Université de Lille

THÈSE

Présentée pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université de Lille

Ecole Doctorale Sciences de l'Ingénierie et des Systèmes

Spécialité : Electronique, Microélectronique, Nanoélectronique et Micro-ondes

Par

Nathan SCHOONJANS

Etablissement d'une boucle de communication bidirectionnelle entre des neurones vivants et des neurones artificiels analogiques pour la conception de neurobiohybrides de nouvelle génération

Soutenue le 13 décembre 2023 devant le jury composé de :

Président de jury :
M. Michael BAUDOIN — Professeur (Université de Lille)

Rapporteurs :
M. Frédéric SARRY — Professeur (Université de Lorraine)
M. Matthieu RAOUX — Maître de Conférences - HDR (Université de Bordeaux)

Examinateurs :
M. Pierre VEINANTE — Professeur (Université de Strasbourg)
M. Guillaume PERRY — Maître de Conférences - HDR (Sorbonne Université)

Membres invités :
Mme Cécile DELACOUR — Chargée de Recherche - HDR (Institut Néel - CNRS)
M. Pascal MARIOT — Maître de Conférences - HDR (Université de Lille)

Directrices de thèse :
Mme Virginie HOEL — Professeure (Université de Lille)
Mme Christel VANBESIEN-MAILLIOT — Maître de Conférences - HDR (Université de Lille)

Co-encadrant :
M. Alexis VLANDAS — Chargé de Recherche (IEMN - CNRS)

Remerciements

Le travail présenté dans cette thèse n'aurait pas été possible sans le soutien indéfectible de toutes les personnes m'ayant entouré au cours de cette aventure. Les multiples échanges avec des scientifiques passionnés, les conseils éclairés des personnes m'ayant supervisé et le soutien moral inconditionnel de ma famille et de mes amis ont contribué à l'enrichissement scientifique de ce document tout en m'aidant à grandir tant professionnellement qu'humainement. Cette thèse n'aurait assurément pas la même valeur sans chacun d'entre eux.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers le Pr. Virginie Hoël, Professeure des Universités à l'Université de Lille / Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologies (IEMN) – CNRS UMR 8520 et directrice de mon doctorat, pour son expertise, sa patience et sa présence tout au long de mon parcours. Je la remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir offert l'opportunité hors du commun de travailler sur ce sujet passionnant. Je lui sais gré de m'avoir guidé et aidé à monter en compétence dans des domaines scientifiques que je ne maitrisais pas à mon arrivée. Je l'assure de toute ma gratitude pour sa bienveillance et son soutien.

Je tiens également à remercier le Dr. Christel Vanbesien-Mailliot, Maître de Conférences à l'Université de Lille / IEMN – CNRS UMR 8520 et co-directrice de mon doctorat, pour m'avoir accompagné et guidé depuis mon arrivée. Je la remercie pour les nombreux échanges que nous avons eus qui m'ont grandement aidé à perfectionner mes compétences techniques en biologie. Sa rigueur et sa passion inspirante m'ont toujours poussé à me surpasser et à évoluer scientifiquement. Je lui sais gré pour ses encouragements qui m'ont toujours redonné la force de poursuivre malgré les difficultés.

Je remercie également très chaleureusement le Dr. Alexis Vlandas, Chargé de Recherche à l'IEMN – CNRS UMR 8520 et co-encadrant de mon doctorat, pour ses nombreux conseils et suggestions m'ayant plusieurs fois mené à des solutions que je n'aurais pas envisagées. Sa créativité associée à son expertise multidisciplinaire m'a grandement aidé à adopter un nouveau regard plus éclairé, essentiel à ce projet.

Je tiens également à remercier très chaleureusement le Pr. Frédéric Sarry, Responsable d'Equipe à l'Institut Jean Lamour, et le Dr. Mathieu Raoux, Maître de Conférences à l'Université de Bordeaux pour avoir accepté d'être rapporteurs pour ce manuscrit de thèse.

Je remercie également le Dr. Cécile Delacour, Chargée de recherche à Institut Néel, le Dr. Guillaume Perry, Maître de Conférences à CentraleSupelec / Université Paris Saclay / Sorbonne Université / *Group of Electrical Engineering* Paris (GeePs) – UMR 8507 CNRS, le Pr. Pierre Veinante, Professeur à l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI) CNRS UPR3212 ainsi que le Pr. Michael Baudoin, Professeur des Universités à l'Université de Lille / IEMN – CNRS UMR 8520 pour avoir accepté de faire partie du jury en tant qu'examinateurs.

Je tiens à remercier le Pr. Alain Cappy, Professeur émérite à l'Université de Lille, pour ses nombreux éclairages tout au long du projet ainsi que pour son immense expertise en électronique qui nous ont permis d'orienter les décisions s'appliquant à ce domaine.

Je tiens également à exprimer mes remerciements les plus sincères au Dr. Pascal Mariot et au Dr. Valerio Farfariello de l'unité INSERM 1003 pour leur immense soutien lors de la réalisation des manipulations d'électrophysiologie. Leur contribution et leur expertise nous ont permis d'aborder sereinement des notions complexes dans ce manuscrit. Pascal, merci pour ton expertise, ta patience et ton investissement. J'ai pris un immense plaisir à travailler et apprendre à tes côtés. Merci pour les repas que nous avons partagés au SN3 et les nombreuses discussions que nous avons pu avoir autour du poste de patch-clamp. Merci également pour ton soutien pour la rédaction de ce manuscrit. Valerio, merci infiniment pour ton expertise et ta flexibilité pour la réalisation des manipulations d'imagerie calcique. Ton soutien a été une immense valeur ajoutée pour ces travaux tant par la qualité des résultats obtenus à tes côtés que par ta contribution à ma compréhension de mécanismes physiologiques complexes. Mes remerciements s'adressent également au Pr. Natalia Prevarskaya pour son accueil au sein de l'unité INSERM 1003 et pour l'accès aux équipements de patch-clamp et d'imagerie calcique utilisés dans le cadre de ces travaux collaboratifs.

Je tiens à remercier le Dr. Redha Kassi, le Dr. Etienne Okada et Mme Vanessa Avramovic pour leurs apports et leur investissement dans le développement du banc d'enregistrement électronique indispensable à ce projet, notamment concernant la sélection des composants et leur assemblage. Je tiens également à remercier David Delcroix pour la fabrication de divers dispositifs inclus au banc et nécessaires à son fonctionnement.

Je tiens à remercier les responsables du laboratoire de biologie L2 Jérôme Follet et Aude Sivery sans lesquels les manipulations présentées dans ce manuscrit n'auraient pas pu être réalisées. Merci à eux pour leurs nombreux conseils techniques et leur support sur le plan matériel.

J'aimerais également exprimer ma profonde gratitude envers le Dr. Dimitri Henniquau qui m'a initié aux méthodes employées par notre équipe en salle blanche et dans le laboratoire de biologie. Merci de m'avoir accueilli dans le laboratoire, de m'avoir guidé entre ses différents services et de m'avoir soutenu pendant mes manipulations au cours des deux premières années. Les nombreuses discussions passionnantes que nous avons eues dans notre bureau ont été une véritable source d'inspiration tout au long de mes travaux. