacité énergétique (Figure 1-17). En effet, la caractéristique la plus importante des neurones fabriqués est leur très faible énergie dissipée : quelques femto-joules par spike. Par rapport à l'existant, cela représente une amélioration de l'état de l'art de deux ordres de grandeur pour les neurones artificiels et trois ordres de grandeur par rapport aux neurones biologiques (Sourikopoulos *et al.*, 2017). Cela représente un avantage majeur pour adresser des applications de calcul neuro-inspirés, ou bien médicales. Il est à noter que le neurone artificiel et le capteur optique sont protégés par les brevets FR1653175 et FR17600621000428716. Ce neurone artificiel génère des potentiels d'actions présentant des caractéristiques similaires à celui des neurones vivants en termes d'allure, de constantes de temps et d'amplitude (Sourikopoulos *et al.*, 2017) (Figure 1-17) ; il est réellement biomimétique. Flexibles, l'amplitude et la fréquence des Spikes émis par ce neurone sont paramétrables.

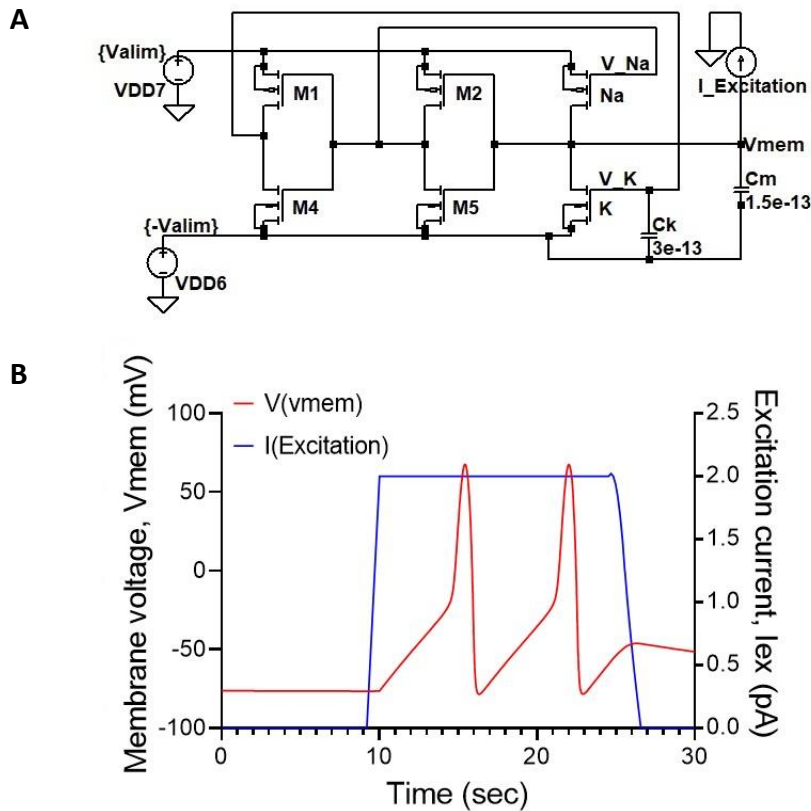


Figure 1-17 : (A) Schéma électrique du neurone artificiel. (B) Spikes émis par le neurone artificiel
 Le potentiel d'action archétypique émis par un neurone vivant est présenté sur la Figure 1-11.

Des synapses artificielles ont également été développées. Elles sont constituées d'un transistor PMOS ou NMOS, reproduisant respectivement une synapse excitatrice ou inhibitrice, et d'un transistor contrôlant le poids de la synapse. Nous disposons donc d'une boîte à outils complète permettant la réalisation de circuits neuronaux remplissant une fonction après un processus d'apprentissage. En nous basant sur cette technologie, notre objectif est de démontrer la possibilité d'interfacer et de connecter des neurones vivants et artificiels puis d'optimiser cette connexion.

1.6 Interface bidirectionnelle entre des neurones vivants et artificiels : Etat de l'art des solutions existantes

L'ingénierie neuromorphique vise au développement de systèmes artificiels s'inspirant des propriétés physiques des réseaux de neurones vivants. Dans le même temps, le domaine des « neuro-biosystèmes », visant à améliorer ou à remplacer des fonctions neuronales défaillantes à l'aide de dispositifs matériels tels que les biocapteurs, les puces multiélectrodes ou même des prothèses neuronales, est en plein essor.

Ce travail de thèse s'inscrit dans une activité scientifique plus vaste visant à créer un pont entre l'ingénierie neuromorphique et les neurosystèmes pour créer des systèmes neurobiohybrides. La création d'une boucle de communication bidirectionnelle entre des neurones vivants et artificiels peut être réalisée en utilisant des neurones biomimétiques et des signaux physiologiques (Figure 1-18).

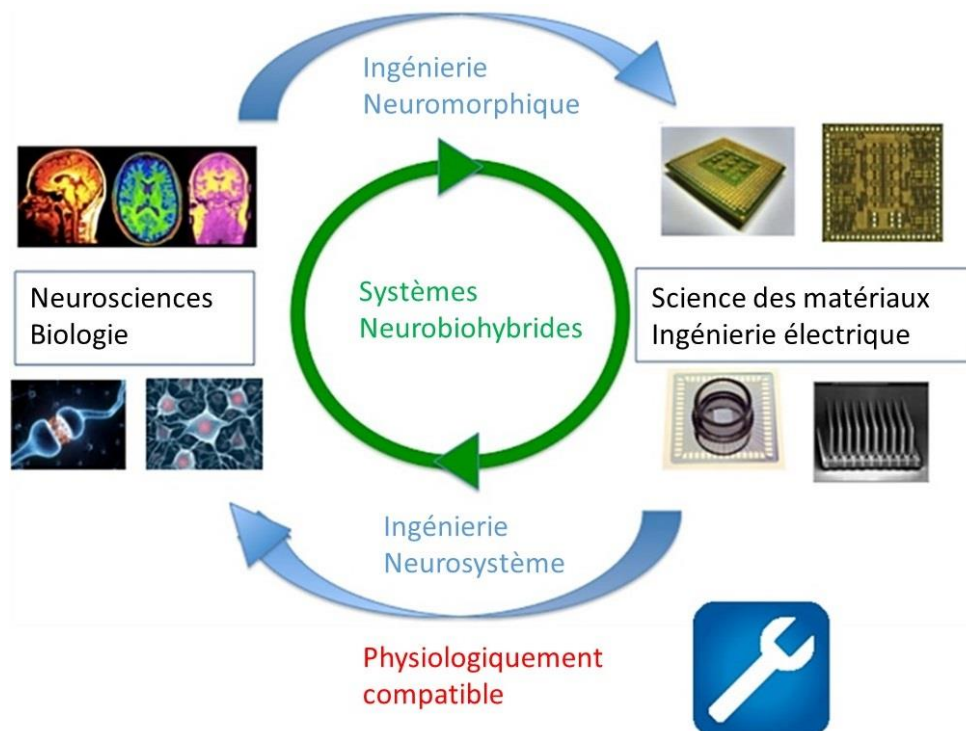


Figure 1-18 : Systèmes neurobiohybrides : créer une interface bidirectionnelle physiologiquement compatible entre des systèmes électroniques et biologiques

L'ingénierie neuromorphique s'inspire des systèmes biologiques pour reproduire leurs fonctions dans des systèmes électroniques et numériques. L'ingénierie neurosystèmes conçoit et réalise des systèmes électroniques permettant d'interfacer des systèmes électroniques et biologiques afin d'étudier le fonctionnement des systèmes biologiques. Assurant la continuité entre ces deux domaines de l'ingénierie, les systèmes neurobiohybrides sont un ensemble de systèmes électroniques et d'interface physiologiquement compatibles visant à établir une communication bidirectionnelle entre les systèmes électroniques biomimétiques et les systèmes biologiques.

Dans ce contexte, l'émergence d'interfaces neuronales avec des dispositifs nanoélectroniques a débuté il y a quelques années. Aujourd'hui, les systèmes neurohybrides font l'objet d'un intense effort de recherche dans le monde entier visant à fournir de nouveaux outils pour remplacer, et/ou restaurer des fonctions altérées, et/ou comprendre le fonctionnement du cerveau (Grassia *et al.*, 2011; Hierlemann, 2017; Kruskal *et al.*, 2015; Ojovan *et al.*, 2015; Radivojevic *et al.*, 2016; Zeck & Fromherz, 2001).

Une première approche dans le domaine des interfaces neurobiohybrides repose sur une communication unidirectionnelle avec comme objectif l'enregistrement de l'activité neuronale. Dans ce domaine, Zeck & Fromherz, (2001) peuvent être considérés comme des pionniers. Ils ont ainsi développé un circuit hybride composé

d'une puce semi-conductrice et de neurones de lymnée (*L. stagnalis*) synaptiquement connectés. La mise en œuvre de ce circuit silicium/neurones a permis de faire la démonstration de faisabilité des systèmes neuro-électroniques.

Les travaux de ces groupes de recherches proposent souvent des solutions complexes et utilisent des signaux d'excitation non-physiologiques. Ils ont cependant établi une première preuve de concept, ce qui a permis à notre équipe Spine d'ouvrir une nouvelle voie, à savoir : écoute et stimulation de l'activité neuronale en temps réel sans conversion des signaux et en appliquant des tensions de polarisation d'amplitude faible, limitant la destruction des tissus.

Ainsi, Grassia *et al.*, (2011) ont proposés un système neuro-mimétique ajustable, sous forme d'un circuit intégré, pour imiter des modèles de neurones corticaux. Les auteurs ont souhaité comparer qualitativement la dynamique des circuits en silicium à celle des cellules biologiques. Afin de copier et de reproduire le signal de neurones vivants, les jeux de paramètres ont été stockés dans une base de données et les paramètres requis ont été chargés dans la puce afin d'imiter les types cellulaires voulus.

Pour l'enregistrement à grande échelle de l'activité neuronale sans dommage, Hai *et al.*, (2010) ont développé une nouvelle plateforme composée de microélectrodes en or en forme de champignon (Hai *et al.*, 2010; Ojovan *et al.*, 2015). Cette nouvelle approche a permis l'enregistrement simultané de signaux électriques provenant de nombreux neurones (*Aplysia californica*) individuels avec une qualité comparable aux enregistrements intracellulaires.

Une nouvelle approche utilisant les nanotechnologies a été proposée par Lieber & Kruskal (Kruskal *et al.*, 2015) afin de repousser les limites des techniques d'électrophysiologie (enregistrements sur un neurone unique, enregistrement sur de courtes périodes de temps). La solution repose sur une communication unidirectionnelle basée sur une nouvelle méthode d'enregistrement utilisant des dispositifs transistors à effet de champ dont la grille est un nanofil en contact avec la membrane d'un neurone vivant. Il est à noter que les auteurs soutiennent que : "*Alors que nous entrons dans un monde de nouveaux dispositifs médicaux neuronaux.../...la technologie avec des propriétés biomimétiques est de plus en plus importante.*"

Une amélioration significative a été apportée récemment par Hierlemann (2017) et Radivojevic *et al.* (2016), qui ciblaient la microstimulation sélective des neurones (rat embryonnaire) et l'enregistrement de spikes sur une surface plane. Le système est un transducteur CMOS qui intègre des sites de stimulation entourés de sites de capteurs. Grâce à leur système, il a été possible d'enregistrer des données subcellulaires et de détecter une fraction du signal du potentiel d'actions généré par les neurones vivants. Cependant, ces auteurs utilisent des signaux d'excitation non-physiologiques du type rectangulaires ou biphasiques.

Un document de synthèse publié par Vassanelli et Mahmud (2016) donne un aperçu des tendances et défis récents de la neuro-ingénierie. Selon les auteurs, « *Le défi est de concevoir et de fabriquer des systèmes neuronaux artificiels imitant au plus près possible leurs homologues biologiques, puis les interfacer efficacement avec leur organe d'origine pour rétablir ses fonctions normales (ou augmenter ses fonctions).* »; l'organe dont il est question pouvant être le cerveau. De plus, « *Les architectures neuromorphiques récentes basés sur la technologie very large scale integration (VLSI) [...], ont posés les bases pour le développement de tels neurobiohybrides de nouvelle génération.* ».

Enfin, une démonstration de communication unidirectionnelle d'un réseau de neurones artificiels vers un réseau de neurones vivants est apportée par Mosbacher *et al.*, (2020). Un réseau de neurones vivants (rat embryonnaire) (« *Biological Neural Network* », [BNN]) génétiquement modifiés pour émettre des potentiels d'action lorsqu'ils sont éclairés avec une lumière bleue est cultivé sur un MEA. L'excitation est fournie par un réseau de 64 neurones à impulsions (« *Spiking Neural Network* », [SNN]) dont les sorties sont codées sous forme d'une image binaire composée de 8 x 8 carrés. Cette image est projetée sur les neurones vivants qui répondent en émettant des potentiels d'action lorsqu'ils sont illuminés. La matrice d'excitation et l'emplacement des PA émis par le BNN sont comparés, les résultats montrant que l'information est transmise du SNN vers le BNN. Cette étude démontre qu'une excitation de neurones vivants par des spikes issus de neurones artificiels est possible. Les neurones artificiels utilisés par Mosbacher *et al.*, (2020) sont informatiques, mais en s'appuyant de nouveau sur les propos de Vassanelli (2016), « *Implémentés en technologie VSLI, les circuits neuromorphiques utilisent, dans une certaine mesure, des principes physiques similaires à ceux utilisés dans les systèmes neuronaux vivants (e.g. les porteurs de charges sont transportés à travers le canal des transistors par diffusion, comme les ions sont transportés à l'intérieur ou à l'extérieur des neurones au travers des canaux ioniques).* Etant donné les analogies au niveau microscopique, les circuits neuromorphiques sont des candidats idéaux pour être interfacés avec des neurones vivants », nous pouvons affirmer que le développement de neurones artificiels physiques est une voie appropriée pour développer de véritables solutions innovantes permettant d'interfacer des neurones vivants et artificiels.

Nombre de ces solutions complexes nécessitent l'utilisation d'interfaces numériques (Hierlemann, 2017; Wagenaar *et al.*, 2004a; Zeck & Fromherz, 2001), de Field Programmable Gate Arrays [FPGA] (Ambroise *et al.*, 2017; Buccelli *et al.*, 2019; Frey *et al.*, 2010; Radivojevic *et al.*, 2016), ou encore de technologies exotiques comme l'optogénétique (Mosbacher *et al.*, 2020). Notre approche est originale et se différencie de l'état de l'art existant (Grassia *et al.*, 2011; Hierlemann, 2017; Kruskal *et al.*, 2015; Ojovan *et al.*, 2015; Radivojevic *et al.*, 2016; Zeck & Fromherz, 2001). Elle consiste à utiliser un neurone artificiel biomimétique et ultra-efficace en énergie pour créer cette

interface bidirectionnelle entre des neurones vivants et artificiels. L'utilisation de signaux physiologiques permet de rester au plus près du fonctionnement du cerveau. Il est possible d'exciter et aussi d'écouter la réponse des neurones vivants. Cette interface servira de support au développement de nouvelles options thérapeutiques palliatives avec la mise au point d'implants intelligents ultra-efficaces en énergie destinés à améliorer la vie des malades atteints de maladies neurodégénératives, permettant en outre une utilisation diagnostique basée sur leurs capacités d'« écoute » locale.

Selon les données récentes de l'Organisation Mondiale de la Santé, 10% de la population mondiale va être affectée par des troubles neurologiques (Cascione *et al.*, 2020; WHO / *Neurological Disorders*, s. d.) et la prévalence des maladies liées à l'âge comme la maladie de Parkinson a augmenté, en partie à cause du vieillissement de la population (Cascione *et al.*, 2020). Les causes exactes de certaines de ces maladies neurodégénératives, notamment la maladie de Parkinson, ne sont pas connues (Cascione *et al.*, 2020). Aucun traitement curatif n'est actuellement disponible et leur prise en charge consiste à atténuer les symptômes et ralentir le développement de la maladie en utilisant des traitements médicamenteux ou par des approches plus invasives et nécessitant une intervention chirurgicale, comme la stimulation cérébrale profonde (« Deep Brain Stimulation », [DBS]). Dans ce contexte, en remplaçant un réseau de neurones détruits ou en suppléant à leur tâche, les neurobiohybrides ont un potentiel de développement avéré dans le domaine de la santé.

Chapitre 2

MODELISATION ET SIMULATIONS

2.1 Introduction

L'objectif de cette thèse est de développer une interface fonctionnelle permettant d'établir un dialogue entre des cellules neuronales vivantes et des neurones artificiels. Ces derniers sont déportés et connectés à des lignes métalliques acheminant le signal électrique. Pour mieux comprendre les enjeux et l'impact des éléments parasites liés à cette configuration, nous avons travaillé au développement d'un modèle électrique afin d'étudier la faisabilité de notre approche.

Dans un premier temps, il était nécessaire de vérifier la possibilité d'exciter les neurones vivants en intégrant les caractéristiques de l'interface et les éléments parasites du couplage capacitif au modèle proposé. Dans un deuxième temps, l'idée a été d'affiner ce modèle afin de guider l'expérimentation biologique et de déterminer les paramètres qui vont servir à l'excitation ou bien à l'écoute des cellules neuronales.

Grâce au modèle, nous disposons d'un outil qui nous permettra de paramétrer les stimuli qui seront utilisés pour les expérimentations biologiques. Ce modèle est une première étape dans notre travail et il sera important de confronter les résultats de simulation aux résultats obtenus sur le volet expérimental pour l'améliorer.

Pour cela, j'ai implémenté sous SPICE un modèle de membrane neuronale représentant le neurone vivant, interfacé avec une électrode métallique. Ce modèle intègre les éléments parasites liés au *coating* nécessaire pour la croissance et la différenciation des cellules. La conception et la caractérisation de ce modèle sont présentées dans ce chapitre. L'idée est de pouvoir décliner le plus fidèlement possible la membrane neuronale en un modèle paramétrique pour tenir compte des deux composantes de la surface du neurone vivant : (i) la première en regard de l'électrode métallique recouverte de *coating* et (ii) la seconde au contact du bain d'électrolyte. Pour ce modèle de membrane, nous nous sommes appuyés sur le modèle de neurone artificiel présenté par Sourikopoulos *et al.*, (2017), également développé sous SPICE. Le détail de la construction du modèle intégrant les éléments constitutifs de l'interface entre le neurone biomimétique et l'électrode sont décrits ci-après.

Les signaux électriques permettant la stimulation du modèle seront définis au travers d'une revue de littérature. Cette revue examinera les signaux contrôlés en tension permettant la stimulation de neurones vivants couplés à des électrodes, *in vitro* dans le cadre de neurones cultivés sur des MEA, et *in vivo* dans le cadre des signaux utilisés pour la prise en charge par DBS de patients atteints de la maladie de Parkinson. Enfin, une étude comparative des réponses du modèle à ces signaux de stimulation, ainsi que de l'impact de l'allure de ces signaux sur la réponse du modèle est proposée dans la suite de ce document. Il faut garder comme principe dans le développement de cet outil que son étude et la confrontation avec les expérimentations permettront

d'affiner les réponses, de poser les limites de validité et de définir son champ d'utilisation.

2.2 Modèle paramétrique de membrane

Pour construire ce modèle, nous sommes partis du modèle de neurone artificiel présenté par Sourikopoulos *et al.*, (2017). Celui-ci a été décliné sous SPICE en un modèle paramétrique de membrane neuronale permettant de séparer cette membrane neuronale en deux parties : la partie en regard de l'électrode est appelée « membrane attachée » et celle qui se retrouve dans l'électrolyte est appelée « membrane libre ». Nous avons travaillé également à la modélisation des éléments constituant l'interface entre le neurone biomimétique et l'électrode permettant la prise en compte de la distance entre la membrane attachée et l'électrode. Cette distance impacte la façon dont le signal électrique est acheminé vers le neurone vivant.

2.2.1 Présentation du modèle de neurone biomimétique

Dans son article intitulé *Neuromorphic electronic systems* (1990), Carver Mead fait le parallèle entre l'évolution des courants transmembranaires d'un neurone vivant et la caractéristique courant-tension d'un MOSFET travaillant sous le seuil, leurs allures étant très similaires. Ce parallèle a permis d'introduire l'utilisation de MOSFET dans l'ingénierie biomimétique. En se basant sur cette analogie ainsi que le modèle théorique proposé par Morris et Lecar (1981), Ilias Sourikopoulos, Sara Hedayat *et al* (2017) ont établi un modèle électrique de neurone artificiel constitué de six transistor MOS travaillant en zone linéaire et de deux capacités (Figure 2-1). Un pulse de courant permet d'exciter le modèle, qui y répond en émettant des potentiels d'action biomimétiques, appelés Spikes (Sourikopoulos *et al.*, 2017). Ce modèle de neurone artificiel nous sert de base et il sera dérivé en modèle de membrane dans la suite de ce chapitre.

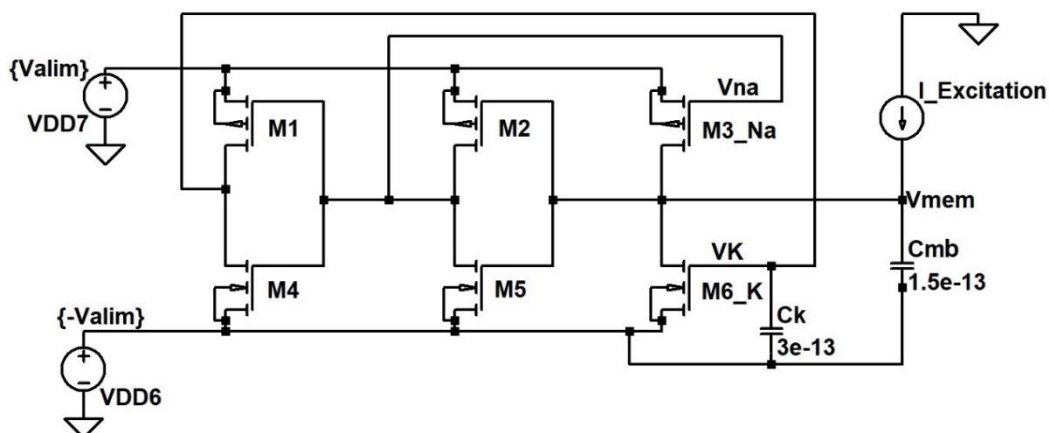


Figure 2-1 : Schéma électrique du neurone artificiel. Issu de Sourikopoulos *et al.*, (2017)

2.2.2 Les éléments de départ pour construire le modèle de membrane

L'objet que nous souhaitons simuler est présenté de façon schématique sur la Figure 2-2. Nous pouvons y voir l'électrode, le *coating* et le neurone vivant avec ses deux parties de membrane. Dans l'expérience complète, il y a également le puits de polydiméthylsiloxane [PDMS] et le substrat de verre qui sert de support à l'ensemble. Ces éléments seront présentés dans le paragraphe 3.4.

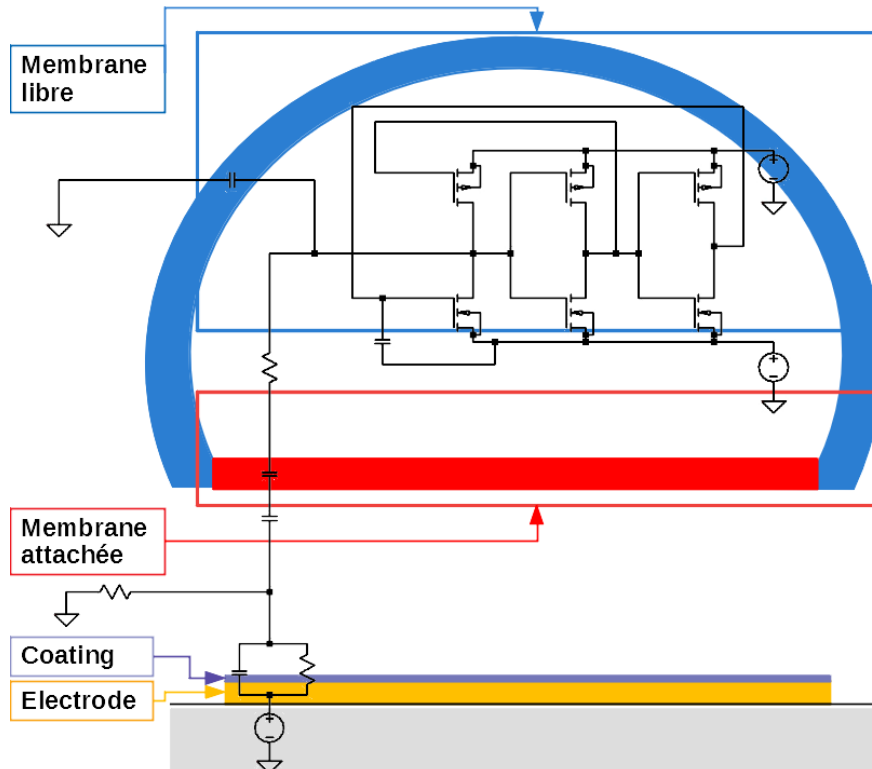


Figure 2-2 : Représentation schématique du neurone et du modèle de membrane neuronale couplée à une électrode métallique recouverte de *coating*

Le neurone est séparé en deux parties de membrane : la membrane attachée faisant face à l'électrode, et la membrane libre en contact avec le milieu de culture cellulaire.

2.2.3 Evolution du modèle de neurone vers un modèle de membrane neuronale

Le neurone artificiel présenté sur la Figure 2-1 est construit autour de caractéristiques usuellement rencontrées dans la littérature. Ce modèle doit être transformé pour l'amener vers un modèle de membrane neuronale représentant les cellules PC-12 que nous cultivons et sur lesquelles nous menons nos expériences (§4.2). En ce sens, ce neurone artificiel doit être adapté à la taille des cellules neuronales PC-12 et tenir compte du fait que ces cellules soient attachées à une électrode. Cette adaptation est effectuée en modifiant la taille des éléments qui constituent ce modèle :

ses transistors et capacités, puis en le séparant en deux parties de membrane : la membrane libre et la membrane attachée. La première étape a consisté à implémenter dans le modèle de neurone artificiel les données liées aux cellules neuronales PC-12. La seconde étape a été de faire évoluer le modèle de neurone vers un modèle de membrane séparé en deux parties pour modéliser le fait qu'une cellule PC-12 soit attachée à une électrode.

2.2.3.1 Adaptation du modèle de neurone à une cellule PC-12

Le modèle de neurone présenté sur la Figure 2-1 doit être adapté en un modèle de membrane représentant une cellule neuronale PC-12. En ce sens, les paramètres du modèle de neurone artificiel sont ajustés pour correspondre à une membrane de cellule neuronale de surface équivalente à celle d'une cellule PC-12. Il faut alors commencer par définir la surface de membrane d'une cellule PC-12 pour ensuite calibrer le modèle à partir de cette nouvelle donnée d'entrée. Le modèle de neurone artificiel (Figure 2-1) est constitué de six transistors et deux capacités ; les dimensions de ces éléments constitutifs sont données dans le Tableau 2-1. La capacité de membrane dans le modèle du neurone artificiel est $C_m = 1,5 \cdot 10^{-13}$ F. Pour avancer sur le modèle paramétrique, il faut pouvoir passer de la valeur standard définie par les auteurs de la publication à celle de la membrane d'un neurone de type PC-12. Pour cela, il faut s'appuyer sur la capacité par unité de surface d'une membrane neuronale qui est référencée dans la littérature tel que : $C_{mb-neuronale} = 0,01$ F/m². En faisant le ratio entre la capacité de membrane surfacique et la capacité de membrane du modèle, cela permet de calculer la surface de membrane ($A_{biomimetique}$) qui est associée au modèle de neurone artificiel. En utilisant l'Équation 2-1, la valeur est $A_{biomimetique} = 15$ μm².

$$A_{Biomimetique} = \frac{C_m}{C_{mb-neuronale}} \quad \text{Équation 2-1 : Surface équivalente du modèle de neurone biomimétique}$$

Le même raisonnement va être appliqué à la surface de membrane d'une cellule neuronale type PC-12. D'après les informations données par l'American Type Culture Collection [ATCC], fournisseur de ces cellules, et corroboré par nos propres observations, le diamètre de ces cellules est de l'ordre de $d_{PC-12} = 10$ μm. Pour simplifier les calculs, il ne faut considérer que la surface membranaire du soma qui est pris comme étant un soma sphérique. Cela permet de calculer la surface de membrane d'une cellule PC-12 telle que : $A_{PC-12} = 314,2$ μm². Pour comparer les surfaces de membrane du modèle de neurone et d'une cellule PC-12, il faut établir le rapport de surface de ces membranes « S », défini par l'Équation 2-2.

$$S = \frac{A_{PC-12}}{A_{Biomimetique}} = \frac{314,159e^{-12}}{15e^{-12}} = 20,94$$

Équation 2-2 : Rapport des surfaces du soma d'une PC-12 différenciée et d'un neurone biomimétique

Pour ajuster la surface de membrane équivalente du modèle de neurone à celle d'une cellule PC-12, il convient d'appliquer un facteur d'échelle aux éléments constituant le modèle, ce qui revient à augmenter uniformément les dimensions de tous les éléments. Pour cela, il faut multiplier les tailles des grilles des transistors et la valeur des capacités C_k et C_m par le rapport « S » des surfaces membranaires du modèle de neurone et d'une cellule PC-12. Les tailles des éléments ainsi calculés sont présentées dans le Tableau 2-1.

		Neurone biomimétique		Modèle de membrane	
		Longueur (nm)	Largeur (nm)	Longueur (nm)	Largeur (nm)
Transistors	M1	65	360	65	7538,4
	M2	65	300	65	6282
	M3_Na	65	200	65	4188
	M4	66	120	66	2512,8
	M5	65	600	65	12564
	M6_K	65	1000	65	20940
Capacités	C_{mb}		$1,50 \cdot 10^{-13}$		$3,14 \cdot 10^{-12}$
	C_K		$3,00 \cdot 10^{-13}$		$6,28 \cdot 10^{-12}$

Tableau 2-1 : Taille des éléments (transistors et capacités) du modèle de membrane équivalent à une cellule PC-12 de surface $A_{PC-12} = 314,16 \mu m^2$

2.2.3.2 Séparation du modèle de membrane en deux parties

Le modèle de neurone (Figure 2-1) faisant correspondre la surface de membrane neuronale équivalente à la surface de membrane d'une cellule PC-12, il faut maintenant modéliser le fait qu'une cellule PC12 sera attachée à une électrode. Cette étape est conduite en s'appuyant sur les travaux de Schoen & Fromherz, (2007) et Ojovan *et al.*, (2015). Le modèle de neurone va évoluer vers un modèle de membrane séparé en deux parties : la membrane attachée et la membrane libre. En utilisant un facteur d'échelle, je calcule la dimension des éléments constituant chaque partie de membrane en fonction de sa surface (libre ou attachée). Pour simplifier ces calculs, je les exprime en fonction d'un seul paramètre : le « ScalingFactor ». Ce « ScalingFactor » est le pourcentage de la surface de la membrane attachée par rapport à la surface totale.

Pour ce modèle, nous considérons une électrode totalement recouverte par la membrane neuronale. La surface de la membrane attachée et celle de l'électrode sont égales. Reprenant les dimensions des électrodes composant les MEA distribués par MultiChannelSystems, (Reutlingen, Germany), les électrodes sont des disques de $10 \mu m$ de diamètre et de surface $A_{electrode} = 78,45 \mu m^2$. La surface de la membrane attachée est donc $A_{mb-attachée} = 78,45 \mu m^2$, ce qui représente 24,97% de la surface

de membrane d'une cellule PC-12, soit un rapport de 0,25. Dans ce cas, la valeur est $\text{ScalingFactor} = 0,2497$.

La surface de la membrane libre est calculée en soustrayant la surface de la membrane attachée à la surface totale d'une cellule PC-12 (Équation 2-3).

$$A_{mb-libre} = A_{PC-12} - A_{mb-attachée} \quad \text{Équation 2-3 : Calcul de la surface de la membrane libre.}$$

Dans ce cas, la surface de la membrane libre est donc $A_{mb-libre} = 234,71 \mu\text{m}^2$, ce qui représente 75,03% de la surface de membrane d'une cellule PC-12.

Par ailleurs, ce modèle prend en compte l'impact de la très faible distance, quelques dizaines de nm, séparant le neurone de l'électrode. Cette distance est très inférieure au $10\mu\text{m}$ de diamètre de la membrane attachée. De ce fait, il y a très peu d'échanges ioniques entre la fine couche d'électrolyte séparant le neurone de l'électrode et le bain d'électrolyte. L'activité électrique de la membrane neuronale reposant sur l'échange d'ions entre l'électrolyte et le cytosol, la quantité d'ions dans est rapidement épuisée. En ce sens, nous considérons pour ce modèle que la quantité d'ions présents dans la fine couche électrolyte séparant le neurone de l'électrode n'est pas suffisante pour maintenir l'activité électrique de la partie de la membrane attachée à l'électrode. La membrane attachée est alors considérée comme passive, et est représentée uniquement par sa capacité membranaire.

Les dimensions de chacun des éléments (transistors et capacités) constituant les membranes attachées et libres en fonction du « ScalingFactor » sont calculés et présentés sur le Tableau 2-3. Les dimensions des éléments constituant la membrane attachée sont multipliées par le ScalingFactor et les dimensions des éléments constituant la membrane libre sont multipliées par l'expression $(1 - \text{ScalingFactor})$. La campagne de simulation dont les résultats sont présentés dans la suite de ce document sont réalisés en considérant une électrode représentant 30% de la surface de la membrane neuronale, soit un $\text{ScalingFactor} = 0,3$. Cette surface a été choisie arbitrairement. Dans ce cas, les valeurs des paramètres nécessaires au dimensionnement des surfaces de l'électrode, de la membrane attachée et de la membrane libre sont données dans le Tableau 2-2.

Rayon du neurone	$r_{neurone}$	(μm)	5
Surface du neurone (μm^2)	A_{soma}	(μm^2)	314,16
ScalingFactor	ScalingFactor		0,3
Surface de l'électrode = Surface de la membrane attachée	$S_{microelec} = S_{mb-attachée}$	(μm^2)	94,248
Surface de la membrane libre	$S_{mb-libre}$	(μm^2)	219,912

Tableau 2-2 : Paramètres nécessaires au dimensionnement du modèle de membrane neuronale interfacé avec une électrode

Les dimensions de chacun des éléments (transistors et capacités) constituant les membranes attachées et libres en fonction du « ScalingFactor » sont alors calculés et présentés sur le Tableau 2-3.

ScalingFactor	0.3	neurone biomimétique		Modèle de membrane libre		Modèle de membrane attachée	
		Longueur (nm)	Largeur (nm)	Longueur (nm)	Largeur (nm)	Longueur (nm)	Largeur (nm)
Transistors	M1	65	360	65	5277,6		
	M2	65	300	65	4398		
	M3_Na	65	200	65	2932		
	M4	66	120	66	1759,2		
	M5	65	600	65	8796		
	M6_K	65	1000	65	14660		
Capacités	C_{mb}	$1,50 \cdot 10^{-13}$		$2,20 \cdot 10^{-12}$		$9,42 \cdot 10^{-13}$	
	C_K	$3,00 \cdot 10^{-13}$		$4,40 \cdot 10^{-12}$			

Tableau 2-3 : Dimension des éléments (transistors et capacités) constituant les membranes attaches et libres en fonction du ScalingFactor = 0,3

La surface de l'électrode est un paramètre essentiel. Une surface d'électrode trop petite entrainera une impédance d'interface élevée et une capacité d'interface faible, bloquant le signal entre le neurone et l'électrode. Une grande surface d'électrode permet de réduire la résistance d'interface et d'augmenter la capacité d'interface, mais augmente les parasites, ce qui nuit également à la transmission du signal entre l'électrode et le neurone. Des travaux de simulation et expérimentaux doivent être conduit en parallèle pour déterminer la surface la plus appropriée à l'excitation et à l'écoute de ces cellules neuronales PC-12.

2.2.3.3 Liaison entre les deux parties de membrane

A ce stade, nous disposons d'un modèle paramétrique constitué de deux membranes neuronales séparées en deux parties : la membrane attachée et la membrane libre. Si nous considérons un neurone vivant, la membrane neuronale est continue, enveloppant le soma, l'axone et les dendrites. Par conséquent, la membrane attachée et

la membrane libre du modèle sont les constituants d'un seul et même neurone et doivent donc être reliées. Suivant les travaux de Thakore *et al.*, (2012), ces deux parties de membrane sont reliées par le cytosol, l'électrolyte remplissant l'intérieur des neurones vivants, qui est représenté par une résistance R_{int} .

Pour calculer la valeur de cette résistance R_{int} , je considère la résistance d'un cylindre d'électrolyte séparant les deux parties de membrane. La surface de la base de ce cylindre est celle de la membrane attachée ($A_{mb-attachée} = 78,45 \mu m^2$) et sa hauteur est le diamètre d'une cellule PC-12 ($d_{PC-12} = 10 \mu m$). Une étude menée par Zheng *et al.*, (2013) a mesuré la conductivité du cytosol $\sigma_{cytosol}$ telle que : $0,62 S.m^{-1} \leq \sigma_{cytosol} \leq 0,76 S.m^{-1}$. Pour les calculs de R_{int} , la valeur de $\sigma_{cytosol}$ est telle que $\sigma_{cytosol} = 0,7 S.m^{-1}$. En utilisant l'Équation 2-4, la valeur de R_{int} est $R_{int} = 18,2 K\Omega$.

$$R_{int} = \frac{d_{PC-12}}{\sigma_{cytosol} \cdot A_{mb-attachée}}$$

Équation 2-4 : Calcul de la résistance R_{int} reliant les parties de membrane libre et attachée

2.3 Interface entre l'électrode et l'électrolyte

Après avoir défini un modèle de membrane paramétrable, je me suis attaché à déterminer les paramètres définissant au mieux l'interface permettant de coupler cette membrane à une électrode métallique. La tension appliquée sur l'électrode sera transmise à la membrane libre au travers d'éléments parasites, constitués par : (i) l'interface électrode/électrolyte, (ii) la couche d'électrolyte, (iii) les fuites de potentiel vers l'électrolyte, et (iv) la membrane attachée.

2.3.1 Présentation de l'interface entre l'électrode et la membrane neuronale

La membrane attachée n'est pas intimement collée sur une électrode planaire ; ces deux éléments sont séparés par une fente emplies d'électrolyte, d'épaisseur « d », de l'ordre de la centaine de nanomètres (Braun & Fromherz, 1998; Massobrio *et al.*, 2007; Thakore *et al.*, 2012). Il y a donc deux interfaces successives : une interface entre l'électrode et l'électrolyte suivie d'une interface entre l'électrolyte et la membrane neuronale. L'interface entre l'électrode et l'électrolyte est décrite par un élément à phase constante un (« Constant phase element » ; [CPE]) (Franks *et al.*, 2005; Joye *et al.*, 2008). Cet élément n'est pas disponible dans la bibliothèque SPICE. Toutefois, il peut être approximé par une capacité équivalente. Ce point sera plus amplement présenté et discuté dans le Chapitre 3, §3.7. L'interface entre l'électrode et l'électrolyte est alors représentée par une capacité d'interface « C_{I-EE} » en parallèle d'une résistance d'interface « R_{I-EE} » (Figure 2-3). L'interface entre l'électrolyte et la membrane neuronale est représentée par la capacité « C_{I-MbE} » (Figure 2-3). La couche d'électrolyte remplissant la fente entre l'électrode et le neurone permet une connexion de l'électrode vers l'intégralité du bain d'électrolyte, provoquant des fuites de potentiel.

Le couplage entre l'électrode et le neurone est représenté par la résistance de jointure R_{seal} . Ce couplage dépend fortement de ces fuites de potentiel : plus la distance séparant le neurone et l'électrode est grande, plus les fuites sont importantes, et plus le couplage, donc R_{seal} , est faible.

Je détaille dans la suite de ce chapitre, les calculs et les valeurs numériques pour ces quatre éléments parasites [C_{I-EE} , R_{I-EE} , C_{I-MbE} et R_{seal}] appuyés sur les travaux de Borkholder (1998), Franks *et al* (2005), Joye *et al* (2008) et Massobrio *et al* (2007). Le Tableau 2-7 donne le résumé de ces paramètres.

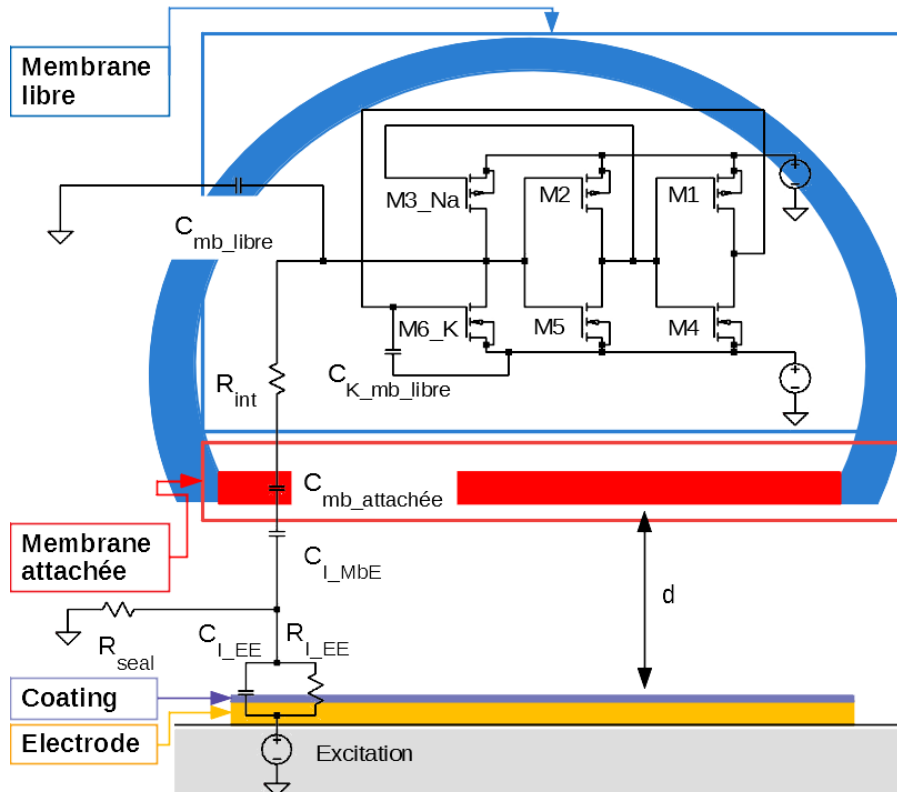


Figure 2-3 : Modèle du circuit équivalent d'un neurone vivant interfacé avec une électrode

Le neurone est séparé en deux parties de membrane. La membrane libre est représentée par un modèle électrique de neurone et la membrane attachée, considérée passive, par sa capacité équivalente ; les deux parties de membrane sont reliées par la résistance R_{int} équivalente du cytosol. Ce modèle intègre les parasites représentés par les interfaces entre l'électrode métallique recouverte de *coating* et l'électrolyte, l'interface entre l'électrolyte et la membrane attachée ainsi que la distance « d » entre l'électrode et la membrane attachée.

2.3.2 Définition des 3 éléments constituant l'interface

2.3.2.1 Résistance de jointure « R_{seal} »

L'électrode et la membrane attachée sont séparées par une fente d'épaisseur « d » de l'ordre de la centaine de nanomètres (Braun & Fromherz, 1998; Massobrio *et al.*, 2007; Thakore *et al.*, 2012), remplie d'électrolyte. Cette couche d'électrolyte entre l'électrode et le neurone entraîne une connexion entre l'électrode et le bain d'électrolyte complet, provoquant des fuites de potentiel. Plus la distance séparant le

neurone et l'électrode est petite, plus les fuites sont faibles et plus le couplage entre le neurone et l'électrode est important. Ce couplage est représenté par la résistance de jointure « R_{seal} », exprimée en fonction de la distance « d ». Plus « d » est petit, plus le couplage est élevé, et plus R_{seal} est grand. Cette résistance de jointure R_{seal} est compliquée à modéliser. Les approches proposées dans la littérature par Borkholder, (1998); Joye *et al.*, (2008); Massobrio *et al.*, (2007) sont investiguées, mais certaines ne sont pas transférables à notre modèle. Pour les simulations, une valeur de $R_{seal} = 3,1 \cdot 10^7 \Omega$ a été retenue, qui se situe dans une plage raisonnable de valeurs en lien avec la littérature. L'ensemble des valeurs de R_{seal} sont présentées dans le Tableau 2-7. La suite de ce paragraphe propose l'investigation des différentes solutions proposées dans la littérature et le calcul de la valeur de R_{seal} retenue pour les simulations.

3.2.1.1 Calcul de R_{seal} d'après la méthode proposée par Borkholder, (1998)

Borkholder, (1998) propose une équation permettant de calculer R_{seal} pour un neurone de rayon « r_1 » centré au-dessus d'une électrode de rayon « r_0 », les deux étant uniformément séparés d'une distance « d » (Figure 2-4). La résistance « R » de l'anneau d'électrolyte que le courant traverse en partant de l'électrode vers le bain d'électrolyte peut être estimée en utilisant l'Équation 2-5, où $\sigma_{electrolyte} = 0,72 \Omega m$ est la résistivité de l'électrolyte, « L » est la longueur d'électrolyte que le courant de fuite traverse et « A » est la section à travers laquelle le courant fuit. « A » est donc égal au périmètre de l'électrode multiplié par la distance « d ».

$$R = \frac{\rho_{electrolyte} \cdot L}{A}$$

Équation 2-5 : Résistance de l'anneau d'électrolyte. (Borkholder, 1998).

La longueur « L » représente la distance entre le bord de l'électrode et le bord extérieur du neurone la recouvrant. La résistance R_{seal} est alors calculée en intégrant l'Équation 2-5 en fonction de la distance entre le bord extérieur de l'électrode de rayon « r_0 » et le bord extérieur de la cellule recouvrant l'électrode, de rayon « r_1 ». Cette intégration est présentée par l'Équation 2-6 :

$$R_{seal} = \int_{r_{microel}}^{r_{neurone}} \frac{\rho_s}{2 \cdot \pi \cdot r \cdot d} \cdot dr$$

$$= \frac{\rho_s}{2 \cdot \pi \cdot d} \cdot \ln \frac{r_{neurone}}{r_{microel}}$$

Équation 2-6 : Résistance de jointure R_{seal} . (Borkholder, 1998).

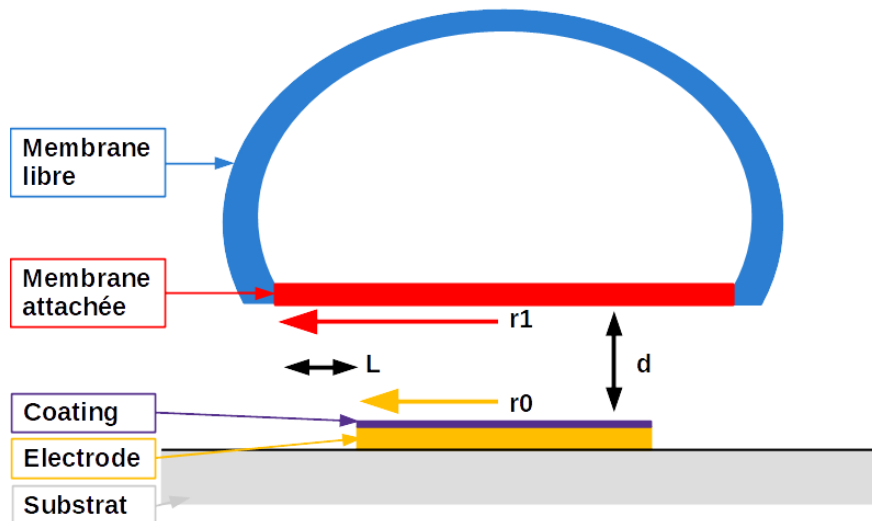


Figure 2-4 : Représentation schématique du calcul de R_{seal} d'après Borkholder, (1998)

Cette représentation de la résistance de jointure R_{seal} n'est pas compatible avec notre modèle de membrane neuronale couplé à une électrode. En effet, notre modèle de membrane a été séparé en deux parties : la membrane libre et la membrane attachée. La membrane attachée représente la partie de la membrane qui est en regard de l'électrode, et toutes les deux sont de même surface. La membrane attachée et l'électrode étant deux disques de même surface, leurs rayons sont égaux, soit $r_{microel} = r_{neurone}$. Il est alors impossible de réaliser l'intégration proposée par l'Équation 2-6. Pour cela, il faudrait ajouter un « coefficient d'écrasement » du neurone permettant de quantifier la distance entre le bord externe de l'électrode et le bord externe de la cellule neuronale la recouvrant.

Dans cette publication, Borkholder, (1998) propose des valeurs de résistance de jointure en fonction de la distance « d » entre le neurone et l'électrode telles que $800K\Omega \leq R_{seal} \leq 80M\Omega$ et $100nm \geq d \geq 1nm$. Ces écarts constituent les bornes des plages acceptables de résistance de jointure R_{seal} et de distance « d » séparant le neurone et l'électrode.

3.2.1.2 Calcul de R_{seal} d'après la méthode proposée par Massobrio et al., (2007)

D'après la définition proposée par Massobrio *et al.*, (2007), R_{seal} modélise la force avec laquelle le neurone est attaché à l'électrode, c'est à dire le couplage entre le neurone et l'électrode. Donnée par l'Équation 2-7, R_{seal} est calculée par le rapport de la résistivité de l'électrolyte « $\rho_{electrolyte}$ » sur la distance « d », pondéré par un coefficient de recouvrement « δ ». La résistivité de l'électrolyte considérée est celle de la solution saline ($\rho_{electrolyte} = 0,7 \Omega m$) et la distance séparant le neurone de l'électrode est $d=70nm$.

$$R_{seal} = \frac{\rho_{\text{électrolyte}}}{d} \cdot \delta$$

Équation 2-7 : Résistance de jointure R_{seal} . (Massobrio *et al.*, 2007).

Ce coefficient de recouvrement δ représente la surface de contact entre le neurone et l'électrode. Il est exprimé par un rapport de surfaces qui est pondéré par un facteur de contact sans dimension lié à la géométrie du neurone ($\eta_{neurone}$) ou de la microélectrode ($\eta_{microel}$) (Équation 2-8 et Équation 2-9). Les surfaces à considérer sont $A_{neurone}$ et $A_{microelec}$. Le choix de la formule dépend de la condition $A_{neurone} > A_{microelec}$ ou inversement.

$$\delta = \frac{\eta_{neurone} \cdot A_{neurone}}{A_{microel}}$$

pour $A_{neurone} \leq A_{microel}$

Équation 2-8 : Coefficient de recouvrement si la surface du neurone est inférieure ou égale à la surface de la microélectrode (Massobrio *et al.*, 2007).

$$\delta = \frac{\eta_{microel} \cdot A_{microel}}{A_{neurone}}$$

pour $A_{neurone} > A_{microel}$

Équation 2-9 : Coefficient de recouvrement si la surface du neurone est supérieure à la surface de la microélectrode. (Massobrio *et al.*, 2007).

Massobrio *et al.*, (2007) donnent des valeurs de résistance de jointure en fonction de la distance « d » séparant le neurone et l'électrode telles que $900K\Omega \leq R_{seal} \leq 20M\Omega$ et $389nm \geq d \geq 17,5nm$. En considérant une électrode de surface $707\mu m^2$ et un neurone de surface $353,5\mu m^2$ séparés par une distance $d=70nm$, Massobrio *et al.*, (2007) donnent d'après les Équation 2-7 et Équation 2-8 une résistance de jointure $R_{seal}=5M\Omega$.

Notre approche de la modélisation d'une membrane neuronale couplée à une électrode impose d'avoir une surface d'électrode et de membrane attachée égales, tel que $A_{neurone} = A_{microel}$. Par conséquent, le coefficient de recouvrement δ doit alors être calculé avec l'Équation 2-8, ce qui mène logiquement à $\delta=1$. Cela implique une simplification du calcul de R_{seal} , qui ne dépend alors plus que de la résistivité de l'électrolyte et de la distance séparant le neurone et l'électrode.

Ce calcul de la résistance de jointure est compatible avec notre approche de la modélisation de l'interface entre une électrode et un neurone. Le résultat du calcul de la résistance de jointure donne $R_{seal}=10M\Omega$ pour une distance $d=70nm$ et d'après les Équation 2-7 et Équation 2-8. Cette résistance de jointure est cohérente avec les ordres de grandeur présentés par Borkholder, (1998)et Massobrio *et al.*, (2007).

3.2.1.3 Calcul de R_{seal} d'après la méthode proposée par Joye *et al.*, (2008)

Neil Joye *et al.*, (2008) expriment R_{seal} en fonction de la résistivité de la solution « $\rho_{\text{électrolyte}}$ », de la distance « d » séparant l'électrode du neurone et d'un facteur de correction « θ » liée à la géométrie (Équation 2-10). Cette publication présente R_{seal} pour les éléments suivants : une cellule de $10\mu m$ de diamètre recouvre une électrode de $5\mu m$ de diamètre, les deux étant écartées d'une distance $d=70nm$. La résistivité de

l'électrolyte est $\rho_{\text{électrolyte}} = 1 \Omega\text{m}$, et le facteur de correction est $\theta=5,78$ ($5 \leq \theta \leq 8$). La surface de l'électrode n'entre pas dans le calcul de R_{seal} par l'Équation 2-10. Elle est peut-être contenue dans le facteur θ , mais ce n'est pas explicite.

$$R_{\text{seal}} = \frac{\rho s}{\theta \cdot \pi \cdot d}$$

Équation 2-10 : Résistance de jointure R_{seal} . (Joye *et al.*, 2008).

Ce calcul de R_{seal} est compatible avec notre approche de la modélisation d'une membrane neuronale couplée à une électrode. D'après cette Équation 2-10 et d'après les paramètres décrits dans la publication, $R_{\text{seal}} = 787\text{K}\Omega$. Cette résistance de jointure est pessimiste mais reste dans les ordres de grandeur présentés par Borkholder, (1998) et Massobrio *et al.*, (2007).

3.2.1.4 Calcul de R_{seal} utilisé dans le modèle de membrane neuronale couplé à une électrode

La résistance de jointure R_{seal} dépend fortement de la distance « d » séparant le neurone et l'électrode. Cette distance est très difficilement accessible à la mesure et peut varier du nanomètre à la centaine de nanomètre (Borkholder, 1998; Massobrio *et al.*, 2007) ; la littérature admettant une valeur moyenne $d=70\text{nm}$. Il est alors difficile de calculer une valeur exacte de R_{seal} . Pour chacun des modèles de résistance de jointure présentés par les Équation 2-6 Équation 2-7 et Équation 2-10, une valeur numérique de R_{seal} est calculée selon notre approche de l'interface entre un neurone et une électrode, à savoir $A_{\text{neurone}} = A_{\text{microel}}$, et pour cette distance $d = 70\text{nm}$. Ces valeurs de R_{seal} sont présentées dans le Tableau 2-4.

	Publication de référence			
	Borkholder, (1998)	Massobrio <i>et al.</i> , (2007)	Franks <i>et al.</i> , (2005)	Joye <i>et al.</i> , (2008)
$R_{\text{seal}} [\Omega]$	$8 \cdot 10^5 \leq R_{\text{seal}} \leq 8 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$		$7,9 \cdot 10^5$

Tableau 2-4 : Valeurs de résistance de jointure « R_{seal} » calculées d'après les Équation 2-6 à Équation 2-10

2.3.2.2 Capacité d'interface C_i - Interface électrode / électrolyte

Nous avons vu que l'électrode et la partie attachée de la membrane du neurone sont séparées par une couche d'électrolyte. Entre la surface de l'électrode recouverte de *coating* et l'électrolyte ainsi qu'entre la membrane attachée et de l'électrolyte, il se crée une interface capacitive (Borkholder, 1998; Merrill *et al.*, 2005). Lorsqu'un solide est plongé dans un électrolyte, des phénomènes d'oxydo-réduction à sa surface entraînent un échange d'électrons entre le solide et l'électrolyte. Le champ électrique généré par ce flux d'électrons polarise les dipôles formés par les molécules d'eau, qui viennent se plaquer contre la surface du solide et forment une couche d'hydratation appelée « Outer Helmholtz Plane (OHP) » (Figure 2-5), agissant comme un diélectrique. Cette OHP se comporte alors comme une capacité C_H , décrite par

l'Équation 2-11, pour laquelle ϵ_0 est la permittivité du vide, ϵ_r est la permittivité de l'électrolyte et d_{OHP} est l'épaisseur de cette couche d'hydratation.

$$C_H = \frac{(\epsilon_0 \cdot \epsilon_r)}{d_{OHP}}$$

Équation 2-11 : Capacité de double couche à l'interface électrode/électrolyte. (Borkholder, 1998)

Au-delà de cette OHP, une couche de diffusion est formée par un nuage d'ions de concentration décroissante (Figure 2-5). L'épaisseur de cette couche de diffusion est donnée par le calcul de la longueur de Debye L_D , décrite par l'Équation 2-12. Elle dépend de la tension thermique V_t , du nombre d'ions en solution n^0 (en ions/litre) et de la valence des ions z ; q étant la charge élémentaire.

$$L_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot V_t}{2 \cdot n^0 \cdot z^2 \cdot q}}$$

Équation 2-12 : Longueur de Debye. (Borkholder, 1998)

Cette couche de diffusion se comporte également comme une capacité, appelée C_G . Lorsque la capacité de cette couche de diffusion est calculée pour une électrode polarisée à un potentiel V_0 , cette capacité devient dépendante du potentiel appliqué. Elle est alors décrite par l'Équation 2-13.

$$C_G = \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r}{L_D} \cdot \cosh\left(\frac{z \cdot V_0}{2 \cdot V_t}\right)$$

Équation 2-13 : Capacité de la couche de diffusion à l'interface électrode/électrolyte. (Borkholder, 1998 ; Franks *et al.*, 2005).

La capacité d'interface C_I totale (Équation 2-14) est alors calculée en mettant en série les capacités C_H et C_G (Figure 2-5) :

$$\frac{1}{C_I} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_G}$$

Équation 2-14 : Capacité d'interface

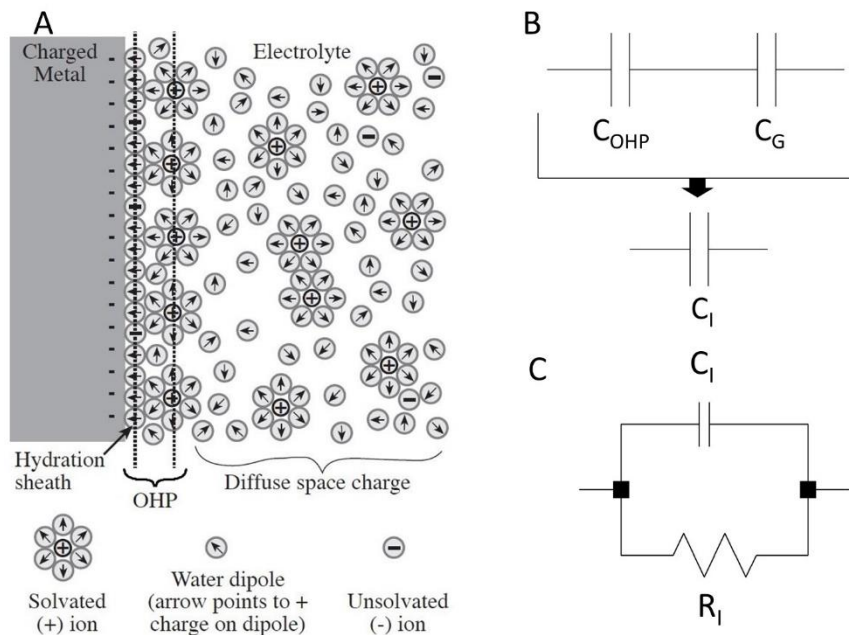


Figure 2-5 : A : Représentation schématique d’une interface électrode - électrolyte (Adapté de: Borkholder, 1998). B : Capacité équivalente de l’interface solide - électrolyte. C : Modèle du circuit équivalent de l’interface solide – électrolyte

2.3.2.3 Résistance d’interface R_i

Dans le cas de l’interface entre une électrode et un électrolyte, lorsque l’électrode est polarisée avec une tension suffisamment élevée, un transfert d’électron peut avoir lieu entre l’électrode et l’électrolyte ; un courant traverse alors l’interface. Il faut alors ajouter une résistance en parallèle de la capacité d’interface C_1 . Cette résistance est décrite par l’Équation 2-15. Cette résistance d’interface dépend de la tension thermique V_T , de la valence des ions z et de la densité de courant d’échange J_0 . Cette densité de courant d’échange J_0 dépend du matériau de l’électrode, et de l’électrolyte.

$$R_i = \frac{V_T}{J_0 \cdot z}$$

Équation 2-15 : Résistance de transfert de charges. (Borkholder, 1998).

2.3.3 Capacités et résistances de l’interface, normalisées au μm^2 : C_{I-EE} , R_{I-EE} et C_{I-MbE}

Pour établir le modèle de membrane interfacé avec une électrode (Figure 2-3) et pouvoir faire évoluer la surface de l’électrode et des membranes attachées et libres en fonction du ScalingFactor, il convient de définir des valeurs numériques normalisées. Ce choix a été retenu pour la capacité C_{I-EE} et la résistance R_{I-EE} à

l'interface électrode/électrolyte ainsi que la capacité C_{I-MbE} à l'interface membrane attachée/électrolyte.

Toutes les solutions proposées par les différents auteurs (Borkholder, 1998; Franks *et al.*, 2005; Joye *et al.*, 2008; Massobrio *et al.*, 2007) sont évaluées numériquement dans la suite de ce travail afin de créer le modèle de membrane interfacé avec une électrode.

Les constantes utilisées pour le calcul de la capacité C_{I-EE} et la résistance R_{I-EE} d'interface électrode/électrolyte sont rassemblées dans le Tableau 2-5 :

		Publication de référence	
		Borkholder, 1998	Franks <i>et al.</i> , 2005
Permittivité du vide	[F.m ⁻¹] ₀	8,850.10 ⁻¹²	
Permittivité relative (solution saline physiologique @ 25°C)	_r	78,50	78,00
Epaisseur de l'OHP	[Å] _{OHP}	5,00	5,00
Valence des ions en solution		1,00	4,00
Nombre d'ions en solution	[ions/m ³] ₀	9,30.10 ²⁵	9,30.10 ²⁵
Tension appliquée sur l'électrode	[mV] ₀	50	
Tension thermique	[V] _t	0.0259	
Charge de l'électron	[C]	1,609.10 ⁻¹⁹	
Densité de courant d'échange (Pt, hydrogen reaction)	[A/cm ²] ₀	8,0.10 ⁻⁴	

Tableau 2-5 : Constantes utilisées pour les calculs de la capacité et la résistance d'interface (C_{I-EE} et R_{I-EE}) normalisés au μm^2

Les Équation 2-11 à Équation 2-15 et le Tableau 2-5, permettent d'obtenir des valeurs numériques et normalisées au μm^2 pour la capacité d'interface C_{I-EE} (pF/ μm^2) et la résistance d'interface R_{I-EE} ($\Omega.\mu\text{m}^2$).

2.3.3.1 Valeurs de C_{I-EE} normalisées au μm^2

A partir des Équation 2-11 à Équation 2-14 et du Tableau 2-5, les différentes valeurs de capacité d'interface entre la membrane neuronale et l'électrolyte sont évaluées comme suit : $C_{I-EE} = 0,684\text{pF}/\mu\text{m}^2$ d'après le modèle décrit par Borkholder (1998), et $C_{I-EE} = 1,36\text{pF}/\mu\text{m}^2$ d'après le modèle décrit par Franks *et al.*, (2005). Par ailleurs, Franks *et al.* donnent dans cette même publication une valeur théorique de capacité d'interface tel que $C_{I-EE} = 0,545\text{pF}/\mu\text{m}^2$. Pour évaluer toutes les solutions numériques, une valeur moyenne de ces capacités d'interface est établie. Cette moyenne sera intégrée au modèle pour représenter le paramètre d'interface C_{I-EE} .

2.3.3.2 Valeurs de R_{I-EE} normalisées au μm^2

A partir de l'Équation 2-15 et du Tableau 2-5, nous pouvons évaluer les valeurs de résistance de transfert de charge à l'interface électrode/électrolyte. Déterminée d'après les constantes données par Borkholder (1998), cette valeur est $R_{I-EE} = 3,24.10^9 \Omega\mu\text{m}^2$. Dans la publication de Franks *et al.*, (2005), utilisée pour la création du modèle de membrane neuronale interfacé avec une électrode, une valeur de résistance de transfert de charge issue de la littérature est donnée, telle que $R_{I-EE} = 3,0.10^9 \Omega\mu\text{m}^2$. Par ailleurs, la publication proposée par Joye *et al.*, (2008), renvoie vers celle de Franks *et al.*, (2005) pour les calculs de la capacité et la résistance d'interface entre l'électrode et l'électrolyte.

2.3.3.3 Valeurs de C_{I-MbE} normalisées au μm^2

La publication de Massobrio *et al.*, (2007) donne une valeur de capacité d'interface membrane/électrolyte $C_{I-MbE} = 17,45\text{pF}$ pour une surface de contact de $353,5\mu\text{m}^2$. La normalisation par unité de surface de cette capacité conduit à $C_{I-MbE} = 0,0494 \text{pF}/\mu\text{m}^2$.

2.3.3.4 Valeurs de C_{I-EE} , R_{I-EE} et C_{I-MbE} normalisées au μm^2 .

Toutes les grandeurs caractéristiques du modèle représentées sur la Figure 2-3 sont évaluées et quantifiées à ce stade. Les valeurs numériques normalisées par unité de surface des capacités et résistances de l'interface entre l'électrode ou la membrane attachée et l'électrolyte sont regroupées dans le Tableau 2-6. Le couplage entre l'électrode et la membrane neuronale est donc fortement capacitif.

		Publication de référence			
		(Borkholder, 1998)	(Massobrio <i>et al.</i> , 2007)	(Franks <i>et al.</i> , 2005)	(Joye <i>et al.</i> , 2008)
C_{I-EE} (area independent value)	[pF/ μm^2]	0,684		1,36 0,545	1,36 0,545
R_{I-EE} (area independent value)	[$\Omega.\mu\text{m}^2$]	$3,24.10^9$		$3,0.10^9$	$3,0.10^9$
C_{I-MbE} (area independent value)	[pF/ μm^2]		$49,4.10^{-3}$		

Tableau 2-6 : Capacités et résistances d'interfaces (C_{I-EE} , R_{I-EE} et C_{I-MbE}) normalisées au μm^2

2.3.4 Dimensionnement du modèle pour la simulation

Après ce travail de définition des grandeurs caractéristiques, il convient d'implémenter le modèle sous le logiciel LTspice. Ce logiciel est utilisé pour réaliser un ensemble de simulation dont le but est de déterminer la forme et la tension des signaux permettant de stimuler la membrane neuronale au travers de l'électrode.

Lors de la construction du modèle de neurone interfacé avec une électrode, j'ai établi un facteur de mise à l'échelle (ScalingFactor) permettant de calculer la surface

de l'électrode et la surface de la membrane attachée, en fonction de la surface totale de la membrane d'une cellule PC-12. Pour ce modèle, un cas favorable est considéré. L'électrode représente 30% de la surface totale d'une cellule PC-12 et une forte adhésion entre l'électrode et le neurone est considérée, avec une distance $d=15\text{nm}$.

Dans la partie 2.2.3.2 de ce chapitre furent présentées les règles de mise à l'échelle. La taille des transistors et capacités constituant le modèle de membrane interfacé avec une électrode sont maintenant adaptées en fonction du ScalingFactor. Les valeurs des paramètres nécessaires au dimensionnement des surfaces de l'électrode, de la membrane attachée et de la membrane libre sont données dans le Tableau 2-2. Les valeurs numériques des éléments constituant le modèle électrique implanté sous SPICE pour un ScalingFactor=0,3 sont donnés dans le Tableau 2-3.

Les valeurs de la résistance de jointure R_{seal} ont été déterminées d'après un ensemble de méthodes de calculs issues du corpus de documents de l'état de l'art. Les ordres de grandeur établis avec ces différents modèles pour une distance $d=70\text{nm}$ sont présentés dans le Tableau 2-4. Ces calculs de R_{seal} sont maintenant appliqués à notre modèle pour une distance $d=15\text{nm}$ simulant une forte adhésion entre le neurone et l'électrode, tout en restant cohérent avec les données présentées par Borkholder, (1998) et Massobrio *et al.*, (2007). D'après les calculs présentés par Massobrio *et al.*, (2007) et représentés par l'Équation 2-7, $R_{\text{seal}} = 4,7 \cdot 10^7 \Omega$, tandis que d'après les calculs présentés par Joye *et al.*, (2008) et représentés par l'Équation 2-10, $R_{\text{seal}} = 3,7 \cdot 10^6 \Omega$. Les valeurs de résistance de jointure présentées par Joye étant pessimistes en comparaison des plages de valeurs présentées par Borkholder, (1998) et Massobrio *et al.*, (2007), l'ordre de grandeur choisi pour représenter R_{seal} dans la simulation SPICE est $R_{\text{seal}} = 3,1 \cdot 10^7 \Omega$. La valeur de R_{seal} ainsi obtenue simule un cas favorable, mais cohérent avec les ordres de grandeurs disponibles dans la littérature. L'ensemble de ces valeurs de R_{seal} sont reprises dans le tableau récapitulatif Tableau 2-7.

Les valeurs numériques des capacités et résistances de l'interface électrode/membrane attachée C_{I-EE} , R_{I-EE} et C_{I-MbE} ont été déterminées d'après les méthodes de calcul issues du corpus de documents de l'état de l'art. Ces méthodes de calculs diffèrent pour chacune des publications. Pour évaluer toutes les solutions numériques, les valeurs de ces résistances et capacités d'interface sont calculées pour chacune de ces méthodes (Équation 2-11 à Équation 2-15) et les résultats sont présentés sur le Tableau 2-6. Ces calculs sont maintenant appliqués à notre modèle de neurone interfacé avec une électrode, dimensionné d'après un ScalingFactor=0,3. Pour chaque paramètre, une moyenne des résultats issus des différentes méthodes de calcul est effectuée, et chaque paramètre sera intégré au modèle d'après sa valeur moyenne. Ces résistances et capacité de l'interface C_{I-EE} , R_{I-EE} et C_{I-MbE} sont présentées dans le Tableau 2-7.

	Publication de référence				Valeur retenue pour le modèle
	(Borkholder, 1998)	(Massobrio <i>et al.</i> , 2007)	(Franks <i>et al.</i> , 2005)	(Joye <i>et al.</i> , 2008)	
$R_{\text{seal}} (\Omega)$	$8.10^5 \leq R_{\text{seal}} \leq 8.10^7$	$4,7.10^7$		$3,7.10^6$	$3,1.10^7$
$C_{\text{I-EE}} (\text{F})$	$6,45.10^{-11}$		$1,28.10^{-10}$ $5,14.10^{-11}$	$1,28.10^{-10}$ $5,14.10^{-11}$	$8,47.10^{-11}$
$R_{\text{I-EE}} (\Omega)$	$2,06.10^7$		$3,18.10^7$	$3,18.10^7$	$2,81.10^7$
$C_{\text{I-MbE}} (\text{F})$		$4,66.10^{-12}$			$4,66.10^{-12}$

Tableau 2-7 : Valeurs numériques des paramètres de l'interface entre l'électrode et la membrane attachée et moyennes implémentées dans le modèle d'interface entre une électrode et une membrane neuronale

Les calculs sont effectués pour une cellule PC-12 de 10 μm de diamètre, un ScalingFactor = 0,3 et une distance séparant l'électrode et le neurone $d=15\text{nm}$.

2.3.5 Conclusion de la création de la modélisation

Cette modélisation de l'interface entre une membrane neuronale et une électrode est une base de travail qu'un ensemble de caractérisations expérimentales viendront consolider. Bien que perfectible, l'exploitation de ce modèle nous permet d'ores et déjà d'orienter les expérimentations biologiques, notamment de déterminer l'amplitude, la fréquence et l'allure des signaux d'excitation. En retour, ces mêmes expérimentations permettront d'affiner les paramètres du modèle. L'objectif est de faire converger la modélisation et les expérimentations pour obtenir un modèle prédictif.

2.4 Définition d'un spike et indicateurs permettant de qualifier la réponse du modèle

Dérivé du modèle de neurone (Figure 2-1), le modèle de membrane neuronale couplé à une électrode répond à une stimulation en émettant un spike. Cette particularité est exploitée pour détecter la réponse du modèle à une stimulation au travers de l'électrode et de l'interface entre l'électrode et la membrane attachée : si un spike est détecté lorsque le modèle est soumis à une stimulation, alors le modèle a répondu à cette stimulation comme un neurone vivant le ferait. Si le modèle réagit mais que la forme du signal issu de la membrane neuronale ne correspond pas à un spike, alors la réponse du modèle n'est pas considérée comme une réponse cohérente avec celle d'un neurone vivant.

Afin d'analyser les réponses issues du modèle Spice de membrane neuronale interfacée avec une électrode, il est nécessaire de définir des indicateurs pertinents et fiables au niveau de la réponse de la membrane. Il faut que le signal soit un spike afin

d'affirmer que la réponse a du sens et de la cohérence avec les expérimentations faites sur les neurones vivants. Il convient de définir un gabarit de réponse correspondant au mécanisme réel de la génération d'un potentiel d'action : ouverture et fermeture des canaux ioniques voltage-dépendants, courants sodique et potassique, amplitude de la tension de membrane, ... Ce travail est présenté dans la suite du chapitre.

2.4.1 Définition d'un spike

Succinctement décrit dans le Chapitre 1, §1.4 (Figure 1-11 & Figure 1-12), nous apportons ici des précisions sur l'évolution du potentiel et des courants transmembranaires conduisant à l'émission d'un potentiel d'action. Au repos, la membrane neuronale est soumise à une différence de potentiel (ddp) de -60mV , liée à la répartition inégale des ions dans le milieu intracellulaire et extracellulaire (0, Tableau 1-1). Lorsque le seuil de dépolarisation est atteint suite à une stimulation, physiologique ou artificielle, les canaux sodiques transmembranaires voltage-dépendant s'ouvrent, entraînant un flux entrant d'ions sodium (Na^+). En conséquence de ce flux entrant d'ions Na^+ , le potentiel transmembranaire (V_{mem}) augmente jusqu'à atteindre le potentiel d'équilibre pour les ions Na^+ , environ 50mV . Ce flux d'ions Na^+ , particules électriquement chargées, génère un courant transmembranaire I_{Na} . Cette phase de potentiel ascendant correspond à la dépolarisation de la membrane. En conséquence de cette augmentation de la ddp transmembranaire, les canaux sodiques transmembranaire voltage-dépendants se ferment progressivement, tandis que les canaux potassiques transmembranaire voltage-dépendants s'ouvrent. Le phénomène inverse a alors lieu : les ions potassium (K^+) sortent massivement de la cellule, entraînant une baisse du potentiel transmembranaire jusqu'à ce que le potentiel d'équilibre soit atteint pour les ions K^+ , environ -70mV . Ce flux d'ions K^+ génère l'apparition du courant transmembranaire I_{K} . Cette phase de potentiel décroissant correspond à la repolarisation de la membrane. Les pompes ioniques transmembranaires rétablissent ensuite les gradients de concentration ioniques, ramenant la ddp transmembranaire à son potentiel de repos. L'évolution des courants transmembranaires I_{Na} , I_{K} et du potentiel transmembranaire V_{mem} sont représentés sur la Figure 2-6.

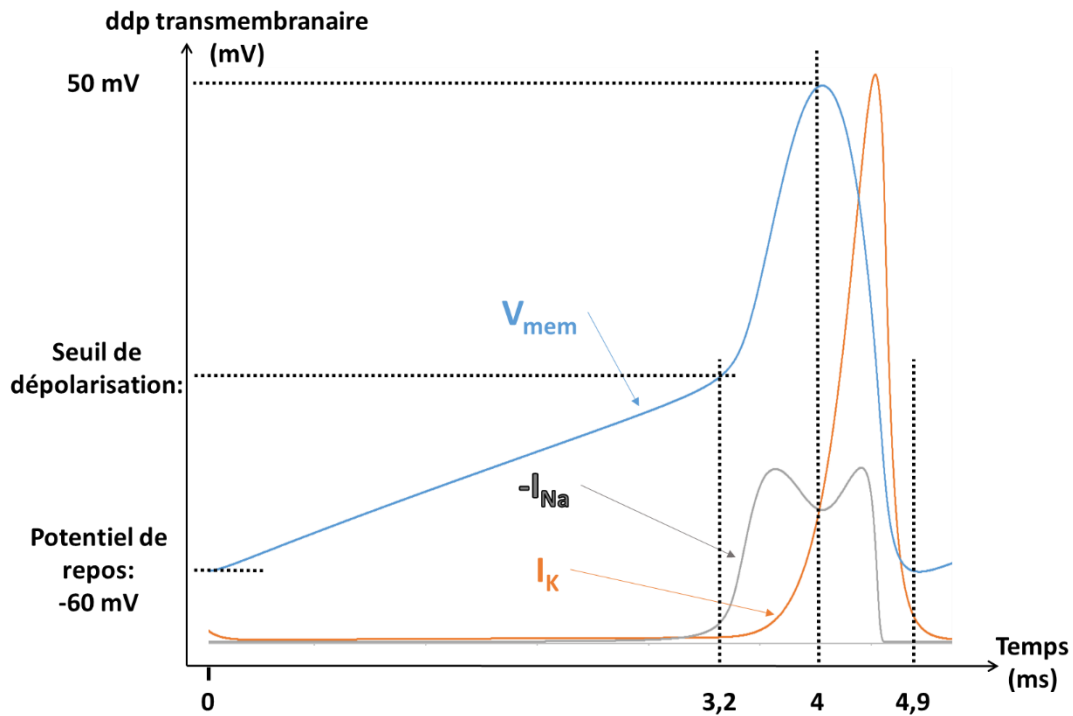


Figure 2-6 : Evolution du potentiel transmembranaire (V_{mem}) et des courants transmembranaires (I_{Na} et I_K) au cours d'un potentiel d'action

La courbe orange représente l'évolution du courant transmembranaire potassique. La courbe grise représente l'évolution de l'opposé du courant transmembranaire sodique. La courbe bleue représente l'évolution de la tension membranaire.

2.4.2 Indicateurs permettant de qualifier un spike

Pour être en mesure de détecter un potentiel d'action parmi les réponses du modèle, un ensemble d'indicateurs : permettant sont identification sont définis en cohérence avec la définition du spike. Représentés sur la Figure 2-7, ils ont été définis comme suit :

- Tension maximale du spike [V_{mem_MAX}]
- Amplitude de la tension du spike [V_{mem}].
- Durée du spike à la moitié de son amplitude [$\Delta t_{V_{mem}/2}$].
- Amplitude des courants I_{Na} [I_{Na}] et I_K [I_K].
- Décalage temporel entre le maximum d'amplitude du spike et l'intersection des courants I_K et I_{Na} [$\Delta t_{V_{mem_MAX}|t_{I_{Na}|I_K}}$].

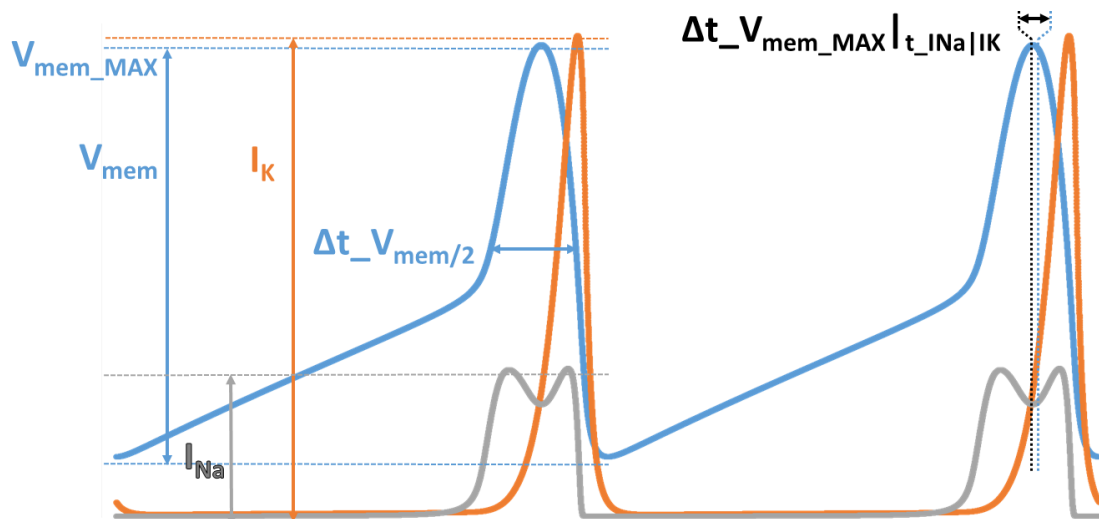


Figure 2-7 : Représentation des indicateurs permettant d'affirmer que la réponse à une stimulation est effectivement un spike et non un artéfact de simulation

La courbe orange représente l'évolution du courant transmembranaire potassique. La courbe grise représente l'évolution de l'opposé du courant transmembranaire sodique. La courbe bleue représente l'évolution de la tension membranaire.

Le gabarit utilisé pour définir une valeur à chacun d'eux correspond à un spike biomimétique émis par le modèle standard de neurone (Figure 2-1). Pour étudier la variation de ces indicateurs en fonction de la fréquence des spikes, j'utilise la flexibilité offerte par le modèle de neurone. En faisant varier le courant de stimulation, il est possible de contrôler la fréquence des spikes émis (Tableau 2-8).

Courant de stimulation (pA)	0,25	0,28	0,50	0,63	1,00	1,22	2,00	3,00	4,00	4,13	9,00
Fréquence (Hz)	5	10	37	50	83	100	152	204	245	250	370

Tableau 2-8 : Fréquence des spikes émis par le modèle Spice de neurone biomimétique en fonction du courant de stimulation

Les relevés sont effectués pour des spikes de fréquences croissantes. Ces valeurs numériques de référence permettent de quantifier la variation des indicateurs en fonction de la fréquence des spikes. Ces références ainsi que les moyennes et les écarts-types autour de la moyenne (Tableau 2-9), sont présentées en fonction de la fréquence sur la Figure 2-8. Les valeurs moyennes de ces indicateurs peuvent être considérées comme les valeurs caractéristiques du spike gabarit.

Les indicateurs V_{mem_MAX} , V_{mem} et I_K (Figure 2-8-a-b-f) croissent linéairement en fonction de la fréquence du spike, tandis que $\Delta t_{V_{mem}/2}$ (Figure 2-8-c) décroît linéairement en fonction de la fréquence du spike. L'indicateur $\Delta t_{V_{mem_MAX} | t_{INa} | I_K}$ (Figure 2-8-d) est stable excepté en très basse fréquence, et l'indicateur I_{Na}

(Figure 2-8-e) est stable quel que soit la fréquence du spike. La mesure des variations de ces indicateurs permet d'établir les références auxquelles seront comparées les réponses issues de la modélisation du modèle de membrane interfacé avec une électrode. Cette comparaison permet de déterminer si la réponse donnée par le modèle aura du sens ou s'il s'agira d'une pseudo-réponse qui n'aurait pas de validité dans l'expérimentation avec des neurones vivants.

Indicateur			Moyenne	Ecart-type
Tension caractéristique du spike gabarit	$V_{mem_MAX_gabarit}$	[mV]	67,23	8,72
Amplitude caractéristique du spike gabarit	$V_{mem_gabarit}$	[mV]	145,77	6,64
Largeur caractéristique du spike gabarit à la moitié de son amplitude	$\Delta t_{V_{mem}/2_gabarit}$	[ms]	1,16	0,02
Décalage temporel entre le maximum d'amplitude du spike et l'intersection des courants, caractéristique du spike gabarit	$\Delta t_{V_{mem_MAX} t_{INa} I_{K_gabarit}}$	[ms]	-0,03	0,26
Amplitude caractéristique du courant sodique du spike gabarit	$I_{Na_gabarit}$	[pA]	23,23	0,05
Amplitude caractéristique du courant potassique du spike gabarit	$I_{K_gabarit}$	[pA]	75,55	5,43

Tableau 2-9 : Moyenne et écart-type des indicateurs de la validité d'un spike. Ces moyennes sont utilisées comme caractéristiques d'un spike gabarit

Je dispose maintenant d'un modèle de membrane couplé à une électrode et d'indicateurs permettant de vérifier que la réponse de ce modèle à une stimulation a du sens. Il convient dorénavant de définir les signaux permettant de stimuler ce modèle.

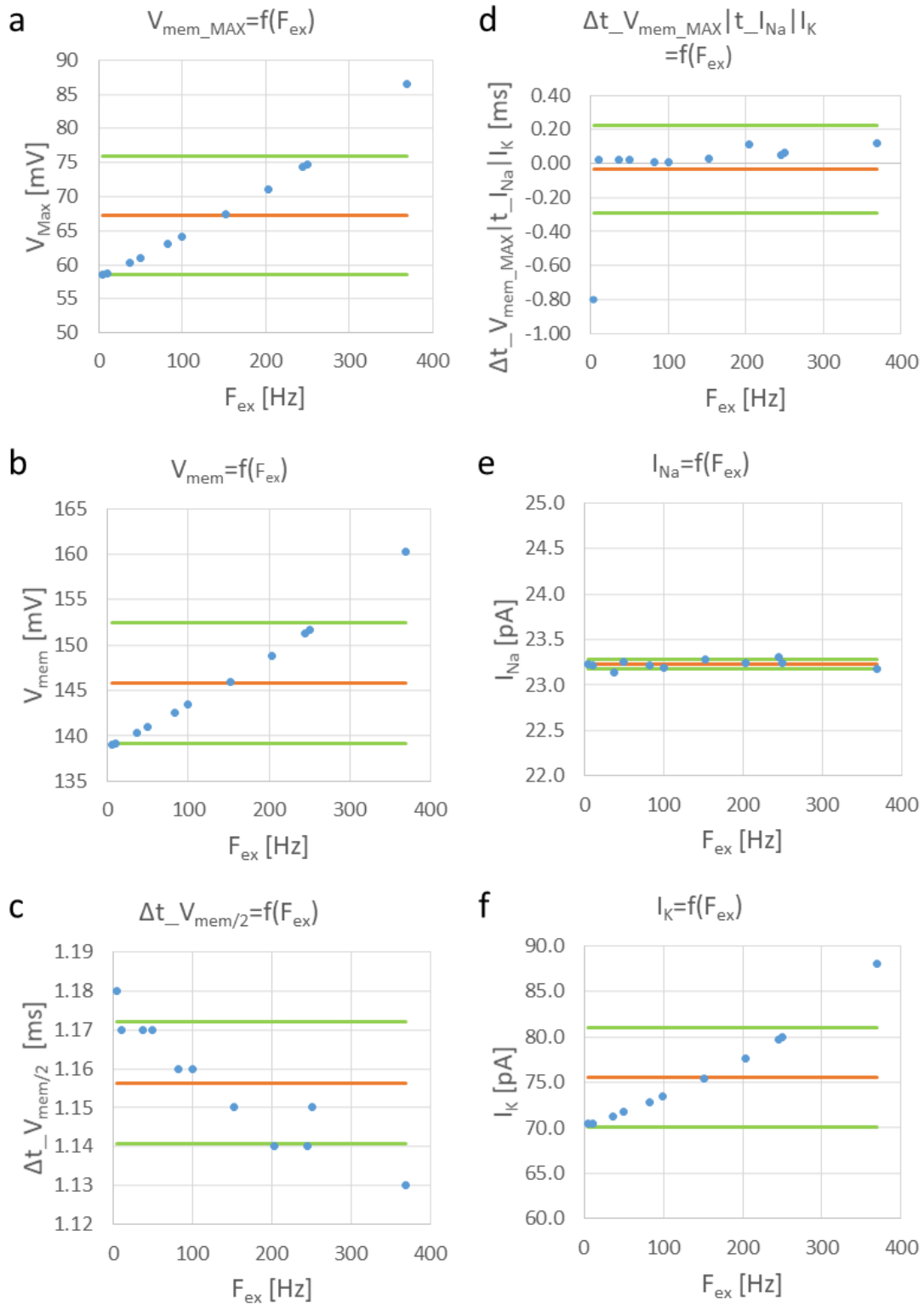


Figure 2-8 : Relevés des indicateurs en fonction de la fréquence des spikes

— Moyenne — Moy - Ecart-type — Moy + Ecart-type

a : Maximum de la tension de membrane V_{mem} . **b** : amplitude de la tension du spike. **c** : durée de la spike à la moitié de son amplitude. **d** : décalage temporel entre le maximum d'amplitude du spike et l'intersection des courants I_{K} et I_{Na} . **e** : amplitude du courant I_{Na} . **f** : amplitude du courant I_{K} .

2.5 Stimulations : signaux utilisés

Pour déterminer les signaux à appliquer lors des expériences dans le domaine du vivant, un travail d'analyse de la littérature a été conduit en tenant compte des cibles visées. Ainsi, une revue des signaux utilisés *in vitro* pour l'excitation de cellules couplées à des microélectrodes et *in vivo* dans le cadre de la DBS a orienté la définition des signaux à utiliser pour les expérimentations biologiques.

2.5.1 Revue des signaux utilisés *in vitro* et *in vivo* pour l'excitation de neurones

Une revue des signaux permettant l'excitation de neurones cultivés sur des MEA est présentée par Wagenaar *et al.*, (2004). D'après cette étude, les signaux d'excitation contrôlés en tension les plus susceptibles de déclencher un potentiel d'action sont des pulses de tension biphasiques first positive (Figure 2-9-c), c'est-à-dire des pulses de tension composés de deux phases successives : une première phase d'amplitude positive suivie d'une seconde phase d'amplitude négative. L'amplitude est comprise entre $\pm 500\text{mV}$ et $\pm 1000\text{mV}$, pour une durée totale de $1000\mu\text{s}$. Ces paramètres sont repris par Buccelli *et al.*, (2019) qui utilise des pulses biphasiques first positive d'amplitude $\pm 750\text{mV}$ d'une durée totale de $600\mu\text{s}$ ainsi que Radivojevic *et al.*, (2016), qui utilise des pulses biphasiques first positive d'amplitude $\pm 10\text{mV}$ à $\pm 1000\text{mV}$ pour une durée totale de $400\mu\text{s}$.

D'après les articles d'Eusebio *et al.*, (2011) et Little & Brown, (2012), les signaux les plus couramment utilisés dans la DBS sont des pulses de tension, d'une amplitude de 1,5V à 2V, et d'une durée de $60\mu\text{s}$. Par ailleurs, dans l'article intitulé « *Randomized, Blinded Pilot Testing of Nonconventional Stimulation Patterns and Shapes in Parkinson's Disease and Essential Tremor: Evidence for Further Evaluating Narrow and Biphasic Pulses* » Akbar *et al.*, (2016) montrent que l'utilisation de pulses biphasiques permettrait d'améliorer l'efficacité thérapeutique de la DBS. De plus, d'autres groupes étudient l'utilisation de signaux non conventionnels (gaussiennes, exponentiels, triangulaires et sinusoïdaux) dans le cadre de la DBS (Akbar *et al.*, 2016) et montrent que de nouvelles formes de signaux permettraient d'atteindre les effets thérapeutiques identiques à l'utilisation de signaux conventionnels tout en réduisant significativement la consommation énergétique. En introduisant les spikes biomimétiques comme signaux de stimulation de cellules neuronales, notre approche s'inscrit dans la continuité de ces expérimentations.

Au-delà de la forme des signaux et de leur amplitude, il est nécessaire de définir les fréquences d'excitation qui seront étudiées et utilisées. D'après les travaux de Z. Wang *et al.*, (2018), la DBS nécessite l'utilisation de signaux de fréquence supérieure à 90Hz pour atteindre une activité thérapeutique. Dans cette même publication, des signaux d'une fréquence de 200Hz sont utilisés, fréquence pour laquelle les neurones

répondent toujours aux excitations. D'après Eusebio *et al.*, (2011) et Little & Brown, (2012), la fréquence nominale des signaux utilisés en DBS est 130Hz ; 100Hz d'après Akbar *et al.*, (2016).

2.5.2 Conception et présentation des signaux d'excitation

La revue de littérature a permis de déterminer les signaux les plus fréquemment utilisés pour stimuler des neurones vivants au travers d'une électrode. Dans un contexte d'expérimentations menées *in vitro*, les signaux les plus utilisés pour stimuler des neurones cultivés sur des MEA sont des pulses biphasiques *first-positive*. Dans le contexte médical de la DBS (*in vivo*) ces signaux sont des créneaux de tension. Cependant, l'objectif du projet est d'interfacer des neurones vivants et des neurones artificiels biomimétiques, ce qui implique la stimulation de neurones vivants au moyen de spikes. Pour stimuler le modèle de membrane neuronale interfacé avec une électrode, ces trois formes de signaux, représentés sur la Figure 2-9, vont être utilisés (créneaux, pulses biphasiques *first-positive* et spikes).

Les simulations réalisées permettront de déterminer pour chaque signal appliqué à l'électrode ses caractéristiques (amplitude et fréquence) qui pourront être utilisées pour les expérimentations biologiques. Il sera ainsi possible d'analyser l'impact de la forme du signal excitateur sur la réponse du modèle de neurone vivant interfacé avec une électrode excitatrice. La fréquence et l'amplitude des stimulations font partie des variables qui peuvent influencer sur la réponse du neurone vivant. Cette étude sera présentée dans la suite de ce document. Les modifications des signaux en amplitude et en fréquence se feront avec une durée de chaque signal qui reste constante. La durée du créneau et du pulse biphasique sont fixés de façon à être cohérente avec celle du spike (1,7ms) dont les caractéristiques ont été présentés dans la partie 2.4.1 de ce chapitre.

Par ailleurs, le modèle d'interface entre l'électrode et la membrane attachée comporte les capacités C_{I-EE} et C_{I-MBE} ; cette interface est capacitive et se comporte comme un dérivateur. Or dériver des signaux présentant d'importantes discontinuités comme des pentes de coefficient quasi-infini ou changements de pente brusques (créneaux et pulses biphasiques avec discontinuités : Figure 2-9-B & D), risque de provoquer des pic de courant. Les tensions de stimulations appliquées à la membrane passant au travers de cette interface capacitive, nous souhaitons éviter ces pics de courant qui pourraient créer des artéfacts de simulation. Pour éviter ce risque, des changements de pente du créneau et du pulse biphasique sont apportées pour en adoucir les contours. Les créneaux sans discontinuités, pulses biphasiques sans discontinuités et spikes utilisés dans les simulations et les expérimentations biologiques sont présentés sur la Figure 2-9-A, C & E.

La suite de ce document présente l'étude de l'impact de la forme du signal d'excitation sur la réponse du modèle de membrane couplé à une microélectrode.

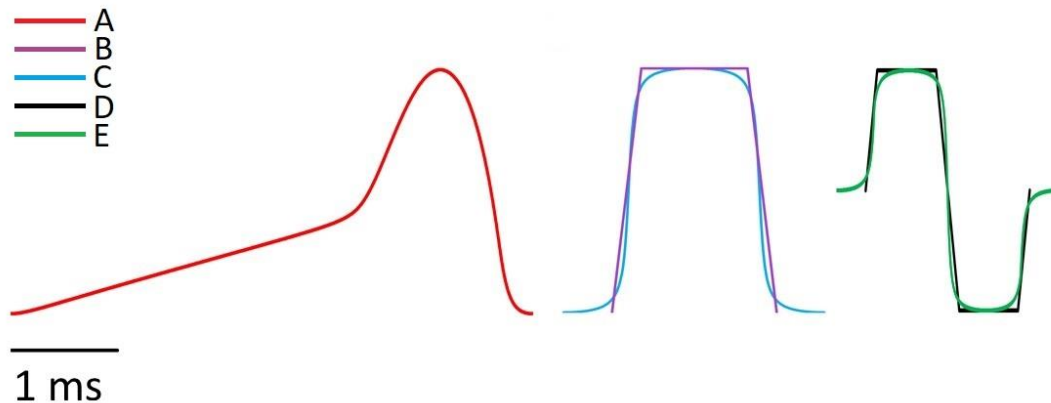


Figure 2-9 : Signaux d'excitation

A : Spike biomimétique (rouge). **B** : créneau avec discontinuités (violet) et **C** : sans discontinuités (bleu). **D** : pulse biphasique avec discontinuités (noir) et **E** : sans discontinuités (vert). Ces signaux sont utilisés lors de l'étude de l'excitabilité du modèle et de la possibilité d'intégration des signaux pour exciter le modèle électrique de neurone vivant interfacé avec une électrode.

2.6 Etude de l'excitabilité du modèle et de la possibilité d'intégration des signaux d'excitation

Après avoir établi le modèle de membrane neuronale couplé à une électrode et l'ensemble de signaux nécessaires à sa stimulation ainsi que les grandeurs caractéristiques d'un spike permettant de déterminer la validité des réponses du modèle, il convient de l'exploiter. L'étude proposée dans la suite de ce document va permettre, pour chaque forme de signal d'excitation, de déterminer la tension seuil nécessaire à la stimulation du modèle de neurone conduisant à la génération d'un spike. Une étude complémentaire permettra d'étudier un éventuel impact de la forme du signal de stimulation. Les données obtenues permettront de calibrer les signaux qui seront utilisés lors des expérimentations biologiques et d'établir des travaux de rétro-ingénierie pour améliorer la compréhension de l'ensemble.

2.6.1 Simulations – Premières validations

Chacun des signaux présentés sur la Figure 2-9 précédente sont utilisés pour stimuler le modèle de membrane, avec une amplitude appliquée qui sera croissante et une fréquence choisie constante de 200Hz. Quatre indicateurs ont été choisis pour identifier un spike parmi les réponses du modèle aux stimulations, et discriminer les réponses ayant du sens. Ces indicateurs sont l'amplitude de la tension de la membrane V_{mem} , le maximum de la tension de membrane V_{mem_MAX} et les courants transmembranaires I_{Na} et I_K .

2.6.1.1 Réponses attendues

Dans l'absolu, deux cas de figure de réponse du modèle aux stimulations sont attendus. Soit le modèle ne répond pas aux stimulations, alors V_{mem} , I_{Na} et I_{K} sont nuls et $V_{\text{mem_MAX}}$ est égal à la tension de repos, -87mV . Soit le modèle répond aux stimulations, alors un spike est observé au niveau de la tension de membrane V_{mem} . Dans ce cas, les indicateurs devront être proches des valeurs moyennes définies au préalable.

La méthode consiste à observer l'évolution de la tension de membrane et des courants en fonction de la tension V_{ex} appliquée au modèle de membrane. Au final, trois situations se distinguent après stimulation. Ces trois cas sont illustrés sur la Figure 2-10.

- Cas n°1 : Le maximum de tension de membrane $V_{\text{mem_MAX}}$ est négatif et les courants I_{Na} ou I_{K} sont de très faibles amplitudes, de l'ordre du pA ($\approx 1\text{pA}$). Cependant, V_{mem} n'est pas nulle. Cela est considéré comme une non réponse du modèle à une excitation.
- Cas n°2 : Pour certaines périodes du signal de stimulation seulement, V_{mem} est de l'ordre de la centaine de mV , $V_{\text{mem_MAX}}$ est positif et les courants I_{Na} et I_{K} sont d'amplitude élevée, de l'ordre de quelques centaines de pA ($>100\text{pA}$). Pour le reste des périodes, les conditions du premier cas sont retrouvées. Un pic de tension est observé de façon intermittente sur la tension de membrane V_{mem} .
- Cas n°3 : Pour chaque période du signal de stimulation, V_{mem} est de l'ordre de la centaine de mV , $V_{\text{mem_MAX}}$ est positif et les courants I_{Na} et I_{K} sont de l'ordre de la centaine de pA . Un pic de tension est observé sur la tension de membrane V_{mem} à l'occasion de chaque excitation appliquée.

Pour permettre une bonne compréhension des résultats, la Figure 2-10 présente les trois cas évoqués ci-dessus à savoir : pas de pics de tension pour V_{mem} (Cas 1), des pics de tension de façon régulière mais après un certain nombre de stimulation du neurone vivant (Cas 2), et un pic de tension observé de façon systématique en réponse à chaque stimulation (Cas 3). Cette Figure 2-10 montre la réponse à une excitation continue de fréquence 200Hz grâce au tracé de V_{ex} (gris), V_{mem} (marron), I_{Na} (bleu) & I_{K} (vert). Les signaux appliqués ayant entraîné ces réponses sont respectivement :

- Figure 2-10-A : Excitation par des créneaux d'amplitude V_{ex} comprise entre 0mV et 267mV . La réponse du modèle correspond au cas n°1.
- Figure 2-10-B : Excitation par des pulses biphasiques sans discontinuités d'amplitude $V_{\text{ex}} = 423\text{mV}$ ($-211,5\text{mV} / +211,5\text{mV}$). La réponse du modèle correspond au cas n°2.
- Figure 2-10-C : Excitation par des spikes d'amplitude totale $V_{\text{ex}} = 446\text{mV}$. La réponse du modèle correspond cas n°3.

Pour chaque signal de stimulation présenté Figure 2-9, les réponses du modèle de membrane sont comparées et calibrées grâce au gabarit défini par le spike biomimétique. L'ensemble des valeurs relevées sont présentées dans le Tableau 2-10. Elles seront discutées dans la suite de ce travail. Le développement de ce modèle conduit à explorer de nombreuses solutions différentes et nécessite de définir une analyse paramétrique.

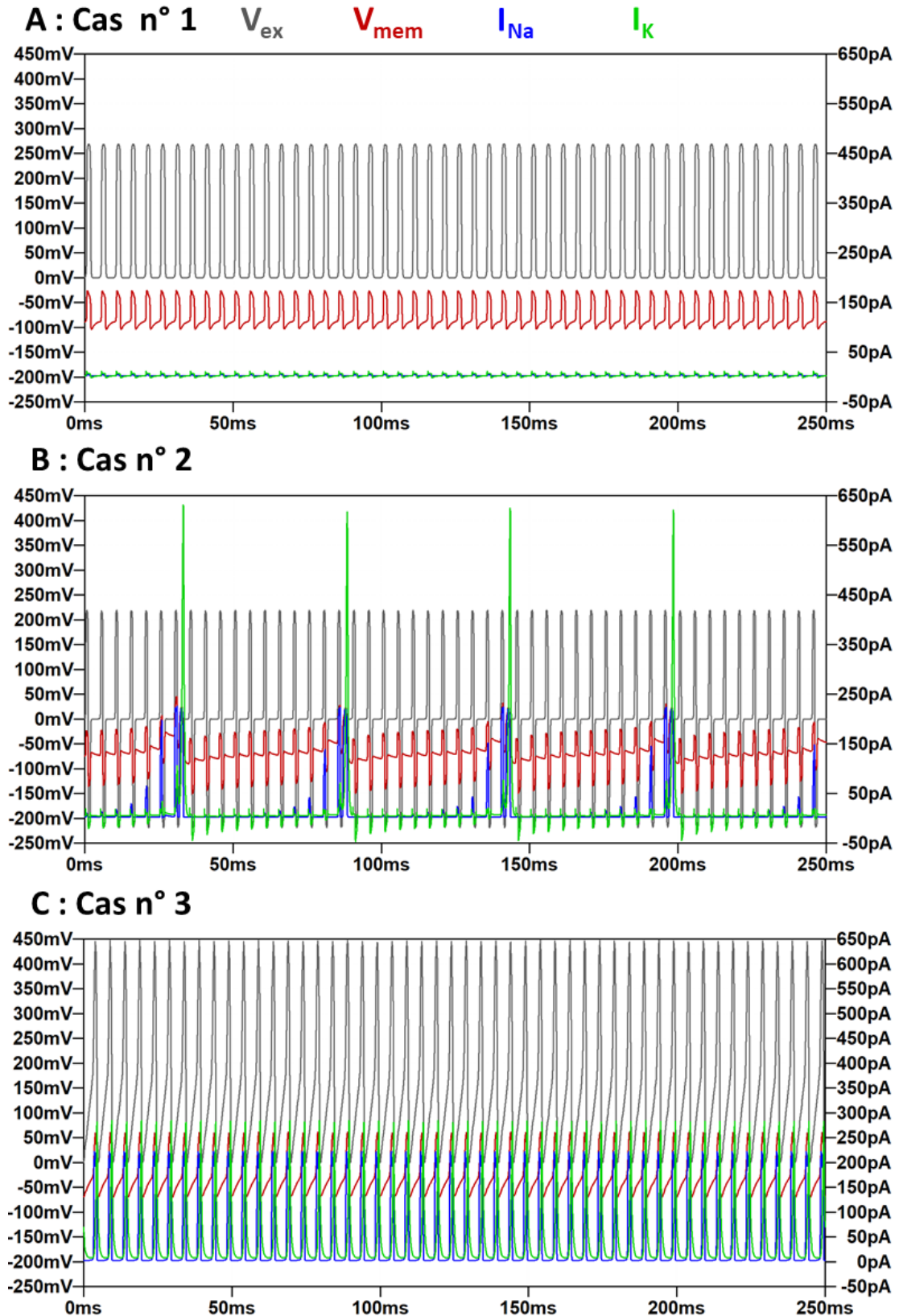


Figure 2-10 : Réponses à une excitation continue de fréquence 200Hz du modèle de membrane interfacé avec une électrode - Tracé de V_{ex} V_{mem} I_{Na} & I_K

A : Cas n°1 Excitation par des créneaux d'amplitude $V_{ex} = 0 - 269\text{mV}$. **B :** Cas n°2 Excitation par des pulses biphasiques d'amplitude $V_{ex} = 438\text{mV}$ ($-219\text{mV} / +219\text{mV}$). **C :** Cas n°3 Excitation par des spikes d'amplitude totale $V_{ex} = 447\text{mV}$.

Paramètre	Spike de référence	Forme du signal de stimulation														
		Créneau sans discontinuités			Créneau avec discontinuités			Pulse biphasique sans discontinuités			Pulse biphasique avec discontinuités					
		Cas n°1	Cas n°2	Cas n°3	Cas n°1	Cas n°2	Cas n°3	Cas n°1	Cas n°2	Cas n°3	Cas n°1	Cas n°2	Cas n°3			
V_{ex} [mV]		268,64	271,60	292,07	262,80	265,72	284,70	409,21	416,13	759,68	401,51	402,96	759,2	350,74	353,67	448,29
V_{mem_Max} [mV]	67,23	-25,56	49,20	35,86	-23,42	49,27	35,22	-24,47	20,08	14,58	-21,19	20,04	15,43	-25,65	60,74	61,53
V_{mem} [mV]	145,77	77,95	130,87	109,71	84,04	97,27	109,32	105,68	96,69	99,60	110,96	107,73	101,68	90,48	136,76	131,41
I_{Na} [pA]	23,23	5,36	221,84	221,42	6,64	223,28	222,90	6,95	217,55	211,39	10,78	217,50	212,62	5,28	222,53	222,01
I_K [pA]	75,55	14,06	504,93	533,18	14,25	532,46	349,05	33,29	580,12	511,58	29,33	578,60	523,16	13,59	423,69	275,74
F_{rep} [Hz]			100	200,00		100,00	200,00		7,41	200,00		3,64	199,77		100,14	199,88

Tableau 2-10 : Simulations à 200Hz : relevés des indicateurs assurant de la validité et la génération d'un spike

2.6.2 Différents signaux d'excitation - Premières analyses pour une excitation en spike

2.6.2.1 Premiers résultats et comparaison avec le spike gabarit

Pour chaque signal de stimulation, les indicateurs constitués par la tension de membrane $V_{\text{mem_MAX}}$, l'amplitude de la tension de membrane V_{mem} , l'amplitude du courant I_{Na} et l'amplitude du courant I_{K} sont relevés sur les réponses du modèle et présentés dans le Tableau 2-10.

Dans ce Tableau 2-10, trois colonnes représentant les trois cas peuvent être identifiées pour chaque signal appliqué. La tension V_{ex} présentée dans chaque colonne correspond à l'amplitude d'excitation nécessaire pour passer du cas 1 vers le cas 2, et du cas 2 vers le cas 3. Dans ces colonnes sont ensuite présentées les valeurs des indicateurs relevés pour chaque cas, et la fréquence des réponses mesurées sur la tension de membrane V_{mem} . Les grandeurs sont données pour les signaux avec discontinuités et les signaux adoucis montrant une très faible influence sur la réponse finale.

Dans la suite de ce paragraphe est présenté un exemple permettant d'illustrer la méthode de comparaison entre les indicateurs relevés et le gabarit. Pour monitorer les valeurs présentées dans le Tableau 2-10, les indicateurs relevés en réponse à une excitation de type spike sont illustrées sur la Figure 2-11. Ces grandeurs sont présentées en fonction de la tension de stimulation V_{ex} . Les données pour le cas 1 sont représentées par la marque (●), pour le cas 2 par (▲) et pour le cas trois par (■).

Avant d'entrer dans le commentaire de ces figures, il est important de souligner la spécificité du modèle de neurone pour le spike gabarit et celui du modèle de neurone vivant interfacé avec une électrode. En effet, le spike gabarit (Figure 2-7) est établi à partir du modèle de neurone standard (Figure 2-1), qui est excitable en courant. Par contre, le modèle de neurone vivant interfacé avec une électrode est stimulé en tension. Cela impacte la représentation des différentes grandeurs issues des résultats de simulation. Ainsi, les données présentées sur la Figure 2-8 sont représentées en fonction de la fréquence des spikes émis en réponse à un courant d'excitation, tandis que les données présentées dans la Figure 2-11 sont représentées en fonction d'une tension d'excitation V_{ex} .

L'élément qui va permettre d'établir une correspondance entre les deux modèles sera la fréquence de la tension de membrane. Si cette dernière est comprise entre 0-300Hz, il sera possible de calibrer la réponse du modèle par rapport au spike gabarit (Tableau 2-9). A partir de la Figure 2-8 qui correspond à l'excitation en courant et au modèle du type neurone gabarit, pour une fréquence du signal de membrane allant de 0 à 300Hz : la tension $V_{\text{mem_MAX}}$ est comprise entre 75,9mV et 58,5mV, la tension V_{mem}

entre 152,4mV et 139,13mV. Le courant I_{Na} , lui, est compris entre 23,28 pA et 23,18pA (quasiment constant) et le courant I_K entre 80,98 pA et 70,12 pA. Des droites pour chacune de ces valeurs sont tracées respectivement en vert sur la Figure 2-11 qui correspond à l'excitation en tension. Une droite en couleur orange donne également la valeur moyenne pour ces quatre grandeurs. Ces droites indiquant les valeurs issues du modèle gabarit servent de guides et de repères numériques pour l'interprétation des réponses.

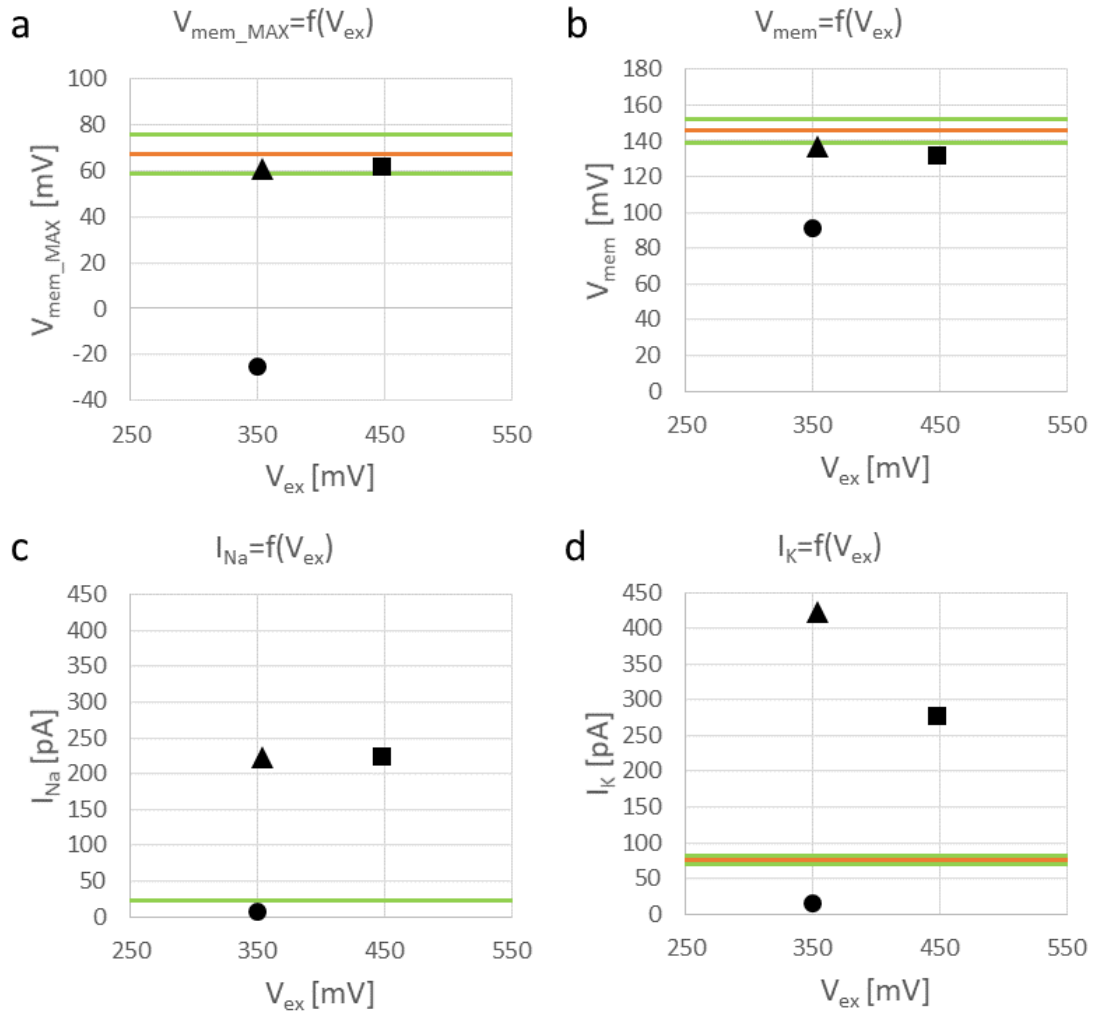


Figure 2-11 : Indicateurs relevés pour les réponse du modèle à un stimulus du type spike et comparaison avec la moyenne et les écart-types des indicateurs de référence (spike gabarit)

• Cas n°1 ▲ Cas n°2 ■ Cas n°3

a : Maximum de la tension de membrane V_{mem_MAX} . **b** : Amplitude de la tension de membrane V_{mem} .
c : amplitude du courant I_{Na} . **d** : amplitude du courant I_K .

2.6.2.2 Premières analyses pour une excitation en spike

Ainsi, les Figure 2-11-A & B construites à partir des éléments présentés dans le Tableau 2-10 pour un signal d'excitation de type spike, permettent d'analyser la tension de membrane V_{mem} et son maximum V_{mem_MAX} . La fréquence du pic de tension en sortie lue sur V_{mem} est de 100Hz pour le cas n°2 et de 200Hz pour le cas n°3. Ces fréquences

sont bien dans la plage 0-300Hz ce qui permet d'utiliser le gabarit pour guider l'analyse de la réponse.

La valeur du maximum de la tension de membrane passe de -26mV pour le cas 1, à 61mV pour le cas 2 et 62 pour le cas 3. Dans ce cas n°1, V_{mem_MAX} est très inférieure au maximum de tension de référence $V_{mem_MAX_gabarit}$. Il n'y a pas de spike émis pour ce cas n°1, cela est bien vérifié. Ensuite, pour les cas n° 2 et 3, V_{mem_MAX} est quasiment égal à $V_{mem_MAX_gabarit}$. Ces données indiquent qu'il y a bien une émission de spikes au niveau du neurone lorsque la tension d'excitation passe de 351mV à 354mV, donc lors du passage du cas 1 au cas 2.

Dans ce cas n°2, les spike sont observés de façon intermittente mais régulière, c'est-à-dire que le neurone ne spike pas à chaque excitation. Pour obtenir une réponse à la tension d'excitation de façon systématique (cas n°3), la tension d'excitation V_{ex} doit être de 448mV. Il est à noter que ces valeurs sont obtenues sans optimisation de la forme du signal et également en utilisant des valeurs de la littérature pour les paramètres de l'interface.

En ce qui concerne l'analyse des courants I_{Na} et I_K (Figure 2-11 C & D) qui font partie des éléments du gabarit, les tendances sont bien respectées. Dans le cas n°1, les courants sont très faibles et inférieurs au courant de référence $I_{Na_gabarit}$, ce qui correspond à une absence de réponse du modèle aux stimulations. Dès que la tension d'excitation passe à 354mV (cas n°2), le courant I_{Na} passe à 223pA et le courant I_K à 424pA, puis lorsque la tension d'excitation passe à 448mV (cas n°3), le courant I_{Na} passe à 222pA et le courant I_K redescend à 276pA. Dans ces cas n°2 et n°3, d'une part ces courants sont très supérieurs aux courants de référence $I_{Na_gabarit}$ et $I_K_gabarit$, et d'autre part, la différence de valeurs avec le cas n°1 est significative. Par ailleurs le rapport entre I_{Na} et I_K est conforme au gabarit, avec un respect de la temporalité pour l'apparition du courant I_{Na} avant le courant I_K . Il y a donc émission d'un spike.

La fréquence des spikes peut également être analysée. Pour le cas n°1, la tension de membrane est au repos et aucun spike n'est observé sur V_{mem} . Dès que la tension d'excitation augmente, la fréquence du spike émis augmente. Ainsi, dans le cas 2, le spike n'est pas émis de façon systématique suite à chaque excitation, mais il est possible de déterminer une fréquence de réponse de 100 Hz. Cette fréquence passe à 200Hz dans le cas 3, où la réponse est systématique.

L'ensemble de cette analyse a été conduite autour des réponses du modèle à une excitation de type spike. Ce même raisonnement doit être appliqué pour les réponses du modèle à chacune des formes de signal d'excitation présentée dans le Tableau 2-10. Complété par les éléments présentés dans la suite de ce paragraphe, les résultats de l'analyse complète sont répertoriés dans le Tableau 2-11.

2.6.3 Les spécificités du modèle – Réponses du modèle aux excitations

Pour analyser plus finement les ordres de grandeur parfois différents entre le gabarit et le neurone vivant, il est important de s'intéresser à la construction du schéma électrique.

2.6.3.1 Excitation et mesure de la tension membranaire : Nœud commun

Pour cela, regardons le schéma de la Figure 2-12. Un signal d'excitation $V_{excitation}$ est appliqué sur l'électrode. Il passe au travers des éléments parasites constituant l'interface entre l'électrode et le neurone, puis à travers la capacité représentant la membrane attachée et la résistance représentant le cytoplasme avant de venir exciter la membrane libre. La membrane libre émet le signal V_{mem} en réponse à cette excitation. Le signal d'excitation $V_{excitation}$ et la mesure du signal de réponse à cette stimulation V_{mem} sont effectués sur le même nœud (nœud commun). Par conséquent, les signaux de stimulation $V_{excitation}$ et la réponse du modèle de membrane V_{mem} sont superposés, ce qui modifie l'allure et l'amplitude de cette réponse. Il est à noter que l'allure du spike n'est jamais retrouvée intégralement sur la tension de membrane V_{mem} , cela quel que soit le signal d'excitation. Cette particularité explique le choix de conserver quatre indicateurs parmi les six proposés dans le paragraphe 2.4.2. En effet, les indicateurs $\Delta t_{V_{mem}/2}$ et $\Delta t_{V_{mem_MAX}|t_{INa}}$ sont extrêmement dépendants de l'allure du spike. L'allure du spike étant ici altérée, ces indicateurs ne peuvent être utilisés.

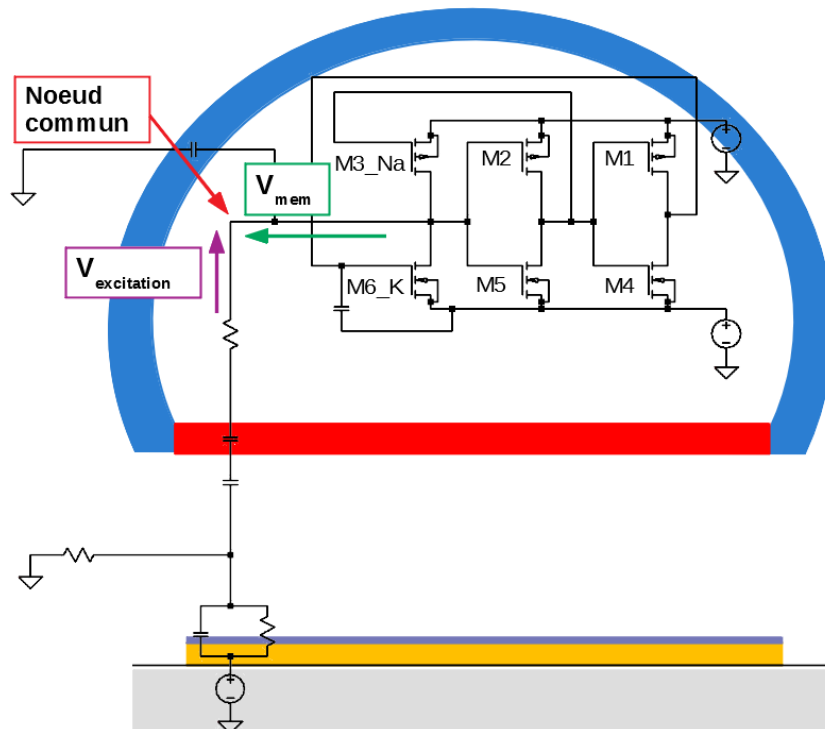


Figure 2-12 : Nœud commun d'injection de l'excitation (V_{ex}) et de la mesure de la tension de membrane (V_{mem})

2.6.3.2 Réponses du modèle aux autres excitations

A partir de cette construction du modèle, il est intéressant de poursuivre l'analyse du Tableau 2-10. En premier lieu, poursuivons l'analyse du maximum de la tension $V_{\text{mem_MAX}}$ pour les cas n° 1, 2 et 3.

- Cas n°1 : $-25,65 \text{ mV} \leq V_{\text{mem_MAX}} \leq -21,19 \text{ mV}$
- Cas n°2 : $20,04 \text{ mV} \leq V_{\text{mem_MAX}} \leq 60,74 \text{ mV}$
- Cas n°3 : $14,58 \text{ mV} \leq V_{\text{mem_MAX}} \leq 61,53 \text{ mV}$
- Gabarit : $V_{\text{mem_MAX_gabarit}} = 67,23 \text{ mV}$

Quel que soit le signal d'excitation appliqué, l'analyse des colonnes « cas n°1 » du Tableau 2-10 montre que le maximum de tension de membrane $V_{\text{mem_MAX}}$ est toujours négatif et largement inférieur au maximum de tension de membrane caractéristique du spike gabarit $V_{\text{mem_MAX_gabarit}}$. Cela correspond à ce qui était attendu et tend à montrer que dans le « cas n°1 », le modèle de membrane ne répond pas aux stimulations.

L'analyse des colonnes « cas n°2 » et « cas n°3 » montrent que $V_{\text{mem_MAX}}$ est proche de la tension caractéristique du spike gabarit $V_{\text{mem_MAX_gabarit}}$, ce qui était aussi attendu. De plus, il est à noter que la tension de membrane $V_{\text{mem_MAX}}$ est cette fois positive. Même si elle reste inférieure à la tension de membrane caractéristique du spike gabarit $V_{\text{mem_MAX_gabarit}}$, elle est bien supérieure à la tension négative du cas n°1. Ces résultats « cas n°2 » et « cas n°3 » tendent à montrer que le modèle de membrane répond aux différentes excitations. Cependant, comme V_{mem} et V_{ex} sont superposées, la seule analyse de la tension de membrane en forme et en amplitude n'est pas suffisante pour donner du sens aux réponses du modèle. Cette analyse doit être enrichie à l'aide d'une étude des courants I_{Na} et I_{K} pour une validation complète.

Les éléments permettant l'analyse des courants I_{Na} et I_{K} sont présentés dans le Tableau 2-10, qui montre que :

- Cas n°1 : $5,28 \text{ pA} \leq I_{\text{Na}} \leq 10,78 \text{ pA}$ $13,59 \text{ pA} \leq I_{\text{K}} \leq 33,29 \text{ pA}$
- Cas n°2 : $217,50 \text{ pA} \leq I_{\text{Na}} \leq 222,53 \text{ pA}$ $423,69 \text{ pA} \leq I_{\text{K}} \leq 578,60 \text{ pA}$
- Cas n°3 : $211,39 \text{ pA} \leq I_{\text{Na}} \leq 222,94 \text{ pA}$ $275,74 \text{ pA} \leq I_{\text{K}} \leq 535,16 \text{ pA}$
- Gabarit : $I_{\text{Na_gabarit}} = 23,23 \text{ pA}$ $I_{\text{K_gabarit}} = 75,55 \text{ pA}$

L'analyse des cas n°1, quel que soit le signal d'excitation appliqué, montre que ces courants sont de très faibles amplitudes, de l'ordre du pA à la dizaine de pA, et très inférieurs aux courants caractéristiques du spike gabarit $I_{\text{Na_gabarit}}$ et $I_{\text{K_gabarit}}$. Il était attendu que ces courants soient nuls, mais les transistors constituant le modèle de membrane présentent des fuites lorsqu'ils sont dans l'état bloqué. L'apparition de ces courants de très faible amplitude est cohérente, et tend à montrer que le modèle n'a pas répondu aux stimulations.

Dans les cas n°2 et cas n°3, ces courants sont de l'ordre de quelques centaines de pA, très supérieurs aux courants caractéristiques relevés à partir du spike gabarit. Cette différence vient de l'augmentation de la taille des transistors et des capacités entre les deux modèles. Celles-ci ont été multipliées par un facteur 14,66. Les amplitudes des courants parcourant le modèle de membrane sont alors beaucoup plus élevées. Ces courants I_{Na} et I_K supérieurs aux courants caractéristiques du spike gabarit tendent à montrer que le modèle de membrane répond aux stimulations pour les cas n°2 et cas n°3.

Cette analyse simultanée du maximum de tension de membrane V_{mem_MAX} ainsi que des courants I_{Na} et I_K montre que dans les cas n°1, le modèle de membrane ne répond pas aux stimulations, et que dans les cas n°2 et cas n°3, le modèle de membrane répond aux stimulations, et ce, quelle que soit la forme des excitations. Le Tableau 2-11 reprend l'ensemble de ces analyses et présente les seuils des tensions de stimulation V_{ex} pour lesquelles chaque cas est observé. Il est à noter que cette seule analyse ne permet pas de faire la distinction entre les cas n°2 et cas n°3. La suite de ce document présente une analyse spécifique du cas n°2, qui se distingue du cas n°3 en ne répondant pas par l'émission systématique d'un spike quand un signal d'excitation est appliqué.

Paramètre	Forme du signal de stimulation														
	Créneau sans discontinuités			Créneau avec discontinuités			Pulse biphasique sans discontinuités			Pulse biphasique avec discontinuités			Spike		
	Pas de réponse	Réponses intermittentes	Réponses systématiques	Pas de réponse	Réponses intermittentes	Réponses systématiques	Pas de réponse	Réponses intermittentes	Réponses systématiques	Pas de réponse	Réponses intermittentes	Réponses systématiques	Pas de réponse	Réponses intermittentes	Réponses systématiques
Tension de stimulation V_{ex} [mV]	268,64	271,60	292,00	262,80	265,72	284,70	409,21	416,13	759,68	401,51	402,96	759,2	350,74	353,67	448,29
Réponse du modèle	non	oui	oui	non	oui	oui	non	oui	oui	non	oui	oui	non	oui	oui
Fréquence des réponses F_{rep} [Hz]		100	200,00		100,00	200,00		7,41	200,00		3,64	199,77		100,14	199,88

Tableau 2-11 : Analyse des réponses du modèle de membrane et de la fréquence « F_{rep} » de ces réponses en fonction de l'allure de la stimulation et de sa tension V_{ex}

2.6.3.3 Intégration de signal

L'analyse de la tension de membrane V_{mem} et des courants I_{Na} et I_{K} a permis d'établir que le modèle de neurone couplé à une électrode est capable de répondre aux stimulations qui lui sont imposées. En effet, d'après le Tableau 2-11 :

- Cas n°2 : $3,64 \text{ Hz} \leq F_{\text{rép}} \leq 100 \text{ Hz}$
- Cas n°3 : $F_{\text{rép}} = 200 \text{ Hz}$
- Excitation : $F_{\text{ex}} = 200 \text{ Hz}$

Ce Tableau 2-11 permet de montrer que dans le cas n°2, la fréquence de la réponse du modèle aux stimulations est inférieure à la fréquence de la stimulation, tandis que dans le cas n°3, ces deux fréquences sont égales. Donc dans le cas n°2, le modèle ne répond pas à chaque application du signal d'excitation, tandis que dans le cas n°3, il y a un spike émis à chaque excitation de la membrane neuronale. Un exemple de représentation de l'évolution de la tension de membrane V_{mem} et des courants I_{Na} et I_{K} dans ce cas n°2 est donné sur la Figure 2-13.

Etudions cette évolution de la tension de membrane V_{mem} et des courants I_{Na} et I_{K} dans ce cas n°2, Figure 2-13-B. A chaque stimulation V_{ex} , le maximum de tension de membrane $V_{\text{mem_MAX}}$ et le courant I_{Na} augmentent faiblement. Après plusieurs stimulations, les courants I_{Na} et I_{K} augmentent brutalement pour atteindre les quelques centaines de pA. A cet instant, la tension de membrane V_{mem} ainsi que le maximum de tension de membrane $V_{\text{mem_MAX}}$ sont à leur valeur maximale. Le modèle de membrane répond alors à la stimulation. Cette augmentation progressive du potentiel de membrane V_{mem} et des courants I_{Na} et I_{K} correspond à un phénomène d'intégration de signal qui existe dans le domaine du vivant. Les stimulations successives chargent progressivement le modèle de membrane et lorsque le seuil de dépolarisation est atteint, le modèle de membrane émet un spike. Ce phénomène est également existant dans un environnement physiologique. Le neurone reçoit un ensemble d'informations qui arrivent au travers des synapses sur les dendrites, puis remontent jusqu'au soma. Chacune de ces stimulations entraîne une faible augmentation du potentiel intracellulaire, et le soma fait la somme de ces stimulations. Si elles sont suffisamment nombreuses et synchronisées, leur somme va permettre d'atteindre le potentiel de seuil, entraînant l'émission d'un potentiel d'action. Le cas n°2 présenté dans les Tableau 2-10 et Tableau 2-11, pour les signaux en créneaux, biphasiques et spikes, correspond donc à une intégration du signal de stimulation par le modèle de membrane.

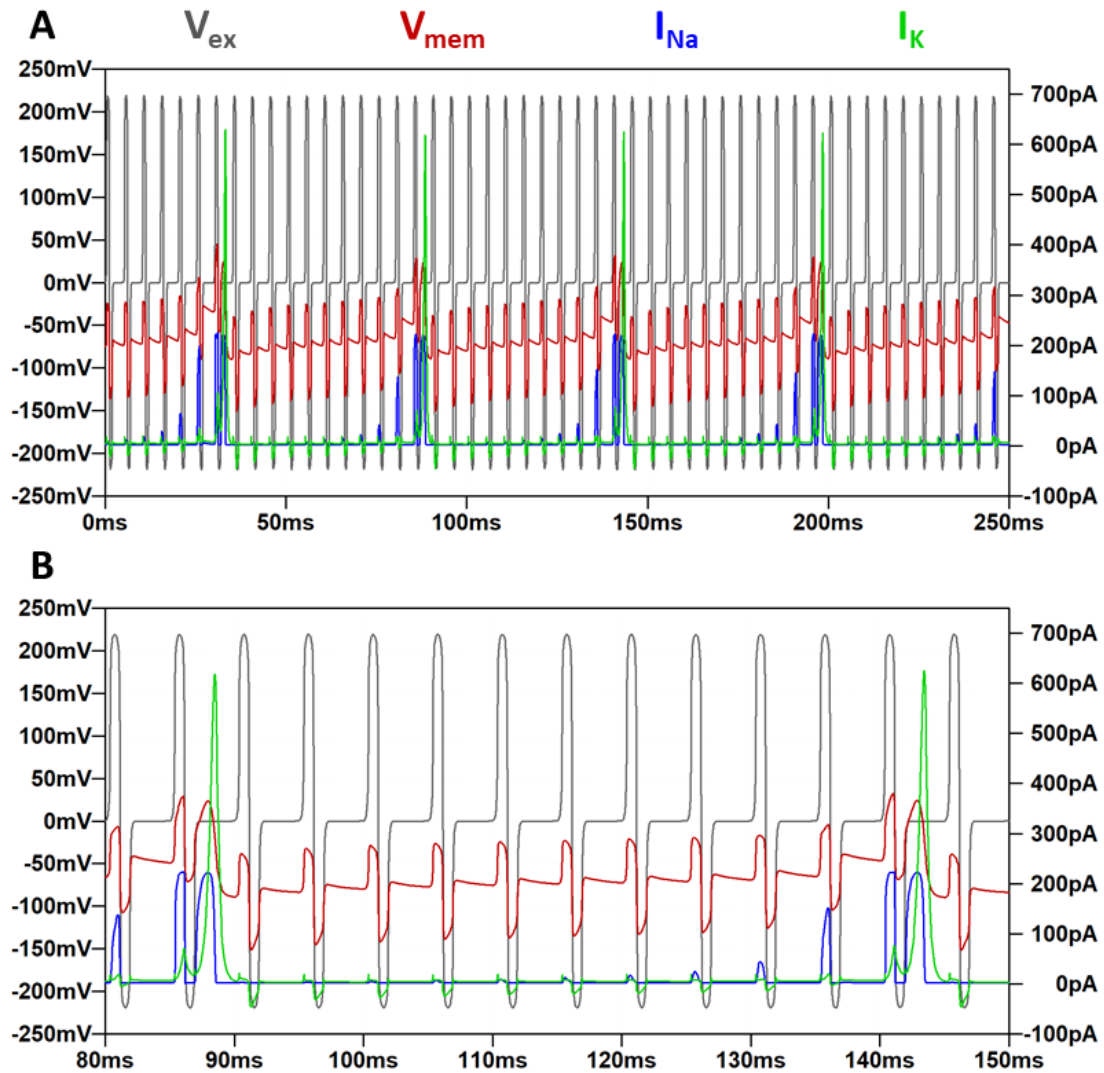


Figure 2-13 : A : réponse du modèle de membrane interfacé avec une électrode à une stimulation par des pulses biphasiques d'amplitude $V_{ex} = 438\text{mV}$, avec une fréquence de 200Hz. B : Zoom sur une période de la réponse du modèle

Plusieurs simulations successives sont nécessaires pour atteindre le seuil de dépolarisation, entrainant une réponse du modèle aux stimulations. Le modèle électrique de neurone vivant interfacé avec une électrode est capable d'intégrer les signaux d'excitation.

En termes de bilan, la Figure 2-14 regroupe les fréquences $F_{rép}$ des signaux obtenus en réponse à la tension de stimulation V_{ex} appliqué au modèle de membrane. Les valeurs sont reportées pour chaque forme du signal de stimulation avec et sans discontinuités. L'étude du Tableau 2-11 et de cette Figure 2-14 montre que la tension d'excitation V_{ex} qu'il faut appliquer pour obtenir une réponse par intégration (\blacktriangle) est bien inférieure à la tension nécessaire pour déclencher une réponse à chaque signal d'excitation (\blacksquare). Constatons également que la tension nécessaire à l'excitation du modèle dépend de la forme du signal d'excitation. En effet, les données présentées sur la Figure 2-14 montrent que les amplitudes des tensions nécessaires à l'excitation du modèle sont plus basses lorsque les signaux utilisés sont des créneaux (marques bleues

et violettes) que des spikes (marques rouges) ou que des pulses biphasiques (marques vertes et noires). Ce dernier point est abordé en détail dans le paragraphe suivant.

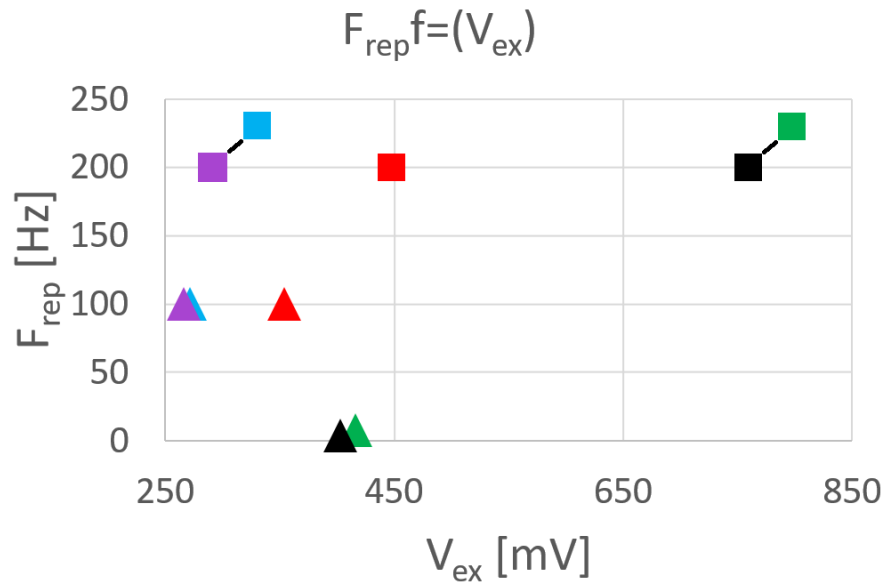


Figure 2-14 : Représentation graphique pour chaque forme de signal d'excitation, de la fréquence des réponses du modèle en fonction de la tension du signal de stimulation

- ▲ Créneau sans discontinuités : cas n°2
- ▲ Créneau avec discontinuités : cas n°2
- ▲ Biphasique sans discontinuités : cas n°2
- ▲ Biphasique avec discontinuités : cas n°2
- ▲ Spike : cas n°2
- ▲ Créneau sans discontinuités : cas n°3
- ▲ Créneau avec discontinuités : cas n°3
- ▲ Biphasique sans discontinuités : cas n°3
- ▲ Biphasique avec discontinuités : cas n°3
- ▲ Spike : cas n°3

2.6.3.4 Etude de l'impact de la forme du signal d'excitation

L'étude des réponses du modèle de membrane couplé à une électrode et excité par des créneaux, des pulses biphasiques et des spikes, a permis de montrer que ce modèle de membrane répond aux stimulations qui lui sont appliquées et qu'il est capable d'intégrer ces signaux au fur et à mesure de la stimulation. L'impact de l'allure des signaux d'excitation sur la réponse du modèle est étudié dans la suite de ce paragraphe, et sera comparé avec des éléments issus de la littérature.

L'exploitation des données présentées dans le Tableau 2-11 permet de montrer qu'un créneau de tension d'amplitude 266mV est nécessaire pour obtenir une réponse du modèle de membrane par intégration de signal (cas n°2), et d'amplitude 292mV pour obtenir une réponse du modèle à chaque application du signal de stimulation (cas n°3). Lorsque le modèle est stimulé par un spike, une stimulation d'amplitude 354mV est nécessaire pour obtenir une réponse du modèle de membrane par intégration de signal (cas n°2), et une stimulation de 448mV est nécessaire pour obtenir une réponse du modèle pour chaque période du signal de stimulation (cas n°3). Enfin, lorsque le modèle est stimulé par des pulses biphasiques, une tension de 403mV est nécessaire pour obtenir une réponse du modèle de membrane par intégration de signal, et une stimulation de 760mV est nécessaire pour obtenir une réponse du modèle pour chaque

période du signal de stimulation (cas n°3). Nécessitant la tension la plus faible, le créneau est donc le signal de stimulation le plus efficace, suivi par le spike. Le signal de stimulation biphasique est le moins performant. Ces tous premiers résultats obtenus en simulation doivent être confrontés à un ensemble de caractérisations expérimentales et d'expérimentations biologique qui sont réalisées en parallèle du développement de ce modèle de membrane, dans le but de faire converger les résultats expérimentaux et les résultats issus du modèle.

En première approche, il est intéressant de positionner ces résultats par rapport à la revue de littérature présentée dans le paragraphe 2.5.1. En effet, il était montré que les pulses biphasiques sont les signaux de stimulation les plus efficaces pour stimuler des neurones de néocortex de rat, dissociés puis cultivés sur des MEA. De plus, une étude préliminaire proposée par Akbar *et al.*, en 2016 montrait que l'utilisation de signaux biphasiques dans la DBS en remplacement des créneaux conventionnels permettraient une efficacité thérapeutique accrue. Les tensions d'excitation nécessaires à la stimulation du modèle de neurone interfacé avec une électrode (266mV à 760mV) sont bien inférieures aux tensions nécessaires à la stimulation de neurones vivants au travers de MEA ($\pm 500\text{mV}$ à $\pm 1000\text{mV}$) (Buccelli *et al.*, 2019; Radivojevic *et al.*, 2016; Wagenaar *et al.*, 2004) ou utilisés en DBS (1,5V à 2V) (Akbar *et al.*, 2016; Eusebio *et al.*, 2011; Little & Brown, 2012). Les résultats obtenus à ce stade du développement du modèle ne permettent pas encore d'établir de conclusion. Toutefois, les résultats obtenus vont dans la bonne direction en montrant qu'il est possible de stimuler des neurones par des signaux biomimétiques en conservant des tensions d'excitation faibles.

Il est délicat de faire une comparaison directe entre nos résultats de simulation et les résultats issus de la revue de littérature. En effet les signaux de stimulation présentés dans la revue de littérature et utilisés dans notre simulation présentent des différences notables. La durée des signaux biphasiques permettant la stimulation de neurones cultivés sur des MEA est de l'ordre de $400\mu\text{s}$ à $1000\mu\text{s}$. La durée des pulses utilisés dans la DBS est de l'ordre de $60\mu\text{s}$. Les signaux de stimulation utilisés dans cette étude de l'excitabilité du modèle ont tous une durée de $1700\mu\text{s}$, durée d'un spike biomimétique. Cette différence de durée de signal de stimulation peut en partie expliquer cette dichotomie entre les résultats issus de la simulation du modèle de membrane et les résultats présentés dans la revue de littérature. La réalisation d'une campagne de simulation visant à étudier l'impact de la durée des signaux de stimulation permettrait de comparer directement les résultats issus des simulations aux résultats expérimentaux présentés dans la revue de littérature. De plus, notre modèle simule une interface entre des cellules PC-12 différenciées et une électrode. Ces cellules PC-12 sont issues de phéochromocytome de médullosurrénale de rat, puis différenciées en cellules neuronales. Les études menées dans la littérature sur MEA utilisent des neurones de néocortex de rat (Buccelli *et al.*, 2019; Mosbacher *et al.*, 2020; Ojovan *et*

al., 2015; Radivojevic *et al.*, 2016; Robinson *et al.*, 2012; Wagenaar *et al.*, 2004), tandis que dans le cas de la DBS il s'agit de neurones humains dans leur environnement physiologique. Il sera donc nécessaire à l'avenir de conduire des expérimentations sur plusieurs types cellulaires, dont des cellules issues de cultures primaires et des tranches de cerveau. Les résultats de ces expérimentations permettront d'évaluer la nécessité de construire un modèle correspondant à chaque type cellulaire, ou si un modèle global est acceptable.

2.6.3.5 Discontinuités des signaux d'excitation et réponses du modèle

Par ailleurs, pour limiter le risque d'artéfact de simulation lié à l'interface capacitive, les discontinuités des créneaux et pulses biphasiques de stimulations ont été adoucis (Figure 2-9-C & E). Ces signaux adoucis sont nommés « créneau sans discontinuités » et « biphasique sans discontinuités ». D'après l'exploitation des données du Tableau 2-11, les différences de tension nécessaires à la stimulation du modèle par des signaux avec ou sans discontinuités représentent 0,02% à 3,3% de l'amplitude de la stimulation V_{ex} . En effet, la représentation des fréquences des réponses en fonction de la tension d'excitation présenté sur la Figure 2-14 permet de constater que quelle que soit la forme du signal de stimulation, les points représentatifs des réponses du modèle aux signaux de stimulation avec ou sans discontinuités sont confondus. Dans le cadre de cette étude, l'impact de ces discontinuités est très limité et peut être négligé.

2.6.4 Conclusion

L'ensemble de ces simulations a montré que ce modèle de membrane neuronale couplé à une électrode répond aux signaux de stimulation qui lui sont appliqués et qu'il intègre ces signaux de stimulation. L'exploitation des résultats de cette campagne de simulation montre que les créneaux de tension sont les signaux les plus efficaces pour stimuler le modèle, suivi par les spikes, les pulses biphasiques se montrant les moins efficaces. Un ensemble de caractérisation et d'expérimentations biologiques viendront compléter et affiner ce modèle, jusqu'à l'obtention d'un modèle prédictif. Enfin, l'utilisation de spikes et la démonstration de la possibilité de stimuler des neurones en utilisant l'intégration de signal s'inscrit dans la nécessité formulée par Akbar *et al.*, (2016) d'explorer des signaux et méthodes de stimulation non conventionnels.

2.7 Conclusion

L'objectif de ce chapitre était de présenter la création d'un modèle paramétrique de membrane neuronale couplé à une électrode qui servira à préparer des expérimentations biologiques au cours desquelles des cellules PC-12 différenciées sont interfacées avec des électrodes et stimulés au moyens d'une tension électrique.

Partant du modèle électrique du neurone sous SPICE, il a été transformé en un modèle paramétrique de membrane neuronale présentant une surface de membrane équivalente à celle d'une cellule PC-12. Pour interfacer ce modèle de membrane avec une électrode métallique circulaire plane, le modèle est séparé en deux parties de membrane : la membrane attachée (faisant face à l'électrode de même surface), et la membrane libre (en regard du bain d'électrolyte). Ce modèle est ensuite complété en y ajoutant une modélisation de l'interface entre l'électrode et la membrane neuronale.

Avant d'utiliser le modèle dans une série de simulation, un ensemble d'indicateurs de référence permettant de déterminer si la réponse du modèle à une stimulation a du sens ou s'il s'agissait d'un artefact de stimulation a été établi. En comparant les résultats issus de simulation à ces indicateurs, il est possible de déterminer si le modèle a oui ou non répondu aux stimulations lui étant imposées.

Une revue de littérature, a permis de sélectionner les différents signaux utilisés pour stimuler le modèle. Pour cela, les signaux utilisés pour stimuler *in vitro* des neurones cultivés sur des MEA et utilisés *in vivo* dans le cadre de la prise en charge par DBS de patients atteints de la maladie de Parkinson ont été passés en revue. Il s'agit respectivement de créneaux de tension et de pulses biphasiques *first-positive*. L'objectif final du projet est la réalisation d'une boucle de communication entre des neurones vivants et des neurones artificiels. Dans ce cadre, les neurones vivants seront stimulés par des spikes biomimétiques. Pour compléter l'étude et établir une comparaison, des signaux conventionnels du type créneau et pulse biphasique ont été ajoutés à la liste des signaux utilisés pour stimuler le modèle de membrane couplé à une électrode.

Les résultats de cette toute première étude permettent de comparer les réponses du modèle en fonction de l'allure du signal de stimulation : créneaux, pulses biphasiques ou spikes. Tous ces signaux se sont révélés capables de stimuler le modèle de membrane interfacé avec une électrode, et les résultats issus de cette série de stimulation montrent que les créneaux de tension seraient les stimulations les plus efficaces. Cependant, la revue de littérature présente les pulses biphasiques comme étant les plus efficaces pour stimuler des neurones vivants couplés à une électrode. La différence de méthodologie peut expliquer cette dichotomie : les expérimentations présentées dans cette revue de littérature sont menées sur des neurones, murins ou humains, tandis que nos expérimentations, et le modèle qui en découle, sont menées sur des PC-12, cellules neuronales différenciées reproduisant les caractéristiques des neurones. Par ailleurs, la durée des signaux de stimulation présentés dans la revue de littérature sont plus courts que ceux utilisés dans ces simulations. Enfin, le modèle de membrane couplé à une électrode manque de maturité. Il s'agit d'une base de travail qu'un ensemble de caractérisations expérimentales viendront consolider. Une campagne de caractérisation de l'interface entre l'électrode et l'électrolyte est en cours

de réalisation. Les résultats qui en découleront seront injectés dans la modélisation de cette interface. Un ensemble d'expérimentations biologiques visant à exciter des cellules neuronales vivantes cultivées sur notre dispositif neurobiohybride avec les mêmes signaux que ceux présentés et utilisés dans les simulations est en cours de réalisation.

2.8 Perspectives

2.8.1 Vecteurs d'amélioration du modèle

Le modèle présenté constitue une base de travail qui sera consolidée au fur et à mesure des avancées du projet et des nouveaux résultats expérimentaux. Les éléments présentés dans ce paragraphe concernant la résistance de la membrane attachée, la surface d'électrode, le *coating* et la résistance de jointure R_{seal} sont des pistes de réflexion. Le développement d'un modèle à éléments finis peut aussi apporter des pistes de travail intéressantes. Enfin, le dimensionnement de l'électrode d'excitation et d'écoute et la passivation d'une partie des lignes est un axe à investiguer.

2.8.1.1 Résistance de la membrane attachée, surface d'électrode, *coating* et résistance de jointure R_{seal}

Dans le modèle de membrane neuronale interfacé avec une électrode proposé dans ce chapitre (Figure 2-2), la membrane attachée est représentée uniquement par sa capacité membranaire équivalente $C_{\text{mb-attachée}}$. Afin de rapprocher le modèle de la réalité biologique, il serait intéressant d'introduire en parallèle de cette capacité une résistance de fuite représentant la résistance membranaire de la portion de membrane attachée.

Ensuite, la maîtrise du ratio entre la surface de l'électrode et la surface totale de la membrane du neurone est un paramètre essentiel de la stimulation et de l'écoute des neurones. Une surface d'électrode trop petite entrainera une résistance d'interface élevée et une capacité d'interface faible, bloquant le signal entre le neurone et l'électrode. Une grande surface d'électrode permet d'augmenter la capacité et de réduire la résistance d'interface, mais augmente les parasites, ce qui nuit également à la transmission du signal entre l'électrode et le neurone. Un cas favorable serait une forte capacité sur une faible surface de contact entre le neurone et l'électrode. Une campagne de simulation axée sur l'impact de la surface de l'électrode par rapport à la surface de la membrane neuronale doit permettre d'étudier cette question et d'optimiser le modèle en fonction des cellules utilisées. De plus, un travail d'ingénierie doit être conduit pour concevoir une interface fortement capacitive.

Par ailleurs, dans le modèle présenté, l'électrode métallique est directement et intégralement recouverte par une membrane neuronale. Dans la réalité de l'expérimentation, le métal de l'électrode est recouvert d'un *coating* de poly-D-lysine et de collagène. L'effet de ce *coating* sur l'interface entre l'électrode et l'électrolyte

fait actuellement l'objet d'une caractérisation expérimentale dont les premiers résultats seront présentés dans le Chapitre 3, §3.6. Intégrés au modèle, ces résultats permettront de le rapprocher de la réalité expérimentale.

Enfin, la définition et le calcul de la résistance de jointure R_{seal} est une problématique complexe qui manque de maturité dans le modèle présenté (Figure 2-3). En premier lieu, la distance « d » séparant le neurone et l'électrode est difficile à évaluer. Le modèle est construit autour de valeurs disponibles dans la littérature, mais il serait intéressant de pouvoir évaluer la distance réelle séparant les cellules PC-12 des électrodes sur lesquelles elles sont cultivées. Une coupe transversale d'une cellule PC-12 attachée à une électrode permettrait de mesurer la distance les séparant au microscope électronique. Ensuite, les méthodes de calcul étudiées sont également issues de la littérature et ne correspondent pas à notre approche de cette problématique. Le développement d'une méthode de calcul adaptée à notre modèle est nécessaire pour donner une définition et une valeur précise de R_{seal} .

2.8.1.2 Evolutions vers un modèle à éléments finis possible

La Figure 2-3 représente le neurone vivant sous la forme de deux parties de membrane discontinues et uniquement reliées par la résistance R_{int} , représentant le cytosol. Dans la réalité et d'un point de vue biologique, la membrane neuronale est continue. De plus, le modèle du neurone est considéré comme une sphère uniforme : la surface de membrane liée au cône axonal, à l'axone et aux dendrites n'est pas représentée, et la répartition des canaux ioniques est considéré uniforme sur l'intégralité de la membrane. Cette concentration de canaux ioniques est en réalité variable avec un maximum situé au niveau du cône axonal, zone de génération des potentiels d'action. La distribution du modèle de membrane ou la réalisation d'un modèle en éléments finis (Buitenweg *et al.*, 2000; Choi & You, 2012) permettrait d'intégrer la continuité de membrane tout en modulant localement les propriétés de cette membrane. Une telle modélisation permettrait de se rapprocher de la biologie et des expérimentations.

2.8.1.3 Taux de recouvrement des électrodes

Des premières expérimentations ont été menées sur un dispositif dont les électrodes sont des lignes continues (Figure 2-15). Ces électrodes sont recouvertes d'une population de cellules neuronales et une partie de l'électrode est exposée à l'électrolyte. Or, comme l'ont montré Buitenweg *et al.*, (2000) et Choi & You, (2012), cette partie de l'électrode exposée à l'électrolyte entraîne une perte de signal. Intégrer

au modèle un paramètre de taux de recouvrement de l'électrode permettrait d'anticiper plus facilement les résultats issus des expérimentations.

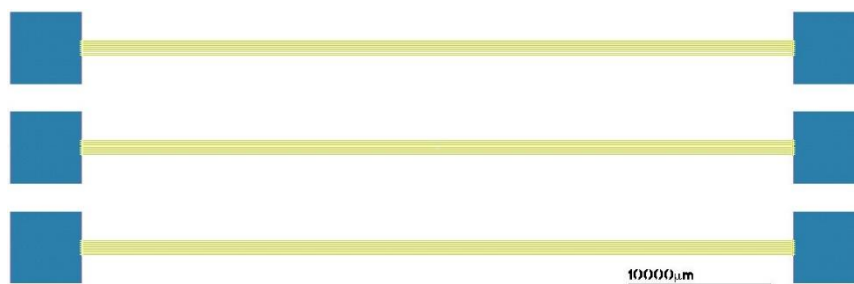


Figure 2-15 : Représentation schématique des électrodes du dispositif IMACA

Chapitre 3

INTERFACE FONCTIONNELLE

3.1 Introduction

Après avoir montré qu'il était possible de stimuler des cellules neuronales PC-12 par des signaux électriques, il convient de travailler à la conception et à la réalisation du système neurobiohybride, réalisations présentées dans ce chapitre. Les propriétés électriques de ces nouveaux systèmes neurobiohybrides seront déterminées par une caractérisation expérimentale.

Le dialogue entre des neurones vivants et des neurones artificiels peut être décomposé de la façon suivante : (i) des neurones artificiels stimulent des neurones vivants et (ii) des neurones vivants stimulent des neurones artificiels. Une preuve de faisabilité doit être expérimentalement apportée pour chacun de ces deux scénarios. Dans le cadre de cette thèse, les premières expérimentations se concentrent sur le scénario (i) où des neurones artificiels (signaux biomimétiques) stimulent des neurones vivants.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons travaillé à la conception de deux systèmes neurobiohybrides permettant la culture et la différenciation de cellules PC-12 directement sur un réseau de microélectrode. Cela s'est accompagné en amont d'un choix des techniques de caractérisation des réponses des cellules vivantes, les bancs de mesure pouvant générer des règles spécifiques au niveau du design.

Ces systèmes neurobiohybrides ont été fabriqués puis ont fait l'objet d'une première campagne de caractérisation visant à déterminer leurs propriétés électriques. Lors des expérimentations biologiques, leur surface est recouverte d'une matrice extracellulaire (*coating*) et baigne dans un milieu électrolytique de culture cellulaire. Une seconde campagne de caractérisation est alors réalisée, visant à déterminer expérimentalement les propriétés électriques de l'interface entre les électrodes recouvertes du *coating* et le milieu de culture. Les résultats issus de ces caractérisations expérimentales seront injectés dans le modèle électrique présenté au Chapitre 2, permettant de le rapprocher de la réalité expérimentale.

3.2 Enjeux des dispositifs à fabriquer

Nous souhaitons établir et démontrer la communication bidirectionnelle entre des neurones artificiels et des neurones vivants en faisant croître des neurones vivants sur une puce qui intègre des neurones et des synapses artificiels comme l'illustre la Figure 3-1.

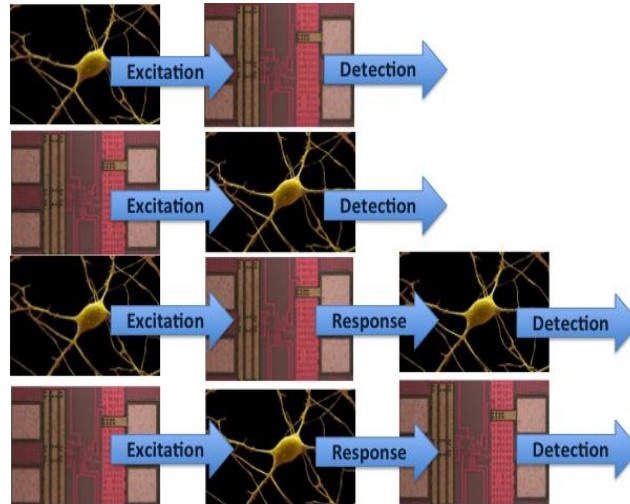


Figure 3-1 : Illustration de l'interface entre les neurones vivants et le circuit artificiel

Le dispositif biohybride sera composé d'un réseau d'électrodes, d'un puits de culture en polydiméthylsiloxane (PDMS) contenant la culture des cellules vivantes, comme le montre la Figure 3-2. Ce premier dispositif permettra d'interconnecter des neurones artificiels et des neurones vivants afin de réaliser la première preuve de concept.

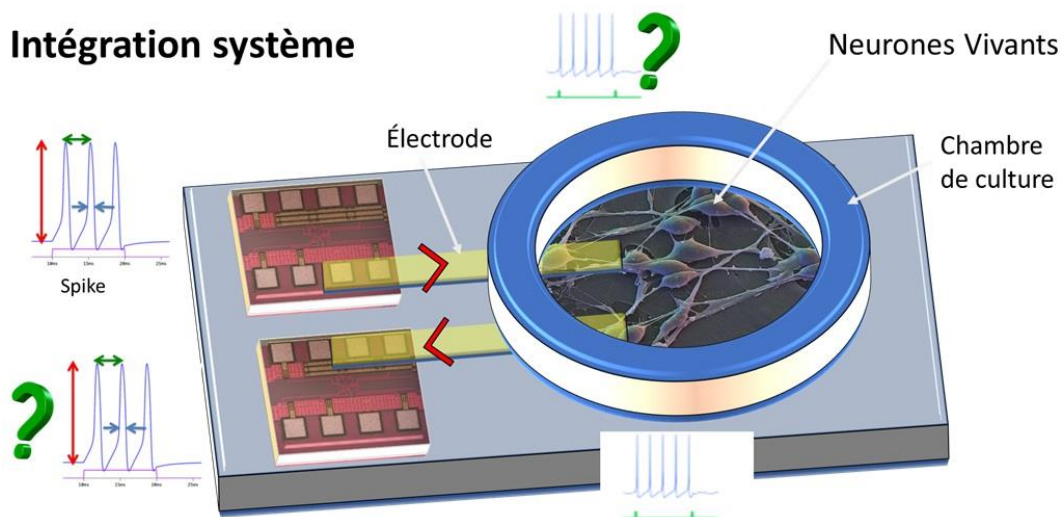


Figure 3-2 : Schéma du dispositif biohybride permettant de faire l'interface entre les neurones vivants et les neurones artificiels

Dès le départ de ce travail de thèse, un grand nombre de questions sont apparues pour développer nos dispositifs (Figure 3-2). Il a été nécessaire de travailler sur la

définition du réseau d'électrodes complet en tenant compte de nombreuses inconnues. En effet, la répartition des cellules vivantes, la qualité de l'accroche, la nature des *coatings* nécessaire à la croissance cellulaire, à quel moment faire la différenciation des cellules, étaient autant d'éléments inconnus au départ de ce travail de thèse. A cela se sont ajoutées d'autres questions techniques comme :

- Étudier le maillage d'électrodes et de la disposition des lignes pour exciter/détecter la génération des potentiels d'action des neurones vivants
- Définir la nature des plots métalliques (Au, Pt, ...)
- Estimer l'amplitude des signaux qui seront appliqués
- Développer le procédé pour la réalisation des électrodes qui doivent rester transparentes
- Réaliser et coller le puits de PDMS (60mm de diamètre extérieur, 35mm de diamètre intérieur) sur substrat de verre (3'')

3.3 Les solutions pour la détection des potentiels d'action des neurones vivants en réponse aux stimulations

Pour mener cette étude, il était primordial d'identifier en amont les techniques qui serviront à caractériser la génération des potentiels d'action par les neurones vivants sous l'effet d'une stimulation électrique ou pour vérifier que les neurones vivants sont électriquement actifs.

Les techniques vont avoir un impact sur le design du système neurobiohybride notamment en termes d'accès aux cellules et au dispositif, de polarisation des lignes, de la population de neurones observable, Ces éléments vont être présentés dans la suite de ce travail. L'activité de cellules vivantes peut être mise en évidence par des techniques d'imagerie fonctionnelle, comme l'imagerie calcique ou d'électrophysiologie, et également par d'autres techniques comme le patch-clamp ou des réseaux de microélectrodes (MEA).

3.3.1 Les techniques de détection usuelles d'un potentiel d'action

Trois grandes techniques vont être utilisées dans ce travail. Les deux premières sont menées dans le cadre d'une collaboration qui s'est construite avec l'Unité INSERM UMR 1003 Canaux ioniques et plus particulièrement avec le Dr. Pascal Mariot et le Dr. Valerio Farfariello spécialistes respectivement de l'électrophysiologie et de l'imagerie calcique. La troisième fait l'objet d'un développement spécifique à l'IEMN.

En premier lieu, il y a le patch-clamp (électrophysiologie) qui permet une mesure directe de l'activité électrique d'un neurone unique. Consistant en l'introduction d'une micropipette remplie de solution ionique conductrice, cette technique est invasive et destructrice pour la cellule mesurée. L'ensemble des

équipements et moyens nécessaires au patch-clamp en fait une technique difficile à mettre en place et à intégrer au sein d'un banc expérimental. Cette technique est plutôt destinée à effectuer des mesures précises de l'activité électrique d'un neurone vivant. Le patch-clamp est utilisé pour mesurer l'activité électrique d'une cellule neuronale PC-12 différenciée. Les résultats de cette mesure et la détection d'un spike validant la nature des cellules neuronales seront présentés dans le Chapitre 4 de cette thèse.

En deuxième solution, il existe l'imagerie calcique qui consiste à observer par fluorescence une entrée de calcium dans le neurone. Cette entrée de calcium résulte de l'ouverture de canaux ioniques au niveau de boutons synaptiques suite à l'émission d'un potentiel d'action. Cette technique permet de mesurer l'activité de neurones à l'échelle d'une population et de vérifier que les neurones biologiques stimulés par les neurones artificiels conservent une activité biologique. Cette solution sera utilisée dans le cadre de ce travail et sera couplée au développement d'un design spécifique.

Enfin, de nombreuses manipulations visant à exciter ou écouter des cellules vivantes sont réalisées au travers de MEA (Multi Electrode Array). Ces réseaux de microélectrodes couplés à un banc expérimental approprié permettent la stimulation ou la détection et l'enregistrement de l'activité électrique d'un neurone ou d'une population de neurones interfacés avec le MEA (Radivojevic *et al.*, 2016). Les mesures réalisées au travers d'un MEA ne sont toutefois pas aussi précises que celles obtenues en utilisant la technique du patch-clamp. Ces MEA peuvent être facilement intégrés au sein d'un banc expérimental pour y être couplés à des techniques d'imagerie fonctionnelle ou de patch-clamp.

C'est justement cette solution que nous avons choisie dans un premier temps. En effet, des systèmes neurobiohybrides avec des lignes d'excitation seront étudiés spécifiquement grâce au principe de l'imagerie calcique. Ces dispositifs sont nommés « IMACA » dans la suite du document. Les règles de design en lien avec les expérimentations seront décrites dans la suite de ce chapitre. Les résultats de l'expérimentation montrant l'expression de potentiels d'action par le neurone vivant seront explicités dans le Chapitre 4, §4.3.2.

Au cours des travaux, il est apparu important de développer collectivement une autre solution de caractérisation s'appuyant spécifiquement sur les compétences en électronique du laboratoire. Pour cela, il s'est avéré important de travailler au développement d'un banc expérimental innovant, complètement analogique, permettant simultanément l'excitation sur la voie Tx et l'écoute sur la voie Rx d'un seul neurone vivant interfacé avec une électrode. Le fonctionnement de ce banc appelé RxTx suit le principe présenté sur la Figure 3-3. Dans le cadre de cette action, j'ai travaillé au développement d'un modèle, et à la fabrication d'une d'interface neurobiohybride spécifique appelée RxTx. Pour atteindre cet objectif, un neurobiohybride permettant la culture et la différenciation de cellules PC-12 sur un

MEA puis l'excitation et l'écoute simultanée des cellules PC-12 doit être développé. Ces MEA existent sous différentes formes, adaptées à des usages spécifiques, et leur

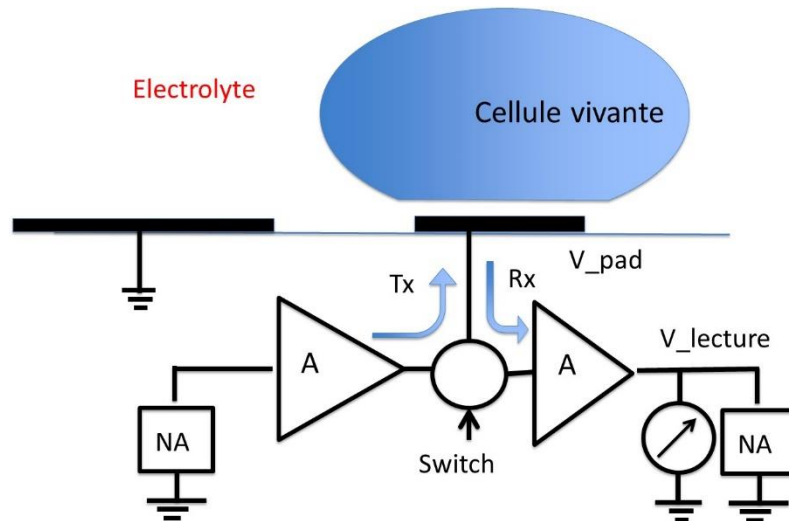


Figure 3-3: Schéma synoptique du banc de stimulation et d'écoute électrique "RxTx"

Voie transmission « Tx » : Un neurone artificiel [NA] émet un signal biomimétique, qui est amplifié, polarise une électrode et excite le neurone vivant couplé à l'électrode. Voie réception « Rx » : Le neurone vivant émet un potentiel d'action, qui est transmis au travers de l'électrode, amplifié, puis enregistré et appliqué à un neurone artificiel, qu'il vient exciter. Un switch permet de router l'électrode vers la voie Tx ou Rx. L'objectif de ce banc est de commuter suffisamment rapidement de la voie Tx vers la voie Rx pour permettre l'excitation d'un neurone sur la voie Tx puis l'écoute sur la voie Rx de la réponse de ce même neurone vivant.

étude sera approfondie par une revue de littérature, présentée dans le paragraphe suivant.

3.3.2 Etat de l'art des MEA

Pour développer ces neurobiohybrides IMACA et RxTx, il faut un dispositif de culture cellulaire commun, et un MEA adapté aux objectifs de chacun de ces deux neurobiohybrides. Ces MEA sont respectivement appelés MEA IMACA et MEA RxTx. Un état de l'art des MEA permet de déterminer le type de MEA adapté à chacun de ces neurobiohybrides.

Les MEA les plus répandus sont constitués d'un réseau de 32 à 256 électrodes. Chacune de ces électrodes est un disque métallique ou de semi-conducteur d'un diamètre de 10 μ m à 100 μ m et elles sont espacées de 30 μ m à 200 μ m. Ces électrodes permettent la détection et l'enregistrement des potentiels d'action émis par les neurones cultivés sur ces MEA. Toutefois, le couplage entre ces électrodes planaires et la membrane neuronale est assez faible. Ces MEA ne permettent pas la détection de signaux électrique de faibles amplitudes, par exemple les variations de potentiels membranaires inférieurs au seuil de dépolarisation. Enfin, la résolution spatiale de ces MEA est limitée par le faible nombre et la grande taille des électrodes ainsi que la distance entre les électrodes (Radivojevic *et al.*, 2016). Ces MEA sont disponibles dans

des solutions intégrées commerciales permettant la stimulation de neurones et l'enregistrement des signaux émis par les neurones. Ils peuvent être utilisés conjointement avec d'autres techniques d'électrophysiologie et d'imagerie fonctionnelle. Ainsi, Mosbacher *et al.*, (2020) ont utilisé un système d'électrodes planaires (Multi Channel Systems, Reutlingen, Germany, Figure 3-4-A) en complément de techniques d'optogénétique, et ont amené une preuve de concept quant à l'excitation de neurones vivant par des signaux issus de réseaux de neurones à impulsions (Spiking Neural Network, SNN).

Une réduction de la taille de ces électrodes et du pas des réseaux d'électrodes permet de réaliser des MEA à haute densité [HD-MEA]. Cette augmentation de densité permet d'améliorer la résolution des MEA. Toutefois, les électrodes constituant ces HD-MEA restent des électrodes planaires, qui ne permettent pas d'amélioration du couplage entre les électrodes et la membrane neuronale. Présenté par Radivojevic *et al.*, (2016), un HD-MEA de 11011 électrodes (noir de platine, 8,2 x 5,8 μ m, espacées de 17,5 μ m centre-à-centre) permet d'atteindre la résolution subcellulaire (Figure 3-4-B). Ce HD-MEA est couplé à une matrice de switches et de convertisseurs analogique-numérique permettant de router arbitrairement chaque électrode vers un système de stimulation ou vers un système d'amplification permettant d'enregistrer des signaux de faible amplitude. Utilisé en enregistrement de signal, ce HD-MEA permet de suivre le parcours d'un potentiel d'action dans un réseau de neurones. La haute résolution spatiale des HD-MEA permet de cibler le cône axonal, permettant de diminuer la tension de stimulation. Cette étude montre qu'une même électrode planaire peut être utilisée en enregistrement ou en stimulation (Ballini *et al.*, 2014; Frey *et al.*, 2010; Radivojevic *et al.*, 2016; Wagenaar *et al.*, 2004).

Un travail sur la géométrie des électrodes permet d'augmenter le couplage entre les neurones et les électrodes. Ojovan *et al.*, (2015) proposent des microélectrodes en or en forme de champignon (« Gold Mushroom-shaped microelectrode » [GM μ E]) (Figure 3-4-C). Ces électrodes sont englouties par les neurones cultivés dessus, réduisant la distance séparant la membrane neuronale de la surface de l'électrode à une dizaine de nm. Cette réduction de distance permet d'augmenter la résistance de jointure R_{seal} (Chapitre 2, §2.3.2.1) et donc le couplage entre le neurone et l'électrode. Des électrodes similaires utilisées par Hai *et al.*, (2010) ont permis l'enregistrement de potentiels d'action et de variations de potentiels inférieurs au seuil de dépolarisation, avec des caractéristiques proches des enregistrements intracellulaires.

La mesure de l'activité électrique des neurones cultivés sur des MEA peut être encore améliorée par l'utilisation de nanoélectrodes verticales capables de pénétrer la membrane neuronale afin d'établir une interface intracellulaire. Robinson *et al.*, (2012) ont développé un réseau de nanoélectrodes verticales en silicium, dont la pointe est recouverte de platine (Figure 3-4-D). Ces nanoélectrodes mesurent 150 nm de

diamètre, pour une hauteur de $3\mu\text{m}$ et le pas entre les nanoélectrodes est de $2\mu\text{m}$. Des neurones sont cultivés sur ces nanoélectrodes pendant plusieurs jours, et cette membrane est ensuite brièvement perméabilisée par électroporation pour permettre aux nanoélectrodes de pénétrer dans les neurones. Ces réseaux de nanoélectrodes verticales permettent l'enregistrement de l'activité électrique de la membrane neuronale avec une haute précision, quasi-identique aux mesures effectuées par patch-clamp, tout en pouvant être couplées à des systèmes d'électrophysiologie ou d'imagerie fonctionnelle.

Après avoir étudié les différentes solutions, notre approche a été de dire que la technologie de MEA utilisée pour concevoir et réaliser les MEA IMACA et RxTx se doit d'être simple et polyvalente. Elle doit permettre la stimulation et l'écoute de neurones vivants au travers d'une même électrode. D'après la revue de littérature, les électrodes métalliques planaires sont les mieux adaptées à nos problématiques. Elles permettent de développer un procédé de fabrication simple afin de faire rapidement des expériences avec les cellules vivantes. La suite de ce chapitre présente la conception et la réalisation des neurobiohybrides IMACA et RxTx, ainsi que leur caractérisation électrique.

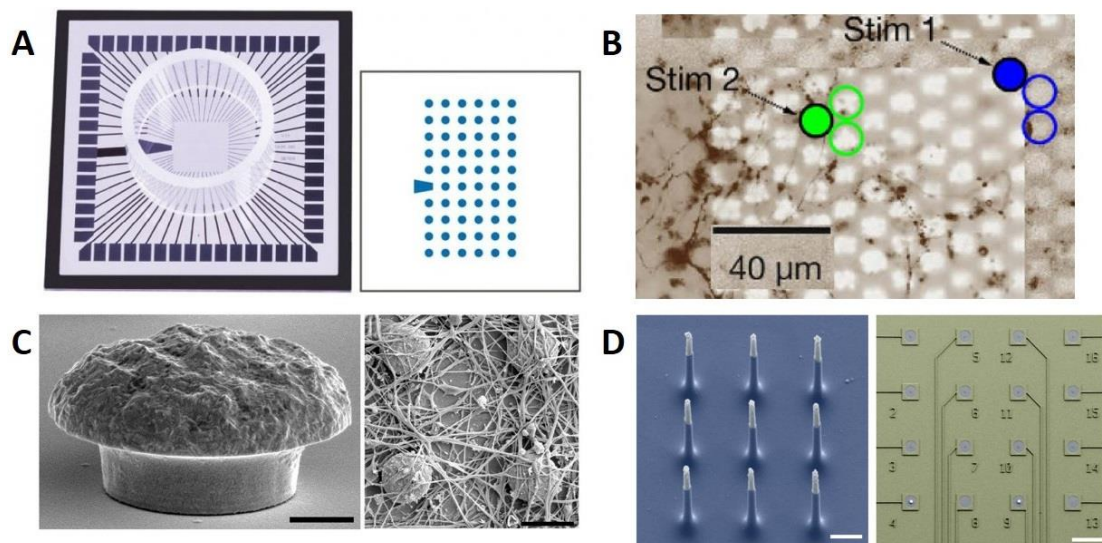


Figure 3-4 : Electrodes et MEA décrits dans l'état de l'art des MEA

A : Electrodes planaires « Multi Channel Systems ». Electrodes en TiN, $30\mu\text{m}$ de diamètre, espacées de $500\mu\text{m}$. Adapté de 60MEA500/30iR-Ti | www.multichannelsystems.com, s. d. Ces électrodes sont utilisées par Mosbacher *et al.*, (2020). **B** : Réseau de microélectrodes à haute densité « HD-MEA ». Electrodes en noir de platine, $8,2 \times 5,8\mu\text{m}$, espacées de $17,5\mu\text{m}$ centre-à-centre. La barre d'échelle représente $40\mu\text{m}$. Adapté de Radivojevic *et al.*, (2016). **C** – A gauche, microélectrode en forme de champignon en or (GµE), diamètre du chapeau $4 - 5\mu\text{m}$, barre d'échelle $1\mu\text{m}$. A droite, réseau de GµE recouverte de neurites, barre d'échelle $5\mu\text{m}$. Adapté de Ojovan *et al.*, (2015). **D** : A gauche, nanoélectrodes verticales, 150nm de diamètre, $3\mu\text{m}$ de hauteur, écartées de $2\mu\text{m}$. Chaque électrode est constituée d'un réseau de 3×3 nanoélectrodes. Barre d'échelle, $1\mu\text{m}$. A droite, MEA utilisant ces nanoélectrodes verticales. Barre d'échelle $120\mu\text{m}$. Adapté de Robinson *et al.*, (2012).

3.4 Conception des neurobiohybrides

Les neurobiohybrides doivent permettre de conduire l'étape complète de différenciation des cellules PC12 afin de les amener à l'état de cellules neuronales matures³ pour les stimuler électriquement au travers d'une électrode. A cela s'ajoute la possibilité de détecter par imagerie calcique ou d'enregistrer à l'aide d'une interface électronique leur activité électrique. Ces neurobiohybrides répondent à deux attentes, à savoir : (i) un dispositif étanche, stérile, et robuste permettant la culture de bout en bout des neurones vivants, et (ii) un réseau de multiélectrodes permettant d'acheminer le signal électrique aux neurones vivants, présentant une excellente adhérence au *coating*, offrant la possibilité de voir en transparence, et permettant de poser les sondes qui acheminent le signal électrique. Concrètement, la solution la plus simple constituée d'un substrat de verre servant de support au MEA, sur lequel est collé un puits de culture cellulaire (Figure 3-5) a été retenue.

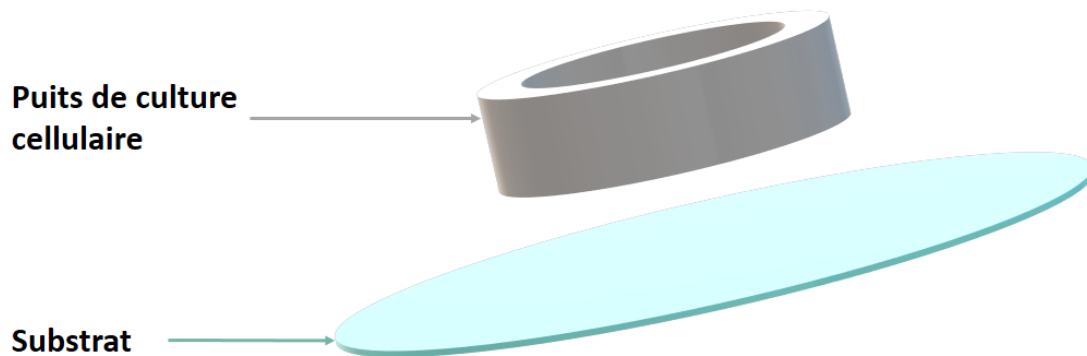


Figure 3-5 : Modélisation du puits de culture cellulaire et du substrat

Le détail des contraintes portant sur les dispositifs est étudié dans le cahier des charges exposé dans la suite du manuscrit. Les lignes directrices établies par ce cahier des charges permettront de concevoir et réaliser des systèmes neurobiohybrides cohérents avec les objectifs définis, et adaptés à l'agencement des plateformes expérimentales. Le protocole de culture cellulaire et le procédé de fabrication sont commun aux neurobiohybrides IMACA et RxTx. Ces deux sujets seront présentés conjointement dans le paragraphe 3.4.1. Les règles pour le design des *layouts* du type IMACA et RxTx seront présentées dans le paragraphe 3.4.2.

³ La maturité des neurones issus de cellules PC-12 différenciées s'apprécie d'une part par l'observation de l'expression de protéines spécifiques des neurones et d'autre part par leur excitabilité. Ces notions sont présentées en détail dans le Chapitre 4.

3.4.1 Protocole de culture et procédé de fabrication du système complet

La culture des cellules PC-12 est effectuée dans le puits de culture des neurobiohybrides et directement sur les électrodes du MEA. Ces neurobiohybrides sont ensuite intégrés au sein de bancs expérimentaux IMACA et RxTx. La culture cellulaire et les bancs expérimentaux imposent des contraintes, qu'il faut anticiper pour établir des directives guidant la conception de ces neurobiohybrides.

3.4.1.1 Cahier des charges des dispositifs

La culture cellulaire impose des contraintes aux neurobiohybrides. Les cellules cultivées dans les neurobiohybrides sont des PC-12 CRL 1721. Elles nécessitent 14 à 21 jours de différenciation avant d'obtenir des cellules neuronales matures et électriquement actives (Wiatrak *et al.*, 2020). Pendant ce laps de temps, les cellules sont maintenues dans une étuve à 37°C, en atmosphère humide, et le milieu de culture cellulaire est changé tous les deux jours. La différenciation des cellules est suivie visuellement à l'aide d'un microscope inversé : l'objectif est situé sous l'échantillon observé qui doit alors être transparent.

Des contraintes découlent de ces conditions de culture cellulaire :

- Le neurobiohybride doit être intégralement biocompatible et stérile.
- Le puits de culture doit contenir 3mL de milieu de culture cellulaire pour pouvoir apporter suffisamment de nutriments aux cellules et ne pas s'assécher à cause de l'évaporation.
- Le neurobiohybride doit être solide et robuste pour supporter les manipulations répétées et ne pas être dégradé par les conditions de culture.
- Le neurobiohybride doit être transparent pour permettre l'observation des cellules.

Aux contraintes liées à la culture cellulaire s'ajoutent les contraintes imposées par les bancs IMACA et RxTx. La plateforme d'imagerie calcique et d'écoute électrique sont éloignées du site de culture cellulaire. Le dispositif doit pouvoir être transporté d'un site à un autre, sans endommager ni les cellules, ni le dispositif. De plus, à l'instar du laboratoire de culture cellulaire, le banc d'imagerie est équipé d'un microscope inversé. Il faut donc que le neurobiohybride soit solide, transportable et transparent.

Il y a également des contraintes liées aux procédés de fabrication. D'abord, les couches métalliques des MEA sont déposées par évaporation sous vide. Cette technologie, très bien maîtrisée, reproductible et rapide, permet une bonne conformité du dépôt métallique. Sa mise en place nécessite un profil de résine qui permette de faire un lift-off et une vigilance particulière doit être accordée à l'état de la surface des substrats afin de garantir une accroche optimale des métallisations sur le verre.

A ce stade du travail, il est clair que le design relatif à l'implémentation des électrodes et leur distribution sur le substrat de verre est susceptible de fortes évolutions. Les retours d'expérience apportés au fur et à mesure des expérimentations permettront d'améliorer et d'affiner les MEA. Par conséquent, il est important de disposer d'une technologie de fabrication polyvalente permettant de faire évoluer le design des MEA rapidement, facilement et à moindre coût.

Enfin, les neurobiohybrides sont fabriqués en salle blanche, un environnement propre mais non stérile. Chaque dispositif doit être stérilisé par un bain d'éthanol avant d'être introduit sous le poste de sécurité microbiologique (PSM) du laboratoire de biologie, où les cellules seront manipulées. Le protocole de stérilisation sera présenté dans le Chapitre 4, §4.2.3 de cette thèse, consacré à la culture cellulaire et aux expérimentations biologiques.

3.4.1.2 Choix des matériaux et des orientations technologiques en réponse au cahier des charges

L'ensemble des solutions matérielles et technologiques répondant au cahier des charges sont présentées dans ce paragraphe. Le choix du matériau pour le substrat s'est porté sur du verre borosilicate Borofloat® 33, d'épaisseur 1000 µm. Ce matériau est robuste, biocompatible, résistant à l'éthanol et transparent aux longueurs d'ondes du spectre visibles. Sa résistance aux hautes températures permet un dépôt métallique par évaporation. Les MEA sont constitués d'une couche d'accroche de 10nm de titane, recouverte d'une couche conductrice de 100nm d'or. Ces deux matériaux sont hautement biocompatibles. Ne pouvant rendre ces MEA métalliques transparentes, une solution de design permettant d'observer les neurones au travers de ces électrodes sera proposée dans la suite de ce paragraphe. Les puits de culture cellulaire sont réalisés en polydiméthylsiloxane [PDMS]. Ce polymère est biocompatible, transparent et mécaniquement et chimiquement très résistant. Deux boîtes de Pétri de diamètre 60mm et 35mm sont utilisées comme moule et contre-moule à usage unique pour former le puits de culture cellulaire. L'utilisation de ces boîtes de pétri à usage unique permet de limiter les risques de contamination et de réaliser des puits de PDMS utilisant les dimensions standard de verrerie de culture cellulaire. En effet, une boîte de pétri de 35mm de diamètre à une contenance de 3mL. Le puits de culture et le substrat sont assemblés par un traitement de surface effectué par Corona sur le puits de PDMS et par plasma O₂ sur le substrat et les électrodes. Ce procédé permet une soudure solide et étanche entre le substrat de verre et le puits de culture en PDMS. Pour pouvoir faire évoluer le design des MEA très rapidement et réaliser des itérations successives avec une grande souplesse d'utilisation, une solution innovante est utilisée. Ainsi, la résine est insolée par un laser UV, qui permet de transférer directement les motifs du *layout* numérique sur le substrat. Le *layout* peut donc être très facilement modifié. Cette technique permet de se passer de masque optique physique, long et coûteux à concevoir et fabriquer.

3.4.2 Design des électrodes spécifiques IMACA et RxTx

Après avoir défini, les matériaux et les orientations technologiques en réponse au cahier des charges, il convient de travailler sur le design des *layouts* des MEA IMACA et RxTx.

3.4.2.1 Design du *layout* IMACA

L'objectif des expériences d'imagerie calcique réalisées sur le neurobiohybride IMACA est d'observer la réponse d'une population de neurones à une stimulation électrique. Par ailleurs, nous ne connaissons pas le tropisme des cellules PC-12. Les électrodes du MEA IMACA doivent alors représenter un maximum de surface pour permettre la stimulation simultanée d'un maximum de neurones. Toutefois ces électrodes sont constituées d'une couche de 10nm de titane et de 100nm d'or et ne sont pas transparentes. Ces électrodes doivent alors également être suffisamment petites pour permettre aux corps cellulaires et aux neurites de dépasser des électrodes pour être visibles. Ensuite, lors de ces expérimentations d'imagerie calcique, les cellules neuronales cultivées sur les électrodes sont stimulées par une tension électrique. Cette tension est transmise d'un générateur vers les électrodes au moyen d'aiguilles métalliques posées sur les pads d'accès aux électrodes. Sur une plateforme de caractérisation standard, ces aiguilles sont positionnées sous microscope droit, à l'aide de micromanipulateurs. La présence d'une enceinte thermorégulée sur le banc d'imagerie calcique (Figure 3-6) ne permet d'introduire que les micromanipulateurs mais pas de microscope droit. Les aiguilles devant être posées à l'œil nu, les pads d'accès doivent être suffisamment grands pour permettre cette manipulation. Enfin, le potentiel du signal de stimulation doit être établi par rapport à une référence de

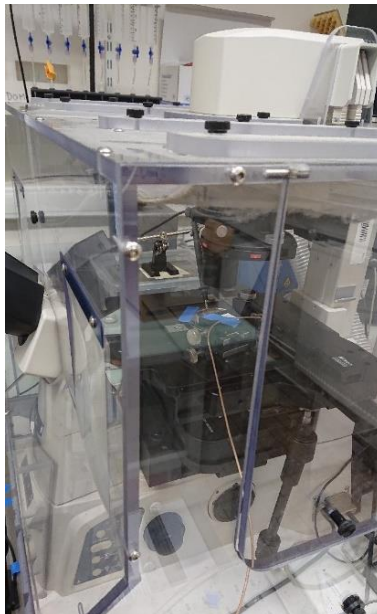


Figure 3-6 : Banc d'imagerie calcique

Le microscope permettant de réaliser les expérimentations d'imagerie calcique est intégré dans une enceinte thermorégulée.

potentiel. Une électrode de référence doit donc être introduite au plus près des électrodes de stimulation. Dans le cas du neurobiohybride IMACA, une référence sera introduite dans l'électrolyte au moyen d'une pointe métallique plongée dans l'électrolyte, indépendante du neurobiohybride IMACA.

Prenant en compte ces contraintes de design, les électrodes sont constituées de lignes longues de 5cm et large de 10 μ m (Figure 3-7-A, Figure 3-12-A & B, Figure 3-14-A & B). La taille du soma des cellules PC-12 étant d'environ 10 μ m et les neurites étant de dimension bien supérieure, ces cellules PC-12 différenciées sont visibles et permettent l'observation par imagerie calcique des réponses des cellules neuronales aux stimulations électriques. Un ensemble d'essais de fabrication a montré que du fait de la très grande longueur de ces électrodes, il arrivait que certaines d'entre elles présentent des défauts et soient coupées. Pour limiter ce risque, plusieurs électrodes sont mises en parallèle. Chaque électrode du neurobiohybride IMACA est constituée d'un faisceau de 10 lignes, espacées de 100 μ m et connectées entre elles par un pad d'accès carré de 500 μ m de côté. Les dimensions de ces pads d'accès sont suffisantes pour permettre de poser les aiguilles de stimulation à l'œil nu. Le MEA IMACA final comporte trois faisceaux de 10 lignes (Figure 3-7-A).

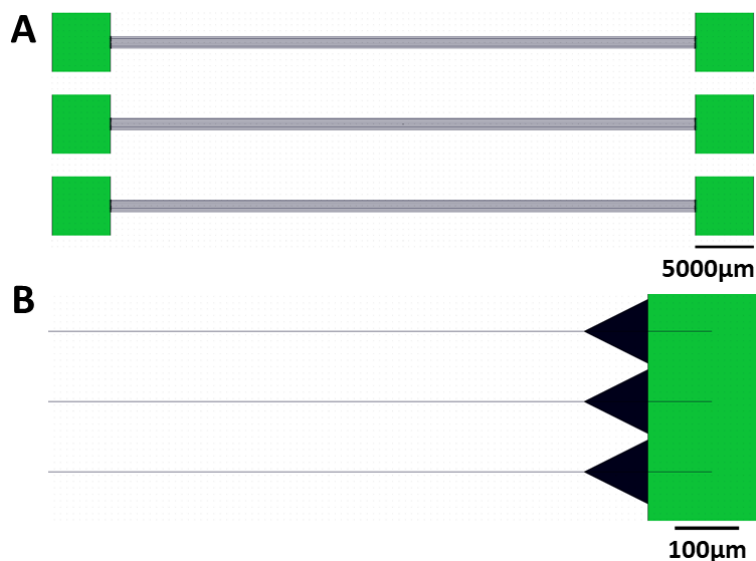


Figure 3-7 : Layout du MEA IMACA

A : *Layout* complet du MEA IMACA. Chaque électrode est composée de 10 lignes, connectées entre elles par les pads d'accès situées à leurs extrémités. **B :** Détail du *layout* : jonction des lignes et des pads d'accès.

3.4.2.2 Conception et design du *layout* RxTx

L'objectif du neurobiohybride RxTx est d'enregistrer l'activité électrique d'une seule et unique cellule PC-12 et d'établir une communication bidirectionnelle en temps réel et sans conversion de signal analogique numérique : neurone artificiel – neurone vivant – neurone artificiel. L'excitation se fait sur la voix Tx et la réception se fait sur la voix Rx.

Pour dialoguer avec une seule cellule, chaque électrode doit être interfacée avec une cellule neuronale unique. Ces électrodes doivent être suffisamment grandes pour maximiser la surface de contact entre l'électrode et la cellule neuronale, tout en permettant l'observation du bord du corps cellulaire et des neurites pendant leur différenciation. Ensuite, nous voulons stimuler et écouter plusieurs cellules neuronales en parallèle. Il faut rendre possible un accès simultané à plusieurs lignes. Enfin, les tensions électriques mesurées sur ces MEA RxTx sont de très faible amplitude. Il faut donc introduire la référence de potentiel au plus proche des électrodes. La terminaison des lignes de métal pour le dispositif RxTx sont des cercles de 20 μ m de diamètre (Figure 3-9-C, Figure 3-11-D, Figure 3-15-D). Ces électrodes sont suffisamment grandes pour maximiser la surface de contact entre l'électrode et la cellule neuronale, tout en permettant l'observation du bord du corps cellulaire et des neurites pendant leur différenciation. Elles sont reliées aux pads d'accès par des lignes de 10 μ m de large pour 2cm de long (Figure 3-9-C, Figure 3-11-C & D, Figure 3-15-C & D).

Le banc d'expérimentation RxTx est équipé d'un microscope droit, permettant de poser les pointes de connexion entre le neurobiohybride RxTx et le banc RxTx. Une pointe multicanaux est utilisée, permettant la connexion simultanée de 8 électrodes avec une seule pointe. Les pads d'accès permettant de poser la pointe multicanaux sont rectangulaires, de dimensions 100 μ m x 60 μ m et sont disposés avec un pas de 100 μ m centre-à-centre, correspondant au pas des accès de la pointe multicanaux (Figure 3-9-B, Figure 3-11-B, Figure 3-15-B). Ce banc RxTx intègre deux technologies complémentaires d'acquisition du signal émis par les neurones vivants. En plus de l'enregistrement de l'activité électrique des cellules neuronales vivantes au travers des électrodes, cette activité sera monitorée par imagerie calcique. Cette double acquisition permet de s'assurer que les signaux enregistrés au travers de l'électrode sur la voie Rx ont du sens et qu'il ne s'agit pas d'artéfacts de mesure. Ce banc RxTx est alors intégré dans une enceinte fermée. Cette enceinte permet de placer le banc d'imagerie calcique dans l'obscurité et joue le rôle de cage de Faraday, isolant le banc RxTx du bruit électromagnétique. Ce banc est présenté sur la Figure 3-8.

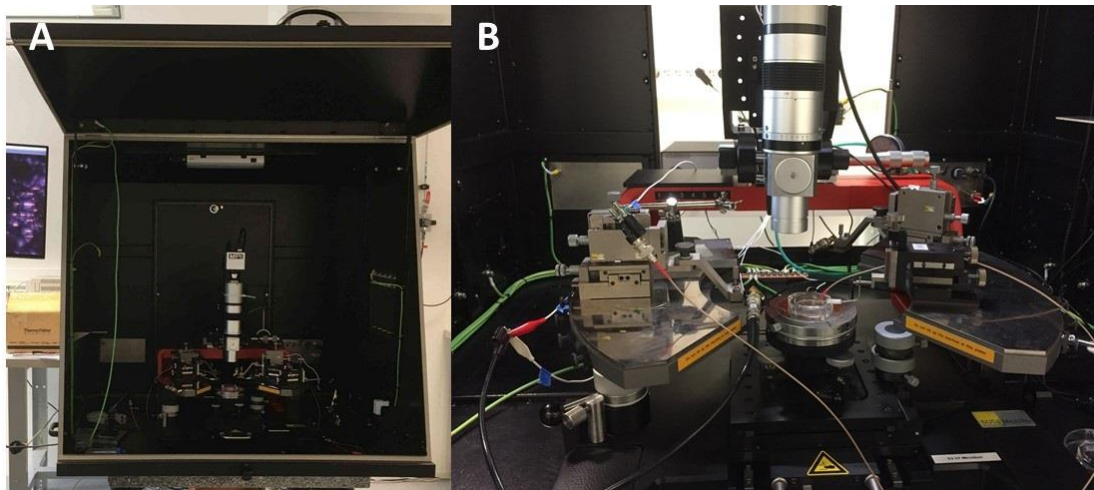


Figure 3-8 : Photographies du banc RxTx

A : Banc RxTx intégré dans son enceinte. **B** : Banc RxTx Les pointes multicanaux sont manipulées sous microscope à l'aide de micromanipulateurs.

Enfin, la référence de potentiel de masse est introduite dans l'électrolyte par une électrode de référence qui est intégrée sur la face avant du MEA RxTx. Il faut réussir à imposer la masse dans le bain d'électrolyte au travers de cette électrode, mise en face avant et recouverte du *coating*. Pour assurer un potentiel proche de 0V dans l'électrolyte, qui est conducteur et qui sera donc équipotentiel, le paramètre important à définir est le rapport des surfaces des plots de signal et de masse. Après une étude menée au sein de l'équipe, il est apparu que la surface du plot de masse doit être très supérieure (au moins dix fois) à la surface du plot de signal d'excitation. Cette condition approximative s'applique également au cas de l'écoute d'une cellule. Pour comprendre cette règle de design, il convient de raisonner au niveau des capacités d'interface reliées respectivement au plot de masse et aux électrodes de signal. En effet, la caractérisation de l'interface recouverte du *coating*, présentée à la fin de ce chapitre, montre qu'il s'agit d'un couplage capacitif entre les plots métalliques et la cellule vivante entourée du bain d'électrolyte. La valeur d'une capacité « C » s'exprime classiquement sous la forme $C = \frac{\epsilon \cdot S}{e}$ montrant la proportionnalité de sa valeur directement à la surface « S » du plot. Plus la surface de métal est grande et plus la valeur de la capacité est grande, les autres grandeurs étant constantes dans notre cas. A cela, il est important de rappeler simplement l'expression d'une impédance pour une capacité qui est sous la forme $Z = \frac{1}{j \cdot C \cdot \omega}$. Ainsi plus la valeur de la capacité est grande, et plus l'impédance tend vers zéro, les autres grandeurs restant constantes. Pour assurer la mise à la masse du bain d'électrolyte, il faut tendre vers la connexion la plus conductrice entre le plot de masse et le bain d'électrolyte. Il faut donc que la capacité C soit très grande pour que l'impédance soit la plus petite possible afin d'assurer le meilleur couplage entre le plot de masse et le bain d'électrolyte. Par ailleurs, il faut noter que l'électrode de signal et

celle du plan de masse sont toutes les deux en face avant. Il y a donc deux couplages, ce qui implique également de travailler sur le rapport entre les deux couplages capacitifs pour assurer la détection ou l'excitation de la cellule en mode RxTx. Après simulation, pour garder une efficacité du dispositif, il faut que la capacité liée au plot de masse soit 10 fois plus grande que celle liée aux électrodes. Les deux types de plots étant recouverts par le même *coating*, il convient de jouer sur la surface des plots. La référence est amenée au plus proche des électrodes par une piste de 130 μm de largeur longeant les lignes puis venant enserrer les électrodes (Figure 3-9-C, Figure 3-11-C & D, Figure 3-15-C). La surface de cette électrode de référence est très supérieure à la surface des électrodes.

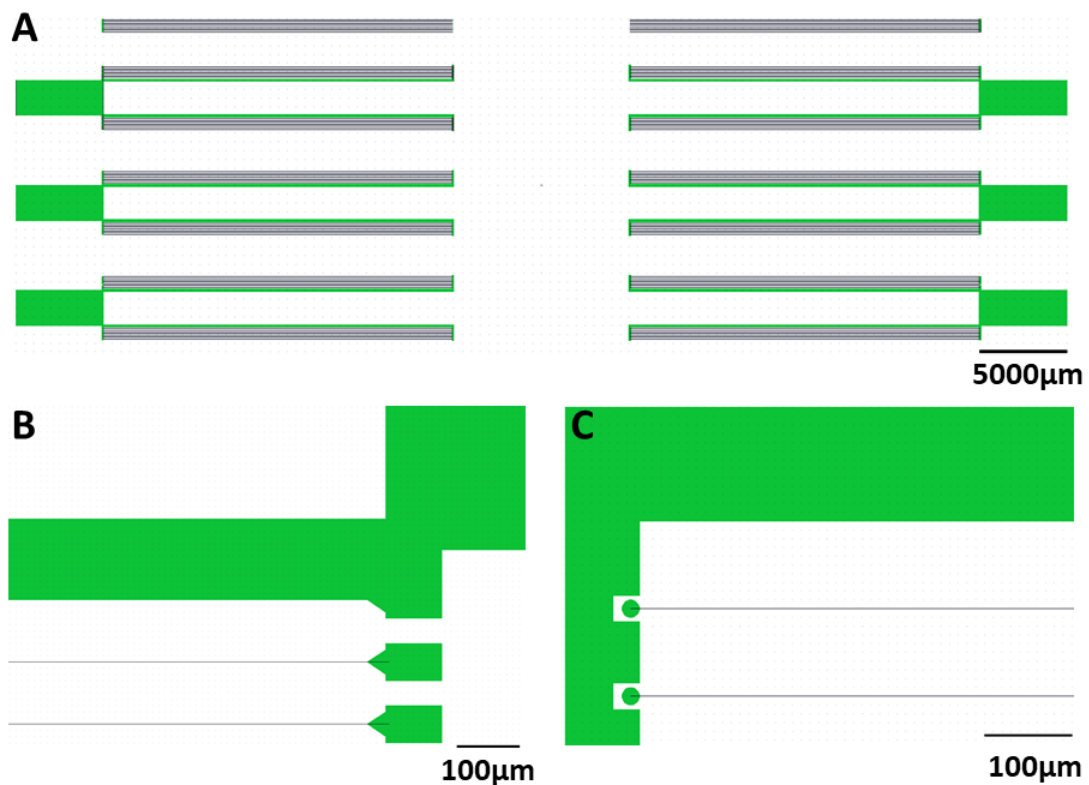


Figure 3-9 : Layout du MEA RxTx

A : *Layout* complet du MEA RxTx. Chacune des 7 électrodes de 20 μm de diamètre est reliée au pad d'accès par une ligne de 10 μm de large sur 2cm de long. Une piste de 130 μm de large permet d'amener la référence de potentiel au plus près des électrodes. **B :** Détail du *layout* : jonction des lignes et de la piste de référence avec les pads d'accès. **C :** Détail du *layout* : Electrodes de 20 μm de diamètre enserrées par la piste de référence des potentiels.

3.5 Enchaînement et détail des étapes de fabrication des neurobiohybrides

Ce paragraphe décrit les étapes de fabrication des neurobiohybrides IMACA et RxTx que j'ai développées pendant ma thèse. Les matériaux et technologies de réalisation sont identiques pour les deux neurobiohybrides, seuls changent les *layouts* des MEA.

Les substrats sont nettoyés et résinés, puis le *layout* du MEA est transféré dans la résine par photolithographie laser. Après révélation du motif, les couches métalliques constituant les électrodes sont déposées par évaporation. Un lift-off permet d'enlever l'excédent de métallisation et de révéler le MEA. L'ensemble des étapes de fabrication sont présentées sur la Figure 3-10. Après moulage et réticulation du puits de culture cellulaire, il est assemblé au substrat par fonctionnalisation de surface, aboutissant à un neurobiohybride.

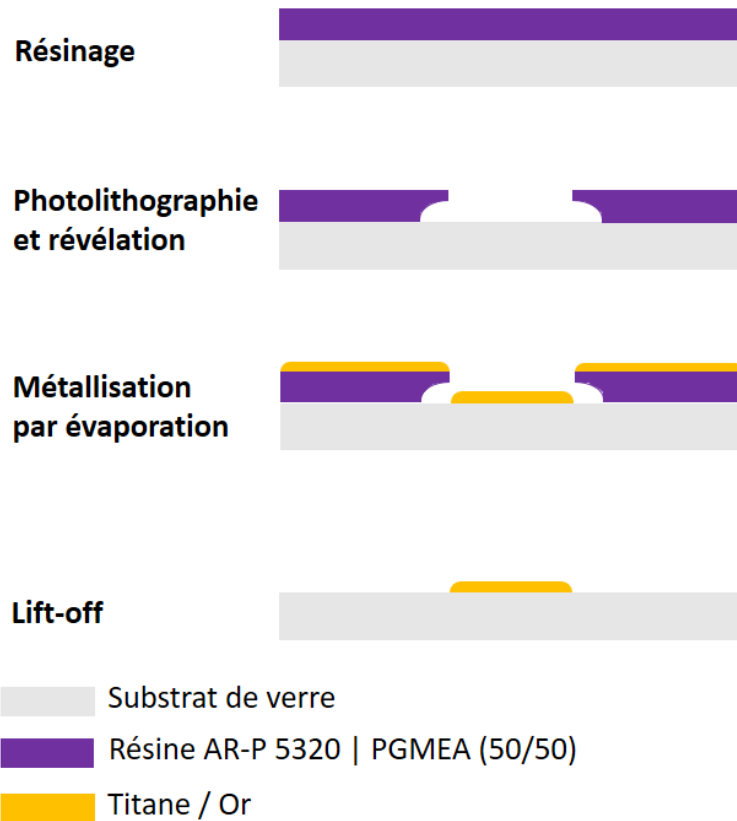


Figure 3-10 : Etapes de fabrication d'un neurobiohybride

3.5.1 Etapes technologiques de la fabrication des électrodes

Un premier nettoyage manuel à l'eau et au détergent (Elma™ Lab Clean N10) permet d'éliminer les poussières et pollutions de la surface des substrats. Ils sont ensuite nettoyés par ultrasons dans deux bains successifs d'acétone puis d'isopropanol pour éliminer les dernières contaminations et poussières, et séchés à l'azote. La longueur des lignes et leur faible largeur rend les dispositifs très sensibles aux défauts et pollutions présentes à la surface des substrats, aussi cette étape de nettoyage est cruciale. Le boîtier contenant le substrat est lui aussi rincé à l'acétone puis isopropanol et séché à l'azote.

Le verre du substrat offre une faible adhérence aux résines. Une fonctionnalisation de surface permet d'augmenter cette adhérence. Lors des premiers

essais de fabrication, le hexaméthylsilazane [HMDS] était utilisé comme promoteur d'adhésion de la résine sur le substrat. Cependant, la couche de résine s'écaillait lors de l'étape de révélation, rendant les dispositifs inutilisables. Des essais ont montré que le HMDS ne favorisait pas l'adhésion de la résine mais polluait la surface du substrat. Cette étape a été remplacée par une fonctionnalisation de surface par plasma O₂ (1000W, 10min, O₂ : 525sccm). Suite à cette fonctionnalisation de surface et avant l'étape de résinage, le substrat est déshydraté sur une plaque chauffante à 100°C pendant 10 minutes. La résine utilisée est de l'AR-P 5320 (Allresist) diluée à 50% dans du PGMEA. Cette résine monocouche offre un profil casquette permettant de réaliser un lift-off humide. Elle est étalée à la surface du substrat par centrifugation, à une vitesse de 1000 tr/min, une accélération 1500 tr/min, et pour une durée de 40s. La résine est ensuite cuite sur une plaque chauffante à 100°C pendant 6 minutes. L'épaisseur de la couche de résine obtenue est de 1000µm, 10 fois supérieure à l'épaisseur de métallisation (110nm). Le transfert du *layout* sur la résine est effectué par photolithographie laser. Le motif est tracé directement sur la résine avec un laser UV (Dilase® 650). Ne nécessitant pas de masque physique, cette technologie est très polyvalente et autorise les modifications de *layout*. Le développement est réalisé par un bain de développeur AR 300-26 (Allresist GmbH) dilué dans de l'eau désionisée (1:2 en volume) pendant 1min45s en agitant délicatement le substrat toutes les 30s. Le substrat est rincé dans un bain d'eau désionisée et séché à l'azote. Après cette révélation, l'ouverture des motifs est observée sous microscope. Les Figure 3-11 et Figure 3-12 présentent des photographies de ces observations microscopiques. Les tailles des motifs des MEA IMACA et RxTx correspondent à ceux du *layout* numérique.

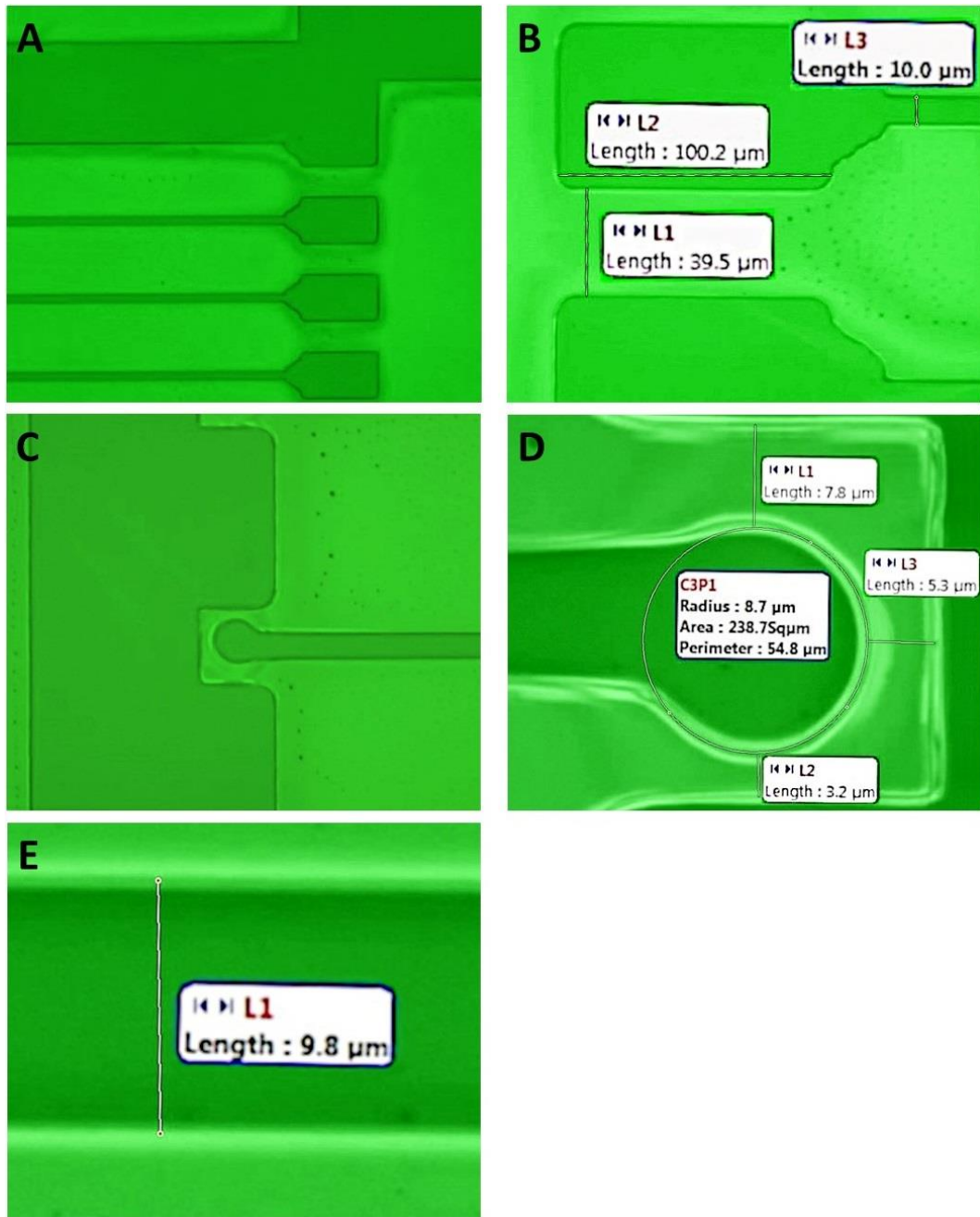


Figure 3-11 : Photographies des motifs du MEA RxTx après ouverture de la résine

A : Jonction des lignes et de la piste de référence des potentiels avec les pads d'accès. **B** : Pads d'accès aux électrodes. Dimensions 100 x 60μm, espacés de 40μm. **C** : Electrode enserrée par la piste de référence des potentiels. **D** : Electrodes de 20μm de diamètre enserrées par la piste de référence des potentiels. L'électrode est séparée de 5μm de la référence des potentiels. **E** : Ligne d'accès aux électrodes. Cette ligne mesure 10μm de large.

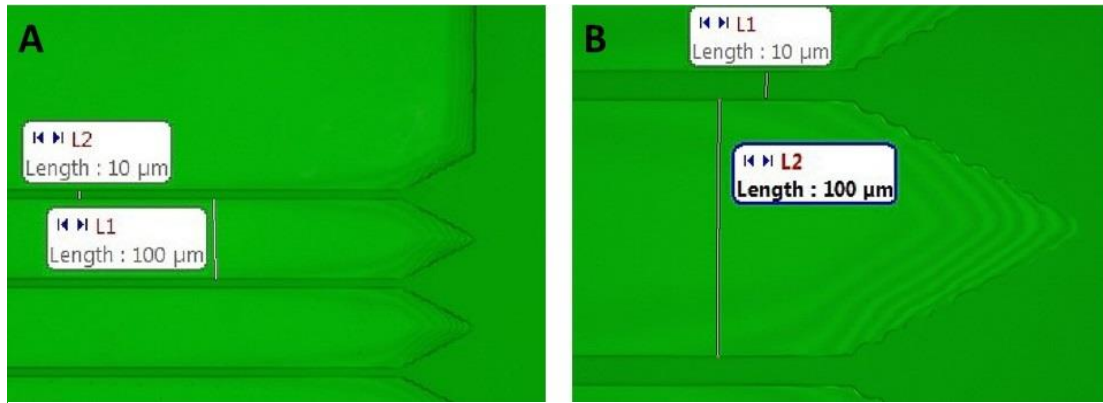


Figure 3-12 : Photographies des motifs du MEA IMACA après ouverture de la résine

A : Jonction des lignes et d'un pad d'accès du dispositif d'une électrode du MEA IMACA. Chaque électrode est composée de 10 lignes connectées entre elles par les pads d'accès situées à leurs extrémités. Les lignes font 10µm de large et sont espacées de 100µm. B : Détail du *layout* : jonction des lignes et des pads d'accès.

Malgré la fonctionnalisation de surface, l'adhésion de la résine sur le substrat est fragile. Il faut être très précautionneux lors du séchage et pousser les gouttes d'eau restantes dans le sens des lignes en utilisant un bas débit d'azote. Un rinçage ou séchage trop brutal dégrade la résine, qui s'écaille et rend le substrat inutilisable (Figure 3-13).

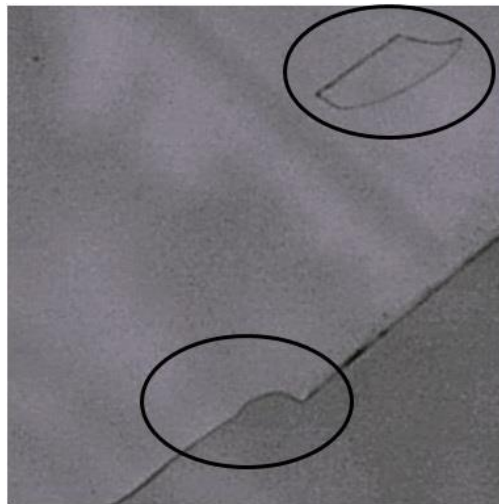


Figure 3-13 : Résine écaillée suite à un séchage trop brutal

La métallisation est effectuée par évaporation. Les deux couches métalliques sont déposées successivement sur l'intégralité de la surface du substrat résiné. La première couche de titane de 10nm d'épaisseur est une couche d'accroche, permettant l'adhésion de la couche d'or sur le substrat de verre. Elle est recouverte par la couche conductrice de 100 nm d'or. Le lift-off est effectué par un bain de remover SVC-14 à 70°C pendant 30min. Le substrat est ensuite rincé par deux bains successifs d'acétone puis d'isopropanol, et séché à l'azote. Après ce lift-off, les MEA sont observés sous microscope. Les Figure 3-14 et Figure 3-15 présente des photographies de ces observations microscopiques. Les tailles des motifs des MEA IMACA et RxTx correspondent aux *layouts*.

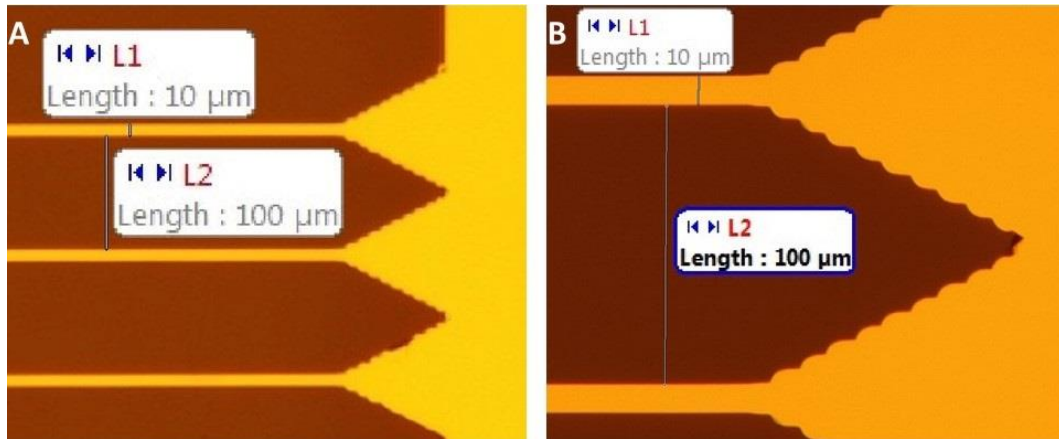


Figure 3-14 : Photographies des motifs du MEA IMACA après métallisation

A : Jonction des lignes et d'un pad d'accès du dispositif d'une électrode du MEA IMACA. Chaque électrode est composée de 10 lignes connectées entre elles par les pads d'accès situées à leurs extrémités. Les lignes font 10µm de large et sont espacées de 100µm. **B** : Détail de la jonction des lignes et des pads d'accès. Le crénelage visible sur le cône de jonction entre le pad d'accès et les lignes est un artéfact de gravure, sans impact sur les caractéristiques des électrodes.

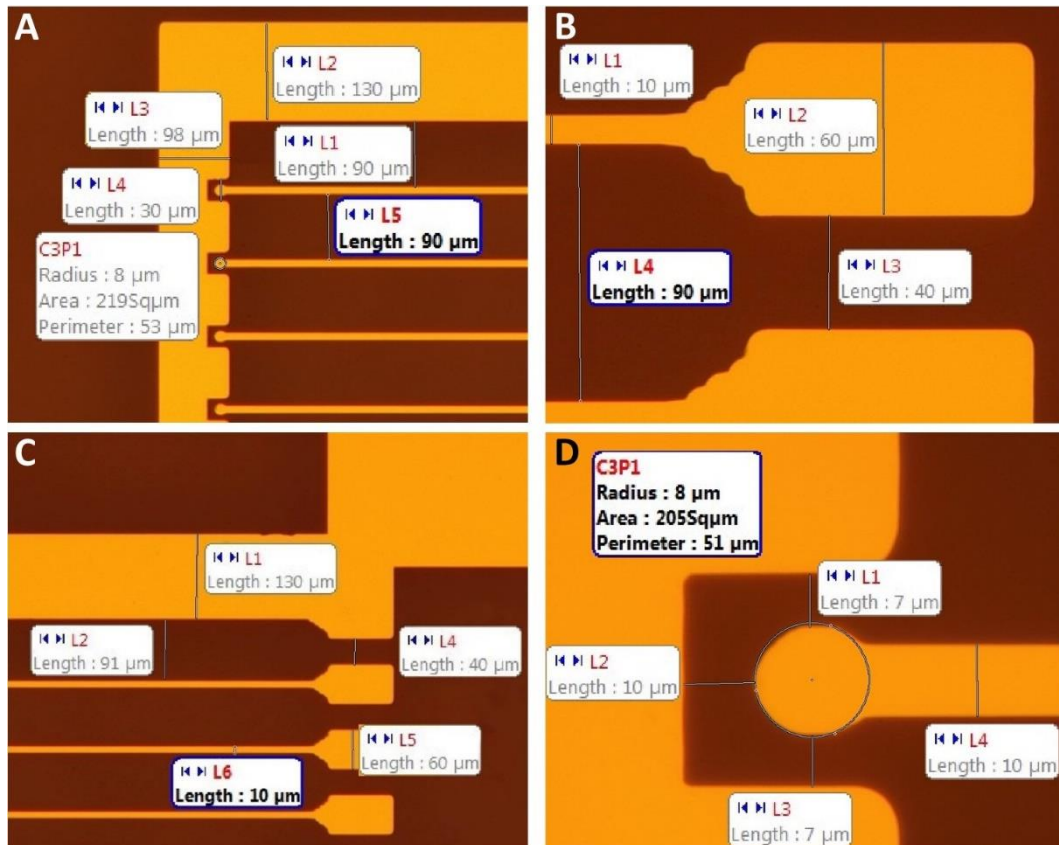


Figure 3-15 : Photographies des motifs du MEA RxTx après ouverture de la résine

A : Jonction des lignes et de la piste de référence des potentiels avec les pads d'accès. La piste de référence des potentiels mesure 130µm de large. Les lignes mesurent 10µm de large et sont espacées de 90µm. Les pads d'accès mesurent 60µm de large et sont espacés de 40µm. **B** : Pads d'accès aux électrodes. **C** : Electrodes enserrées par la piste de référence des potentiels. **D** : Electrodes de 20µm de diamètre enserrées par la piste de référence des potentiels. L'électrode est séparée de 5µm de la référence des potentiels.

Les faisceaux de lignes du MEA IMACA ont connu des premiers lift-off difficiles. En effet, le rapport entre la longueur des lignes constituant les électrodes (5cm), leur largeur (10 μ m) et la distance les séparant (100 μ m) rend la jonction entre ces lignes et les pads de connexion difficile d'accès au remove. Pour faciliter cet accès, le lift-off était effectué face métallisée vers le bas. Mais le métal étant déposé sur la totalité de la surface du substrat, la quantité de métal lifté est très importante par rapport aux lignes adhérant au substrat, ce qui mettait les électrodes sous tension. A cause de ces tensions, les lignes se décollaient et cassaient au niveau de la jonction avec les pads de connexion. Ce problème a été résolu en modifiant le *layout* pour ajouter des cônes aux jonctions entre les lignes et les pads de connexion, en diminuant les imperfections en ajoutant l'étape de nettoyage avec du détergent. Ces solutions ont été conservées sur le dispositif RxTx.

La fabrication des MEA IMACA et RxTx étant terminée, il faut réaliser les puits de PDMS puis assembler les électrodes et les puits de PDMS pour obtenir un neurobiohybride complet et fonctionnel.

3.5.2 Fabrication des puits de culture cellulaire

Le PDMS (SYLGARD™ 184) est mélangé avec son réticulant (SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer Curing Agent) à raison de 10 : 1 en masse, puis mélangé et dégazé sous vide dans un mélangeur planétaire (THINKY, ARV 310) pendant 1 minute. Ce PDMS est ensuite coulé dans les moules réalisés avec les boîtes de pétri et réticulé 4 heures à 70°C (Figure 3-16).



Figure 3-16 : Puits de culture en PDMS. Il est moulé à l'aide de deux boîtes de Pétri de 60mm et 35mm de diamètre

3.5.3 Assemblage des neurobiohybrides

L'anneau de PDMS est démoulé en faisant attention de garder la surface à assembler parfaitement propre. La présence de poussières ou débris provoque des bulles entre le puits de PDMS et le substrat, entraînant un risque de fuites. La surface

du PDMS est fonctionnalisée par Corona pendant 1min30s. La surface du substrat et les électrodes sont fonctionnalisées par un plasma O₂ (100W, 5min, pression O₂: 0,7mbar). Le puits de PDMS et le substrat sont ensuite pressés ensemble et l'assemblage est recuit 4 heures à 70°C.

L'effet corona se déclenche lorsqu'un courant traverse un gaz ionisé entre deux électrodes portées à haut potentiel. Dans notre application, l'électrode de masse est constituée par la surface à fonctionnaliser. Un essai de fonctionnalisation de la surface du substrat et des électrodes par traitement corona a été effectué, mais un courant de forte intensité traverse alors les électrodes et les détruit (Figure 3-17-A). La fonctionnalisation du substrat et des électrodes est alors effectuée par un plasma O₂. Ces deux techniques de fonctionnalisation de surface entraînent la formation de radicaux libres à la surface des matériaux. Mis en présence les uns des autres, ces radicaux libres forment des liaisons covalentes qui soudent les surfaces ensemble. Cette soudure est parfaitement étanche et très solide. Lors de tests visant à déterminer la solidité de cette soudure, le puits de PDMS ne s'est pas décollé du substrat, mais s'est déchiré au niveau de la soudure, la base du puits restant collée au substrat de verre et aux électrodes (Figure 3-17-B).

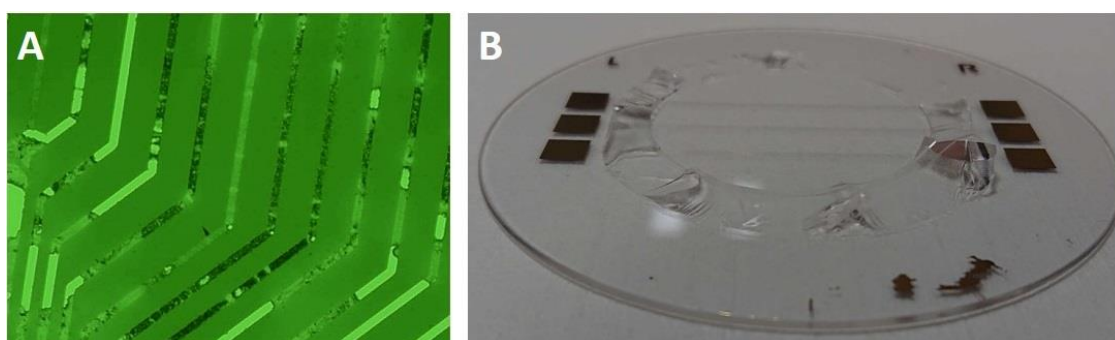


Figure 3-17 : A : Electrodes détruites après une décharge Corona. Ces lignes mesurent 10µm de large. B : Tests de la résistance de la soudure entre le puits de culture et le substrat. Le puits de culture ne se détache pas du substrat, mais le puits de PDMS se déchire au niveau de la soudure.

Ainsi assemblé, le neurobiohybride est prêt à être décontaminé pour une utilisation lors d'expériences de biologie. La Figure 3-18 présente des photographies des neurobiohybrides IMACA et RxTx assemblés.

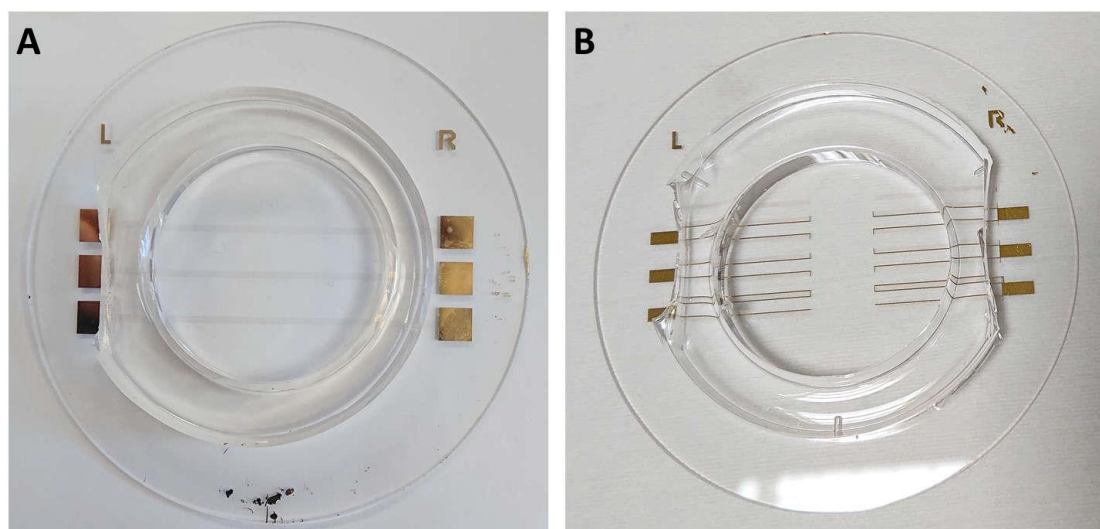


Figure 3-18 : Photographies des neurobiohybrides. Substrat de verre 3'. Puits de culture en PDMS, diamètre extérieur 50mm et diamètre intérieur 35mm

A : Neurobiohybride IMACA. **B :** Neurobiohybride RxTx.

3.6 Caractérisation des dispositifs

Les neurobiohybrides IMACA et RxTx ont été conçus pour observer la réponse de cellules neuronales à des stimulations électriques par d'imagerie calcique ou en enregistrant leur activité électrique. Les cellules neuronales étant électriquement stimulées, il est nécessaire de connaître les propriétés électriques de l'ensemble composé par les électrodes, l'interface entre les électrodes (*coating*) et le milieu de culture. Par ailleurs, un modèle électrique de membrane neuronale couplé à une électrode est présenté dans le Chapitre 2. Ce modèle est conçu sur la base d'éléments disponibles dans la littérature, mais il doit être confronté à la réalité expérimentale. La réalisation d'une campagne de caractérisation va permettre de mesurer la résistance des électrodes, et l'impédance de l'interface entre les électrodes et l'électrolyte. Les résultats issus de ces caractérisations permettront de rapprocher le modèle de membrane neuronale interfacé avec une électrode de la réalité des expérimentations et de calibrer les expériences biologiques.

Ces mesures sont réalisées en utilisant un potentiostat CHI 750E (CH Instruments, Inc.) paramétré pour réaliser des mesures d'impédimétrie. Une tension continue « Init_E » est appliquée entre une électrode de travail et une contre-électrode, puis une tension sinusoïdale d'amplitude « V_{\sin} » et de fréquence « f_{\sin} » est superposée à cette tension continue (Figure 3-19). Le potentiostat effectue une mesure du courant entre l'électrode de travail et la contre-électrode. La fréquence et l'amplitude de la tension sinusoïdale appliquée étant connues, le logiciel associé au potentiostat permet de calculer l'impédance du dipôle équivalent séparant l'électrode de travail et la contre-

électrode. Ces mesures peuvent être effectuées sur un balayage fréquentiel, l'impédance est alors calculée pour 12 points de mesure par décade. Lors de la caractérisation du dispositif IMACA, le potentiostat est paramétré comme suit : $\text{Init-E} = 0\text{V}$, $V_{\text{sin}} = \pm 500\text{mV}$ et $1\text{Hz} \leq f_{\text{sin}} \leq 1\text{MHz}$.

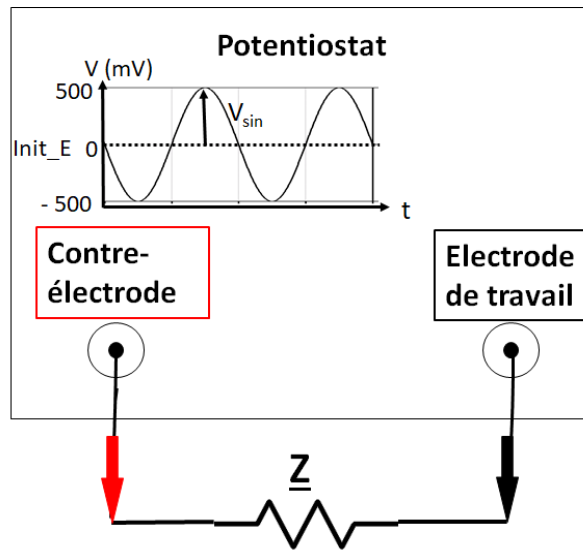


Figure 3-19 : Représentation schématique du potentiostat utilisé pour des mesures d'impédance

3.6.1 Mesure de la résistance des électrodes du dispositif IMACA

Les mesures d'impédances sont effectuées entre l'électrode de travail et la contre-électrode du potentiostat. Ces deux électrodes sont connectées aux pads d'accès situés à chaque extrémité d'une électrode d'un neurobiohybride IMACA. L'impédance de l'électrode est alors mesurée sur une plage fréquentielle allant de 1Hz à 1MHz. Ce banc de mesure est présenté sur la Figure 3-20-A.

La Figure 3-20-B présente les évolutions du module de l'impédance Z_{IMACA} (courbe bleue) et de sa phase (courbe orange) en fonction du logarithme de la fréquence. La phase est nulle sur l'ensemble des mesures ($-3 \geq \theta \geq 4$), ce qui indique que les électrodes du neurobiohybride IMACA sont purement résistives. Ensuite, d'après la revue de littérature⁴ présentée dans le Chapitre 2, §2.5, la fréquence des signaux de stimulation utilisés serait de l'ordre de la centaine Hz. Ainsi, à partir de la Figure 3-20-B étudiée dans la plage des basses fréquences (100-200Hz), les électrodes du dispositif IMACA sont équivalentes à des résistances telles que $R_{\text{IMACA}} = 206\Omega$.

⁴ (Akbar *et al.*, 2016; Buccelli *et al.*, 2019; Eusebio *et al.*, 2011; Little & Brown, 2012; Radivojevic *et al.*, 2016; Wagenaar *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2018)

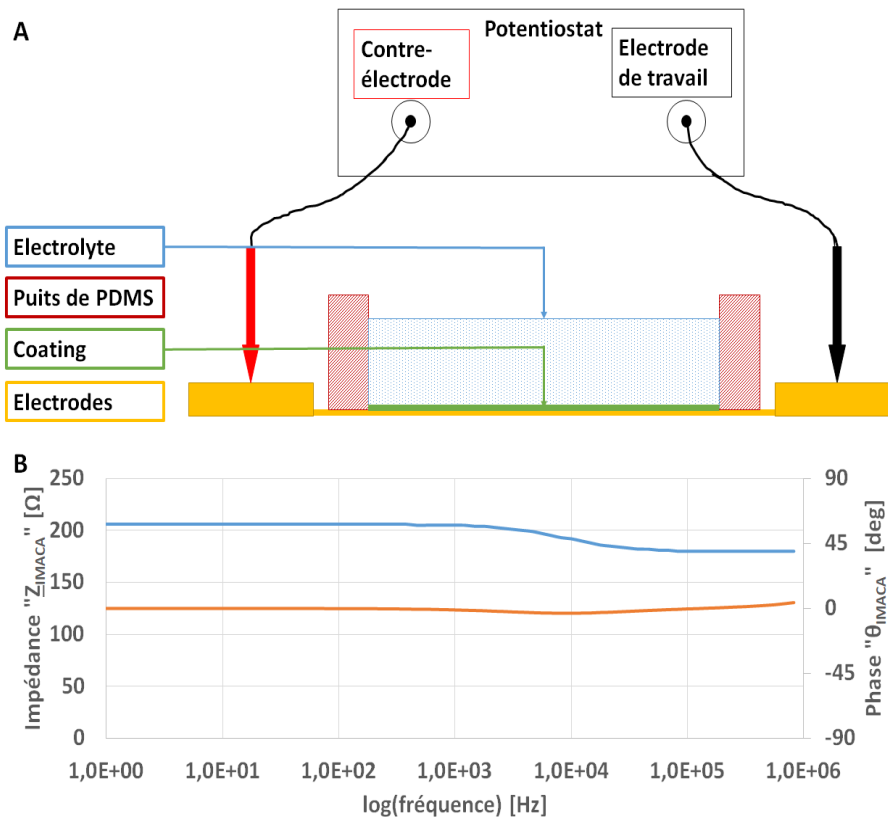


Figure 3-20 : Mesure de l'impédance des électrodes du neurobiohybride IMACA

A: Représentation schématique du banc de mesure de l'impédance des électrodes du neurobiohybride IMACA. B : Représentation du module de l'impédance et de la phase des électrodes du neurobiohybride IMACA, en fonction du log de la fréquence.

3.6.2 Caractérisation de l'interface entre les électrodes et l'électrolyte

Pour les expérimentations qui seront menées sur les neurobiohybrides IMACA et RxTx, les électrodes sont recouvertes d'un *coating* de poly-D-lysine [PDL] et collagène, et l'électrolyte est du milieu de culture cellulaire. Une caractérisation expérimentale va permettre de mesurer l'impédance de l'interface entre des électrodes recouvertes de *coating* et le milieu de culture. Les résultats issus de cette caractérisation permettront de rapprocher le modèle électrique développé dans le Chapitre 2 de la réalité expérimentale. En effet, le modèle d'interface entre l'électrode et l'électrolyte présenté dans le cadre de la simulation (Chapitre 2) décrit une électrode métallique nue sans *coating*. De plus, la résistivité de l'électrolyte considérée pour la simulation ($0,7 \Omega.m \leq \rho_{\text{electrolyte}} \leq 1 \Omega.m$) est celle d'une solution saline physiologique (Massobrio *et al.*, 2007). Nos paramètres expérimentaux sont plus complexes.

L'impédance constituée par l'interface entre une électrode du neurobiohybride IMACA et le milieu de culture est mesurée avec le potentiostat. L'électrode de travail du potentiostat est connectée à une électrode du neurobiohybride IMACA, et la contre-électrode du potentiostat est reliée à une aiguille métallique plongée dans le milieu de culture (Figure 3-21-A). L'impédance Z_2 mesurée à l'aide de ce banc de caractérisation peut être décomposée en un système de trois impédances en série : l'impédance de l'interface entre l'électrode IMACA et le milieu de culture « $Z_{interface_EE}$ », l'impédance de la portion de milieu de culture « Z_{milieu} » séparant les deux électrodes, et l'impédance de l'interface entre l'aiguille et le milieu de culture « $Z_{interface_AE}$ » (Figure 3-21-B). L'impédance équivalente du système mesuré est alors $Z_2 = Z_{interface_EE} + Z_{milieu} + Z_{interface_AE}$ (Figure 3-21-C).

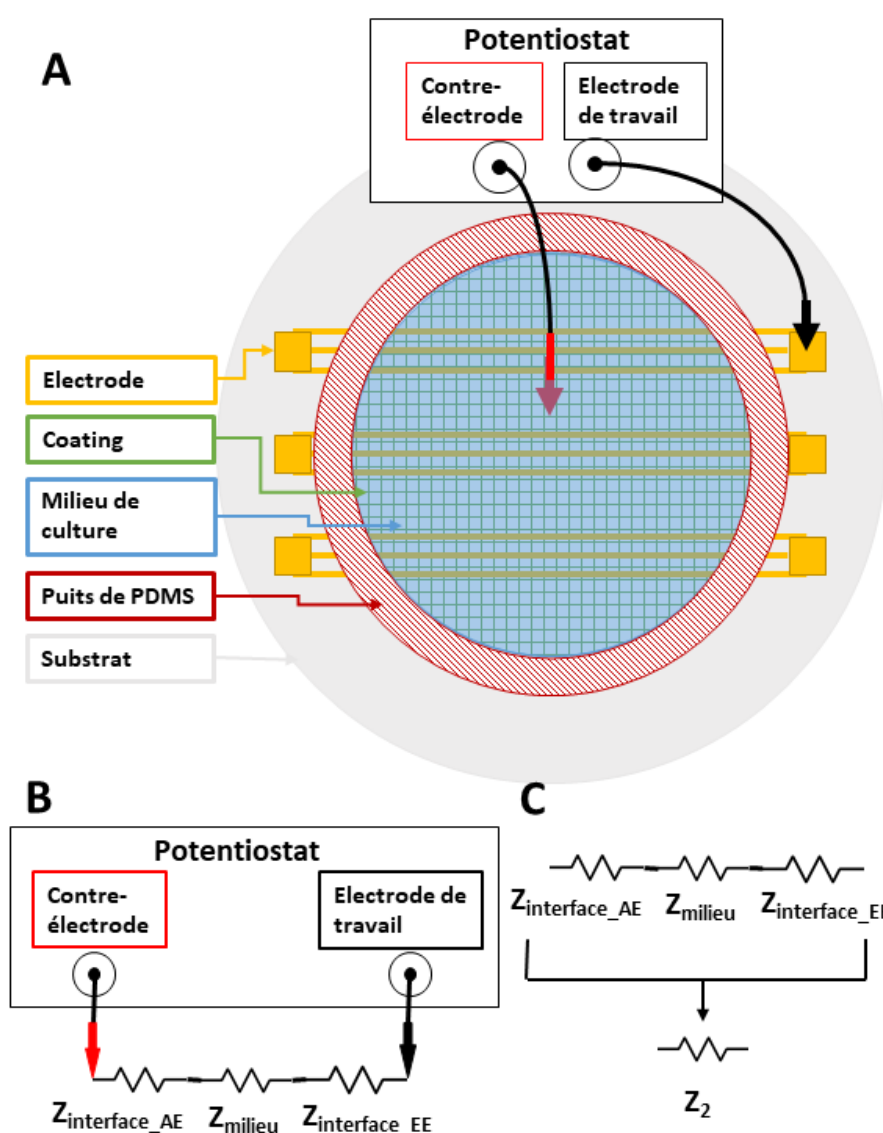


Figure 3-21 : Caractérisation de l'interface entre les électrodes IMACA recouvertes de *coating* et le milieu de culture

A : Représentation schématique du banc de mesure de l'impédance de l'électrolyte. **B** : Schéma électrique du système d'impédance mesurée. **C** : Impédance Z_2 équivalente aux impédance $Z_{interface_EE}$, Z_{milieu} et $Z_{interface_AE}$ en série.

L'impédance Z_2 de ce système est mesurée entre 1Hz et 1MHz. L'évolution du module \underline{Z}_2 (courbe bleue) et de la phase θ_2 (courbe orange) de cette impédance tracée en fonction du logarithme de la fréquence est proposée sur la Figure 3-22. Il a été montré dans le Chapitre 2 que l'interface entre un solide et un électrolyte est capacitive. Ces deux impédances $Z_{\text{interface_EE}}$ et $Z_{\text{interface_AE}}$ devraient correspondre à des capacités. Il est alors attendu que l'impédance Z_2 du système mesuré soit capacitive, donc que la phase θ_2 de ce système soit égale à -90° . L'étude de l'évolution de la phase θ_2 tracée en fonction du logarithme de la fréquence (Figure 3-22, courbe orange) montre que $-70^\circ \leq \theta_2 \leq 0^\circ$. Les interfaces entre l'électrode IMACA et le milieu de culture ainsi que l'aiguille métallique et le milieu de culture ne sont pas capacitives.

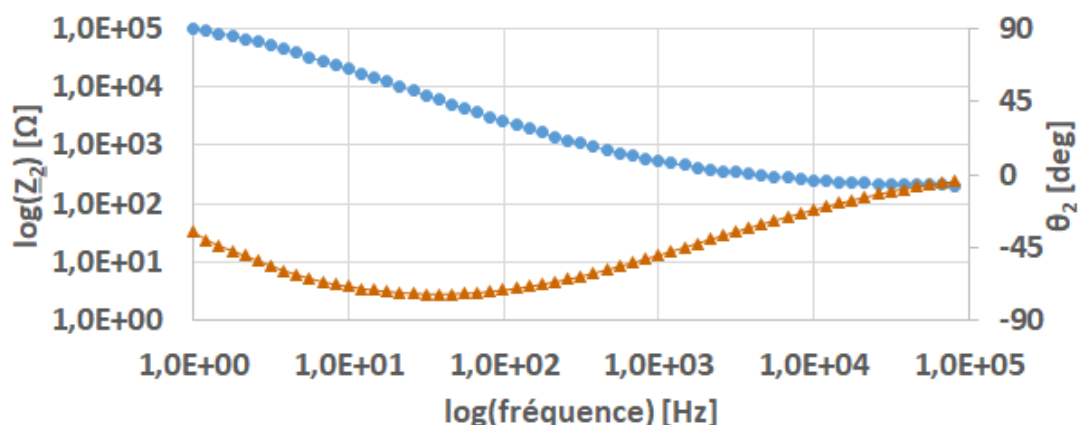


Figure 3-22 : Caractérisation de l'interface entre les électrodes IMACA recouvertes de *coating* et le milieu de culture

Représentation graphique de l'évolution du module de l'impédance \underline{Z}_2 et de la phase θ_2 en fonction du logarithme de la fréquence.

—●— \underline{Z}_2 —▲— θ_2

Cette seule caractérisation ne permet pas de déterminer l'impédance de l'interface entre une électrode IMACA recouverte de *coating* et le milieu de culture constituant l'électrolyte. Toutefois, l'évolution du module \underline{Z}_2 et de la phase θ_2 en fonction de la fréquence sont caractéristiques d'un élément à phase constante. Une caractérisation de l'élément à phase constante constituant l'interface entre une électrode recouverte de *coating* et le milieu de culture fait l'objet de la suite de ce chapitre. Cette caractérisation est réalisée à l'aide d'un analyseur d'impédance sur un dispositif spécifiquement conçu.

3.7 Caractérisation de l'interface

3.7.1 Double-couche et élément à phase constante

Lorsqu'un solide est immergé dans un électrolyte, la redistribution des charges présentes à l'interface entre le solide et l'électrolyte entraînent la formation d'une double-couche (Chapitre 2, §2.3.2.2). Cette interface est représentée par une capacité

permettant de réaliser un modèle électrique de membrane neuronale interfacée avec une électrode et de l'implémenter sous SPICE. Une première caractérisation expérimentale de cette interface a montré que l'élément n'évolue pas comme une simple capacité. En effet, l'évolution de l'impédance de cette interface correspond plutôt au comportement d'un élément à phase constante (« Constant phase element » ; [CPE]). Cette analyse est corroborée par les travaux de Franks *et al.*, 2005; Joye *et al.*, 2008, pour lesquels l'interface entre une électrode et un électrolyte est représentée par un élément à phase constante mis en parallèle de la résistance de transfert de charge.

Dans le cadre de notre étude, j'ai travaillé sur la conception et la fabrication des neurobiohybrides. J'ai ensuite participé à leur caractérisation qui a pour but d'en déterminer les propriétés physiques de l'interface entre les électrodes recouvertes de *coating* et le milieu de culture. Celle-ci est expérimentalement caractérisée à l'aide d'un analyseur d'impédance, sur un dispositif adapté (Figure 3-23) et sur une plage de fréquence $20\text{Hz} \leq f_{\text{sin}} \leq 10\text{MHz}$. L'exploitation de ces mesures de l'impédance de l'interface entre une électrode métallique recouverte de *coating* et le milieu de culture cellulaire sur une large plage fréquentielle permettra d'obtenir les paramètres du CPE constituant cette interface. Une approximation de la capacité et de la résistance de l'interface aux fréquences d'intérêt, de la dizaine à la centaine de Hz (0, 2.5.1), sera calculée à partir des paramètres de ce CPE. Ces capacités et résistances seront introduites dans le modèle électrique d'interface, permettant de le rapprocher des conditions expérimentales réelles.

3.7.2 Définition de l'élément à phase constante

L'élément à phase constante est un dipôle électrique permettant de décrire le comportement d'une double-couche. Son impédance Z_{CPE} est donnée par l'Équation 3-1 :

$$Z_{\text{CPE}}(\omega) = \frac{1}{Q(j\omega)^n} = \frac{1}{Q(\omega)^n} e^{-jn\frac{\pi}{2}} \quad \text{Équation 3-1 : Impédance de l'interface.}$$

Le module de l'impédance d'un CPE est donné par l'Équation 3-2. Il dépend de la constante « Q ».

$$|Z_{\text{CPE}}| = \frac{1}{Q(\omega)^n} \quad \text{Équation 3-2 : Module de l'impédance d'un élément à phase constante.}$$

La phase d'un CPE est décrite par l'Équation 3-3. Elle dépend de la constante « n », avec $0 \leq n \leq 1$.

$$\varphi_{CPE} = -jn \frac{\pi}{2} = -90 * n$$

Équation 3-3 : Phase d'un élément à phase constante.

Si la constante « n » est nulle (n=0), l'impédance du CPE peut être décrite par l'Équation 3-4. Le CPE est alors purement résistif et de résistance 1Ω . Sa résistance devient alors négligeable.

$$Z_{CPE}(\omega) = \frac{1}{(Q\omega)^0} e^{-j0\frac{\pi}{2}} = 1$$

Équation 3-4 : Impédance équivalente d'un CPE pour une constante n = 0. Le CPE est alors purement résistif et de résistance négligeable.

Si la constante n est unitaire (n=1), l'impédance du CPE peut être décrit par l'Équation 3-5 et son module par l'Équation 3-6. Dans cette Équation 3-6, le coefficient « Q » peut alors être remplacé par une capacité. Le CPE devient alors purement capacitif.

$$Z_{CPE}(\omega) = \frac{1}{Q(j\omega)^n} = \frac{1}{Q(\omega)^1} e^{-j\frac{\pi}{2}}$$

Équation 3-5 : Impédance équivalente d'un CPE pour une constante n = 1.

$$|Z_{CPE}|(\omega) = \frac{1}{Q(j\omega)^1} = \frac{1}{jQ\omega} = \frac{1}{jC\omega}$$

Équation 3-6 : Module de l'impédance équivalente d'un CPE pour un coefficient n = 1. Le CPE est alors purement capacitif.

Caractériser un élément à phase constante revient à déterminer les valeurs des constantes « Q » et « n » à partir du module et de la phase de l'impédance $Z_{CPE}(\omega)$ en fonction de la fréquence.

La suite de ce chapitre propose la description de la conception d'un dispositif adapté à la caractérisation de l'interface entre des électrodes recouvertes de *coating* et un bain de milieu de culture cellulaire. Cette interface est ensuite expérimentalement caractérisée.

3.7.3 Dispositifs de caractérisation « LiInDi »

3.7.3.1 Conception et réalisation du dispositif de mesure LiInDi

Un dispositif spécifique de caractérisation de l'interface entre une électrode recouverte de *coating* et le milieu de culture est conçu et réalisé en suivant les procédés de fabrication et de *coating* utilisés pour l'ensemble des neurobiohybrides IMACA et RxTx (Chapitre 3, §3.5.1 et Chapitre 4, §4.2.3). Ce dispositif est appelé « LiInDi » (Lignes InterDigitées). Les électrodes de ce dispositif comportent 5 lignes d'or interdigitées et deux lignes continues. Les lignes interdigitées sont écartées de 10, 20, 50, 100, 200µm. Le *layout* de ce dispositif LiInDi est présentée sur la Figure 3-23 et une représentation de ses électrodes interdigitées est donnée sur la Figure 3-24-A. Ces lignes sont recouvertes de milieu de culture cellulaire pour PC-12 différenciées, tenant lieu d'électrolyte. Les spécifications des électrodes de ce dispositif LiInDi sont données

sur le Tableau 3-1. La mesure d'impédance est effectuée avec un analyseur d'impédance Keysight E4990A. Le principe de mesure est identique à celui utilisé par le potentiostat et présenté sur la Figure 3-19. Une tension sinusoïdale d'amplitude $V_{\sin} = \pm 500\text{mV}$ est superposée à une tension continue $\text{Init}_E = 0\text{V}$. 36 points de mesures sont relevés par décade, sur une plage fréquentielle $20\text{Hz} \leq f_{\sin} \leq 10\text{MHz}$.

Longueur des lignes continues	L_{continue} [cm]	5
Longueur des lignes interdigitées	L_1 [cm]	3,9
Longueur de la zone interdigitée	L_2 [cm]	2,8
Largeur des lignes	l [μm]	10
Épaisseur de métallisation des lignes (Ti + Au)	e [nm]	10 + 100
Écartement entre les lignes interdigitées	w [μm]	10, 20, 50, 100, 200
Surface des lignes	S_{ligne} [cm^2]	$2,3 \cdot 10^{-3}$

Tableau 3-1 : paramètres du dispositif LiInDi de caractérisation de l'interface entre des électrodes métalliques recouvertes d'un *coating* de poly-D-lysine et de collagène, et du milieu de culture cellulaire

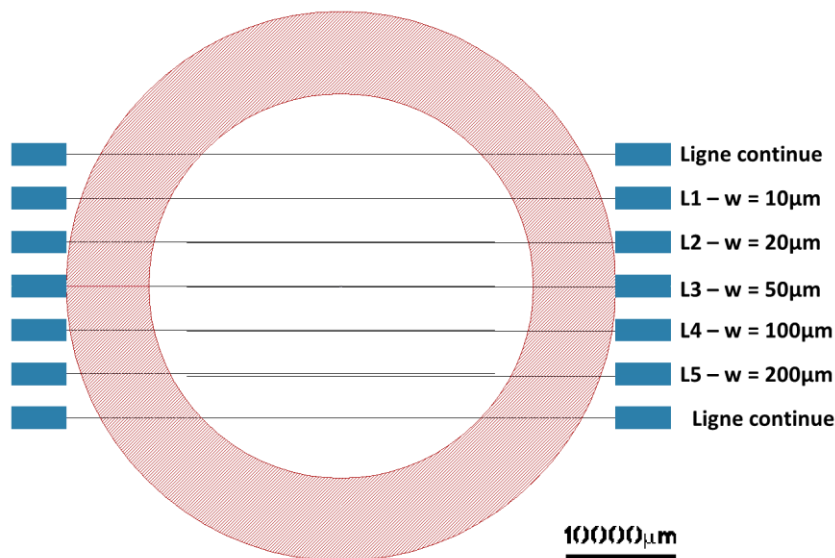


Figure 3-23 : Layout du dispositif de caractérisation de l'interface

Les lignes sont représentées en noir, les pads d'accès aux lignes sont représentés par les rectangles bleus et le puits de culture est représenté par le cercle rouge.

3.7.3.2 Schéma équivalent du système caractérisé

Une représentation schématique du système symétrique de lignes couplées ainsi qu'un schéma électrique équivalent sont donnés sur la Figure 3-24. L'interface entre les électrodes recouvertes de *coating* et l'électrolyte est représentée par un CPE

d'impédance « Z_{CPE} ». Les lignes sont représentées par leur résistance « R_{ligne} » et la portion d'électrolyte entre les lignes est définie par la résistance « $R_{\text{électrolyte}}$ ».

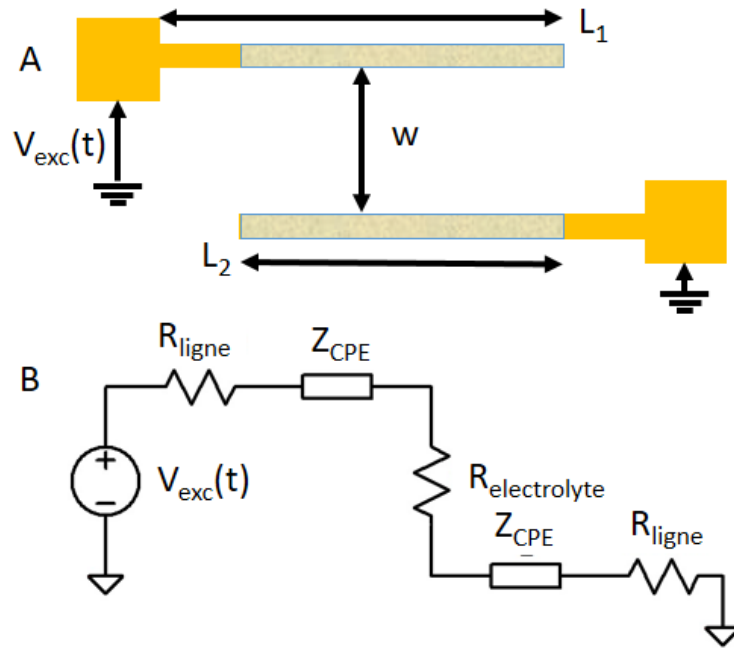


Figure 3-24 : A : Représentation schématique des lignes couplées. B : schéma électrique équivalent de deux lignes couplées

L'impédance du système de lignes couplées « $Z_{\text{LiInDi}}(\omega)$ » représenté sur la Figure 3-24-A & B est donnée par l'Équation 3-7. La somme de la résistance des lignes et de la résistance de la portion d'électrolyte séparant ces lignes est appelé R_{l-e} et est présentée sur l'Équation 3-8 :

$$\begin{aligned} Z_{\text{LiInDi}}(\omega) &= 2R_{\text{ligne}} + R_{\text{electrolyte}} \\ &+ 2Z_{CPE}(\omega) \\ &= R_{l-e} + 2Z_{CPE}(\omega) \end{aligned}$$

Équation 3-7 : Z_{LiInDi} : Impédance du système de lignes couplées.

$$R_{l-e} = 2R_{\text{ligne}} + R_{\text{electrolyte}}$$

Équation 3-8 : R_{l-e} : Somme de la résistance des lignes LiInDi et de la portion d'électrolyte séparant ces lignes.

L'élément à phase constante et le dispositif permettant sa caractérisation ont été définis. Le paragraphe suivant présente la caractérisation de ce CPE.

3.7.4 Caractérisation du système

Le système mesuré, présenté sur la Figure 3-24-A, consiste en deux lignes interdigitées, séparées par une portion d'électrolyte. Pour avoir accès à l'impédance des CPE $Z_{CPE}(\omega)$, il faut soustraire la résistance des lignes et celle de la portion d'électrolyte séparant les lignes R_{l-e} (Équation 3-7).

En ce sens, il est intéressant de regarder l'Équation 3-2. En effet, cette équation montre que si la fréquence tend vers 0, alors l'impédance du CPE tend vers l'infini. Dans ces conditions, l'impédance du système de lignes couplées est dominée par l'impédance du CPE (Équation 3-7). Au contraire, si la fréquence tend vers l'infini, l'impédance du CPE tend vers 0. Dans ces conditions, l'impédance du CPE devient négligeable devant la résistance des lignes et de la portion d'électrolyte séparant les lignes (Équation 3-7).

Pour poursuivre les extractions, il est intéressant de regarder les points particuliers mis en lumière par les Équation 3-4 et Équation 3-6. En effet, l'Équation 3-4 montre que dans le cas d'un CPE, si la phase $\varphi=0^\circ$, alors $n=0$ et le CPE devient résistif, avec $Z_{CPE} = 1\Omega$. Dans ce cas, $Z_{LiInDi} \approx R_{l-e}$ (Équation 3-7) et la résistance des lignes et de la portion d'électrolyte peuvent être extraites de l'impédance Z_{LiInDi} . Il est attendu que ce cas corresponde à la mesure de l'impédance Z_{LiInDi} en basse fréquence. Ensuite, l'Équation 3-6 décrivant le module de l'impédance d'un CPE permet d'affirmer que pour un coefficient $n=1$, alors le coefficient « Q » est une capacité électrique, soit $Q = C$. En ce sens, lorsque le coefficient « n » est proche de 1, soit une phase φ proche de -90° , alors une capacité équivalente de l'interface entre les électrodes recouvertes de *coating* et le milieu de culture peut être approximée à partir du coefficient « Q », tel que $C \approx Q$. Il est attendu que ce cas corresponde à la mesure de l'impédance Z_{LiInDi} en haute fréquence. D'après ces éléments, il faut disposer de l'impédance Z_{LiInDi} aux fréquences pour lesquelles $\varphi=0^\circ$ et $\varphi=-90^\circ$ pour mesurer la capacité équivalente de l'interface entre une électrode métallique recouverte de *coating* et le milieu de culture. Pour cela, l'impédance Z_{LiInDi} des lignes couplées d'un dispositif LiInDi est mesurée sur une bande de fréquence 20Hz – 10MHz.

3.7.4.1 Mesure de l'impédance Z_{LiInDi}

L'impédance des lignes interdigitées du dispositif LiInDi est mesurée avec un analyseur d'impédance entre 20Hz et 10MHz. L'évolution de la phase « φ_{LiInDi} » et du logarithme du module « $|Z_{LiInDi}|$ » du système de lignes couplées sont représentés en fonction du logarithme de la fréquence sur la Figure 3-25. Cette représentation graphique est effectuée pour les différents écartements « w » entre les lignes couplées.

L'analyse de l'évolution de la phase entre 20Hz et 200Hz (Figure 3-25-B) montre une phase constante proche de -80° . Sur cette plage de fréquence, l'interface est essentiellement capacitive. Par ailleurs, la courbe représentant l'évolution de la

phase en fonction de la fréquence (Figure 3-25-B) coupe l'axe des abscisses à une fréquence proche du MHz ; à cette intersection, la phase est nulle ($\varphi_{\text{LiInDi}} \approx 0^\circ$). Enfin, au-delà du MHz, l'ensemble du système se comporte comme une inductance, la phase devenant positive. Malgré une calibration préalable du système de mesure, ce comportement selfique est probablement dû à la connectique du banc de mesure.

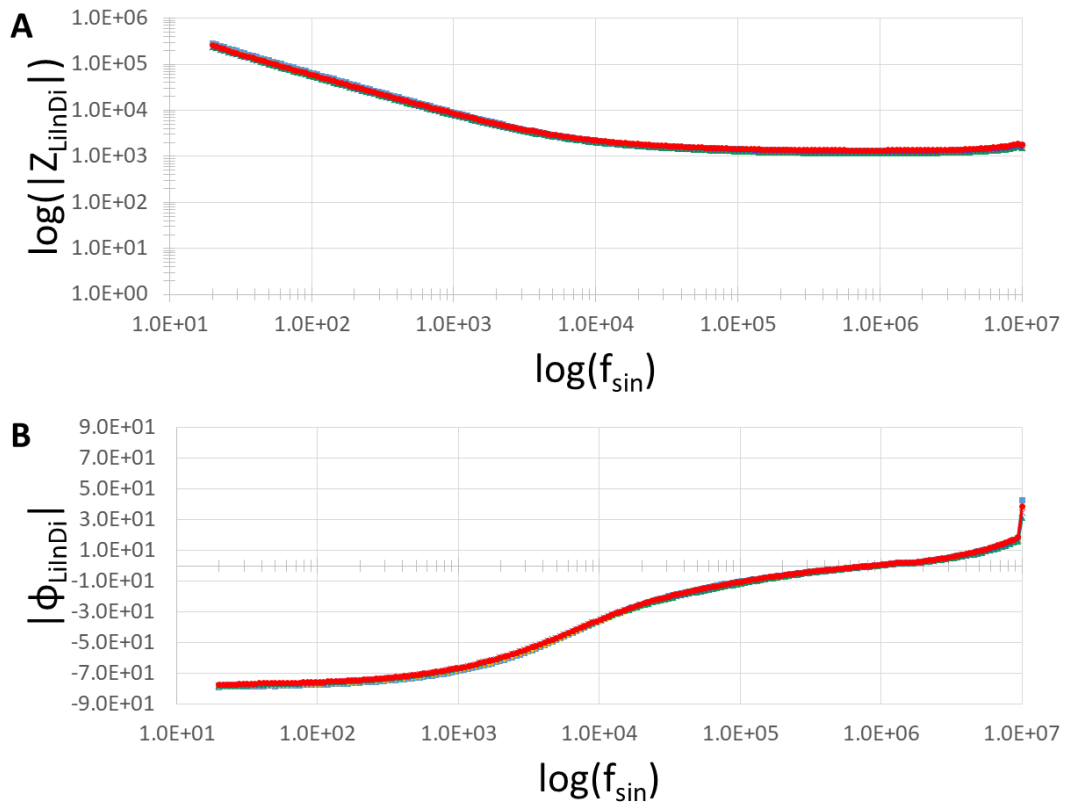


Figure 3-25 : **A :** Evolution du logarithme du module l'impédance de l'interface en fonction du logarithme de la fréquence, pour les différents écartements « w » entre les lignes interdigitées. **B :** Evolution du logarithme du module l'impédance de l'interface en fonction du logarithme de la fréquence, pour les différents écartements « w » entre les lignes interdigitées.

— LiInDi - w=10 μm
— LiInDi - w=20 μm
— LiInDi - w=50 μm
— LiInDi - w=100 μm
— LiInDi - w=200 μm

Les valeurs de l'impédance Z_{LiInDi} et de la phase φ_{LiInDi} en fonction de l'écartement « w » des lignes LiInDi sont données pour deux points de mesure : pour une fréquence de 20Hz, où la phase φ_{LiInDi} est proche de -90° et lorsque la phase φ_{LiInDi} nulle (Figure 3-25).

	w	[μm]	10	20	50	100	200
$\varphi \approx -90^\circ$	$f_{\text{impédance}}$	[Hz]	20	20	20	20	20
	$ Z_{\text{LiInDi}} $	[Ω]	$2,84 \cdot 10^5$	$2,64 \cdot 10^5$	$2,40 \cdot 10^5$	$2,40 \cdot 10^5$	$2,60 \cdot 10^5$
	φ_{LiInDi}	[deg]	-78,92	-78,65	-78,15	-77,81	-77,62
$\varphi \approx 0^\circ$	$f_{\text{impédance}}$	[Hz]	$8,82 \cdot 10^5$	$9,42 \cdot 10^5$	$9,42 \cdot 10^5$	$8,82 \cdot 10^5$	$8,26 \cdot 10^5$
	$ Z_{\text{LiInDi}} $	[Ω]	1320,76	1204,36	1169,27	1220,35	1355,59
	φ_{LiInDi}	[deg]	0,11	0,12	0,03	-0,04	0,08

Tableau 3-2 : Module et phase de l'impédance « Z_{LiInDi} »

Mesure du module « $|Z_{\text{LiInDi}}|$ » et de la phase « φ_{icpl} » de l'impédance « Z_{LiInDi} » en fonction de l'écartement « w » des lignes interdigitées, pour une phase proche de -90° et la phase la plus proche de 0.

La suite de ce paragraphe est consacrée au calcul de la résistance « $R_{\text{l-e}}$ » et des constantes « n » et « Q » permettant de calculer une capacité équivalente de l'interface entre des lignes métalliques recouvertes de *coating* et l'électrolyte, appelée « C_{i_0} ».

3.7.4.2 Résistance des lignes et de l'électrolyte « $R_{\text{l-e}}$ » - $\varphi \approx 0^\circ$

Les mesures de l'impédance du système Z_{LiInDi} ont montrées que la phase est quasi-nulle aux fréquences proches du MHz. Les valeurs du module de l'impédance Z_{LiInDi} lorsque la phase est quasi-nulle sont répertoriées dans le Tableau 3-2. Par ailleurs, l'Équation 3-4 montre que $Z_{\text{CPE}} = 1$ lorsque cette phase est quasi-nulle. Dans ce cas, l'impédance du système Z_{LiInDi} est ramenée à l'impédance des lignes et de la portion d'électrolyte séparant les lignes, telle que $Z_{\text{LiInDi}} = R_{\text{l-e}}$. En suivant ce raisonnement, il est possible de déterminer les valeurs de la résistance $R_{\text{l-e}}$ en fonction de l'écartement des lignes « w » données dans le Tableau 3-3.

w	[μm]	10	20	50	100	200
$R_{\text{l-e}}$	[Ω]	1321	1204	1169	1220	1356

Tableau 3-3 : Résistance des lignes et de la portion d'électrolyte séparant les lignes pour les différents écartements entre les lignes interdigitées du dispositif LiInDi

Par ailleurs, $R_{\text{l-e}}$ représente la résistance des lignes R_{ligne} en série avec la résistance liée à la portion d'électrolyte séparant les lignes interdigitées $R_{\text{électrolyte}}$ (Équation 3-7). Etant donné le design du dispositif avec des écartements croissants entre les lignes LiInDi, une augmentation de la résistance $R_{\text{l-e}}$ proportionnellement à cet écartement « w » était attendue. Cependant, les mesures de cette résistance $R_{\text{l-e}}$ présentées sur le Tableau 3-3 ne montrent pas cette évolution, et les valeurs de la résistance $R_{\text{l-e}}$ ne semblent pas corrélées à la distance « w ». Cela amène à conclure que la résistance de l'électrolyte est alors inférieure à la variabilité des mesures effectuées et reste négligeable par rapport à la résistance des lignes. La résistance de l'électrolyte

peut donc être négligée dans la modélisation électrique d'un neurone interfacé avec une électrode.

3.7.4.3 Capacité de l'interface électrode / électrolyte - $\varphi \approx -90^\circ$

L'Équation 3-6 montre que si la phase d'un CPE est de -90° , alors le coefficient « n » est égal à 1 et le CPE peut être assimilé à une capacité. Les mesures de l'impédance du système de lignes couplées présentées sur le Tableau 3-2 montrent qu'à une fréquence $f_{\text{impédance}} = 20\text{Hz}$, la phase « φ_{LiInDi} » est proche de -90° . Il est nécessaire de calculer les valeurs du coefficient « n » avant de calculer une capacité équivalente de l'interface. Ces valeurs du coefficient « n » sont calculées d'après le Tableau 3-2 et l'Équation 3-9, pour chaque écartement « w » entre les lignes interdigitées, et présentées dans le Tableau 3-4.

$$n = \frac{\varphi_{\text{LiInDi}}}{-90}$$

Équation 3-9 : Coefficient « n » en fonction de la phase de l'impédance des lignes interdigitées « Z_{LiInDi} » et de la fréquence à laquelle cette impédance a été mesurée « $f_{\text{impédance}}$ ».

Ensuite, le coefficient « Q » est calculé en utilisant l'Équation 3-10, ainsi que les modules de l'impédance $|Z_{\text{LiInDi}}|$ présentés dans le Tableau 3-2, et les coefficients « n » présentés dans le Tableau 3-4. L'ensemble de ces valeurs de « Q » sont rassemblées dans le Tableau 3-4 pour les différents écartements « w » entre les lignes interdigitées.

$$Q = \frac{1}{Q(j\omega)^1} = \left(\frac{1}{|Z_{\text{LiInDi}}| \cdot \omega^n} \right)^{1/n}$$

Équation 3-10 : Coefficient « Q » en fonction de du module de l'impédance des lignes interdigitées « $|Z_{\text{LiInDi}}|$ » et de la fréquence à laquelle cette impédance a été mesurée « $f_{\text{impédance}}$ ».

L'ensemble des valeurs de ce coefficient « n » sont proches de 1. En utilisant l'analyse (§3.7.4) faite autour de l'Équation 3-6, une capacité équivalente « C_i » de l'interface entre les lignes du dispositif LiInDi recouvertes de *coating* et le milieu de culture est approximée à partir du coefficient « Q », tel que $Q=C_i$. Les valeurs de cette capacité d'interface sont présentés en fonction de l'écartement « w » entre les lignes interdigitée dans le Tableau 3-4.

A ce stade, il est intéressant d'établir un point de comparaison entre la capacité de l'interface C_i (définie entre les électrodes recouvertes de *coating* et le milieu de culture) avec la capacité d'interface $C_{\text{I-EE}}$ (utilisée dans le modèle de membrane neuronale interfacé avec une électrode, présenté dans le Chapitre 2, 2.3.3) et $C_{\text{mb-neuronale}}$ (la capacité théorique de la membrane neuronale, présentée au Chapitre 2, 2.3.3). Pour permettre cette comparaison, les valeurs du coefficient « Q » sont normalisées par cm^2 par rapport à la surface des lignes du dispositif LiInDi « S_{lignes} » (Tableau 3-1) et sont

appelés Q_0 . De même, la capacité d'interface C_i normalisée par cm^2 est appelée $C_{i,0}$. Les constantes « Q_0 » et les capacités d'interface « $C_{i,0}$ » normalisées par cm^2 sont répertoriées dans le Tableau 3-4.

Ecartement entre les lignes	w [μm]	10	20	50	100	200
Constante "n"	n [s.d.]	0,88	0,87	0,87	0,86	0,86
Constante "Q"	Q [s.d.]	$4,80.10^{-9}$	$4,97.10^{-9}$	$5,07.10^{-9}$	$4,75.10^{-9}$	$4,19.10^{-9}$
Constante "Q" normalisée au cm^2	Q_0 [s.d./ cm^2]	$1,71.10^{-6}$	$1,77.10^{-6}$	$1,81.10^{-6}$	$1,70.10^{-6}$	$1,50.10^{-6}$
Capacité équivalente de l'interface	C_i [F]	$4,80.10^{-9}$	$4,97.10^{-9}$	$5,07.10^{-9}$	$4,75.10^{-9}$	$4,19.10^{-9}$
Capacité de l'interface, normalisée au cm^2	$C_{i,0}$ [F/ cm^2]	$1,71.10^{-6}$	$1,77.10^{-6}$	$1,81.10^{-6}$	$1,70.10^{-6}$	$1,50.10^{-6}$

Tableau 3-4 : Coefficients n et Q mesurés à une fréquence de 20Hz & capacité équivalente de l'interface entre les lignes du dispositif LiInDi et le milieu de culture

Les coefficients n et Q sont mesurés pour les différents écartements « w » des électrodes du dispositif LiInDi. Le coefficient « n » étant proche de 1, une capacité équivalente « C_i » de l'interface entre les lignes du dispositif LiInDi recouvertes de *coating* et le milieu de culture est approximée à partir du coefficient « Q », tel que $Q=C_i$. Les valeurs du coefficient « Q » et de la capacité d'interface « C_i » sont normalisées au cm^2 et sont respectivement appelées Q_0 et $C_{i,0}$.

3.7.4.4 Comparaison de ces valeurs avec celles utilisées pour le modèle

Les paramètres de l'interface entre une électrode métallique et une portion de membrane neuronale, présentée dans le Chapitre 2 de cette thèse, ont été calculés d'après les données disponibles dans la littérature. Ces données ont permis de calculer une capacité d'interface moyenne ramenée au cm^2 « C_{i-EE} » telle que $C_{i-EE} = 8,9.10^{-5}$ F/ cm^2 . La mesure de l'impédance de l'interface entre les lignes du dispositif LiInDi recouvertes de *coating* et le milieu de culture cellulaire a permis d'approximer une capacité de cette même interface, telle que $C_{i,0} = 1,70.10^{-6}$ F/ cm^2 . Par ailleurs, la capacité de la membrane neuronale est communément admise est $C_{mb-neuronale} = 1.10^{-6}$ F/ cm^2 (0).

La mesure de l'impédance ayant permis de calculer la capacité d'interface $C_{i,0}$ a été effectuée sur des électrodes recouvertes de *coating*. Remplacer dans le modèle paramétrique de membrane neuronale la capacité C_{i-EE} issue de la littérature, par cette capacité « $C_{i,0}$ », mesurée sur des électrodes recouvertes de *coating*, permettra d'introduire la capacité du *coating* dans le modèle, et le rapprocher ainsi de la réalité des expérimentations.

Il est à noter que la valeur de la capacité de l'interface C_{i-0} (électrode recouverte de *coating*-électrolyte) reste supérieure à celle de la membrane neuronale $C_{mb-neuronale}$, ce qui est favorable pour l'excitation ou pour l'écoute des neurones vivants. En effet, ces deux capacités étant en série, il est possible de déterminer que la capacité qui est prépondérante est celle de la membrane du neurone vivant $C_{mb-neuronale}$: $\frac{1}{C_{totale}} = \frac{1}{C_{i-0}} + \frac{1}{C_{mb-neuronale}}$. Soit avec $C_{i-0} \gg C_{mb-neuronale}$, alors $C_{totale} \approx C_{mb-neuronale}$. Dans ce cas, l'interface devient en quelque sorte « transparente » assurant une bonne détection des signaux émis par un neurone vivant couplé à une électrode. Le même raisonnement peut être appliqué pour l'excitation des neurones vivants.

3.7.4.5 Résultats de la caractérisation de l'interface

Les mesures de la résistance et de la capacité indiquent que l'interface serait plus capacitive et moins résistive que celle décrite par le modèle. Ces mesures peuvent être utilisées pour raffiner le modèle et le rapprocher de nos expérimentations réelles.

De plus, ces mesures montrent que l'interface entre une électrode recouverte d'un *coating* et l'électrolyte présente des propriétés capacitives bien supérieures à celle d'une membrane biologique ($C_{membrane} = 0,01 \text{ F/m}^2$), ce qui est favorable à l'excitation capacitive de cellules neuronales.

3.8 Conclusion et perspectives

3.8.1 Conclusion

Ce troisième chapitre a permis de présenter le travail de conception, de réalisation et de caractérisation des neurobiohybrides IMACA et RxTx qui seront utilisés pour observer la réponse de cellules neuronales à des excitations électriques biomimétiques. Une analyse de nos besoins et l'identification des contraintes imposées par les conditions de culture cellulaire et le banc d'imagerie calcique conjointe à une étude de la littérature disponible autour des différentes technologies permettant de détecter et mesurer et mesurer l'activité électrique de neurones vivants nous ont permis définir un cahier des charges pour la conception, les matériaux et les orientations technologiques des neurobiohybrides et des électrodes. En suivant ce cahier des charges, nous avons abouti à la conception des électrodes IMACA et RxTx puis à la création des neurobiohybrides IMACA et RxTx. Ces neurobiohybrides sont constitués d'un substrat de verre sur lequel sont déposées les électrodes par un procédé de métallisation. Un puits de culture en PDMS dans lequel seront cultivées les cellules neuronales vivantes est collé sur ce substrat. La réalisation en salle blanche des neurobiohybride a rencontré quelques difficultés liées à la faible adhérence de la résine sur les substrats de verre et aux dimensions des électrodes. Un travail d'optimisation du procédé de réalisation a permis d'améliorer la qualité de l'accroche de la résine sur le substrat et de réduire le nombre d'imperfections présentes sur les électrodes.

Avant d'utiliser les neurobiohybrides en culture cellulaire et dans les expériences d'imagerie calcique, il apparaît nécessaire de déterminer leurs propriétés électriques. Dans nos conditions expérimentales, les électrodes des neurobiohybrides sont recouvertes de *coating* et le puits de PDMS est rempli milieu de culture. Une première caractérisation expérimentale de l'interface entre les électrodes recouvertes du *coating* et le milieu de culture a montré que cette interface se comporte comme un élément à phase constante (CPE). Les électrodes des dispositifs IMACA et RxTx se sont révélés inadaptés à l'étude de cette interface. Nous avons alors développé puis réalisé un dispositif spécifique nommé LiInDi. Une seconde campagne de caractérisation réalisée sur ce dispositif LiInDi a permis de mesurer l'impédance du CPE constituant l'interface entre les électrodes recouvertes du *coating* et le milieu de culture puis de déterminer sa capacité équivalente. Les propriétés capacitives de cette interface sont supérieures à celle d'une membrane neuronale. Cette condition est favorable à l'excitation capacitive de neurones vivants au travers d'une électrode métallique planaire. Ces premiers résultats de caractérisation valident notre approche consistant à exciter un neurone vivant au travers d'une électrode métallique planaire. Ils viendront compléter et affiner le modèle SPICE de membrane neuronale interfacée avec une électrode pour le rapprocher d'un modèle prédictif.

3.8.2 Perspectives et vecteurs d'amélioration

Les neurobiohybrides IMACA et RxTx présentés sont amenés à évoluer au fur et à mesure des avancées du projet et en fonction des résultats obtenus lors des expérimentations biologiques.

3.8.2.1 Diminution de la résistance des électrodes

Un vecteur d'amélioration des neurobiohybrides consiste à diminuer la résistance électrique des électrodes. Les premières expérimentations biologiques menées sur nos neurobiohybrides ont permis d'affiner notre connaissance du tropisme des cellules neuronales. Ces dernières adhèrent préférentiellement sur la surface métallique des électrodes et leur concentration est plus élevée au centre du puits. Connaissant ce tropisme des cellules neuronales, il est possible de diminuer la taille du puits de culture cellulaire, ce qui permettrait de réduire la longueur des électrodes IMACA et RxTx. Un puits de culture de 35mm de diamètre extérieur et 20mm de diamètre intérieur offre une contenance suffisante pour permettre la culture cellulaire tout en réduisant la longueur des électrodes d'un facteur 2. La résistance électrique évoluant linéairement en fonction de la longueur de ligne, cette réduction de la longueur des électrodes s'accompagnerait d'une réduction de leur résistance d'un facteur 2. En outre, l'épaisseur de métallisation des électrodes peut également être augmentée. Un ensemble d'essais ont été conduits par Dr. Mohamed Bellaredj en considérant une épaisseur de métallisation de 50nm de titane recouverte de 200nm d'or. Ces essais ont montré que cette épaisseur de métallisation n'est pas un obstacle à l'assemblage du

substrat et du puits de PDMS. Ce dernier est suffisamment souple pour se conformer autour des électrodes et assurer l'étanchéité du puits de culture. De plus, l'augmentation de l'épaisseur de métallisation améliore son accroche sur le substrat et facilite le lift-off, conduisant à la réalisation d'électrodes présentant moins de défauts. L'augmentation de l'épaisseur de métallisation d'un facteur 2 permet également d'en diminuer la résistance d'un facteur 2.

3.8.2.2 Amélioration des neurobiohybrides RxTx

Les premières expérimentations biologiques menées sur les neurobiohybrides RxTx ont montré que les électrodes sont recouvertes d'une population de cellules neuronales et qu'une partie de l'électrode est exposée à l'électrolyte. Cependant, la mise en place du banc expérimental RxTx vise à établir une communication bidirectionnelle par couplage capacitif entre un seul neurone et une seule électrode. De plus, Buitenweg *et al.*, (2000) et Choi & You, (2012) ont montré que la partie de l'électrode exposée à l'électrolyte entraîne une perte de signal. Pour diminuer ces pertes de signal et limiter le couplage à un seul neurone par électrode, nous nous orientons vers une solution consistant à recouvrir les électrodes d'une couche de passivation de type nitrure de silicium ouverte uniquement au niveau des électrodes.

En outre, notre connaissance du tropisme préférentiel des cellules neuronales pour le milieu du puits de culture cellulaire montre que le placement des électrodes du neurobiohybride RxTx sur le pourtour du puits de culture n'est pas optimal. Un travail d'optimisation du positionnement des électrodes dans le puits de culture du neurobiohybride RxTx visant à les rapprocher du centre du puits sera conduit.

3.8.2.3 Augmentation du couplage capacitif

L'interprétation faite au paragraphe 3.7.4.4 des résultats que nous avons obtenus en caractérisant l'interface entre les électrodes recouvertes du *coating* et le milieu de culture montre que la capacité équivalente de cette interface doit être la plus grande possible par rapport à la capacité de la membrane neuronale. Ce rapport des capacités permet d'améliorer le couplage capacitif entre l'électrode et le neurone vivant, facilitant l'excitation et l'écoute de ces neurones. Dès lors, il apparaît intéressant d'augmenter la capacité de cette interface en recouvrant les électrodes d'un matériau présentant une constante diélectrique très élevée. En ce sens, nous nous orientons vers l'utilisation de dioxyde de titane.

Chapitre 4

EXPERIMENTATIONS BIOLOGIQUES

4.1 Introduction

Après avoir présenté la conception, la réalisation et la caractérisation des neurobiohybrides IMACA et RxTx au Chapitre 3, ce quatrième chapitre présente l'ensemencement de ces neurobiohybrides avec des neurones vivants issus de cellules PC-12 différenciées et l'usage de l'imagerie calcique pour mettre en évidence la capacité des neurones vivants à répondre à une excitation par un signal électrique biomimétique. Ce quatrième chapitre permet d'établir la preuve de concept d'une partie de la boucle de communication, à savoir « artificiel vers vivant ». Cela valide également la conception des dispositifs neurobiohybrides et les différentes stratégies mises en place tout au long de ce travail de thèse.

Dans ce chapitre, les motivations ayant conduit au choix des neurones vivants avec lesquels nous avons travaillé sont exposées, la lignée cellulaire est décrite, les conditions de culture et de différenciation sont présentées. La caractérisation morphologique et fonctionnelle des cellules PC-12 différenciées détaillée ensuite a permis de mettre en évidence l'acquisition d'un phénotype neuronal mature⁵ au cours de leur différenciation. Enfin, sont présentées les expérimentations d'imagerie calcique démontrant la possibilité d'exciter des neurones vivants par des signaux électriques biomimétiques.

4.2 Culture des cellules PC-12

Les cultures *in vitro* de cellules vivantes sont très utilisées en biologie pour étudier les phénomènes physiologiques ou pathologiques et pour modéliser des contextes pathologiques. Les cultures cellulaires les plus répandues sont des cultures en deux dimensions où la surface de culture inerte est recouverte de cellules vivantes qui y adhèrent. L'ensemble est maintenu dans un milieu nutritif reproduisant les conditions de vie des cellules *in vivo*. Certains types cellulaires nécessitent une culture flottante : les cellules sont alors cultivées en suspension dans le milieu de culture. Ces deux types de cultures ont été utilisés dans les travaux décrits dans ce manuscrit.

Nos expérimentations portent sur l'excitation de neurones vivants par des stimulations électriques. Un unique type cellulaire excitable, des neurones, a ainsi été cultivé dans un contexte en deux dimensions lors de ces expérimentations. Cependant, un cerveau dans son environnement physiologique est une structure tridimensionnelle constituée d'un ensemble de types cellulaires : neurones, cellules gliales, vaisseaux sanguins, ... Les expérimentations présentées dans ce document s'appuient donc sur une modélisation simple d'une réalité beaucoup plus complexe qui ne peut ultimement être abordée qu'*in vivo*. Toutefois, les cultures *in vitro* de cellules permettent d'aborder

⁵ La maturité des neurones issus de cellules PC-12 différenciées s'apprécie d'une part par l'observation de l'expression de protéines spécifiques des neurones, et d'autre part par leur excitabilité.

des questions scientifiques complexes dans un contexte expérimental simplifié, notamment en réduisant le nombre de types cellulaires en présence, et en contrôlant étroitement de très nombreuses variables, ce qui est conforme à l'approche réductionniste proposée par Claude Bernard dès le XIX^{ème} siècle (Bernard, 1865).

Deux types de neurones peuvent être maintenus *in vitro* : des neurones issus de lignées primaires et des neurones issus de lignées continues. Les cellules issues de cultures primaires sont prélevées directement sur un organisme vivant. Il peut s'agir de cellules souches, qui seront ensuite différenciées en neurones, ou d'un type neuronal établi prélevé à un stade de développement précis. Cependant, les neurones issus de cultures primaires ont une durée de vie limitée *in vitro*, de 3 à 4 semaines environ. Chaque expérimentation nécessite une nouvelle culture et donc un nouveau prélèvement sur un organisme vivant. Ce nouveau prélèvement doit être effectué sur un autre organisme que celui ayant fourni les premières cellules ; en effet, le prélèvement de neurones du système nerveux central entraîne la mort de l'animal. Ce procédé diminue la reproductibilité des résultats. En outre, l'utilisation de neurones issus de lignées primaires nécessite d'être adossé à un établissement d'expérimentation animal agréé qui puisse recevoir les animaux à partir desquels on prélève les cellules d'intérêt. Ce type d'expérimentations n'était pas envisagé dans le cadre de mon travail de thèse. Les lignées cellulaires continues sont quant à elles constituées de cellules pouvant se multiplier indéfiniment, suite à des modifications génétiques spontanées ou induites. Elles possèdent ainsi des caractéristiques biologiques (nombre de chromosomes, pouvoir prolifératif, capacité de croissance en suspension...) qui les distinguent des cellules constituant les tissus d'un organisme vivant en contexte physiologique. De nombreuses lignées cellulaires continues sont maintenues en culture par différents revendeurs commerciaux, auprès desquels il est possible de commander un échantillon d'un (ou plusieurs) type(s) cellulaire(s); les cellules PC-12 font partie de ces lignées continues. Ainsi, à la réception de l'échantillon de cellules PC-12, la lignée est amplifiée et de nouveaux échantillons sont congelés dans un liquide cryoprotecteur et stockés dans l'azote liquide pour un usage ultérieur. A chaque nouvelle expérimentation, des cellules ayant la même ancienneté cellulaire sont décongelées et utilisées, ce qui assure une plus grande reproductibilité des résultats. Une gestion correcte du stock de cellules permet de réaliser l'ensemble des expérimentations d'une étude sur un même lot de cellules.

4.2.1 Choix des PC-12 et description de la lignée

La plupart des études disponibles dans la littérature portant sur la stimulation de neurones par des impulsions électriques s'appuient sur l'utilisation de lignées cellulaires primaires murines (Buccelli *et al.*, 2019; Radivojevic *et al.*, 2016; Wagenaar *et al.*, 2004). En ce qui concerne notre travail, nous avons dès le départ souhaité nous affranchir des contraintes de manipulation imposées par l'utilisation de lignées

primaires et nous assurer d'une meilleure reproductibilité des résultats. Pour cela, nous avons opté pour une lignée cellulaire continue : les cellules PC-12 CRL 1721. Cette lignée provient de l'*American Type Culture Collection* [ATCC] (ATCC, CRL-1721, lot n° 63268729). Elle a été établie par Greene & Tischler en 1976. Ces cellules sont issues d'un phéochromocytome de rat (*Rattus norvegicus*), une tumeur des glandes surrénales caractérisée par une augmentation de la production des catécholamines. Les catécholamines sont une famille de neuromédiateurs importants du système nerveux central et périphérique, les plus connues étant l'adrénaline et la dopamine. Les cellules PC-12 ont la particularité de pouvoir être différenciées en neurones catécholaminergiques en présence de facteur de croissance nerveuse ou *Nerve Growth Factor* (NGF, Sigma-Aldrich, réf. SRP4304) (Greene & Tischler, 1976; Wiatrak *et al.*, 2020). Enfin, ces cellules sont bien caractérisées sur les plans morphologiques et électrophysiologiques selon les données disponibles dans la littérature (Dichter *et al.*, 1977; Hu *et al.*, 2018) et sont communément utilisées en neuroscience (Hu *et al.*, 2018; Wiatrak *et al.*, 2020).

4.2.2 Maintien de la culture mère et différenciation des PC-12

Les cellules PC-12 ont été cultivées selon les recommandations du fournisseur (ATCC, CRL-1721, lot n° 63268729). Brièvement, la culture mère en suspension a été maintenue à 37°C et 5% de CO₂, dans du milieu RPMI-1640 supplémenté en glutamine (RPMI 1640 supplément GlutaMAX, Thermo Fisher Scientific, Gibco, réf. 61870044) additionné de 10% de sérum de cheval inactivé par la chaleur (Thermo Fisher, réf. 26050088) et 5% de sérum de veau fœtal non inactivé (LGC Standards™, ATCC®, réf. 30-2020) afin de maintenir un phénotype préneuronal. Le milieu était changé tous les deux jours et les cellules étaient divisées une fois par semaine. Un travail d'observation et de comptage des cellules PC-12 nous a permis de constater un temps de doublement de ~36H. Les cellules PC-12 ont été régulièrement observées au microscope à contraste de phase Leica DiM, ce qui a permis de suivre la progression de leur différenciation. Sur la Figure 4-1, l'hétérogénéité des cellules PC-12 non différenciées dans la culture mère est nettement apparente. Nous observons en effet une majorité de cellules flottantes, poussant en agrégats réfringents, et quelques cellules isolées, soit (i) flottantes avec des cytoplasmes élargis par rapport aux cellules poussant en îlots groupés, soit (ii) adhérent au fond de la boîte de culture et présentant un phénotype plus étalé. Cette hétérogénéité des cellules PC-12 est retrouvée dans la littérature (Greene & Tischler, 1976) (Figure 4-1).

La différenciation des cellules PC-12 en neurones catécholaminergiques a été effectuée directement dans les neurobiohybrides (chapitre 3, figure 4-8) en présence de NGF à raison de 50ng/ml dans un milieu appauvri en sérum et en présence de 1% de pénicilline/streptomycine (Merck, Sigma-Aldrich, réf. P4333). Comme pour la culture mère, le milieu de différenciation était changé tous les deux jours.

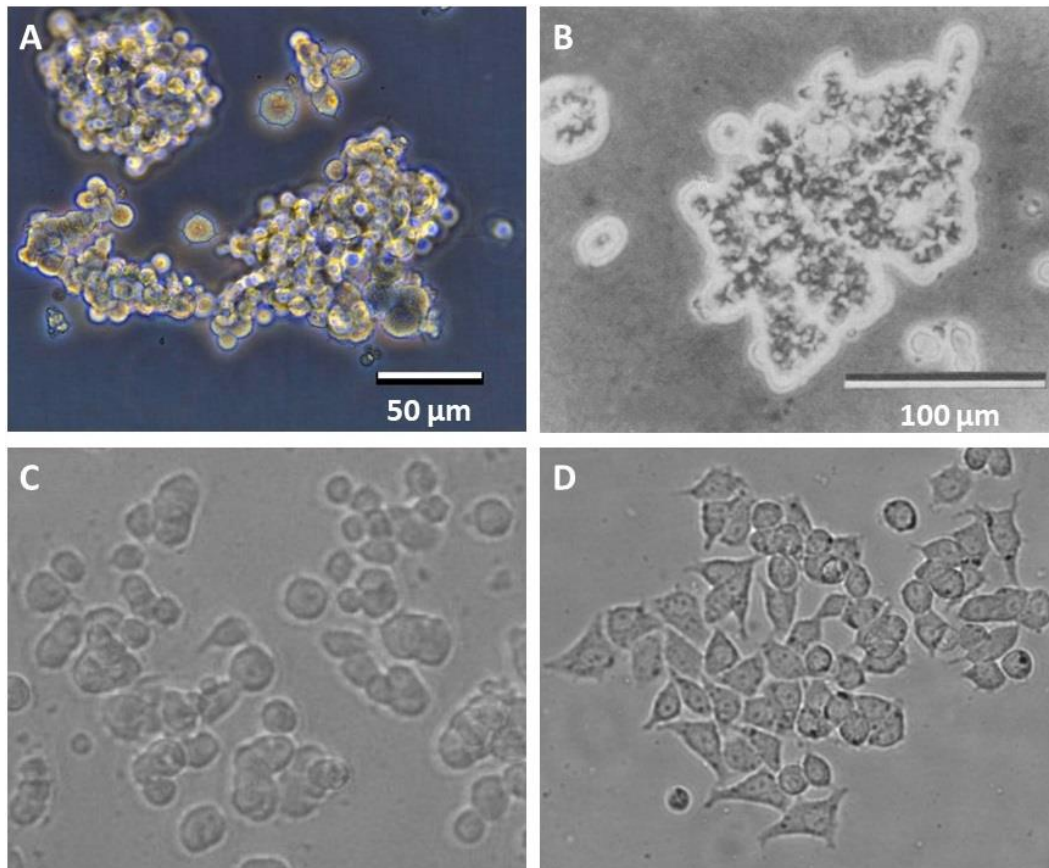


Figure 4-1 : Photographies au microscope à contraste de phase de cellules PC-12 non différenciées

A : Photographies de cellules PC-12 non différenciées de la culture mère. Ces cellules rondes, irrégulières et réfringentes forment de petits agrégats, certains restants isolés. Le phénotype flottant est prédominant ; quelques cellules acquièrent un phénotype adhérent. Nous retrouvons l'hétérogénéité des cellules décrite dans la littérature (Greene & Tischler, 1976). **B** : Photographies de cellules PC-12 non différenciées. Ces cellules flottantes et formant des agrégats présentent le même phénotype flottant hétérogène. Adapté de Greene & Tischler, 1976. **C** et **D** : Photographies de cellules PC-12 non différenciées exprimant le phénotype flottant (**C**) et adhérent (**D**). Adapté de Wiatrak *et al.*, 2020.

4.2.3 *Coating* et ensemencement des neurobiohybrides

Les neurobiohybrides sont préparés en salle blanche selon la procédure décrite au Chapitre 3, §3.5. Ils sont ensuite stérilisés dans un bain d'éthanol à 70° pendant 2 heures et transférés dans le laboratoire de biologie L2. Après séchage sous poste de sécurité microbiologique allumé, le puits de culture est rincé 3 fois 5 minutes avec de l'eau stérile (Thermo Fisher Scientific, Sigma-Aldrich, réf. W3500) avant la préparation des surfaces de culture pour permettre l'adhésion des neurones vivants.

En effet, l'interaction des neurones vivants avec leur environnement biologique fait intervenir une matrice extracellulaire complexe (Barros *et al.*, 2011). Il est donc nécessaire d'en reproduire une majorité des caractéristiques *in vitro* afin d'obtenir des cultures neuronales viables et le plus proches possible des conditions physiologiques. Cette étape d'enrobage des substrats inertes de culture s'appelle le « *coating* » et consiste à faire polymériser une ou plusieurs couches des constituants principaux de la

matrice extracellulaire adaptée aux neurones mis en culture. Pour la composition de ce *coating*, nous avons suivi les recommandations du Dr José Wojnacki de l'Institut de Psychiatrie et Neurosciences de Paris / INSERM U1266. Ainsi, les neurobiohybrides sont tapissés successivement de poly-D-lysine hydrobromide (100µg/ml) (PDL, Merck, Sigma-Aldrich, réf. P7280), puis de collagène de rat de type 1 (100µg/ml) (Collagen I HC rat tail, Corning, réf. 354249) pour permettre l'adhésion des cellules PC-12, préalable indispensable à leur différenciation en neurones vivants. L'intérêt de ce double *coating* est corroboré par deux revues comparatives des différents *coatings* permettant l'adhésion et la différenciation des cellules PC-12, proposée par Wiatrak *et al.*, 2020 et Orłowska *et al.*, 2018. Cette publication conclut que le collagène représente le meilleur *coating* et qu'un double *coating* PDL-collagène permet une adhésion plus forte des cellules PC-12 différenciées et surtout de leurs prolongements (appelés indistinctement neurites) sur le substrat, ainsi qu'une différenciation et une émission de neurites plus rapides.

Ensuite, chaque neurobiohybride estensemencé avec 150 000 cellules (30 000 cellules/ml). Après ensemencement, les cellules PC-12 adhèrent au *coating* en 24h à 48h. L'adhésion des cellules PC-12 au *coating* n'est cependant pas très robuste. Aussi, il est nécessaire de manipuler les cultures avec grande précaution, non seulement pour les changements de milieux en routine, mais aussi et surtout lors de leur transport vers le laboratoire collaborateur avec lequel nous avons travaillé pour certaines expérimentations, au risque de casser des prolongements, voire de décoller des cellules.

En raison du caractère hétérogène déjà mentionné des cellules PC-12 non différenciées, 20% ne répondent pas au NGF (Dichter *et al.*, 1977). Un changement de milieu 24H après l'ensemencement permet d'éliminer les cellules qui ne se différencieront pas ainsi que les éventuels débris de culture. D'après la littérature, les cellules PC-12 cessent de proliférer après 5 à 7 jours d'exposition au NGF (Dichter *et al.*, 1977). Nos propres observations ont permis de constater un arrêt de la prolifération 2 à 3 jours après exposition au NGF. Cet écart peut s'expliquer par une différence de milieu de différenciation : notre milieu de différenciation est appauvri en sérum, tandis que Dichter *et al.*, (1977) utilisent le même milieu de culture à forte concentration de sérum, supplémenté en NGF (50ng/ml) pour différencier les cellules PC-12. Après adhésion au *coating* et arrêt de la prolifération, les cellules PC-12 s'engagent dans un processus post-mitotique ; elles commencent alors à émettre des prolongements. Le nombre, la longueur et la densité des prolongements augmentent jusqu'à 2 semaines après arrêt de la division (Greene & Tischler, 1976). Ces prolongements mesurent de 500µm à 1000µm de long (Dichter *et al.*, 1977) jusqu'à 70mm (Hu *et al.*, 2018) ; ils sont très arborescents et présentent des varicosités et vésicules (Dichter *et al.*, 1977; Greene & Tischler, 1976). Cet aspect visuel des cellules PC-12 différenciées est identique à ce qui est constaté dans nos cultures (Figure 4-2). Les neurones vivants issus de PC-12 différenciés dans les neurobiohybrides sont transportés 24h avant de

réaliser les enregistrements de *patch-clamp* ou d'imagerie calcique. Ce transport de courte durée, une quinzaine de minutes, est effectué dans une boîte isotherme permettant de maintenir la température des cellules à 37°C. Ces dernières sont ensuite conservées dans une étuve, à 37°C en atmosphère humide et à 5% de CO₂ jusqu'à la réalisation des expérimentations prévues (~16h après leur transfert).

4.3 Caractérisation des cellules PC-12 au cours de la différenciation

Afin de vérifier que les cellules PC-12 différenciées dans nos conditions de culture développent bien un phénotype neuronal, nous avons mené une double caractérisation, morphologique et fonctionnelle, de ces cellules au cours de leur différenciation.

4.3.1 Caractérisation morphologique des cellules PC-12 en microscopie optique

La différenciation des cellules PC-12 en neurones catécholaminergiques peut s'apprécier sur la Figure 4-2. Après 7 jours de différenciation en milieu appauvri en sérum et supplémenté en NGF (50ng/ml), les cellules PC-12 commencent à émettre de fins prolongements, préférentiellement en direction d'autres cellules mais également dans toutes les directions (Figure 4-2-A & E). Les prolongements les plus longs ne sont pas nécessairement adhérents sur l'ensemble de leur longueur, mais principalement au niveau de leur cône d'émergence et de leur bouton terminal. Après 14 jours de différenciation, les prolongements augmentent en nombre, en longueur et en épaisseur, et forment un véritable réseau interconnectant les neurones (Figure 4-2-A, C & F). Il devient difficile d'identifier les prolongements d'un même neurone sur l'ensemble de leur longueur. Quelques varicosités commencent à apparaître sur les prolongements, comme décrit par ailleurs dans la littérature (Greene & Tischler, 1976)(Figure 4-2-B, D & G).

Les conditions de culture que nous avons développées ont permis de reproduire le phénotype cellulaire décrit (Dichter *et al.*, 1977; Greene & Tischler, 1976; Wiatrak *et al.*, 2020). Nos observations en microscopie optique ont en effet permis de constater que les neurites étaient les plus denses, longues et belles après 14 jours de différenciation. Ce travail de caractérisation morphologique a été poursuivi par un travail d'immunocytochimie visant à mettre en évidence des marqueurs protéiques spécifiques de l'acquisition d'un phénotype neuronal mature lors de la différenciation des cellules PC-12 en neurones catécholaminergiques par exposition au NGF. Les premiers résultats obtenus en immunocytochimie sont présentés en Annexe 1 :

Caractérisation morphologique des cellules PC-12 différenciées par immunocytochimie de cette thèse.

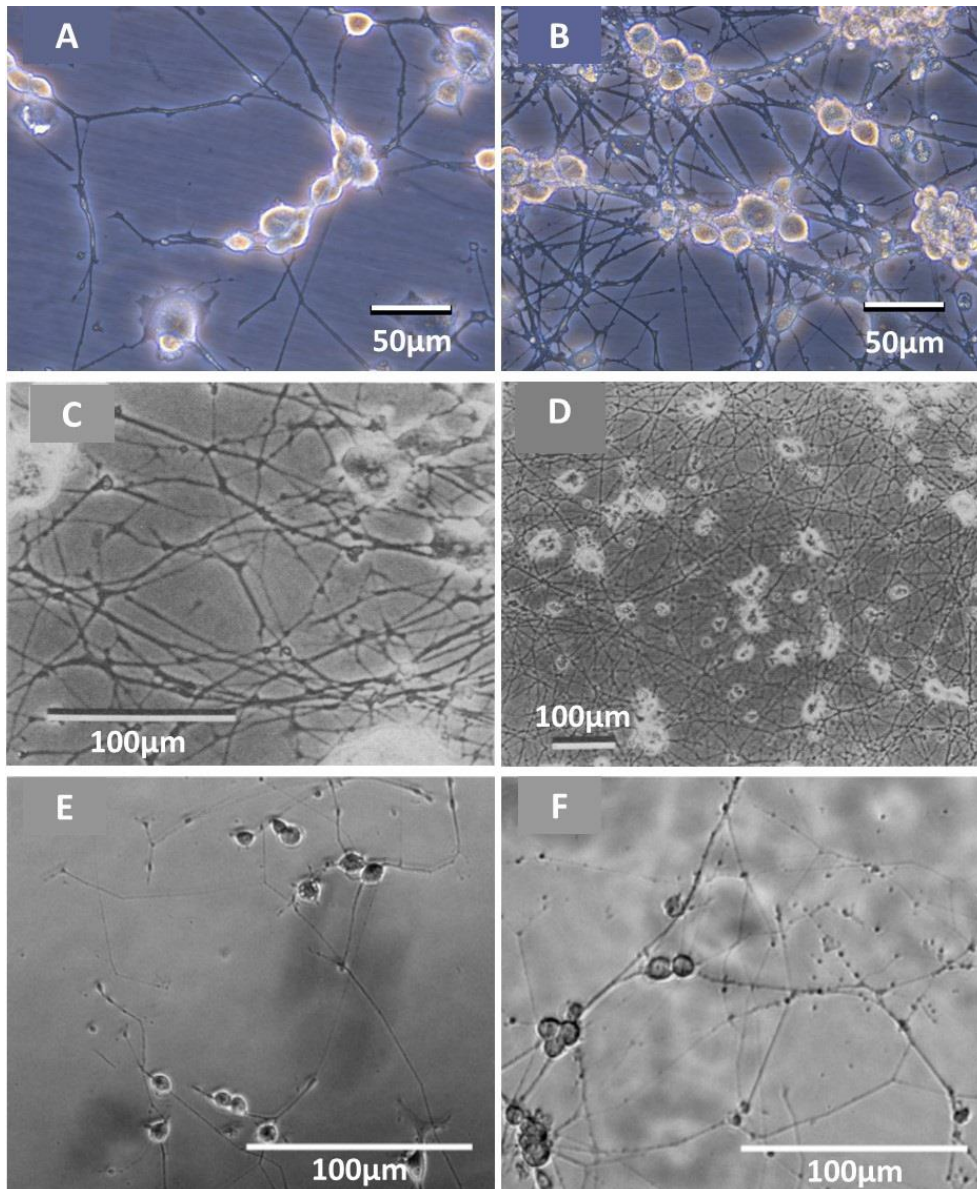


Figure 4-2 : Photographies en microscopie à contraste de phase de cellules PC-12 à différents stade de différenciation. La différenciation est induite par exposition au NGF (50ng/ml)

A & B : Photographies de cellules PC-12 différenciées après 7, 14 jours d'exposition au NGF. Après 7 jours de différenciation (**A**), les cellules PC-12 lancent de fins prolongements, préférentiellement vers d'autres cellules PC-12 mais également dans toutes les directions. Après 14 jours de différenciation (**B**), les prolongements s'épaississent et s'allongent. Ils forment un réseau dense interconnectant les neurones. **C & D :** Cellules PC-12 différenciées après 14 (**C**) et après 22 (**D**) jours de différenciation, adaptées de Greene & Tischler, 1976. **E & F :** Cellules PC-12 différenciées après 7 (**E**) et après 14 (**F**) jours de différenciation, adaptées de Wiatrak *et al.*, 2020.

4.3.2 Caractérisation fonctionnelle des cellules PC-12 différenciées

Au-delà de la caractérisation morphologique des cellules PC-12 différenciées, une caractérisation fonctionnelle est nécessaire pour établir le caractère électriquement actif de ces neurones vivants. Cette caractérisation fonctionnelle a été réalisée par

électrophysiologie en utilisant la technique du patch-clamp en configuration cellule entière, en collaboration avec le Dr Pascal Mariot (INSERM U1003, laboratoire de physiologie cellulaire : canaux ioniques, inflammation et cancer, à Villeneuve d'Ascq).

4.3.2.1 Technique du patch-clamp

Le patch-clamp en cellule entière est une technique d'électrophysiologie permettant de mesurer directement l'activité électrique d'une cellule excitable, un neurone par exemple, plongée dans une solution externe de composition contrôlée. Concrètement, une micropipette remplie de solution physiologique électriquement conductrice et de composition de même osmolarité que celle du milieu intracellulaire est mise en contact avec la membrane plasmique d'une cellule (Figure 4-3). Grâce aux propriétés d'adhésion de la membrane plasmique au verre (Hamill *et al.*, 1981), une aspiration douce permet de faire adhérer très fortement la membrane plasmique de la cellule à la pipette de patch. Cette configuration appelée « cellule-attachée » repose ainsi sur l'existence d'un « seal », ou scellement de résistance, très élevé entre la pipette et la membrane (résistance supérieure à plus de 10 G Ω). Une aspiration brusque ou un choc électrique permet ensuite de détruire le fragment de membrane situé sous la pipette, sans léser le « seal » préalablement obtenu qui doit rester stable et permettre d'éviter les fuites de courant (et de solutés) vers la solution externe. La solution conductrice de la micropipette entre alors en contact direct avec le cytoplasme, permettant d'injecter un courant et de mesurer le potentiel membranaire de la cellule patchée (configuration dite *current-clamp*) ou bien d'imposer un potentiel et de mesurer le courant transmembranaire global de la cellule patchée (configuration dite *voltage-clamp*). Une électrode de masse est connectée au milieu externe. Un schéma de principe du *patch-clamp* en configuration cellule entière est proposé sur la Figure 4-3. Il existe également d'autres configurations d'enregistrement en patch-clamp (*inside-out* et *outside-out*) permettant d'étudier les courants unitaires (Teulon, 2004). Elles ne sont pas détaillées dans ce paragraphe car elles n'ont pas été utilisées lors de nos expérimentations.

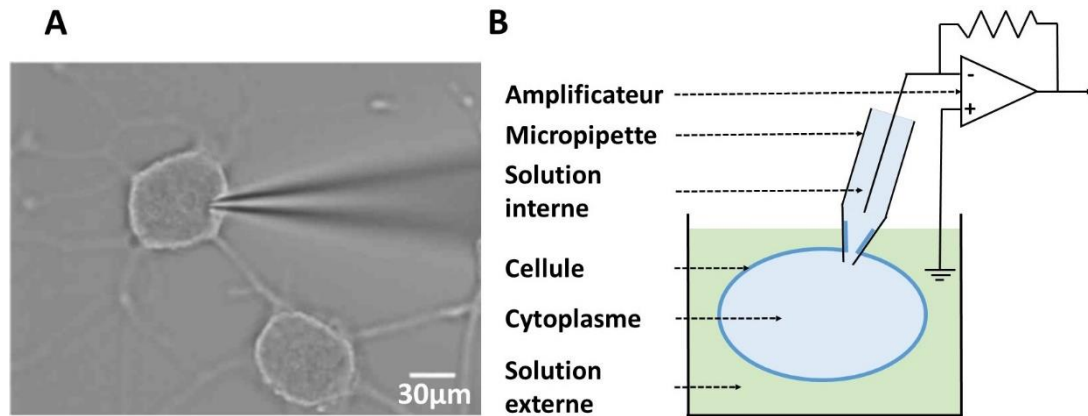


Figure 4-3 : Principe du patch-clamp en configuration cellule entière

A : Photographie d'une micropipette en contact d'une cellule PC-12 différenciée. Adapté de Hu *et al.*, (2018). **B** : Schéma simplifié du principe du patch-clamp en configuration cellule entière. Une pipette remplie de solution conductrice perce la membrane plasmique et est mise en contact avec le cytosol. En configuration *current-clamp*, un courant est injecté dans le cytoplasme et la tension membranaire est simultanément amplifiée et mesurée. En configuration *voltage clamp*, une tension est appliquée dans le cytoplasme et le courant transmembranaire global est simultanément amplifié et mesuré.

Les mécanismes moléculaires sous-tendant le maintien du potentiel de repos impliquent différents canaux ioniques (principalement sodiques, potassiques et calciques) qui ont fait l'objet d'une présentation détaillée dans le Chapitre 1, §1.4. Lors de leur ouverture, ces canaux voltage-dépendants sont traversés par un flux d'ions. D'un point de vue électrique, ce déplacement de charges est assimilé à un courant. L'ouverture des canaux voltage-dépendants étant contrôlée par la tension appliquée à ces derniers, il est raisonnable de considérer que le courant transmembranaire est contrôlé en tension. Il est alors possible d'étudier la relation courant-tension d'une cellule électriquement active, comme un neurone, ce qui donne lieu à des représentations des résultats de *patch-clamp* sous la forme de graphiques courant-tension (I-V). La technique de *current-clamp* en cellule entière permet d'enregistrer les variations du potentiel membranaire d'une cellule en réponse à l'injection d'un courant électrique dans son cytoplasme. L'injection du courant et la mesure du potentiel sont simultanées et effectuées au travers de la même micropipette de patch. Ces mesures permettent d'étudier l'excitabilité d'une cellule. De manière analogue, la technique de *voltage-clamp* en cellule entière permet de mesurer les courants macroscopiques traversant la membrane neuronale en réponse à des créneaux de tension. Ces mesures renseignent sur les propriétés dynamiques des courants observés.

4.3.2.2 Excitabilité des neurones vivants issus de cellules PC-12 différenciées

Afin de vérifier l'excitabilité des neurones catécholaminergiques issus de cellules PC-12 différenciées en présence de NGF pendant 14 jours, une étude en *patch-clamp* a été menée dans le cadre de notre travail. Ces caractérisations ont été réalisées

en configuration *current-clamp* (Figure 4-4) et *voltage-clamp* (Figure 4-6 et Figure 4-11) en utilisant un amplificateur RK-300 (Biologic, Grenoble, France). L'amplificateur était contrôlé par le logiciel Pulse 9.1 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany). Les courants et tensions mesurés ont été échantillonnés à une fréquence de 20KHz en utilisant un convertisseur analogique numérique ITC16 (Instrutech Corp., Long Island, NY) et filtrés par un filtre passe-bas coupant à 3KHz. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel OriginPro 2015 Beta3 (1991–2014 OriginLab Corporation). Des solutions internes et externes de composition différentes sont utilisées en *voltage-clamp* et en *current-clamp*. En *voltage-clamp*, la solution externe est composée de HBSS (142 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES and 5,6 mM glucose) supplémenté avec 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ et 10mM chlorure de tétraéthylammonium. La solution interne est composée de 30mM N-méthyl Glucamine-Gluconate, 10 mM NaCl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, et 1 mM EGTA. En *current-clamp*, la solution externe est composée de HBSS supplémenté avec 2 mM CaCl₂ et 1 mM MgCl₂. La solution interne est composée de 130mM K-Gluconate, 10 mM NaCl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, et 1 mM EGTA. L'osmolarité des solutions externes est de 310 mOsmol/L et celle des solutions internes est de 290 mOsmol/L. Le pH des solutions externes et internes est respectivement de 7,4 et de 7,2. Les mesures ont été effectuées à température ambiante, environ 20°C. Les expérimentations en *voltage-clamp* et *current-clamp* sont réalisées successivement sur une même cellule.

3.2.2.1 Expérimentations en *current-clamp* : mesure du potentiel transmembranaire

Le potentiel de repos moyen mesuré pour les cellules non différenciées est de -36,5mV (Tableau 4-1). A ce potentiel de repos, les canaux voltage-dépendants participant à la phase de dépolarisation ne sont pas activables (Armstrong, 2006). Pour réaliser les mesures en patch-clamp, les cellules ont donc été hyperpolarisées par injection d'un courant de -5pA, pour atteindre un potentiel hyperpolarisé de -70mV, ce qui est classique dans ce type d'étude (Dichter *et al.*, 1977; Zhong *et al.*, 2019).

	Potentiel de repos [mV]	Potentiel de repos moyen [mV]
Cellule n°1	-48	-36,5
Cellule n°2	-42	
Cellule n°3	-22	
Cellule n°4	-38	
Cellule n°5	-28	
Cellule n°6	-37	
Cellule n°8	-40	
Cellule n°9	-38	

Tableau 4-1 : Potentiels de repos mesurés par *current-clamp* sur les neurones catécholaminergiques issus de cellules PC-12 différenciées après 14 jours d'exposition au NGF. La cellule n°7 étant morte pendant l'enregistrement, les données ne sont pas reportées pour cette dernière.

L'excitabilité des neurones catécholaminergiques issus de cellules PC-12 différenciées en présence de NGF pendant 14 jours a été mesurée en configuration *current-clamp*. Les Figure 4-4-A & B représentent la variation du potentiel de membrane en fonction du courant de stimulation. Concrètement, la cellule patchée a été soumise à des courants successifs d'amplitudes croissantes : 10, 20, 30, 40, 50pA, et la tension transmembranaire associée a été mesurée. L'analyse de la Figure 4-4-A permet de montrer que la réponse de cette cellule à une excitation de 10pA (courbe rose) est uniquement passive et correspond à la charge d'un circuit électrique RC. En effet, d'un point de vue électrique et comme déjà évoqué au Chapitre 1, la membrane d'un neurone est une bicouche lipidique constituée de phospholipides non conducteurs, lui conférant des propriétés capacitives et résistives, qui peuvent être modélisées par un condensateur en parallèle d'une résistance (Chapitre 1, Figure 1-13). Le créneau de courant injecté dans la cellule va charger cette capacité, qui va ensuite se décharger lorsque l'excitation cesse. On observe alors une variation de la tension membranaire correspondant au cycle de charge/décharge du dipôle R/C parallèle représenté par la membrane cellulaire. Lorsque l'intensité de la stimulation augmente, un pic de tension est observé. Une excitation de 50pA permet d'observer une réponse spécifique d'environ 40mV (Figure 4-4A (courbe bleue) & B (courbe orange)). Ce pic de tension correspondrait à l'ouverture de canaux ioniques transmembranaires voltage-dépendants, signature des cellules excitables. Une étude des courants globaux par *voltage-clamp* est nécessaire pour confirmer cette hypothèse. L'amplitude de cette réponse (40mV) est cependant inférieure au potentiel d'action émis classiquement par un neurone, qui est d'environ 100mV, aussi il serait abusif de qualifier cette réponse spécifique de potentiel d'action. Toutefois, ces résultats permettent de montrer que les neurones vivants différenciés à partir de cellules PC-12 sont bien excitables électriquement puisque ce type de réponse n'a pas été enregistrée sur des cellules PC-12 non différenciées (Figure 4-11-B).

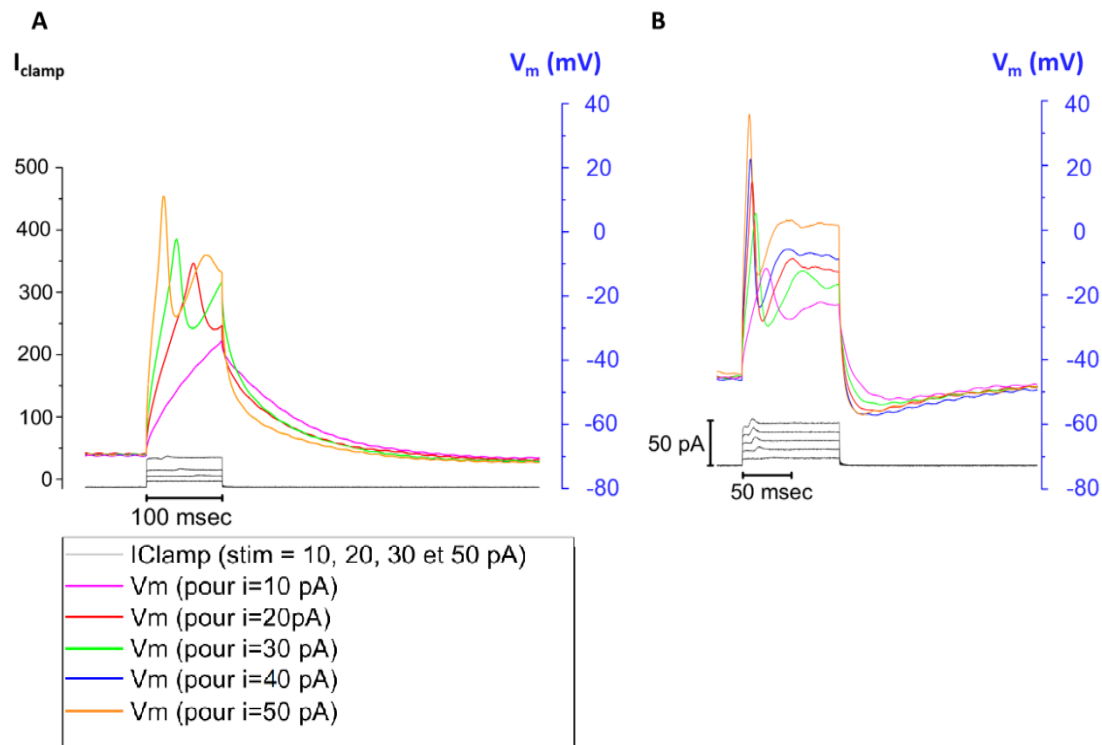


Figure 4-4 : Représentation de la variation du potentiel de membrane en fonction du temps, pour des courants de stimulation d'intensité croissante

La mesure de l'activité électrique a été effectuée en configuration *current-clamp* sur deux cellules PC-12 différenciées après 14 jours d'exposition au NGF. **A** : Pour une stimulation de 10pA (rose), aucun potentiel d'action n'est enregistré. L'évolution de la tension correspond à une réponse passive de la membrane, qui se comporte comme un circuit RC. Pour des stimulations d'intensité plus élevée, un potentiel d'action est enregistré, d'une amplitude de l'ordre de 40mV pour une stimulation de 50pA (courbe bleue). **B** : Pour une stimulation de 10pA (courbe rose), la réponse de la membrane est de faible amplitude. Pour des stimulations d'intensité plus élevée, un potentiel d'action est enregistré, d'une amplitude de l'ordre de 40mV pour une stimulation de 50pA (courbe orange).

Des potentiels d'action d'amplitudes équivalentes à celles que nous avons mesurées ont été décrits dans la littérature et viennent conforter nos résultats (Hu *et al.*, (2018) et Zhong *et al.*, (2019)). La Figure 4-5 montre l'évolution du potentiel membranaire de cellules PC-12 non différenciées et différenciées après 6 jours d'exposition au NGF (50ng/ml) (Hu *et al.*, 2018). Ces mesures de *current-clamp* ont été effectuées en configuration cellule entière après injection dans la cellule de créneaux de courant croissant, de -50pA à 90pA par pas de 10pA. L'allure de la courbe représentant les variations de la tension membranaire des cellules non différenciées (Figure 4-9-A) est typique de la réponse RC d'une membrane cellulaire, mais ne présente pas de pic de potentiel caractéristique d'un potentiel d'action. Le pic de tension observé (Figure 4-9-B) correspond à une dépolarisation de la membrane neuronale, donc à l'émission d'un potentiel d'action d'une amplitude de l'ordre de 30mV. Zhong *et al.*, (2019) ont quant à eux mesuré le potentiel membranaire de cellules PC-12 non différenciées et différenciées après exposition au NGF (25ng/ml) en configuration cellule entière après injection de créneaux de courant de 1,9nA pour une durée de 50ms. La Figure 4-5-C représente la variation du potentiel membranaire des

cellules PC-12 non différenciées (à gauche) et différenciées (à droite) pour un échelon de courant de 1,9nA. Ces auteurs concluent à la présence d'un potentiel d'action émis par les cellules PC-12 non différenciées et différenciées, qu'ils qualifient toutefois de « *suspicious* ». Il est cependant à noter que, dans cette étude, les procédures employées sont nettement différentes des nôtres : après 3 jours de différenciation, les cellules PC-12 sont décollées par trypsinisation et transférées sur un disque de verre *coaté* de poly-L-lysine. Les cellules sont ensuite incubées pendant 24H avant la réalisation des mesures de patch-clamp. Les paramètres et conditions de mesure appliqués dans ces différentes études sont repris dans le tableau disponible en Annexe 2.

Ces données de la littérature corroborent ainsi les résultats de nos expérimentations et étayent l'existence d'une activité électrique spécifique⁶ des neurones catécholaminergiques obtenus après différenciation des cellules PC-12 par le NGF. Cela permet de confirmer l'acquisition d'un phénotype neuronal fonctionnel au fur et à mesure de la différenciation. Ces neurones vivants émettent toutefois des potentiels d'action d'une amplitude inférieure à celle documentée pour les neurones en général.

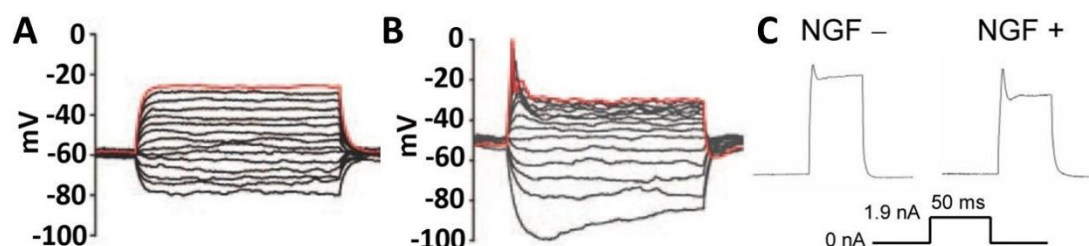


Figure 4-5 : Illustrations de la caractérisation électrique des PC-12

A & B : Evolution de la tension transmembranaire d'une cellule PC-12 non différenciée (**A**) et différenciée après 6 jours d'exposition au NGF (50ng/ml) (**B**) en réponse à des stimulations en courant d'amplitude croissante de -50pA à 90pA par pas de 10pA, adapté de Hu *et al.*, 2018. Les courbes représentant les tensions membranaires mesurées sont superposées, représentation habituelle en électrophysiologie. **A :** Aucun potentiel d'action n'est enregistré sur la cellule PC-12 non différenciée. **B :** Un potentiel d'action d'environ 40mV est enregistré sur la cellule PC-12 différenciée. **C :** Evolution de la tension transmembranaire d'une cellule PC-12 non différenciée et différenciée en réponse à une stimulation par un créneau de courant d'amplitude 1,9nA et d'une durée de 50ms ; adapté de Zhong *et al.*, 2019. Les cellules PC-12 sont différenciées par 3 jours d'exposition au NGF (25ng/ml), puis décollées par trypsinisation et transférées sur un *coverslip* *coaté* de poly-L-lysine. Les cellules sont ensuite incubées pendant 24H avant la réalisation des mesures de patch-clamp. Les auteurs concluent à la présence d'un potentiel d'action émis par les cellules PC-12 non différenciées et différenciées.

⁶ Par opposition au potentiel d'action spontané. Les neurones émettent spontanément des potentiels d'actions. Ces potentiels d'actions peuvent être induits par une excitation provenant d'un autre neurone ou d'une source extérieure, comme un courant électrique.

3.2.2.2 Expérimentations en *voltage-clamp* : variations du courant transmembranaire

L'étude des variations du potentiel transmembranaire par *current-clamp* ayant permis de mettre en évidence une activité électrique spécifique des cellules PC-12 différenciées, elle a été poursuivie par l'analyse des courants macroscopiques transmembranaires par *voltage-clamp*, afin de confirmer les résultats obtenus d'explorer les mécanismes d'action sous-tendant cette activité électrique spécifique. La Figure 4-6 présente le courant transmembranaire macroscopique mesuré en configuration *voltage-clamp* sur les neurones catécholaminergiques obtenus au laboratoire après 14 jours de différenciation de cellules PC-12. Ce courant transmembranaire est représenté pour des stimulations électriques de tension croissante de -120mV à 50mV par pas de 10mV (Figure 4-6). L'analyse de l'évolution des courants présentés montre une composante transitoire négative suivie d'une composante positive continue et stable. Le courant mesuré au pic de la composante transitoire négative est appelé « I_{peak} » et le courant mesuré au plateau de la composante positive continue est appelé « $I_{\text{steady_state}}$ ». Le courant $I_{\text{steady_state}}$ est assez lent à apparaître après l'excitation. Ce courant sortant correspondrait à la sortie d'ions potassium, donc à l'ouverture des canaux potassiques voltage-dépendants (Figure 4-6). Un courant sortant potassique est présent dans toutes les cellules. Le pic de courant « I_{peak} » apparaît immédiatement après l'excitation. Ce courant entrant correspondrait à l'entrée d'ions sodium ou calcium, donc à l'ouverture des canaux sodiques ou calciques voltage-dépendants, ce qui correspond à la phase de dépolarisation de l'émission d'un potentiel d'action (Chapitre 1, Figure 1-11). Ces courants entrants sont caractéristiques des cellules excitables. La présence de ce pic de courant entrant corrobore les résultats obtenus en *voltage-clamp* et confirme que les cellules PC-12 différenciées par 14 jours d'exposition au NGF sont des cellules excitables.

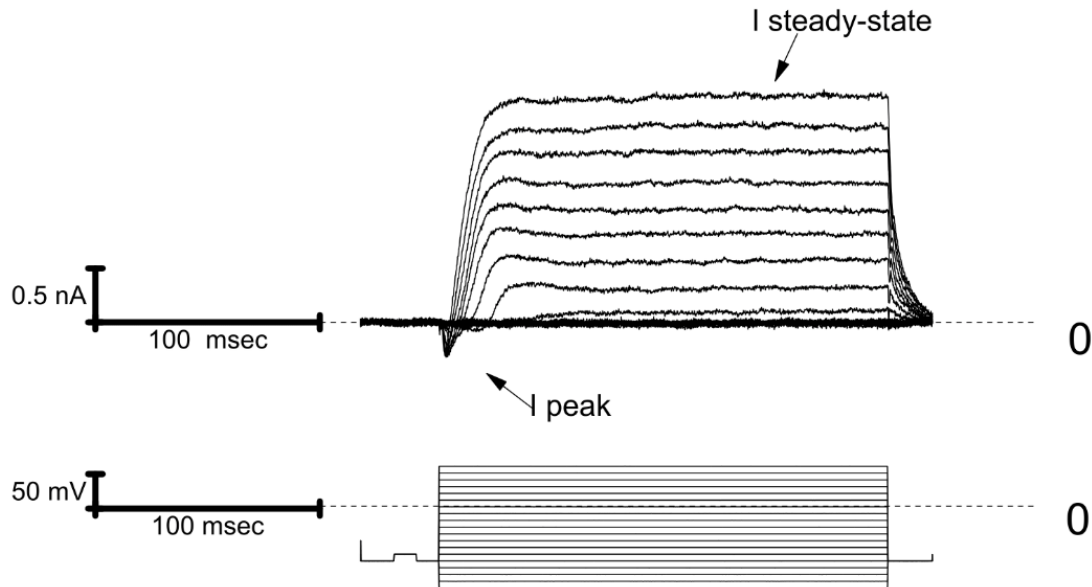


Figure 4-6 : Mesure par *voltage-clamp* de l'activité électrique de cellules PC-12 différenciées au laboratoire. Représentation de la variation du courant transmembranaire en fonction du temps, pour des stimulations électriques de tension croissante telles que $-120\text{mV} \leq V_{\text{excitation}} \leq 50\text{mV}$

La mesure de la variation du courant transmembranaire a été effectuée en configuration *voltage-clamp* sur des cellules PC-12 différenciées après 14 jours d'exposition au NGF en milieu appauvri en sérum. La composante transitoire I_{peak} correspondrait à l'ouverture de canaux sodiques et calciques voltage-dépendants tandis que la composante continue $I_{\text{steady-state}}$ correspondrait à l'ouverture de canaux potassiques voltage-dépendants.

La caractérisation fonctionnelle des cellules PC-12 différenciées est poursuivie par l'exploration des mécanismes sous-tendant leur activité électrique spécifique, c'est-à-dire que nous avons cherché à déterminer l'origine physiologique du pic de courant entrant « I_{peak} ». Afin d'étudier uniquement les courants entrants, le courant sortant potassique ($I_{\text{steady-state}}$) est supprimé par adjonction de tétraéthylammonium [TEA], un bloqueur non sélectif des canaux potassiques voltage-dépendants, dans le milieu externe. Ces courants sortants sont supprimés pour l'ensemble des enregistrements de *voltage-clamp* développés dans la suite de ce manuscrit. Les courants mesurés correspondent alors uniquement aux courants entrants. La Figure 4-7-A présente l'évolution du courant entrant mesuré en configuration *voltage-clamp* sur les cellules PC12 pour des stimulations électriques de tension croissante allant de -80mV à 60mV par pas de 10mV . Un pic suivi d'un plateau de courant sont clairement identifiables. Le courant mesuré au pic est appelé « I_{pic} » et le courant mesuré au plateau est appelé « I_{plateau} ». La Figure 4-7-B restreint la présentation aux courants enregistrés pour des stimulations électriques de tension -5mV , -15mV et -25mV , permettant de mettre en avant le pic et le plateau de courant. La Figure 4-7-C présente l'évolution du courant mesuré au pic et au plateau en fonction de la tension d'excitation. Le courant I_{pic} apparaît pour une tension d'excitation de -30mV , atteint un pic de courant de -300pA pour une excitation de -10mV , puis décroît lorsque la tension d'excitation augmente.

Le courant I_{plateau} apparaît pour une tension d'excitation de -20mV , atteint un pic de -300pA pour une excitation de 10mV , puis son amplitude décroît lorsque la tension d'excitation augmente et il croise l'axe des abscisses pour une excitation de 60mV . Le décalage entre les courants enregistrés au pic et au plateau montre l'implication de canaux voltage-dépendants de nature différentes dans la genèse du potentiel d'action. Les courants entrants correspondants à la phase de dépolarisation (Chapitre 1, Figure 1-11), nous émettons l'hypothèse que le pic de courant « I_{pic} » soit d'origine sodique et que le plateau de courant « I_{plateau} » soit d'origine calcique.

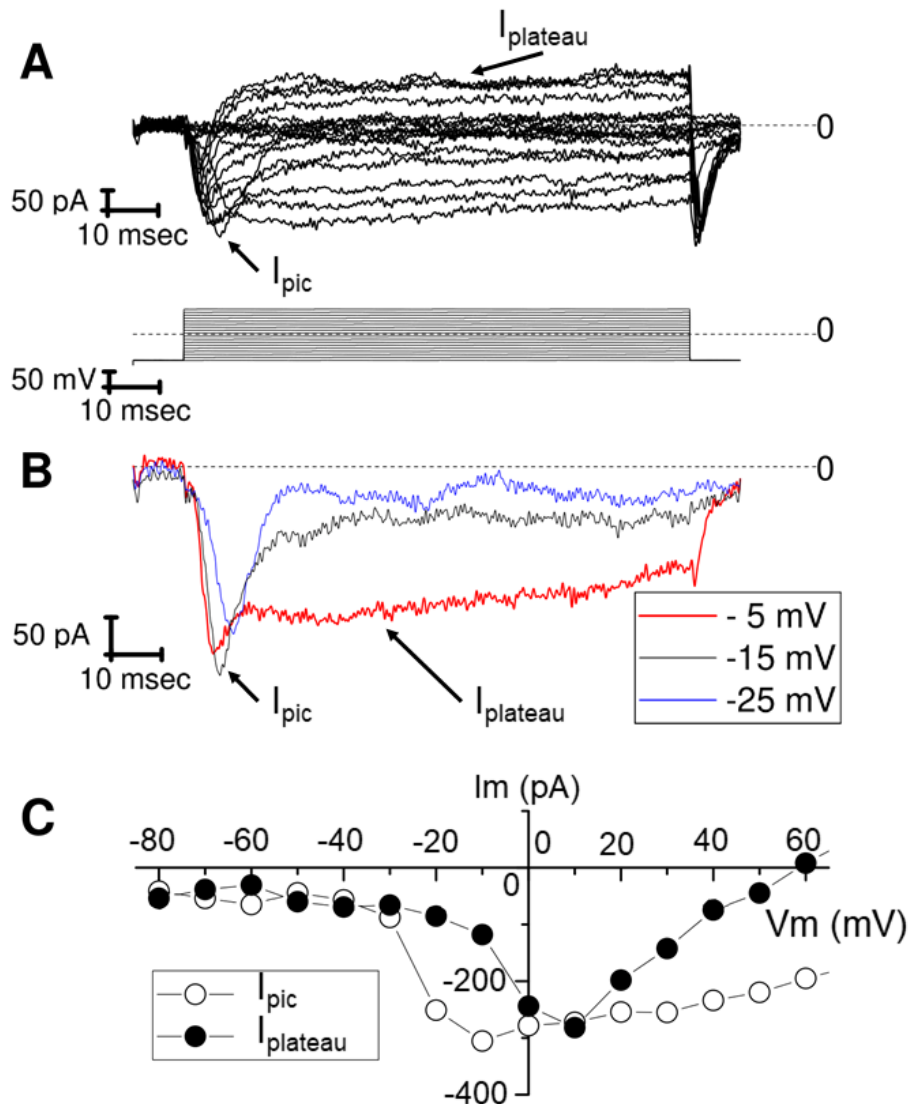


Figure 4-7: Courants entrants enregistrés par *voltage-clamp* sur des cellules PC-12 différenciées

Les cellules sont excitées par des tensions croissantes d'amplitude -80mV à 60mV par pas de 10mV . Les courants sortants sont bloqués par adjonction de TEA dans le milieu externe.

(A) : Evolution du courant entrant en fonction du temps. (B) : Détail de l'évolution du courant entrant en fonction du temps pour des excitations d'amplitude -5mV , -15mV et -25mV . (C) : Caractéristiques courant-tension enregistrées au pic et au plateau. Le décalage entre les tracés montre une implication de canaux voltage-dépendants de nature différentes dans la genèse du potentiel d'action.

Afin de tester l'hypothèse de l'origine sodique du courant I_{pic} , une nouvelle étude utilisant la technique du *voltage-clamp* est menée sur les cellules PC-12 différenciées. L'évolution de la variation du courant transmembranaire en fonction du temps et pour des stimulations électriques de 60mV est mesurée sans (courbe noire) et avec (courbe rouge) ajout de tétrotoxine [TTX] dans le milieu externe (Figure 4-8). La TTX est antagoniste sélectif des canaux sodiques voltage-dépendants. En présence de TTX, ces canaux ioniques sont bloqués et il ne peut y avoir de courant lié à un flux d'ions sodium au travers de ces canaux. La Figure 4-8 montre la disparition du pic de courant en présence de TTX. Ces résultats nous permettent d'affirmer que le pic de courant « I_{pic} » est d'origine sodique et correspond à l'ouverture de canaux sodiques voltage-dépendants. Avant d'explorer les origines physiologiques du plateau de courant « $I_{plateau}$ », les résultats obtenus sont comparés à la littérature disponible explorant par *voltage-clamp* les propriétés électriques des cellules PC-12 différenciées.

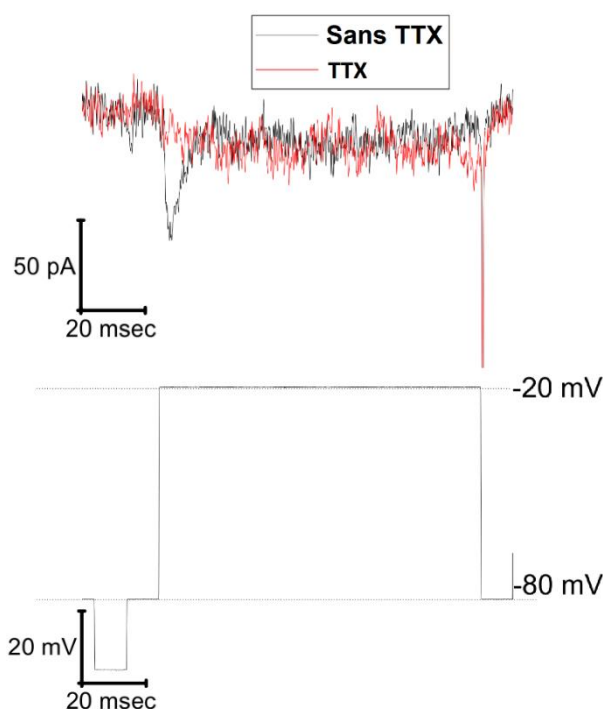


Figure 4-8 : Courants sortants enregistrés par *voltage-clamp* sur des cellules PC-12 non différenciées et différenciées

Représentation des courants sortants en fonction du temps pour des stimulations électriques de 60mV. Ces mesures sont effectuées sans (courbe noire) et en présence de TTX (courbe rouge) dans le milieu externe. La TTX est un antagoniste spécifique des canaux sodiques voltage-dépendants. Le pic de courant transitoire négatif I_{pic} disparaissant en présence de TTX, nous pouvons en conclure qu'il s'agit d'un pic de courant sodique.

Des études par *voltage-clamp* des cellules PC-12 sont documentées dans la littérature (Yang *et al.*, 2011) ; Figure 4-9 ; (Streit & Lux, (1987) ; Figure 4-10). Yang *et al.*, (2011) ont étudié par *voltage-clamp* les mécanismes sous-tendant l'activité électrique des cellules PC-12 non différenciées et différenciées (9 jours d'exposition au NGF, 50ng/ml) (Figure 4-9). Les cellules ont été excitées par des échelons de

tensions (Annexe 2). Les courants sortants tardifs ont été inhibés par l'utilisation conjointe de 4-aminopyridine [4-AP] et de tétraéthylammonium chloride [TEA-Cl] (bloqueurs spécifiques des canaux potassiques) (Figure 4-9-A), et les courants transitoires rapides ont été inhibés par l'utilisation de tétrodotoxine [TTX] (bloqueur spécifique des courants sodiques) (Figure 4-9-B, en bas). Ces résultats démontrent que la dépolarisation membranaire observée en *voltage-clamp* est sous-tendue par un courant précoce entrant sodique et un courant tardif sortant potassique, corroborant l'analyse que nous avons faite de nos résultats (Figure 4-6 & Figure 4-8). Cependant, cette étude proposée par Yang *et al.*, (2011) ne fait aucune mention d'une composante calcique dans le courant précoce entrant.

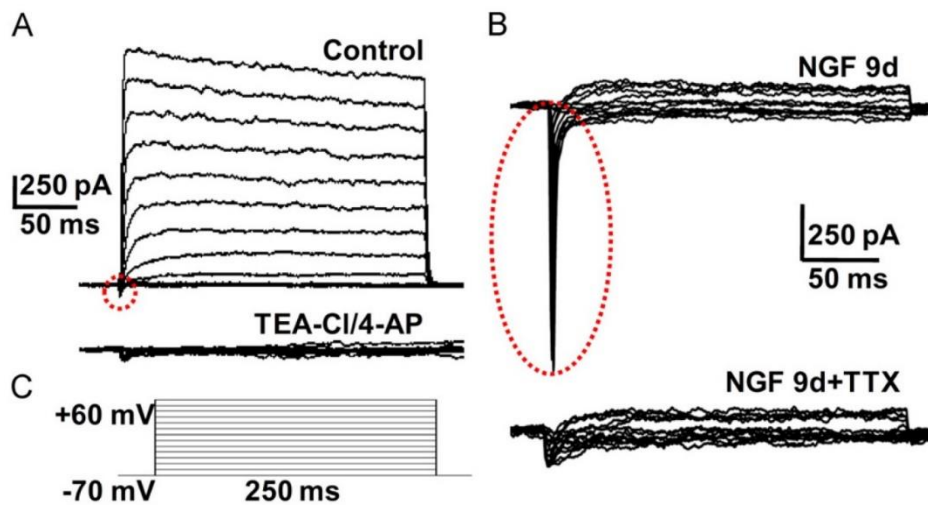


Figure 4-9 : Enregistrements des courants macroscopiques de cellules PC-12 non différenciées (A) et différenciées (B) après 9 jours d'exposition au NGF (50ng/ml) par application de créneaux de tension croissants de -70mV à -60mV, par pas de 10mV et pour une durée de 250ms (C). Adapté de Yang *et al.*, (2011)

Les courbes représentant les courants macroscopiques mesurés sont superposées. Cette représentation temporelle permet de distinguer les différentes composantes des courants macroscopiques.

A : Courants positifs stables atteignant 1835pA enregistrés sur les cellules PC-12 non différenciées (Yang *et al.*, (2011) ; Figure 4-9-A). Ces courants ont été complètement inhibés par l'utilisation conjointe de 4-aminopyridine [4-AP] et de tétraéthylammonium chloride [TEA-Cl], bloqueurs spécifiques des canaux potassiques. Ces résultats montrent que les courants enregistrés résultent d'un flux sortant d'ions K^+ au travers de canaux potassiques voltage-dépendants. **B :** Enregistrements effectués en présence de 4-AP et TEA-Cl sur les cellules PC-12 différenciées montrant des courants négatifs transitoires atteignant 1200pA. Ces courants ont été complètement inhibés par l'utilisation de tétrodotoxine [TTX], bloqueur spécifiques des canaux sodiques. Ces résultats montrent que les courants résultent donc d'un flux entrant d'ions Na^+ au travers de canaux sodiques voltage-dépendants. **C :** Signaux de stimulations : créneaux de tension croissants de -70mV à -60mV, par pas de 10mV et pour une durée de 250ms.

Nous avons par ailleurs émis l'hypothèse d'un plateau de courant « $I_{plateau}$ » d'origine calcique. Ne disposant pas de bloqueur spécifique des canaux calciques, nous n'avons pas pu explorer cette hypothèse expérimentalement. Toutefois, les données de la littérature permettent d'étayer cette hypothèse. Ainsi, Streit & Lux, (1987) ont étudié par *voltage-clamp* la contribution de canaux calciques voltage-dépendants à la dépolarisation membranaire observée dans des cellules PC-12 différenciées après 7

jours d'exposition au NGF (450ng/ml) (Figure 4-10). Les enregistrements présentés dans cette publication ont été effectués sur une cellule PC-12. La solution externe de patch-clamp contenait du calcium (20mM) et de la TTX ($3 \cdot 10^{-6}M$). La solution interne contenait du TEA (20mM). Les cellules ont été excitées par des échelons de tensions de -40mV à +60mV (Annexe 2). Ces mesures montrent une apparition de courant transmembranaire pour une excitation de -20mV, courant qui augmente, atteint son maximum d'amplitude (175pA) pour une excitation de 5mV, puis décroît et disparaît à partir d'une excitation de 50mV (Figure 4-10 A & B). Des courants analogues, bien que de plus faibles amplitude, sont enregistrés dans des cônes d'émergence axonaux mécaniquement séparés de la membrane neuronale. Les auteurs comparent ces courants aux courants calciques dus à des canaux ioniques voltage-dépendants activés à haute tension (en anglais dans le texte : *classical high-voltage-activated calcium currents*) présents dans de nombreuses cellules neuronales. Les conditions expérimentales de *voltage-clamp* proposées par Streit & Lux, (1987) sont analogues aux nôtres ; les courants sortants potassiques sont inhibés par utilisation de TEA et les courants entrants sodiques sont inhibés par de la TTX. De ce fait, comparons les enregistrements réalisés par Streit & Lux, (1987) et présentés sur la Figure 4-10-B aux enregistrements que nous avons réalisés et présentés sur la Figure 4-7-C. D'après cette Figure 4-7-C, le courant I_{plateau} apparaît pour une tension d'excitation de -20mV, atteint un pic de -300pA pour une excitation de 10mV, puis son amplitude décroît lorsque la tension d'excitation augmente pour disparaître à partir d'une excitation de 60mV. Les tensions pour lesquelles le courant apparaît, disparaît et atteint un pic sont identiques dans les deux cas. De plus, l'amplitude du pic de courant est de même ordre de grandeur. Enfin, les représentations de l'évolution des courants en fonction des tensions d'excitation présentés sur les Figure 4-10-B et Figure 4-7-C présentent la même allure générale. En procédant par analogie, nous pouvons en déduire que le plateau de courant « I_{plateau} » est d'origine calcique et correspond à l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants.

Ainsi, le potentiel d'action produit par les neurones catécholaminergiques issus de cellules PC-12 différenciées pendant 14 jours en présence de NGF présente une composante rapide sodique et calcique suivie d'une composante lente potassique. Ces courants précoces entrants sodiques et calciques et tardifs sortants potassiques sont retrouvés dans la littérature disponible.

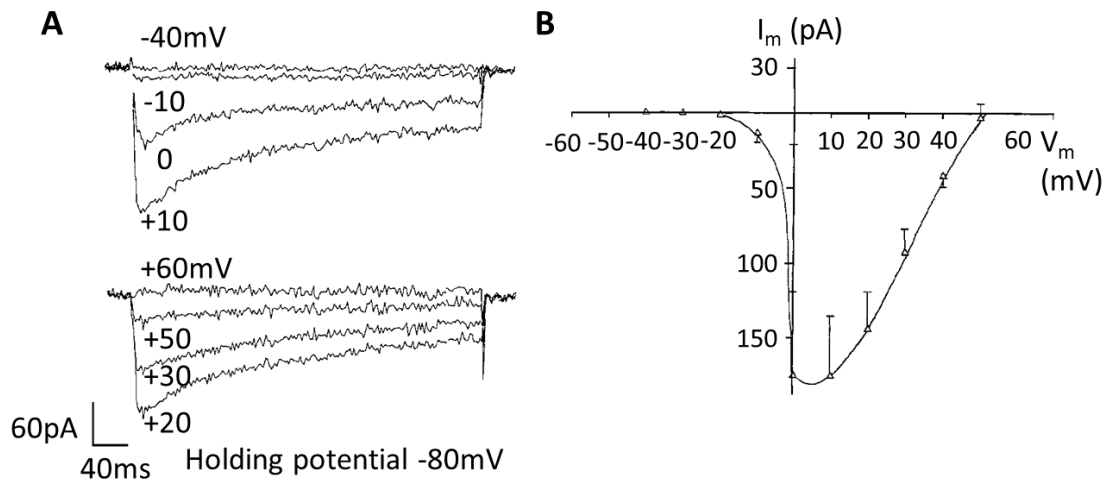


Figure 4-10 : Courants macroscopiques calciques enregistrés par Streit & Lux, (1987) sur des cellules PC-12 différenciées après 7 jours d'exposition au NGF (450ng/ml) par application de créneaux de tension croissantes

La solution externe de patch-clamp contenait du calcium et de la TTX ($3 \cdot 10^{-6}M$) (inhibiteur spécifique des canaux sodiques) et la solution interne du TEA (20mM) (inhibiteur spécifique des canaux potassiques).

A : Evolution des courants macroscopiques en fonction du temps pour les créneaux de tension d'amplitudes croissantes appliqués à la membrane. **B** : Relation courant-tension entre le pic de courant en fonction de la tension imposée à la cellule. Ces mesures montrent une apparition de courant transmembranaire pour une excitation de -20mV, atteint un maximum pour une excitation de 5mV, puis disparaît à partir d'une excitation de 50mV. Les auteurs comparent ces courants aux courants calciques dus à des canaux ioniques voltage-dépendants activés à haute tension (en anglais dans le texte : *classical high-voltage-activated calcium currents*) présents dans de nombreuses cellules neuronales.

Enfin, nous avons voulu nous assurer que l'apparition de ces courants entrants sont bien une conséquence de la différenciation des cellules PC-12 par exposition au NGF. Pour cela, les courants transmembranaires entrants (« I_{peak} » sur la Figure 4-6) ont été enregistrés en *voltage-clamp* sur 3 cellules PC-12 contrôles non différenciées et 6 cellules PC-12 différenciées par 14 jours d'exposition au NGF. Les cellules ont été excitées par des créneaux de tension d'amplitudes croissantes, de -80mV à 80mV, appliquées par pas de 10mV. La Figure 4-11 compare l'évolution de la densité de courant moyen enregistré sur des cellules PC-12 contrôles non différenciées (CTL - ■) à celle du courant moyen enregistré sur des cellules PC-12 différenciées par 14 jours d'exposition au NGF (DiffJ14 - ○) en fonction de la tension appliquée à la membrane neuronale. Les enregistrements effectués sur les cellules contrôles non différenciées (CTL) montrent une apparition de courant membranaire pour une excitation de -40mV, un pic de densité de courant de -2pA/pF pour une excitation de 0mV, puis une décroissance du courant qui revient à son niveau de base à partir d'une excitation de 30mV. Les enregistrements effectués sur les cellules PC-12 différenciées (DiffJ14) montrent une apparition du courant transmembranaire pour une excitation de -45mV, un pic de densité de courant de -4pA/pF atteint pour une excitation de 5mV, puis une décroissance du courant lorsque la tension d'excitation augmente. Les relations courant-tension présentés sur cette Figure 4-11 permettent de constater une

augmentation d'un facteur 2 de la densité de courant transmembranaire enregistré sur les cellules PC-12 différenciées par rapport à la densité de courant enregistrée sur les cellules contrôles non différenciées. Ces résultats permettent de confirmer que les cellules PC-12 différenciées par exposition au NGF sont électriquement actives et d'affirmer que cette activité électrique est induite par la différenciation.

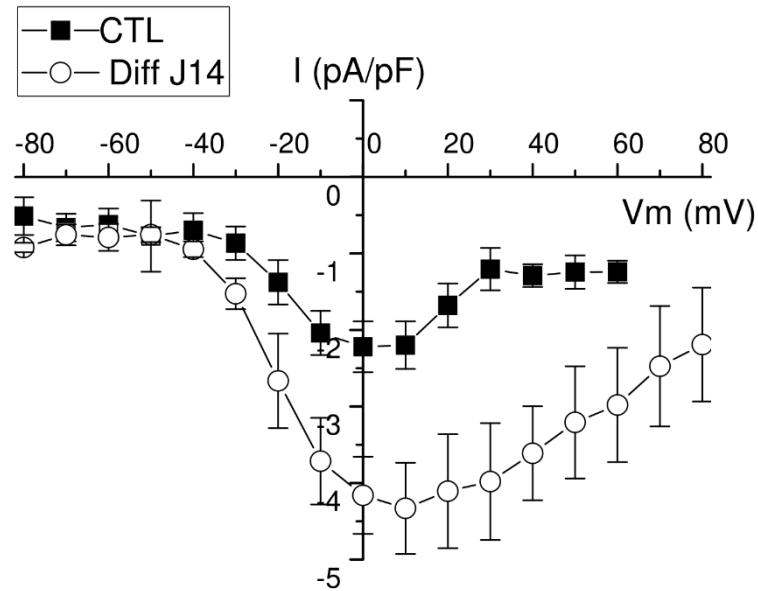


Figure 4-11 : Effet de la différenciation des cellules PC-12 sur la densité de courant entrant moyen

La densité de courant entrant moyen est enregistrée en configuration *voltage-clamp* sur 3 cellules non différenciées (CTL) et 6 cellules différenciées (DiffJ14) par 14 jours d'exposition au NGF (50ng/ml). Les cellules sont excités par des créneaux de tension d'amplitudes croissantes, de -80mV à 80mV par pas de 10mV. Sur les cellules contrôles non différenciées (CRL), ces mesures montrent une apparition de courant membranaire pour une excitation de -40mV, un pic de densité de courant de -2pA/pF pour une excitation de 0mV, puis le courant revient à son niveau de base à partir d'une excitation de 30mV. Sur les cellules PC-12 différenciées (DiffJ14), un courant transmembranaire apparaît vers -45mV, un maximum de densité de courant de -4pA/pF est atteint pour une excitation de 5mV, puis le courant décroît lorsque la tension d'excitation augmente. Le courant moyen mesuré est plus important sur les cellules différenciées que sur les cellules contrôle. Cela permet d'affirmer que les cellules PC-12 différenciées sont électriquement actives et que cette activité électrique est induite par la différenciation.

En conclusion, nos données établissent que les cellules PC-12 se différencient en neurones catécholaminergiques matures, excitables et capables d'émettre des potentiels d'actions après 14 jours d'exposition au NGF. Cela permet de définir le temps minimum de différenciation nécessaire pour la suite de nos travaux, à savoir l'excitation/écoute des cellules neuronales. Ces résultats corroborent en outre les données de la littérature. Cette étape était un préalable indispensable avant d'établir, par imagerie calcique, la preuve de concept de la capacité de ces neurones vivants à être activés par un signal électrique biomimétique analogue à celui délivré par les neurones artificiels présentés au Chapitre 1, Figure 1-17 et Chapitre 2, §2.4.

4.4 Preuve de concept et démonstration d'une réponse des cellules PC-12 différenciées excitées par un signal biomimétique : analyse des résultats obtenus en imagerie calcique

Afin d'apporter la preuve de notre capacité à exciter des neurones vivants par une stimulation électrique artificielle⁷ biomimétique, il fallait mettre en évidence dans les neurones en culture des modifications physiologiques spécifiquement déclenchées par les impulsions électriques biomimétiques appliquées : soit directement la genèse de potentiels d'action par la technique de patch clamp, soit indirectement en enregistrant les modifications de concentrations en calcium intracellulaire qui précèdent la libération par les neurones activés des neuromédiateurs dans la fente synaptique. Nous avons dans le cadre de cette thèse opté pour cette seconde approche et utilisé un protocole d'imagerie calcique afin d'établir cette preuve de concept. Les expériences décrites dans la suite de ce chapitre ont été menées en collaboration avec le Dr. Valerio Farfariello (INSERM U1003, laboratoire de physiologie cellulaire : canaux ioniques, inflammation et cancer, à Villeneuve d'Ascq).

L'imagerie calcique est une technique permettant d'observer la présence et, selon la sonde choisie, de mesurer les variations de concentrations intracellulaires d'ions calcium (Barreto-Chang & Dolmetsch, 2009). Dans les neurones, la détection de ces flux de calcium est utilisée comme marqueur indirect d'une activité neuronale. Dans un neurone au repos, le cytoplasme est quasiment exempt d'ions calcium libres. Lorsqu'un potentiel d'action atteint le bouton synaptique, il provoque l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants, ce qui entraîne une entrée massive d'ions calcium dans le cytoplasme. L'entrée de ces ions déclenche une réorganisation des microfilaments d'actine du cytosquelette dans les boutons synaptiques, ce qui aboutit à la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique et à la libération de leur contenu, les neuromédiateurs, dans la fente synaptique. Cette cascade d'événements intracytoplasmiques déclenchée par l'entrée de calcium dans les boutons synaptiques est indispensable à la transmission d'informations aux neurones post-synaptiques. Ainsi, la mesure des flux de calcium intraneuronaux est un marqueur indirect d'une activité électrique neuronale et d'une communication effective au sein d'un réseau neuronal. Cette mesure de flux calciques peut se faire par imagerie calcique en utilisant des sondes fluorescentes sensibles au calcium.

Le Fura-2 est une sonde ratiométrique classiquement utilisée en imagerie calcique pour quantifier les flux de calcium intracellulaires. Le spectre d'absorption du Fura-2 dépend de son état de liaison avec le calcium : sous sa forme libre, il est à 340nm

⁷ Le terme artificiel est utilisé ici par opposition au terme naturel, faisant référence au fonctionnement des neurones vivants en condition physiologique.

et passe à 380nm sous sa forme liée. Indépendamment de sa liaison au calcium, le pic du spectre d'émission du Fura-2 est à 510nm (Figure 4-12). Le dérivé estérifié du Fura-2, l'acétoxy-méthyl-ester Fura-2 [Fura-2-AM], possède un groupement ester. Ce groupement ester rend la molécule lipophile, permettant au FURA-2-AM de diffuser à travers la membrane neuronale. Une fois entré dans le neurone, les estérases naturellement présentes dans le cytoplasme clivent le groupement acétoxyméthyl, transformant le Fura-2-AM en Fura-2 et le piégeant à l'intérieur du cytoplasme (Oakes *et al.*, 1988). L'ablation du groupement ester permet également au Fura-2 de se lier aux ions calcium libres présents dans le cytoplasme. A ce stade, le Fura-2 est contenu à l'intérieur des cellules tandis que le calcium libre est présent à l'extérieur des cellules.

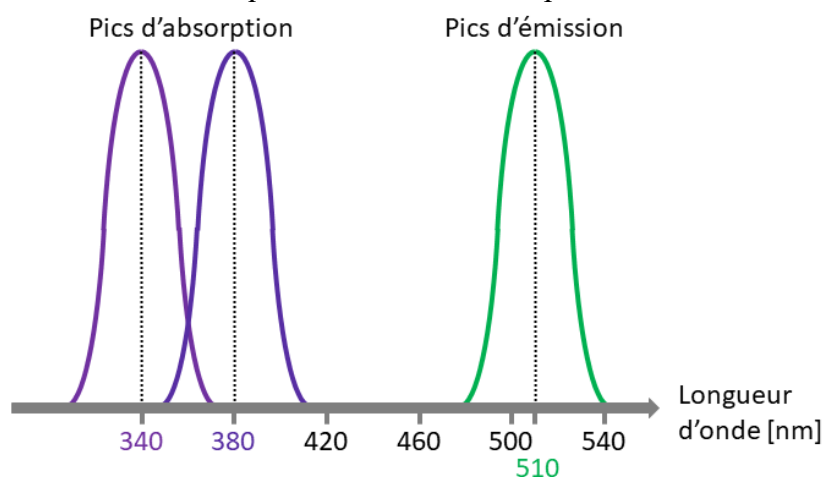


Figure 4-12 : Spectre d'absorption et d'émission du fluorochrome Fura-2

Sous sa forme libre, le pic du spectre d'absorption du Fura-2 se situe à la longueur d'onde 340nm, et sous sa forme liée, il se situe à 380nm. Sous ses deux formes, le pic de son spectre d'émission se situe à la longueur d'onde 510nm. L'expérimentation d'imagerie calcique consiste à exciter les neurones chargés en Fura-2 aux longueurs d'ondes 340nm et 380nm et enregistrer la fluorescence au pic d'émission, 510nm. Tant que le neurone n'est pas stimulé, le cytoplasme ne contient pas d'ions calcium libres et la totalité du Fura-2 présent dans le cytoplasme est sous forme libre. L'intensité lumineuse mesurée pour une excitation à 340nm est élevée, tandis qu'elle est faible pour une excitation à 380nm. Lorsque le neurone étudié est excité électriquement, des ions calcium entrent massivement dans le cytoplasme, se liant avec une partie du Fura-2 disponible. La quantité de Fura-2 sous forme libre diminue et la quantité de Fura-2 sous forme liée au calcium augmente. En conséquence, l'intensité lumineuse mesurée pour une excitation à 340nm baisse, tandis l'intensité lumineuse mesurée pour une excitation à 380nm augmente. Les variations du ratio 340nm/380nm traduisent les entrées (augmentation de ce rapport) ou sorties (diminution de ce rapport) de calcium dans les neurones. Ces variations permettent ainsi de mettre en évidence, de façon indirecte par rapport à un enregistrement électrophysiologique, l'activité électrique des neurones marqués. L'utilisation d'une sonde ratiométrique permet de réduire les artéfacts dus aux variations de concentration du Fura-2, aux fuites de Fura-2 et au photoblanchiment (Barreto-Chang & Dolmetsch, 2009).

4.4.1 Imagerie calcique - Matériel et méthodes

4.4.1.1 Banc d'imagerie calcique

Les enregistrements ont été effectués avec un objectif 20x monté sur un microscope inversé (SuperFluor Nikon Eclipse Ti-), couplé à une caméra EMCCD Rolera EM-2C (Qimaging). Les neurones sont illuminés alternativement aux longueurs d'onde 340nm et 380nm par un système d'illumination DG4 (Sutter) équipé d'une lampe à xénon (300W). L'acquisition et les analyses sont effectuées avec le logiciel Metafluor 7.7.5.0 (Molecular Devices Corporation). Le traitement des résultats est effectué avec le logiciel GraphPad Prism (version 9.1.1, GraphPad Software Inc.). Les neurobiohybrides IMACA utilisés ont été décrits dans le Chapitre 3, §3.4.2 (Figure 3-14, Figure 3-18-A). Les expérimentations sont réalisées dans une pièce obscure, mis à part la lumière de l'écran de l'ordinateur nécessaire au pilotage du banc d'imagerie calcique et à l'acquisition des données. Dans le cadre des expérimentations présentées ici, leurs électrodes étaient recouvertes d'un coating de PDL et de collagène (Chapitre 4, §4.2.3). Le signal d'excitation biomimétique est généré par un générateur basse fréquence [GBF]. Ce signal biomimétique est issu du modèle SPICE des neurones qui ont été fabriqués ensuite en technologie CMOS. Le signal est donc identique à celui en sortie d'une puce artificielle neuronale. Un schéma de principe ainsi qu'une photographie du banc d'imagerie calcique sont donnés sur la Figure 4-13.

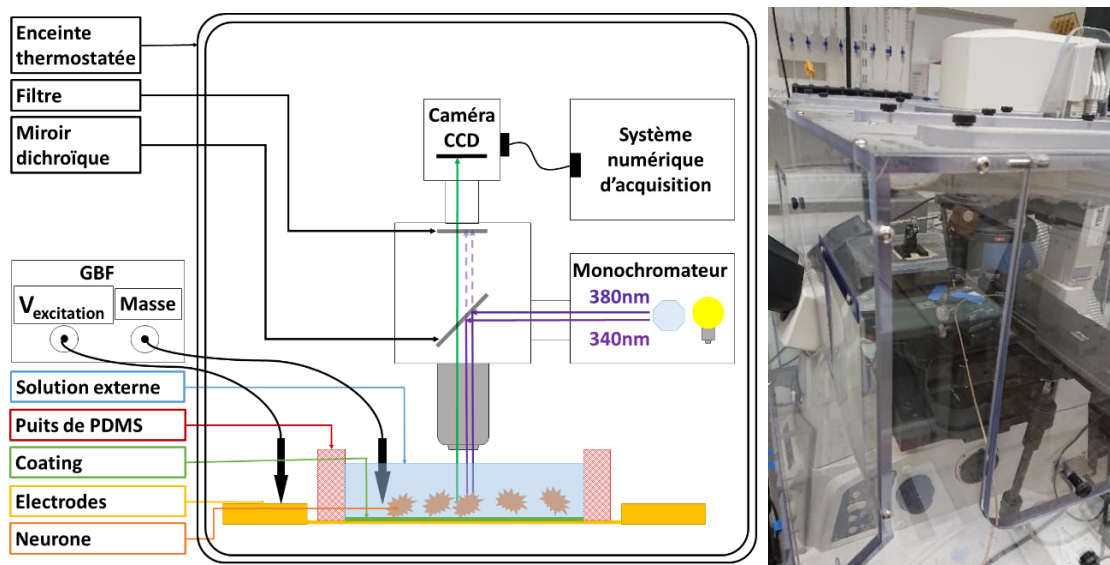


Figure 4-13 : A : Schéma simplifié du banc d'imagerie calcique et B : photographie du banc d'imagerie calcique utilisé pour les enregistrements présentés dans ce manuscrit

Deux faisceaux de lumière de longueur d'onde contrôlée (340nm et 380nm, respectivement spectres d'excitations du Fura-2 libre et du Fura-2 lié à un ion calcium) sont alternativement envoyés par un monochromateur et dirigés par un miroir dichroïque vers les neurones chargés en Fura-2. La lumière de fluorescence émise par le Fura-2 (510nm de longueur d'onde) traverse le miroir dichroïque, le filtre permettant d'éliminer les réflexions du signal d'excitation, et illumine le capteur CCD d'une caméra. La caméra numérise le signal et le transmet à un logiciel d'acquisition et d'analyse.

4.4.1.2 Chargement des cellules en Fura-2

Les neurones vivants issus de cellules PC-12 différenciées après 14 jours d'exposition au NGF sont incubés en présence de 4 μ g/ml de Fura-2-AM (Fura-2, AM ester, FP-42776C, Interchim) dans du milieu de différenciation maintenu à 37°C et 5% de CO₂ pendant 45 minutes. Les neurones sont rincés avec du HBSS immédiatement avant de les imager. Les enregistrements sont effectués dans 1ml de solution externe constituée de HHBS (NaCl (140mM), KCl (5mM), KH₂PO₄ (0,4mM), Na₂HPO₄ (0,3mM), glucose (5mM) and HEPES (10mM), pH ajusté à 7,3) contenant 10mM de calcium par ajout de CaCl₂ (1mM) pour atteindre une concentration d'ions calcium de 2mM.

4.4.1.3 Réalisation des enregistrements d'imagerie calcique

Le neurobiohybride contenant les neurones chargés en Fura-2 est positionné dans l'enceinte thermostatée du banc d'imagerie calcique (Figure 4-13). Le point chaud du générateur est connecté à une électrode du dispositif IMACA au moyen d'une aiguille métallique manipulée par un micromanipulateur. Une seconde aiguille jouant le rôle d'électrode de référence est placée dans la solution externe et est connectée à la masse du générateur. Il est indispensable de mettre le bain d'électrolyte à la masse pour assurer une différence de potentielle entre l'électrode d'excitation et la cellule vivante. Une représentation schématique du montage du banc de stimulation électrique des neurones différenciés dans le neurobiohybride IMACA est donnée sur la Figure 4-14-A. La Figure 4-14-B présente une photographie en microscopie optique de neurones issus de cellules PC-12 différenciés sur les électrodes IMACA. Ces neurones présentent un tropisme préférentiel pour les électrodes, que nous n'avons pas étudié spécifiquement et que nous n'expliquons pas à ce jour. La Figure 4-14-C présente le logiciel permettant de suivre en temps réel l'enregistrement de la fluorescence des événements marqués. L'augmentation brutale du ratio des fluorescences 340nm/380nm visible sur cette photographie indique une entrée de calcium intracellulaire.

Deux expérimentateurs sont nécessaires pour réaliser les enregistrements. Un premier expérimentateur contrôle manuellement le GBF : déclenchement et arrêt des stimulations, gestion de l'amplitude des stimulations. Un second expérimentateur contrôle le banc d'imagerie calcique : sélection du champ d'enregistrement, déclenchement de l'enregistrement et gestion des éventuels réactifs ajoutés à la solution externe en cours d'enregistrement. Un chronomètre déclenché simultanément avec le début de l'enregistrement permet de synchroniser les excitations électriques sur l'enregistrement d'imagerie calcique. Les variations de concentrations de calcium intracellulaire peuvent ainsi être suivies en temps réel pendant l'acquisition des données, qui seront ensuite analysées *a posteriori*.

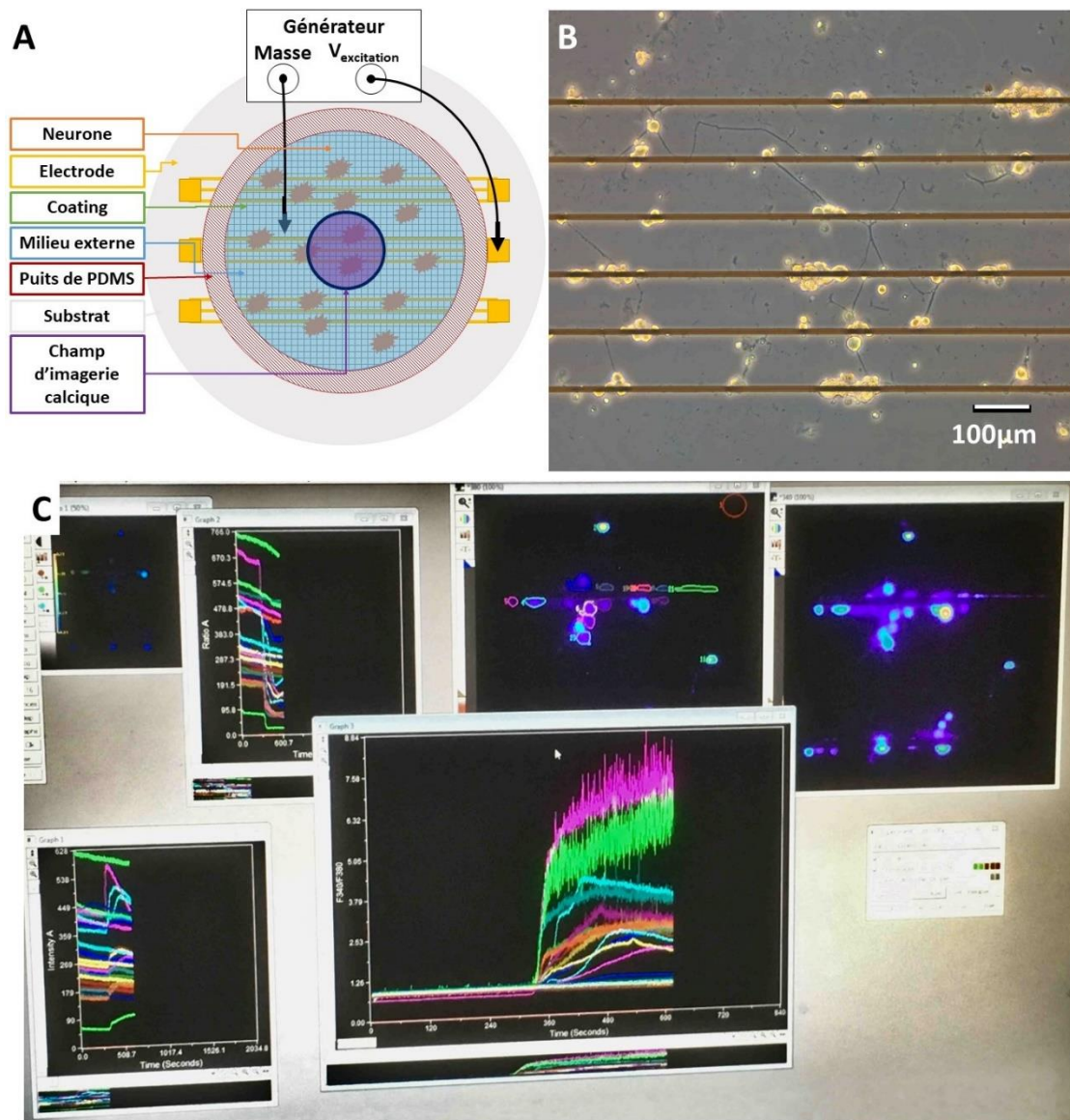


Figure 4-14: Neurons différenciés dans un neurobiohybride IMACA pendant l'enregistrement d'imagerie calcique

A : Schéma simplifié du neurobiohybride pendant l'enregistrement d'imagerie calcique (Figure 4-13). Les neurones sont différenciés sur l'ensemble de la surface d'un neurobiohybride IMACA. Le champ étudié en imagerie optique est choisi après un travail d'observation au microscope optique. Les neurones présents dans ce champ doivent recouvrir les électrodes. Ces neurones présentent un tropisme préférentiel pour les électrodes. **B** : Photographie en microscopie à contraste de phase de neurones croissant sur les électrodes d'un dispositif IMACA. Les regroupements de neurones émettent des prolongements neuritiques qui permettent des contacts interneuronaux. **C** : Enregistrement de la fluorescence des événements marqués pendant l'imagerie calcique. Les corps cellulaires sont délimités manuellement à l'aide du logiciel d'acquisition. L'augmentation brutale du ratio des fluorescences 340nm/380nm indique une entrée intracellulaire d'ions calcium.

4.4.2 Analyse des enregistrements d'imagerie calcique

Deux enregistrements successifs d'imagerie calcique effectués sur deux neurobiohybrides IMACA au cours d'une même campagne de mesure sont présentés ci-après. Pour chaque enregistrement, un champ d'observation est choisi après repérage sous microscope à fluorescence des corps cellulaires des neurones présents ; ils sont

délimités manuellement par l'intermédiaire du logiciel d'enregistrement. L'acquisition des signaux débute par un enregistrement du niveau basal de fluorescence pendant 120 secondes. Ce niveau basal correspond au bruit de fond observé aux deux longueurs d'ondes d'excitation. Il est automatiquement soustrait aux enregistrements. Cela permet d'augmenter le ratio signal à bruit et de limiter les artéfacts dus à la luminosité ambiante. Après cet enregistrement du niveau basal, les neurones sont excités par les stimulations électriques biomimétiques (Chapitre 2, §2.5.2, Figure 2-9) de fréquence constante et fixée à 100Hz, fréquence cohérente avec l'étude de littérature présentée au Chapitre 2, §2.5.1. Le nombre, l'amplitude, la durée et le temps de repos entre deux stimulations sont différents pour chaque enregistrement.

Un premier enregistrement de 163 évènements est présenté sur la Figure 4-15. Les paramètres d'enregistrement et de stimulation sont donnés dans le Tableau 4-2. Dans le but d'apporter la preuve de notre capacité à exciter des neurones vivants par une stimulation électrique artificielle biomimétique, les neurones vivants ont été stimulés par des signaux biomimétiques d'amplitudes croissantes de 0,25V à 2V. Cette amplitude de départ se situe dans la gamme des amplitudes nécessaires à l'excitation des neurones telles qu'étudiées dans le modèle de membrane neuronale interfacée avec une électrode (Chapitre 2, Tableau 2-11) et l'amplitude de 2V correspond à l'amplitude des signaux d'excitation utilisés dans la DBS (Chapitre 2, §2.5.1). L'enregistrement du ratio des fluorescences 340nm/380nm pour chaque évènement est donné sur la Figure 4-15-A. Cette représentation globale permet de repérer les évènements indésirables pouvant avoir eu lieu pendant l'enregistrement, par exemple un corps flottant traversant le champ ou une cellule isolée mourant pendant les enregistrements. De tels évènements sont visibles pendant l'enregistrement. Ils sont répertoriés puis exclus des analyses. La courbe verte dont la pente augmente brutalement après 850s d'enregistrement correspond à une cellule morte qui s'est détachée des électrodes (Figure 4-15-A). L'enregistrement de cet évènement n'est pas pertinent et a donc été exclu. La Figure 4-15-B présente une moyenne du ratio 340nm/380nm. Les tracés pointillés verticaux correspondent aux stimulations électriques. Ils permettent de corréliser ces stimulations avec leur effet sur les neurones vivants. L'augmentation du ratio 340nm/380nm correspond à une entrée de calcium dans les neurones vivants, laquelle traduit l'existence de potentiels d'actions dans ces derniers. La corrélation entre l'application d'une stimulation électrique aux neurones vivants et une augmentation du ratio 340nm/380nm, le maintien de cette augmentation sur la durée de la stimulation, suivie de la baisse du ratio concomitante à son arrêt permet d'affirmer que les neurones vivants répondent à l'excitation en émettant des potentiels d'action.

Une première excitation électrique biomimétique de 1,5V d'amplitude a déclenché un potentiel d'action (Figure 4-15-B & Tableau 4-2). Chaque stimulation suivante d'amplitude égale ou supérieure (1,5V, 1,75V et 2V) entraîne une réponse qui se cumule avec la précédente. Nous observons alors un effet cliquet. Entre les

excitations, le ratio 340nm/380nm ne redescend jamais à son niveau de base. L'ensemble des excitations électriques imposées aux neurones vivants ont pu provoquer une électroporation, entraînant des fuites d'ions calcium du milieu externe vers l'intérieur des neurones. Nous n'avons pas étudié plus en détail cette hypothèse. Cet enregistrement permet toutefois d'établir un seuil de tension d'excitation à 1,5V pour une stimulation biomimétique à une fréquence de 100Hz. Les neurones vivants issus de cellules PC-12 différenciées peuvent donc, dans nos conditions de culture et de réalisation des neurobiohybrides, répondre à plusieurs excitations électriques biomimétiques successives par couplage capacitif.

Amplitude de l'excitation [V]	Durée de l'excitation [s]	Durée de repos [s]	Réponse des neurones
0,25	15	60	Non
0,5	15	60	Non
0,75	15	60	Non
1	15	60	Non
1,25	15	60	Non
1,5	15	120	Oui
1,25	60	60	Oui
1,5	18	120	Oui
1,5	60	120	Oui
1,75	60	60	Oui
2	120	120	Oui

Tableau 4-2 : Paramètres des stimulations électriques de l'étude par imagerie calcique de la réponse des neurones vivants cultivés dans les neurobiohybrides IMACA à des stimulations électriques biomimétiques

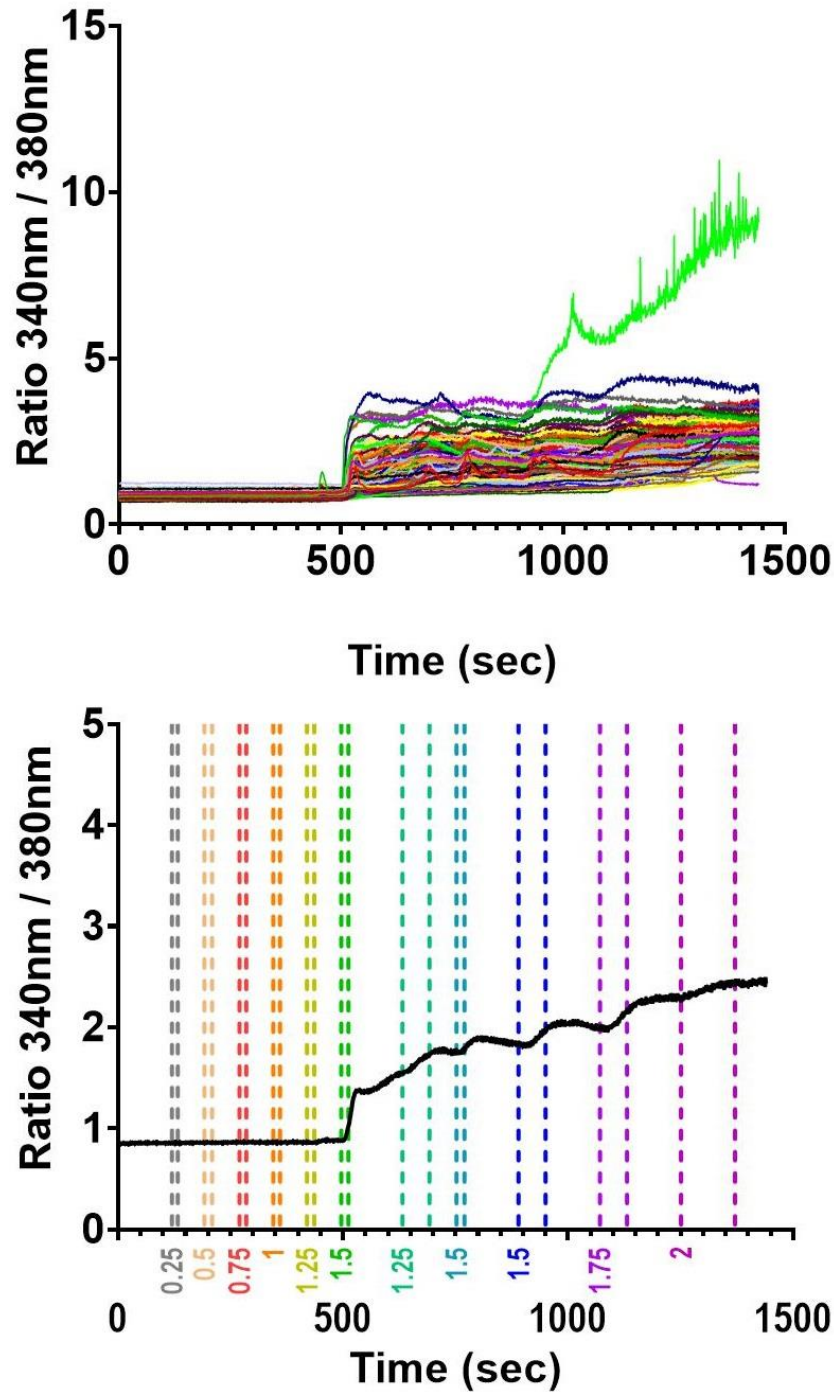


Figure 4-15 : Etude par imagerie calcique de la réponse des neurones vivants cultivés dans les neurobiohybrides IMACA à des stimulations électriques biomimétiques

A : Enregistrement du ratio des fluorescences 340nm/380nm sur 163 évènements distincts. La courbe verte dont la pente augmente brusquement à partir de 850s correspondant à un neurone mort pendant l'enregistrement. **B :** moyenne du ratio. Les tracés pointillés verticaux correspondent aux stimulations électriques.

Les neurones ont été stimulés avec des signaux électriques biomimétiques d'amplitude croissante, de 0,25V à 2V. Une réponse des cellules est enregistrée pour une chaque stimulation d'amplitude égale ou supérieure à 1,5V. Cet enregistrement permet d'établir la preuve de la capacité des neurones vivants à être stimulés par des signaux électriques biomimétiques.

Un deuxième enregistrement de 142 évènements a été conduit sur un neurobiohybride distinct afin d'explorer les mécanismes d'action permettant la génération de potentiels d'actions par les neurones issus de cellules PC-12. Lors de ce deuxième enregistrement, les neurones sont également excités par des spikes biomimétiques puis de la TTX est ajouté à la solution externe (Alomone Labs, réf. T-550, lot. T550Tx391f, 1 μ M en concentration finale). Il est attendu que les neurones répondent lors des premières stimulations, puis que la TTX bloque les canaux sodiques voltage-dépendants, entraînant un arrêt de la réponse des neurones aux stimulations. La Figure 4-16-A représente l'enregistrement du ratio des fluorescences 340nm/380nm pour chaque évènement. La Figure 4-16-B représente la moyenne de ces ratios. Les tracés pointillés verticaux correspondent aux stimulations électriques et à l'ajout de TTX. Les neurones sont excités par une stimulation d'amplitude 3V et d'une durée de 135s. Le ratio augmente après le début de la stimulation, indiquant une réponse des neurones vivants. Puis 30s après le début de cette stimulation, la TTX est ajoutée au milieu externe. Lors de l'adjonction de TTX, un pic est observé sur la courbe représentant la moyenne des ratios 340nm/380nm (Figure 4-16, 150s). Ce pic est un artefact lié à la goutte de TTX qui tombe dans le milieu externe et ne correspond pas à une réponse des neurones. Comme cela été attendu, simultanément à l'adjonction de TTX, la moyenne des ratios arrête d'augmenter et se stabilise pour le reste de la durée de la stimulation. Ce résultat indique que la TTX interrompt l'émission de potentiels d'actions.

Il est intéressant de comparer les résultats obtenus lors des deux enregistrements d'imagerie calcique. La courbe des ratios issus du premier enregistrement (Figure 4-15-B) montre clairement un effet cliquet lié aux stimulations successives. A chaque excitation des neurones, leur réponse se cumule à la précédente. Au contraire, la Figure 4-16-B montre qu'en présence de TTX, cet effet cumulatif est annihilé. Ainsi, les réponses des neurones obtenus à partir de cellules PC-12 différenciées dans des neurobiohybrides après 14 jours d'exposition au NGF (50ng/ml) sont bien inhibées par la TTX, confirmant l'implication de canaux sodiques voltage-dépendant dans le mécanisme de génération des potentiels d'action par ces neurones (Figure 4-16) comme précédemment étudiés (Figure 4-8). Ces observations sont cohérentes avec celles de Yang et al., (2011) qui ont démontré la présence de canaux sodiques voltage-dépendants dans les cellules PC12 après 9 jours de différenciation par le NGF.

Excitation : - Electrique : amplitude [V] - Chimique : réactif	Durée de l'excitation [s]	Durée de repos [s]	Réponse des neurones	Commentaire
3	135	310	Oui	
TTX	N/A	N/A	Non	Ajout de TTX 30s après le début de la stimulation

Tableau 4-3 : Paramètres des stimulations électriques de l'étude par imagerie calcique de l'implication des canaux sodiques voltage-dépendants dans le mécanisme de génération des potentiels d'actions par les neurones catécholaminergiques issus de PC-12 différenciées

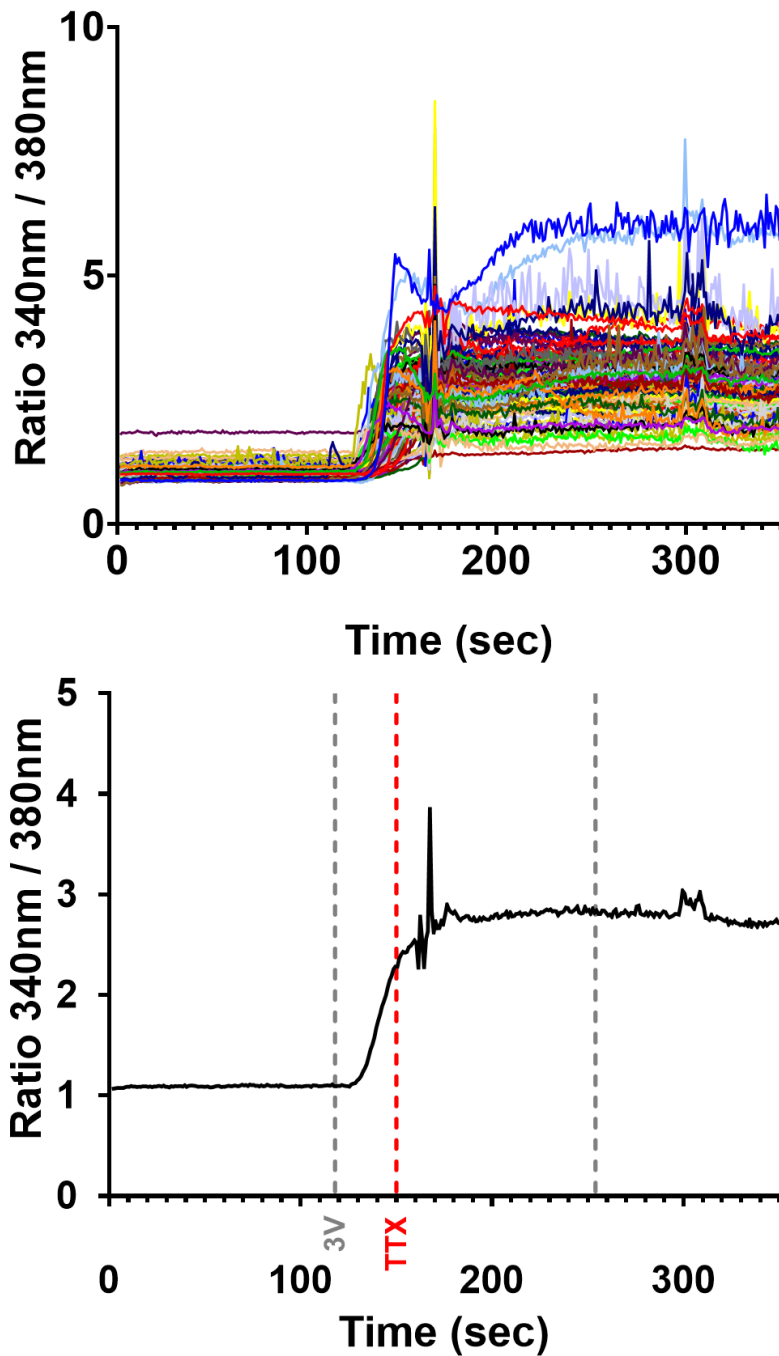


Figure 4-16 : Etude par imagerie calcique de l'implication des canaux sodiques voltage-dépendants dans le mécanisme de génération des potentiels d'actions par les neurones catécholaminergiques issus de PC-12 différenciés

A : Enregistrement du ratio des fluorescences 340nm/380nm pour 142 évènements distincts. **B :** moyenne du ratio pour l'ensemble des évènements enregistrés. Les tracés pointillés verticaux correspondent à la stimulation électrique et à l'ajout de TTX.

Les neurones ont été stimulés avec un signal électrique biomimétique de 3V d'amplitude. Pendant cette stimulation, de la TTX a été ajoutée à la solution d'imagerie calcique, bloquant la réponse des neurones. La réponse des neurones à une stimulation biomimétique par la suite inhibée avec de la TTX démontre l'implication de canaux sodiques voltage-dépendants dans le mécanisme de génération des potentiels d'action dans ces neurones issus de cellules PC-12 différenciées.

4.5 Conclusion et perspectives

4.5.1 Preuve de concept de la capacité des neurones vivants à être excités par des signaux électriques biomimétiques

L'objectif de cette partie de mon travail de thèse était d'établir la preuve de concept de la capacité de neurones vivants interfacés avec une électrode métallique planaire recouverte de PDL et de collagène à répondre à des signaux électriques biomimétiques. Les neurones vivants issus de cellules PC-12 différenciées directement dans les neurobiohybrides permettent d'apporter cette première preuve de concept. En effet, dans nos conditions de culture, ces neurones vivants sont bien électriquement actifs et présentent les caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques décrites dans la littérature (Dichter *et al.*, 1977; Hu *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2011; Zhong *et al.*, 2019). Nous avons par ailleurs établi que, dans nos conditions de culture, les neurones vivants dérivés de cellules PC-12 après exposition au NGF répondent à des stimulations électriques en émettant des potentiels d'action d'une amplitude de 30mV à 40mV. De plus, nos études d'imagerie calcique ont montré que ces neurones vivants répondent bien aux stimulations électriques biomimétiques avec une tension de seuil de 1,5V. Ces enregistrements établissent donc la capacité de ces neurones vivants à être excités par des signaux électriques biomimétiques.

4.5.2 Vecteurs d'amélioration et perspectives

4.5.2.1 Compléter les études sur les signaux d'excitation à l'aide d'enregistrements par imagerie calcique

Les résultats présentés en imagerie calcique obtenus en stimulant les neurones vivants par des signaux électriques biomimétiques appliqués à une fréquence de 100Hz représentent une première étape importante dans le travail initié avec cette thèse. La tension de seuil de stimulation observée, de 1,5V, est cohérente avec les stimulations utilisées dans le cadre de la DBS, mais elle s'avère très supérieure aux tensions utilisées dans le cadre du modèle de neurone interfacé avec une électrode, qui étaient de 0,45V (cf. Chapitre 2, §2.5.1). Ce point doit être exploré en mettant en place une étude comparative de la réponse des neurones vivants aux différentes formes de signaux d'excitation présentés dans le Chapitre 2, Figure 2-9 (créneaux, pulses biphasiques, spikes biomimétiques). Ce travail doit permettre de converger vers un modèle prédictif en caractérisant au mieux toutes les interfaces et en développant les designs adaptés pour les neurobiohybrides. Outre la forme des signaux, il conviendra également d'étudier l'impact de la fréquence des signaux et les seuils de déclenchement en amplitude. Nous avons vu dans le Chapitre 2, §2.6.3.3, que les neurones artificiels, à l'instar des neurones vivants, sont capables d'intégrer les signaux d'excitation. Plutôt que d'exciter les neurones par une stimulation unique d'amplitude élevée, il apparaît

possible d'exciter les neurones avec un train de stimulations plus rapide et des amplitudes plus faibles. Une piste de recherche consistera à voir si tel est le cas. Une amplitude plus faible serait intéressante sur le plan énergétique et sur le plan thérapeutique avec un risque amoindri d'endommager les tissus vivants.

4.5.2.2 Compléter l'étude sur d'autres types de neurones vivants

L'étude de la stimulation de neurones vivants par des signaux électriques biomimétiques décrite au cours de ce travail de thèse porte uniquement sur les neurones vivants issus de la différenciation par exposition au NGF de cellules PC-12. Une étude complémentaire utilisant un autre type cellulaire permettra d'éliminer tout biais lié à la lignée cellulaire utilisée. Une telle étude pourra ainsi confirmer et renforcer le niveau de preuve des résultats déjà obtenus. Il serait ensuite envisageable d'utiliser des cellules issues de culture primaire, voire des tranches de cerveau, ou encore des organoïdes tridimensionnels reproduisant la physiologie du cerveau humain, afin de faire évoluer les neurobiohybrides proposés vers de futures applications thérapeutiques pour la médecine humaine.

4.5.2.3 Perspectives

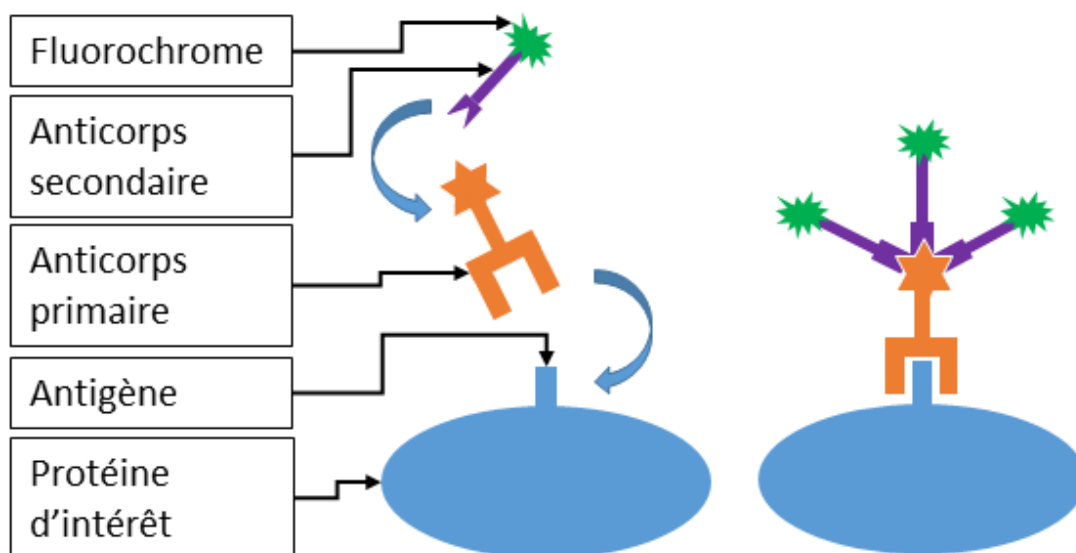
En parallèle des travaux présentés dans ce manuscrit, j'ai contribué au développement d'un banc expérimental innovant permettant d'interfacer un réseau de neurones vivants et un neurone artificiel. Le neurone artificiel émet en effet un signal biomimétique capable d'exciter les neurones vivants, ainsi que nous l'avons établi supra (Chapitre 4, §4.4.2). Simultanément, les potentiels d'action émis par les neurones vivants sont enregistrés. En parallèle de cet enregistrement, l'activité électrique des neurones est surveillée par un système de détection des flux de calcium, issu de l'imagerie calcique non ratiométrique. Cette double acquisition permet de s'assurer que les signaux enregistrés sont pertinents et qu'il ne s'agit pas d'artéfacts de mesure. Les potentiels d'actions enregistrés par patch-clamp sur les neurones vivants issus de cellules PC-12 étant de faible amplitude (30mV à 40mV, Figure 4-4) l'utilisation d'une nouvelle lignée cellulaire produisant des potentiels d'action d'amplitude plus élevée permettrait de faciliter l'utilisation de ce banc de caractérisation expérimental. Il permettra d'établir la boucle de communication « neurone artificiel-neurone vivant-neurone artificiel ».

Enfin, la boucle de communication sera exploitée dans le cadre médical visé *in fine* par les recherches présentées dans ce manuscrit. Cette boucle est le point central autour duquel pourra être développée une nouvelle génération de neuroprothèses intégrant des réseaux de neurones artificiels. Ces neuroprothèses visent à dialoguer en temps réel avec les réseaux de neurones vivants constituant les organes dans lesquels elles seront implantées. Ce dialogue permettra de renseigner sur l'état de l'organe dans le cas d'une maladie évolutive (Maladie de Parkinson, dégénérescence maculaire liée à l'âge). Ensuite, elles pourront s'adapter à l'état du patient et l'évolution de la maladie

pour moduler et ajuster le traitement en temps réel aux conditions de l'organe et du patient.

4.6 Annexe 1 : Caractérisation morphologique des cellules PC-12 différenciées par immunocytochimie

L'immunocytochimie est une technique classique de biologie cellulaire permettant de visualiser *in situ* une ou plusieurs protéine(s) d'intérêt dans une cellule ou un tapis cellulaire en culture. Pour cela, après fixation des cellules, perméabilisation de leurs membranes et saturation des sites de liaison non spécifiques, les cellules sont mises en présence d'un (ou plusieurs) anticorps primaire(s) spécifique(s) de la protéine d'intérêt. Ensuite, après rinçages, elles sont mises en présence d'un anticorps secondaire spécifiquement dirigé contre le (les) anticorps primaire(s) et lié(s) à un fluorochrome. Une fois marquées, les cellules sont illuminées dans le spectre d'absorption du fluorochrome, qui réémet cette lumière dans son spectre d'émission, à une longueur d'onde plus élevée. Une observation sous microscope de cette lumière fluorescente permet de localiser la protéine d'intérêt dans la cellule. Une illustration de cette technique d'immunocytochimie est présentée sur la figure ci-dessous.

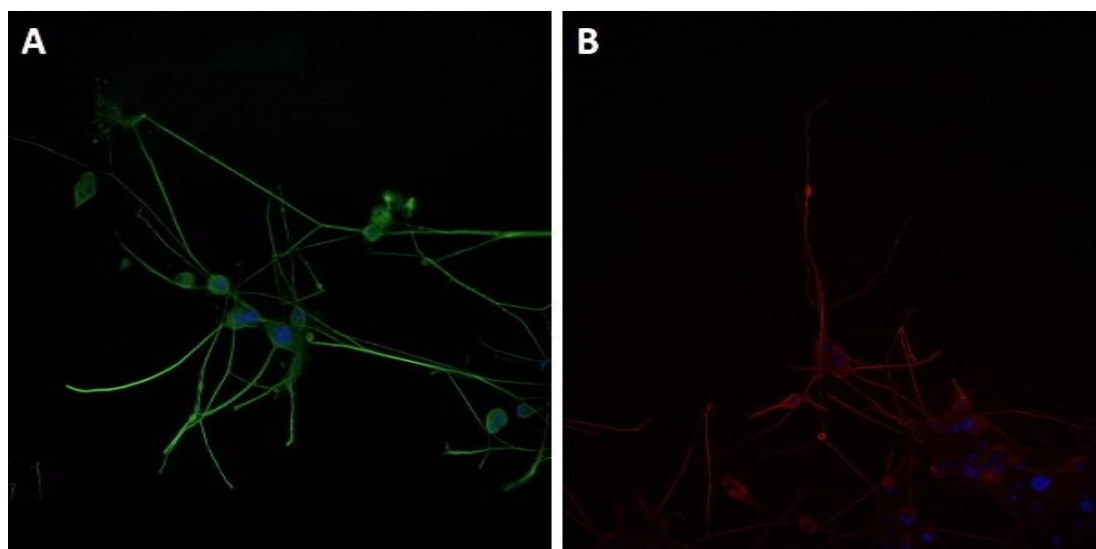


Principe de l'immunocytochimie

Technique de marquage utilisant des anticorps et des fluorochromes pour marquer une (ou plusieurs) protéine(s) dont la présence et/ou la concentration dans une cellule fait l'objet d'une étude. Une cellule est mise en présence d'un anticorps primaire spécifique d'une protéine visée ; cet anticorps primaire se fixe sur la protéine. La cellule est ensuite mise en présence d'un anticorps secondaire, lui-même lié à un fluorochrome. Cet anticorps secondaire présente une très forte affinité avec l'anticorps primaire et plusieurs molécules d'anticorps secondaires se fixent sur l'anticorps primaire. Une observation avec un microscope à fluorescence permet d'observer les fluorochromes et de déterminer si la protéine visée est présente ou non dans la cellule. Des études de morphologie cellulaire/ultracellulaire peuvent ainsi être menées.

Deux protéines nous ont permis d'observer l'acquisition d'un phénotype neuronal après exposition au NGF : la tubuline et la *microtubule-associated protein 2* [MAP-2]. La tubuline est une protéine ubiquitaire chez les eucaryotes. Il s'agit d'une composante structurale essentielle du cytosquelette. Cette protéine participe en effet à

l'assemblage des microtubules, permettant aux cellules de maintenir leur structure et aux neurones d'émettre leurs prolongements. Le marquage de cette protéine permet ainsi de visualiser le cytosquelette, donc de repérer les neurites en microscopie. La MAP-2 est une protéine spécifique des neurones matures (Benowitz & Routtenberg, 1997). Cette protéine lie plusieurs molécules de tubuline, créant des polymères stables. Ces polymères de tubuline permettent la croissance de structures longues, comme les neurites. Cette protéine est utilisée comme marqueur de la maturité physiologique des neurones (Sánchez *et al.*, 2000, Binder *et al.*, 1984). Un contre-marquage au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI), agent intercalant de l'ADN est également réalisé. La figure ci-dessous présente les résultats obtenus par immunocytochimie pratiquée sur des cellules PC-12 après 22 jours de différenciation. Le marquage de la tubuline permet d'observer la morphologie des cellules PC-12 différenciées (A). Le marquage MAP-2 à 22 jours d'exposition au NGF confirme la différenciation des cellules PC-12 en neurones matures sur le plan morphologique (B).



Marquage par immunocytochimie des protéines « tubuline » et « MAP-2 » du cytosquelette de neurones issus de cellules PC-12 après 22 jours de différenciation par le facteur de croissance nerveux (NGF).

A : Marquage par immunofluorescence de la tubuline (en vert). Le cytosquelette et les neurites sont bien visibles. **B :** Marquage par immunofluorescence de la MAP-2 (en rouge). Ce marquage permet de mettre en évidence la présence de MAP-2 dans le cytosquelette des PC-12 différenciées, confirmant l'acquisition d'un phénotype neuronal au cours de leur différenciation.

Un contremarquage de l'ADN est effectué avec du 4',6-diamidino-2-phénylindole [DAPI]. Le DAPI est un fluorochrome qui présente une forte affinité pour les bases adénine et thymine de l'ADN. Ce marquage de l'ADN permet de confirmer que l'objet observé est une cellule eucaryote, encore vivante au moment de sa fixation.

4.7 Annexe 2 : Tableau récapitulatif des paramètres et conditions de patch-clamp

Tableau récapitulatif des paramètres et conditions de patch-clamp des différentes études issues de la littérature et présentées dans le manuscrit et des expérimentations réalisées pendant les travaux de thèse.

Current-clamp			
	Hu <i>et al.</i> , 2018	Zhong <i>et al.</i> , 2019	Expérimentations réalisées pendant les travaux effectués
Milieu de culture	RPMI 1640 : 85%, Sérum de cheval : 10%, sérum de veau foetal 5%, pénicilline : 100u/ml, streptomycine 100µg/ml	RPMI 1640 : 85%, Sérum de cheval : 10%, sérum de veau foetal 5%, pénicilline : 100u/ml, streptomycine 100µg/ml	RPMI 1640 : 85%, Sérum de cheval : 10%, sérum de veau foetal 5%
Milieu de différenciation	Opti-MEM supplémenté avec NGF : 50ng/mL + 0,5% de sérum de veau foetal : 0,5% ou 1% de sérum de cheval 1% + sérum de veau foetal : 0,5%	RPMI 1640 : 85%, Sérum de cheval : 10%, sérum de veau foetal 5%, NGF 25ng/ml	RPMI 1640 : 98%, Sérum de cheval : 1%, sérum de veau foetal 5%, pénicilline : 100u/ml, streptomycine : 100µg/ml
Durée de différenciation	6 jours	Les cellules PC-12 différenciées sont décollées par trypsination puis réensemencées sur des coverslips coatis de poly-L-lysine 1 jour avant la mesure. La durée de différenciation n'est pas spécifiée.	14 jours
Solution externe	KCl : 140mM, NaCl : 5mM, CaCl ₂ : 5mM, MgCl ₂ : 1mM, HEPES : 10mM - pH ajusté à 7,3.	NaCl : 140mM, KCl : 5mM, CaCl ₂ : 1,8mM, MgCl ₂ : 1mM, glucose : 10mM - pH ajusté à 7,4 avec du NaOH	NaCl : 142mM, KCl : 5,6mM, MgCl ₂ : 1mM, HEPES : 10mM, glucose : 5,6mM, CaCl ₂ : 2mM, MgCl ₂ : 1mM - pH ajusté à 7,4 - osmolarité de la solution : 310mOsmol/L
solution interne	KCl : 140mM, NaCl : 5mM, CaCl ₂ : 1mM, HEPES : 10mM, EGTA : 5mM, Na-ATP : 2mM. - pH ajusté à 7,3.	apsartate de potassium : 110mM, KCl : 20mM, Na-phosphocréatine : 5mM, MgCl ₂ : 1mM, ATP-2Mg : 5mM, GTP-2Na : 0,1mM, K2-EGTA : 0,05mM, HEPES : 10mM - pA ajusté à 7,4 avec KOH	K-Gluconate : 130mM, NaCl : 10mM, HEPES : 10mM, MgCl ₂ : 1mM, EGTA : 1mM - pH ajusté à 7,2 - osmolarité de la solution : 290mOsmol/L
Potentiel de repos	N/A	V _{repos} = -65mV	V _{repos} = -38mV
Conditions de patch	Température : culture perfusée à 22°C - 24°C	Température : culture perfusée à 37°C Cellules hyperpolarisées en ajoutant de l'ivabradine : 10µmol/L dans le milieu de différenciation. Le potentiel de repos hyperpolarisé est V _{hyperpolarisé} = -71mV.	Température ambiante : 20°C Cellules hyperpolarisées par une courant négatif de -5pA, pour atteindre un potentiel de membrane V _{hyperpolarisé} = -70mV
Variation de courant imposé	-50pA ≤ I _{excitation} ≤ 90pA, pas de 10pA	intensité : 1,9nA durée : 50ms	10pA ≤ I _{excitation} ≤ 50pA, pas de 10pA durée des excitation : 50ms
Enregistrement d'un potentiel d'action	Potentiel d'action d'amplitude environ 30mV	Détection d'un potentiel d'action qualifié de "suspect" par les auteurs	Potentiel d'action d'amplitude environ 40mV

Voltage-clamp				
	Yang <i>et al.</i> , 2011	Streit et Lux, 1987	Zhong <i>et al.</i> , 2019	Expérimentations réalisées pendant les travaux effectués
Milieu de culture	DMEM : 85%, sérum de cheval : 10%, sérum de veau foetal inactivé par la chaleur : 5%, pénicilline : 100u/mL, streptomycine : 100µg/mL	DMEM : 85%, sérum de cheval : 10%, sérum de veau foetal : 5%	RPMI 1640 : 85%, Sérum de cheval : 10%, sérum de veau foetal 5%, pénicilline : 100u/mL, streptomycine 100µg/mL	RPMI 1640 : 85%, Sérum de cheval : 10%, sérum de veau foetal 5%
Milieu de différenciation	Milieu de Leibovitz (L15) supplémenté en NGF : 50ng/mL	Milieu de culture supplémenté en NGF : 450ng/mL	RPMI 1640 : 85%, Sérum de cheval : 10%, sérum de veau foetal 5%, NGF 25ng/mL	RPMI 1640 : 98%, Sérum de cheval : 1%, sérum de veau foetal 5%, pénicilline : 100u/mL, streptomycine : 100µg/mL
Durée de différenciation	9 jours	14 jours	14 jours	14 jours
Solution externe	NaCl : 140mM, KCl : 3mM, MgCl ₂ : 1mM, CaCl ₂ : 2mM, HEPES : 10mM, Glucose : 10mM - pH ajusté à 7,4	NaCl : 130mM, CaCl ₂ : 10mM, MgCl ₂ : 1mM, Hepes : 8mM, glucose : 10mM, TTX : 3e ⁻⁶ M ou NaCl : 105mM, CaCl ₂ : 20mM, MgSO ₄ : 1,5mM, Hepes : 5mM, glucose : 15mM, TTX : 3e ⁻⁶ M - pH ajusté à 7,35 avec du NaOH	D-(+)-glucose : 10mM, HEPES : 5mM, NaCl : 110mM, KCl : 25mM, CaCl ₂ : 1,8mM, MgCl ₂ : 1,2mM, MnCl ₂ : 2mM, CdCl ₂ : 0,2mM, 4-aminopyridine : 0,5mM - pH ajusté à 7,5 avec NaOH	NaCl : 142mM, KCl : 5,6mM, MgCl ₂ : 1mM, HEPES : 10mM, glucose : 5,6mM, CaCl ₂ : 2mM, MgCl ₂ : 1mM, chlorure de tétraéthylammonium : 10mM - pH ajusté à 7,4 - osmolarité de la solution : 310mOsmol/L
Solution interne	KCl : 140mM, MgCl ₂ : 2mM, HEPES : 10mM, EGTA : 10mM, Mg-ATP : 2mM - pH ajusté à 7,3	Methylglucamine : 110mM, TEA : 20mM, EGTA : 10mM, MgCl ₂ : 2mM, Hepes : 10mM, Glucose : 10mM, ATP : 5mM - pH est ajusté à 7,35 avec du HCl	K-L-aspartic acid : 130mM, MgCl ₂ : 2mM, ATP-2Na : 5mM, EGTA : 11mM, CaCl ₂ : 5mM, HEPES : 10mM - pA ajusté à 7,2 avec KOH	N-méthyl Glucamine-Gluconate : 30mM, NaCl : 10mM, HEPES : 10mM, MgCl ₂ : 1mM, EGTA : 1mM - pH ajusté à 7,2 - osmolarité de la solution : 290mOsmol/L
Potentiel de repos			V_repos = -65mV	V_repos = -38mV
Conditions de patch	Expérimentations réalisées en moins de 2h, à température ambiante (25 ± 2°C)	Expérimentations réalisées à température ambiante : 20°C Les mesures sont effectuées sur des cônes axonaux dissociés du corps cellulaire et de l'axone	Température : culture perfusée à 37°C	Température ambiante : 20°C Cellules hyperpolarisées par une courant négatif de -5pA, pour atteindre un potentiel de membrane V-hyperpolarisé = -70mV
Variation de potentiel imposé	-70mV ≤ V _{excitation} ≤ +60mV, pas de 10mV, durée de 250ms.	-40mV ≤ V _{excitation} ≤ +60mV, pas de 10mV, durée de 400ms.	Etude canaux Na ⁺ : -120mV ≤ V _{excitation} ≤ +70mV, pas de 10mV, durée de 50ms. Etude canaux K ⁺ : -60mV ≤ V _{excitation} ≤ +60mV, pas de 10mV, durée de 400ms.	-120mV ≤ V _{excitation} ≤ +50mV, pas de 10mV durée de 50ms.

Conclusions

<ul style="list-style-type: none"> - Courants entrants précoces inhibés par un utilisation conjointe de 4-AP et TEA-Cl ; courants potassiques - Courants sortants tradifs inhibés par l'utilisation de TTX ; courants sodiques 	<ul style="list-style-type: none"> - Courants sortants sodiques inhibés par de la TTX, systématiquement présente dans la solution externe - Courants entrants potassiques inhibés par du TEA, systématiquement présente dans la solution interne 	<ul style="list-style-type: none"> - Etude canaux Na⁺ : protocole de stimulation pour activer les canaux Na⁺ voltage-dépendants, en absence de bloqueur de canaux. Aucun courant entrant de Na⁺ n'est enregistré. - Etude canaux K⁺ : protocole de stimulation pour activer les canaux K⁺ voltage-dépendants, en absence de bloqueur de canaux. Un courant sortant de K⁺ est enregistré. 	<ul style="list-style-type: none"> - Stimulation en présence de TTX (bloqueur spécifique des canaux sodiques) : pas de potentiel d'action - Mécanisme d'action proposé : PA générés par l'ouverture de canaux sodiques voltage-dépendants
--	--	--	---

Chapitre 5

CONCLUSION

5.1 Conclusion générale

La performance énergétique dans le traitement de l'information est un des enjeux majeurs du 21^{ème} siècle. Tandis que la quantité de données produites à travers le monde augmente de manière exponentielle, le secteur des nouvelles technologies représente le troisième consommateur mondial d'électricité, derrière la Chine et les Etats-Unis. De plus, les limites des architectures actuelles de traitement de l'information, la limite de miniaturisation des transistors et les problèmes liés à la surchauffe des processeurs, se traduisent par la fin de la loi de Moore (Waldrop, 2016). Ces éléments de contexte soulignent la nécessité de trouver de nouvelles solutions pour le traitement de l'information présentant une meilleure efficacité énergétique. Dans ce sens, il est intéressant de s'inspirer du fonctionnement du cerveau humain, ce dernier présentant une architecture distribuée conçue autour de neurones et de réseaux de neurones. Cette architecture permet un traitement parallèle des informations et rend le cerveau capable d'apprentissage, tout en étant extrêmement économe en énergie. Il convient dès lors de s'orienter vers des systèmes reproduisant la biologie : les systèmes neuromorphiques.

L'objectif du groupe de recherche dans lequel j'ai effectué ma thèse est d'interfacer le monde des puces neuromorphiques avec celui des neurones vivants, ce qui permet notamment de développer de nouvelles solutions thérapeutiques pour pallier les dysfonctionnements cérébraux pathologiques comme les maladies neurodégénératives. Dans cette dynamique, l'objectif de ma thèse a été de développer une interface fonctionnelle permettant d'établir un dialogue entre des neurones vivants et des neurones artificiels. Cela s'inscrit dans la volonté de créer une boucle de communication bidirectionnelle entre des neurones vivants et des neurones artificiels. Pour cela, j'ai développé des actions dans le domaine de la simulation, de la fabrication et la caractérisation de dispositifs d'interface, et dans la croissance et la caractérisation de neurones vivants. Ce travail a débouché sur la création de dispositifs « neurobiohybrides » permettant de mettre en lumière une des parties de la boucle de communication, à savoir l'excitation des neurones vivants par un signal biomimétique. Cet axe de recherche a débuté au laboratoire de façon concomitante avec le démarrage de ma thèse, première contribution dans le domaine. Après le bilan des enjeux énoncés au début de cette conclusion et correspondant au chapitre 1 de ce manuscrit, j'ai travaillé sur les aspects modélisation de l'interface neurobiohybride.

Ainsi, le chapitre 2 a exposé la conception et le développement d'un modèle électrique de membrane neuronale interfacée avec une électrode métallique planaire qui tient compte au mieux de tous les éléments parasites (C_{I-EE} , R_{I-EE} , C_{I-MbE} et R_{seal} , cf. 0, §2.3). Le modèle de neurone artificiel capable de générer des signaux électriques biomimétiques a été développé dans le cadre du projet SPINE (Sourikopoulos *et al.*, 2017) et a fait l'objet du travail de la thèse présentée par Sara Hedayat (Hedayat, 2018).

Pendant mon travail de thèse, j'ai décliné ce modèle de neurone artificiel en un modèle paramétrique de membrane neuronale présentant une surface de membrane équivalente à celle d'une cellule PC-12. J'ai ensuite complété ce modèle paramétrique par une modélisation des éléments parasites liés à l'interface entre l'électrode et la membrane neuronale. Avant d'utiliser ce modèle dans une série de simulations, un ensemble d'indicateurs de référence permettant de déterminer si une réponse du modèle à une stimulation est réellement observée ou s'il s'agissait d'un artéfact de stimulation a été établi. Pour la suite de ce travail de thèse, ce sont les spikes biomimétiques issus du modèle électrique de neurone artificiel qui ont logiquement été utilisés comme signaux d'excitation des neurones vivants dans l'étape de modélisation. Cette forme de signal a été sélectionnée en cohérence avec les visées du projet. Pour compléter l'étude, deux autres signaux d'excitation ont été retenus après un travail d'analyse de la littérature. Les premiers sont des créneaux de tension utilisés *in vitro* pour exciter des neurones couplés à des microélectrodes et les seconds sont des pulses biphasiques *first-positive* utilisés *in vivo* dans le cadre de la DBS. Cette revue de littérature a également permis d'établir un ordre de grandeur des amplitudes et fréquences nécessaires à l'excitation des neurones vivants. Les fréquences des signaux utilisés en DBS se situent entre 90Hz et 200Hz. Les amplitudes de signaux permettant l'excitation de neurones cultivés sur des MEA se situent entre 5V et 1V tandis que l'amplitude des signaux utilisés en DBS se situe entre 1,5V et 2V. Les résultats de la campagne de simulation montrent d'une part que les trois formes de signaux sélectionnés sont capables d'exciter le modèle de membrane neuronale couplé à une électrode métallique, et d'autre part que ce modèle est capable d'intégrer les signaux d'excitation. Ainsi, 270mV sont nécessaires pour obtenir une réponse du modèle excité par des créneaux de tension, 365mV par des spikes biomimétiques et 425mV par des pulses biphasiques. Ces résultats sont encourageants et montrent qu'il est possible de stimuler des neurones vivants par des signaux biomimétiques tout en conservant des tensions d'excitation faibles. Enfin, l'utilisation de spikes biomimétiques et la démonstration de la possibilité de stimuler des neurones en utilisant l'intégration de signal s'inscrit dans la nécessité formulée par Akbar *et al.*, (2016) d'explorer des signaux de stimulation non conventionnels, par opposition aux créneaux et pulses biphasiques couramment utilisés.

Le chapitre 3 présente le travail de conception et de réalisation du système neurobiohybride permettant l'observation de la réponse de cellules neuronales à des excitations électriques biomimétiques. Ensuite, l'analyse de nos besoins et l'identification des contraintes imposées par les conditions de culture cellulaire nous ont conduits à définir un cahier des charges pour la conception, les matériaux et les orientations technologiques des neurobiohybrides et des électrodes. Suivant ce cahier des charges, le neurobiohybride est constitué d'un wafer de verre de 1000 μ m d'épaisseur et d'un puits de culture de PDMS moulé autour d'une boîte de pétri de 35mm de diamètre, permettant de conserver à peu de choses près les dimensions

classiques de verrerie de culture cellulaire. Les électrodes sont planaires et constituées d'une couche d'accroche de 10nm de titane recouverte d'une couche conductrice de 100nm d'or. Le travail de design a abouti à la conception de neurobiohybrides nommés « IMACA » présentant des électrodes constituées de faisceaux de 10 lignes longues de 5cm, larges de 10 μ m et reliées ensemble à chaque extrémité par un pad d'accès carré de 500 μ m de côté. Ces neurobiohybrides ont été réalisés en suivant le procédé que j'ai développé et optimisé tout au long de mon travail de thèse. Un nettoyage préliminaire au détergent permet d'éliminer les pollutions. Ensuite, une fonctionnalisation de la surface par plasma O₂ augmente l'adhésion de la résine sur le substrat. Après résinage, le *layout* des électrodes est transféré dans la résine par lithographie laser. Cette technique innovante sans masque offre une grande versatilité en permettant des modifications simples et rapides du motif à transférer selon l'évolution des besoins expérimentaux. Après métallisation, un *lift-off* permet de révéler les électrodes. Le substrat et le puits de culture sont assemblés par fonctionnalisation de surface effectuée par Corona sur le puits de PDMS et par plasma O₂ sur le substrat et les électrodes.

Considérant que la propagation d'un potentiel d'action au sein d'un neurone vivant aboutit à des variations de taux de calcium intracellulaires précédant la libération des neuromédiateurs dans la fente synaptique, préalable à toute communication au sein d'un réseau de neurones vivants, nous avons choisi d'utiliser l'imagerie calcique afin d'objectiver la réponse des neurones vivants à des stimulations électriques biomimétiques. Dans ces conditions expérimentales, les électrodes sont recouvertes d'un double *coating* de poly-D-lysine [PDL] et de collagène, et le puits de culture est rempli de milieu électrolytique permettant la survie des neurones. Avant d'utiliser les neurobiohybrides dans les expériences biologiques, il est apparu nécessaire de déterminer les propriétés électriques de cet ensemble « électrode – neurone vivant – électrolyte ». Une caractérisation expérimentale de l'interface entre une électrode IMACA recouverte de *coating* et le milieu de culture a montré que cet élément n'évolue pas comme une simple capacité. L'évolution de l'impédance de cette interface correspond en effet au comportement d'un élément à phase constante [CPE]. Le neurobiohybride IMACA n'étant pas adapté à la caractérisation de ce CPE, un dispositif spécifique a alors été conçu puis réalisé en suivant le procédé de fabrication développé pour les neurobiohybrides. Ce dispositif nommé LiInDi est constitué de lignes interdigitées longues de 5cm et espacées de 10 μ m à 200 μ m. Ce dispositif a été caractérisé et l'impédance du CPE a été déterminée sur ce dispositif LiInDi. Ainsi, les mesures obtenues ont permis d'approximer la capacité équivalente de l'interface entre une électrode recouverte de *coating* et le milieu électrolytique de culture cellulaire. Normalisée au cm², cette interface présente une capacité de 1,70.10⁻⁶ F/cm². Les propriétés capacitives de cette interface sont supérieures à celle d'une membrane neuronale, donc la capacité communément admise est de 1.10⁻⁶ F/cm² (*Massobrio et al.*, 2007). Cette condition est favorable à l'excitation capacitive de neurones vivants

au travers d'une électrode métallique planaire. Ces premiers résultats de caractérisation physique valident notre approche consistant à exciter un neurone vivant au travers d'une électrode métallique planaire. Ils sont venus compléter et affiner le modèle SPICE de membrane neuronale interfacée avec une électrode pour le rapprocher d'un modèle prédictif. Il faut toutefois noter quelques limites au travail effectué. En effet, la technique d'imagerie calcique ne permet pas de mesurer l'activité électrique à l'échelle d'un neurone unique. De plus, le neurobiohybride IMACA a été conçu pour stimuler un maximum de neurones et n'est pas adapté pour interfacier un seul neurone artificiel avec un neurone vivant unique. Enfin, l'enceinte thermostatée du banc d'imagerie calcique empêche l'installation du setup permettant d'alimenter un neurone artificiel et de l'interfacier avec un neurone vivant. Le banc d'imagerie calcique et le neurobiohybride IMACA ne sont donc pas adaptés pour mettre en évidence l'ensemble de la boucle de communication bidirectionnelle. Dès lors est apparu la nécessité de développer un banc permettant de mettre en évidence l'ensemble de cette boucle. J'ai donc contribué au développement de ce banc innovant permettant l'excitation et l'écoute simultanée d'un neurone vivant unique interfacé avec un neurone artificiel. Conjointement, j'ai participé au travail de l'équipe concernant l'élaboration d'un nouveau neurobiohybride visant à interfacier une électrode unique avec un seul neurone vivant. Deux voies de communications parallèles connectées à une seule électrode servant à la fois pour l'excitation et pour l'écoute permettent de réaliser la boucle de communication bidirectionnelle complète. L'excitation se fait sur la voie Tx et l'écoute sur la voie Rx. Le banc « électronique » comme le neurobiohybride sont nommés RxTx. Les électrodes sont des lignes métalliques de 10 μ m de large terminées par des disques de 20 μ m de diamètre prenant place au centre du neurobiohybride. Les électrodes sont recouvertes d'une couche de passivation constituée de nitrure de silicium. Cette couche est ouverte au niveau des disques terminaux, permettant alors d'interfacier un unique neurone avec l'électrode. Le banc électronique RxTx intègre deux technologies complémentaires d'acquisition du signal émis par les neurones vivants. En plus de l'enregistrement en temps réel du signal électrique émis par les neurones vivants, leur activité est monitorée simultanément par imagerie calcique. Cette double acquisition permet de s'assurer que les signaux enregistrés au travers de l'électrode sur la voie Rx sont pertinents et qu'il ne s'agit pas d'artéfacts de mesure.

Le chapitre 4 vise à apporter une preuve expérimentale de la capacité des signaux électriques biomimétiques à exciter des neurones vivants interfacés avec une électrode métallique planaire recouverte du *coating* adapté à la lignée de neurones étudiés. Nous avons en effet choisi les cellules PC-12 CRL-1721 pour établir cette preuve de concept. Ces cellules se différencient en neurones catécholaminergiques en présence de NGF, un type cellulaire proche des neurones dopaminergiques de la substance noire. Or la dégénérescence de ces neurones est à l'origine de la maladie de Parkinson dont l'amélioration de la prise en charge peut ultimement bénéficier des

retombées de notre projet. Ces cellules sont en outre bien caractérisées sur les plans morphologiques et électriques dans la littérature disponible et sont communément utilisées en neurosciences. Enfin, il s'agit d'une lignée établie, assurant la bonne reproductibilité des résultats obtenus. Les cellules PC-12 ont été cultivées et différenciées directement dans les neurobiohybrides IMACA dont les électrodes ont été préalablement recouvertes du double *coating* de PDL et de collagène. Après avoir vérifié que les cellules PC-12 différenciées dans nos conditions de culture développent bien un phénotype neuronal et sont électriquement actives nous avons apporté la preuve de notre capacité à exciter ces neurones catécholaminergiques par une stimulation électrique biomimétique. Ces neurones vivants ont ainsi été excités par un signal électrique biomimétique de fréquence constante fixée à 100Hz. A cette fréquence spécifique (fréquence moyenne utilisée en DBS d'après la littérature (Z. Wang *et al.*, (2018), Eusebio *et al.*, (2011) et Little & Brown, (2012), Akbar *et al.*, (2016)), une réponse des neurones vivants a bien été enregistrée pour chaque stimulation d'amplitude égale ou supérieure à 1,5V. Ces résultats apportent ainsi une preuve expérimentale de la capacité de signaux électriques biomimétiques à exciter des neurones vivants issus de cellules PC-12 différenciées par 14 jours d'exposition au NGF.

Pour conclure, cette thèse est un travail fortement transdisciplinaire de par sa nature à l'interface entre l'électronique, les bio-MEMS et les neurosciences. Il a en effet nécessité la modélisation électrique d'un neurone vivant interfacé avec une électrode métallique, la conception et la réalisation de dispositifs neurobiohybrides permettant la culture et la différenciation de neurones vivants et leur excitation par des signaux électriques biomimétiques. Cette importante interdisciplinarité a rendu ce travail très riche et enthousiasmant mais a également été source de difficultés, notamment dues à la nécessité de comprendre les notions indispensables dans de multiples domaines et de créer des ponts entre ces domaines.

Enfin, la finalité du projet présenté dans ce manuscrit s'oriente vers la création de neuroprothèses permettant d'améliorer la prise en charge de déficits du fonctionnement neuronal dans des contextes pathologiques humains comme les maladies neurodégénératives ou la dégénérescence maculaire liée à l'âge. De telles neuroprothèses devront être construites autour de réseaux de neurones artificiels biomimétiques, leur conférant une capacité à s'adapter en temps réel aux fluctuations de l'activité des neurones sains survivants ainsi qu'à l'évolution de la maladie. Pour concevoir et réaliser de telles neuroprothèses, il apparaît nécessaire de développer un apprentissage *in-situ* et en temps réel. Pour cela, il est impératif d'établir une communication bidirectionnelle en temps réel et sans conversion de signal entre les neurones vivants et les neurones artificiels qui constitueront ces prothèses. Par ailleurs, la conception de nouveaux neurobiohybrides sur substrats souples permettrait d'améliorer la biocompatibilité de ces neuroprothèses. Ainsi, deux thèses s'inscrivent

dans la continuité des travaux présentés et visant à atteindre ces objectifs ont débuté. Une première thèse réalisée Mr. Nathan Schoonjans vise à développer le banc RxTx et établir la boucle complète de communication bidirectionnelle. Une seconde thèse menée par Mme. Chakrya-Anna Chhuon, s'oriente vers l'étude de la conformabilité des implants neuronaux et leur autonomie énergétique.

5.2 Communications

5.2.1 Diffusion de la connaissance dans les milieux socio-économique et scientifique

Programme d'échanges universitaires internationaux Lavergne, R., Henniquau, D., Yous, I., Hoel, V. Magazine radiophonique « Campus Lille - Infos », Radio Campus, 19 octobre 2016. http://www.ondesdechine.fr/CampusLilleInfos_2016-2017.html

5.2.2 Rapports de contrat

Digital system for human knowledge. Henniquau, D., Kassi, R., Avramovic, V., Delcroix, D., Cappy, A., Vlandas, A., Vanbesien, C., Hoel, V. Rapport mi-parcours projet DiSyKnow, contrat R-PILOTE-013-DiSyKnow, lauréat du dispositif *projets pilotes*, Isite Université Lille Nord-Europe (ULNE), mars 2021

INTERfaCe neurObiohybride pour la communication bidirectionnelle entre des neurones artificiels et des neurones vivants. Henniquau, D., Kassi, R., Avramovic, V., Delcroix, D., Cappy, A., Vlandas, A., Vanbesien, C., Hoel, V. Rapport bilan fin de parcours projet Interconnect, contrat CNRS Innovation, octobre 2020

INTERfaCe neurObiohybride pour la communication bidirectionnelle entre des neurones artificiels et des neurones vivants. Henniquau, D., Kassi, R., Avramovic, V., Delcroix, D., Cappy, A., Vlandas, A., Vanbesien, C., Hoel, V. Rapport bilan mi-parcours projet Interconnect, contrat CNRS Innovation, septembre 2019

5.2.3 Communications nationales avec actes

Système de vision neuro-inspirée: application à la vision artificielle Henniquau, D., Falez, P., Devienne, P., Vanbesien-Mailliot, C., Vlandas, A., Cappy, A., Hoel, V. Actes du 14ème Colloque Enseignement des Technologies et des Sciences de l'Information et des Systèmes, CETSIS 2021, Valenciennes, France, 8-10 juin, 2021, 197-202, Entièrement virtuel

5.3 Déclaration d'invention

Les résultats issus de ces recherches font l'objet de la déclaration d'invention n°M0524, déposée à la SATTNORD le 1^{er} Septembre 2020 par Virginie Hoel, Christel Vanbesien-Mailliot, Alexis Vlandas et Dimitri Henniquau.

5.4 Articles dans une revue internationale avec comité de lecture

5.4.1 En cours de rédaction

“Fully analog energy-efficient neurobiohybrid loop model towards real time bidirectional communication between living and artificial biomimetic neurons”. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. Redaction in progress, To be submitted 2022.

"Neurobiohybrids: next generation tools for realistic bidirectional communication between artificial and living neurons". *Frontiers in neuroscience*. Redaction in progress, To be submitted 2022.

5.5 Références

Akbar, U., Raike, R. S., Hack, N., Hess, C. W., Skinner, J., Martinez-Ramirez, D., DeJesus, S., & Okun, M. S. (2016). Randomized, Blinded Pilot Testing of Nonconventional Stimulation Patterns and Shapes in Parkinson's Disease and Essential Tremor : Evidence for Further Evaluating Narrow and Biphasic Pulses. *Neuromodulation*, *19*(4), 343-356. <https://doi.org/10.1111/ner.12397>

Ambroise, M., Buccelli, S., Grassia, F., Pirog, A., Bornat, Y., Chiappalone, M., & Levi, T. (2017). Biomimetic neural network for modifying biological dynamics during hybrid experiments. *Artificial Life and Robotics*, *22*(3), 398-403. <https://doi.org/10.1007/s10015-017-0366-1>

Armstrong, C. M. (2006). Na channel inactivation from open and closed states. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(47), 17991-17996. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607603103>

Azevedo, F. A. C., Carvalho, L. R. B., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E. L., Leite, R. E. P., Filho, W. J., Lent, R., & Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *Journal of Comparative Neurology*, *513*(5), 532-541. <https://doi.org/10.1002/cne.21974>

Ballini, M., Müller, J., Livi, P., Chen, Y., Frey, U., Stettler, A., Shadmani, A., Viswam, V., Jones, I. L., Jäckel, D., Radivojevic, M., Lewandowska, M. K., Gong, W., Fiscella, M., Bakkum, D. J., Heer, F., & Hierlemann, A. (2014). A 1024-Channel CMOS Microelectrode Array With 26,400 Electrodes for Recording and Stimulation of Electrogenic Cells In Vitro. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, *49*(11), 2705-2719. <https://doi.org/10.1109/JSSC.2014.2359219>

Barreto-Chang, O. L., & Dolmetsch, R. E. (2009). Calcium Imaging of Cortical Neurons using Fura-2 AM. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *23*, 1067. <https://doi.org/10.3791/1067>

Barros, C. S., Franco, S. J., & Müller, U. (2011). Extracellular Matrix : Functions in the Nervous System. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005108>

Benowitz, L. I., & Routtenberg, A. (1997). GAP-43 : An intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends in Neurosciences*, *20*(2), 84-91. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)10072-2](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)10072-2)

Bernard, C. (1865). *INTRODUCTION À L'ÉTUDE DE LA MÉDECINE EXPÉRIMENTALE* (J.B. Baillière&Fils). https://www.irphe.fr/~clanet/otherpaperfile/articles/Bernard/bernard_introduction_etude_medicine_experimentale.pdf

Binder, L. I., Frankfurter, A., Kim, H., Caceres, A., Payne, M. R., & Rebhun, L. I. (1984). Heterogeneity of microtubule-associated protein 2 during rat brain development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(17), 5613-5617.

- Borkholder, D. (1998). *Cell Based Biosensors Using Microelectrodes*.
- Braun, D., & Fromherz, P. (1998). Fluorescence Interferometry of Neuronal Cell Adhesion on Microstructured Silicon. *Physical Review Letters*, 81(23), 5241-5244. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.81.5241>
- Buccelli, S., Bornat, Y., Colombi, I., Ambroise, M., Martines, L., Pasquale, V., Bisio, M., Tessadori, J., Nowak, P., Grassia, F., Aversa, A., Tedesco, M., Bonifazi, P., Difato, F., Massobrio, P., Levi, T., & Chiappalone, M. (2019). A Neuromorphic Prosthesis to Restore Communication in Neuronal Networks. *IScience*, 19, 402-414. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.07.046>
- Buitenweg, J., Rutten, W., & Marani, E. (2000). Finite element modeling of the neuro-electrode interface. *Engineering in Medicine and Biology Magazine, IEEE*, 19, 46-52. <https://doi.org/10.1109/51.887245>
- Cailloce, L. (2018, mai 16). *Numérique : Le grand gâchis énergétique*. CNRS Le journal. <https://lejournal.cnrs.fr/articles/numerique-le-grand-gachis-energetique>
- Canon, F. (2016, février). *Physiologie des systèmes intégrés, les principes et fonctions—Potential d'action*. http://ressources.unisciel.fr/physiologie/co/Physiologie_web.html. http://ressources.unisciel.fr/physiologie/co/grain3b_1.html
- Cascione, M., De Matteis, V., Leporatti, S., & Rinaldi, R. (2020). The New Frontiers in Neurodegenerative Diseases Treatment: Liposomal-Based Strategies. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.566767>
- Cauwenberghs, G. (2013). Reverse engineering the cognitive brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(39), 15512-15513. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313114110>
- Cavin, R., Zhirnov, V., & Shankar, S. (2008, août). *Computation vis-à-vis Physics : A Framework*. <https://www.src.org/calendar/e003362/p4-presentation-cavin.pdf>
- Choi, C., & You, S.-J. (2012). Finite Element Models of Neuron Electrode Sealing Interfaces. *IEEE Transactions on Magnetics - IEEE TRANS MAGN*, 48, 643-646. <https://doi.org/10.1109/TMAG.2011.2175717>
- Cook, G., Lee, J., Tsai, T., Kong, A., Deans, J., Johnson, B., & Jardim, E. (2017). *Clicking clean: Who is winning the race to build a green internet?* Greenpeace Inc. <https://www.greenpeace.org/usa/global-warming/click-clean/#top>
- Dichter, M. A., Tischler, A. S., & Greene, L. A. (1977). Nerve growth factor-induced increase in electrical excitability and acetylcholine sensitivity of a rat pheochromocytoma cell line. *Nature*, 268(5620), 501-504. <https://doi.org/10.1038/268501a0>
- Eusebio, A., Thevathasan, W., Doyle Gaynor, L., Pogosyan, A., Bye, E., Foltynie, T., Zrinzo, L., Ashkan, K., Aziz, T., & Brown, P. (2011). Deep brain stimulation can suppress pathological synchronisation in parkinsonian patients. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 82(5), 569-573. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2010.217489>

Franks, W., Schenker, I., Schmutz, P., & Hierlemann, A. (2005). Impedance characterization and modeling of electrodes for biomedical applications. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 52(7), 1295-1302. <https://doi.org/10.1109/TBME.2005.847523>

Frey, U., Sedivy, J., Heer, F., Pedron, R., Ballini, M., Mueller, J., Bakkum, D., Hafizovic, S., Faraci, F. D., Greve, F., Kirstein, K., & Hierlemann, A. (2010). Switch-Matrix-Based High-Density Microelectrode Array in CMOS Technology. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, 45(2), 467-482. <https://doi.org/10.1109/JSSC.2009.2035196>

Grassia, F., Buhry, L., Lévi, T., Tomas, J., Destexhe, A., & Saïghi, S. (2011). Tunable Neuromimetic Integrated System for Emulating Cortical Neuron Models. *Frontiers in Neuroscience*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00134>

Greene, L. A., & Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(7), 2424-2428.

Hai, A., Shappir, J., & Spira, M. E. (2010). Long-Term, Multisite, Parallel, In-Cell Recording and Stimulation by an Array of Extracellular Microelectrodes. *Journal of Neurophysiology*, 104(1), 559-568. <https://doi.org/10.1152/jn.00265.2010>

Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv*, 391(2), 85-100. <https://doi.org/10.1007/BF00656997>

Hedayat, S. (2018). *Conception et fabrication de neurones artificiels pour le traitement bioinspiré de l'information* [These de doctorat, Lille]. <https://www.theses.fr/2018LILUI039>

Hierlemann, A. (2017). Direct interfacing of neurons to highly integrated microsystems. *2017 IEEE 30th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)*, 199-204. <https://doi.org/10.1109/MEMSYS.2017.7863375>

Hu, R., Cao, Q., Sun, Z., Chen, J., Zheng, Q., & Xiao, F. (2018). A novel method of neural differentiation of PC12 cells by using Opti-MEM as a basic induction medium. *International Journal of Molecular Medicine*, 41(1), 195-201. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3195>

Joye, N., Schmid, A., & Leblebici, Y. (2008). An electrical model of the cell-electrode interface for high-density microelectrode arrays. *2008 30th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 559-562. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2008.4649214>

Kruskal, P. B., Jiang, Z., Gao, T., & Lieber, C. M. (2015). Beyond the Patch Clamp : Nanotechnologies for Intracellular Recording. *Neuron*, 86(1), 21-24. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.004>

Le Big Data. (2015). CCI France / Département Industrie, Innovation, Intelligence économique. https://www.cci.fr/c/document_library/get_file?uuid=1fed966d-332e-4583-8257-5016266f0ad9&groupId=10988

Little, S., & Brown, P. (2012). Brain Stimulation in Neurology and Psychiatry. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1265(1), 9-24. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06650.x>

Maetschke, S. (2014, août 11). *Media : Analytics, Algorithms, AI, Big Data - IBM*. https://researcher.watson.ibm.com/researcher/view_group.php?id=4933

Masanet, E., Shehabi, A., Lei, N., Smith, S., & Koomey, J. (2020). Recalibrating global data center energy-use estimates. *Science*, 367(6481), 984-986. <https://doi.org/10.1126/science.aba3758>

Massobrio, P., Massobrio, G., & Martinoia, S. (2007). Multi-program approach for simulating recorded extracellular signals generated by neurons coupled to microelectrode arrays. *Neurocomputing*, 70(13), 2467-2476. <https://doi.org/10.1016/j.neucom.2006.09.008>

Mead, C. (1990). Neuromorphic electronic systems. *Proceedings of the IEEE*, 78(10), 1629-1636. <https://doi.org/10.1109/5.58356>

Merolla, P., Arthur, J., Alvarez-Icaza, R., Cassidy, A. S., Sawada, J., Akopyan, F., Jackson, B., Imam, N., Guo, C., Nakamura, Y., Brezzo, B., Vo, I., Esser, S. K., Appuswamy, R., Taba, B., Amir, A., Flickner, M. D., Risk, W., Manohar, R., & Modha, D. (2014). A million spiking-neuron integrated circuit with a scalable communication network and interface. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1254642>

Merrill, D. R., Bikson, M., & Jefferys, J. G. R. (2005). Electrical stimulation of excitable tissue : Design of efficacious and safe protocols. *Journal of Neuroscience Methods*, 141(2), 171-198. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.10.020>

Morris, C., & Lecar, H. (1981). Voltage oscillations in the barnacle giant muscle fiber. *Biophysical Journal*, 35(1), 193-213. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(81\)84782-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(81)84782-0)

Mosbacher, Y., Khoyratee, F., Goldin, M., Kanner, S., Malakai, Y., Silva, M., Grassia, F., Simon, Y. B., Cortes, J., Barzilai, A., Levi, T., & Bonifazi, P. (2020). Toward neuroprosthetic real-time communication from in silico to biological neuronal network via patterned optogenetic stimulation. *Scientific Reports*, 10(1), 7512. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63934-4>

Nowicki, W. (2011). *English : An updated version of the file on [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Computer_system_bus.svg#file with fixed I/O to Address Bus](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Computer_system_bus.svg#file_with_fixed_I/O_to_Address_Bus). http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Computer_system_bus.svg. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Computer_system_bus\(fixed\).svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Computer_system_bus(fixed).svg)*

Oakes, S. G., Martin, W. J., Lisek, C. A., & Powis, G. (1988). Incomplete hydrolysis of the calcium indicator precursor fura-2 pentaacetoxymethyl ester (fura-2 AM) by cells. *Analytical Biochemistry*, 169(1), 159-166. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90267-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90267-9)

Ojovan, S., Rabieh, N., Shmoel, N., Erez, H., Maydan, E., Cohen, A., & Soira, M. (2015). A feasibility study of multi-site, intracellular recordings from mammalian neurons by extracellular gold mushroom-shaped microelectrodes. *Scientific reports*, 5, 14100. <https://doi.org/10.1038/srep14100>

Orlowska, A., Perera, P. T., Al Kobaisi, M., Dias, A., Nguyen, H. K. D., Ghanaati, S., Baulin, V., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2018). The Effect of Coatings and Nerve Growth Factor on Attachment and Differentiation of Pheochromocytoma Cells. *Materials*, *11*(1), 60. <https://doi.org/10.3390/ma11010060>

Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A.-S., & White, L. (2019). *Neurosciences* (6e édition). De Boeck. <https://www.deboecksuperieur.com/ouvrage/9782807314924-neurosciences>

Radivojevic, M., Jäckel, D., Altermatt, M., Müller, J., Viswam, V., Hierlemann, A., & Bakkum, D. J. (2016). Electrical Identification and Selective Microstimulation of Neuronal Compartments Based on Features of Extracellular Action Potentials. *Scientific Reports*, *6*(1), 31332. <https://doi.org/10.1038/srep31332>

Richard, D., Camps, J., Eugène, D., Gauthier, M., & Gioanni, Y. (2013). *Neurosciences, tout le cours en fiches*.

Robinson, J. T., Jorgolli, M., Shalek, A. K., Yoon, M.-H., Gertner, R. S., & Park, H. (2012). Vertical nanowire electrode arrays as a scalable platform for intracellular interfacing to neuronal circuits. *Nature Nanotechnology*, *7*(3), 180-184. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.249>

Rosenblatt, F. (1958). The perceptron : A probabilistic model for information storage and organization in the brain. *Psychological Review*, *65*(6), 386-408. <https://doi.org/10.1037/h0042519>

Sánchez, C., Díaz-Nido, J., & Avila, J. (2000). Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Progress in Neurobiology*, *61*(2), 133-168. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00046-5](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00046-5)

Schoen, I., & Fromherz, P. (2007). The Mechanism of Extracellular Stimulation of Nerve Cells on an Electrolyte-Oxide-Semiconductor Capacitor. *Biophysical Journal*, *92*(3), 1096-1111. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.094763>

Sivasubramaniapandian, M. (2013). *The effect of coatings on the performance of the microelectrode arrays* [Master of Science Thesis]. Tampere University of technology.

Sourikopoulos, I., Hedayat, S., Loyez, C., Danneville, F., Hoel, V., Mercier, E., & Cappy, A. (2017). A 4-fJ/Spike Artificial Neuron in 65 nm CMOS Technology. *Frontiers in Neuroscience*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00123>

South-South Cooperation in a Digital World—2018 Annual Report in South-South Cooperation. (2019). <https://www.unsouthsouth.org/2019/03/18/south-south-cooperation-an-a-digital-world-2018-annual-report-in-south-south-cooperation/>

Streit, J., & Lux, H. D. (1987). Voltage dependent calcium currents in PC12 growth cones and cells during NGF-induced cell growth. *Pflügers Archiv*, *408*(6), 634-641. <https://doi.org/10.1007/BF00581167>

Teulon, J. (2004). LE PATCH-CLAMP EN BREF. *médecine/sciences*, 20(5), 550-550. <https://doi.org/10.1051/medsci/2004205550>

Thakore, V., Molnar, P., & Hickman, J. J. (2012). An Optimization-Based Study of Equivalent Circuit Models for Representing Recordings at the Neuron–Electrode Interface. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 59(8), 2338-2347. <https://doi.org/10.1109/TBME.2012.2203820>

Vassanelli, S., & Mahmud, M. (2016). Trends and Challenges in Neuroengineering : Toward “Intelligent” Neuroprostheses through Brain-“Brain Inspired Systems” Communication. *Frontiers in Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00438>

Versace, M., & Chandler, B. (2010). The brain of a new machine. *IEEE Spectrum*, 47(12), 30-37. <https://doi.org/10.1109/MSPEC.2010.5644776>

Von Neumann, J. S. A. O. D. ;University of P. (1945). *First draft of a report on the EDVAC* [Digital Book]. Moore School of Electrical Engineering, University of Pennsylvania. <https://library.si.edu/digital-library/book/firstdraftofrepo00vonn>

Wagenaar, D. A., Pine, J., & Potter, S. M. (2004). Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays. *Journal of Neuroscience Methods*, 138(1-2), 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.03.005>

Waldrop, M. M. (2016). The chips are down for Moore’s law. *Nature News*, 530(7589), 144. <https://doi.org/10.1038/530144a>

Wang, Z., Feng, Z., & Wei, X. (2018). Axonal Stimulations With a Higher Frequency Generate More Randomness in Neuronal Firing Rather Than Increase Firing Rates in Rat Hippocampus. *Frontiers in Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00783>

WHO | *Neurological Disorders : Public Health Challenges*. (s. d.). WHO; World Health Organization. Consulté 30 décembre 2020, à l’adresse https://www.who.int/mental_health/neurology/neurodiso/en/

Wiatrak, B., Kubis-Kubiak, A., Piwowar, A., & Barg, E. (2020). PC12 Cell Line : Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. *Cells*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/cells9040958>

Yang, X., Liu, X., Zhang, X., Lu, H., Zhang, J., & Zhang, Y. (2011). Investigation of morphological and functional changes during neuronal differentiation of PC12 cells by combined Hopping Probe Ion Conductance Microscopy and patch-clamp technique. *Ultramicroscopy*, 111(8), 1417-1422. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2011.05.008>

Zeck, G., & Fromherz, P. (2001). Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18), 10457-10462. <https://doi.org/10.1073/pnas.181348698>

Zheng, Y., Shojaei-Baghini, E., Wang, C., & Sun, Y. (2013). Rapid measurement of specific membrane capacitance and cytoplasm conductivity on single cells. *2013 IEEE 26th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)*, 1105-1108. <https://doi.org/10.1109/MEMSYS.2013.6474443>

Zhong, L.-Y., Fan, X.-R., Shi, Z.-J., Fan, Z.-C., Luo, J., Lin, N., Liu, Y.-C., Wu, L., Zeng, X.-R., Cao, J.-M., & Wei, Y. (2019). Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Ion (HCN) Channels Regulate PC12 Cell Differentiation Toward Sympathetic Neuron. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00415>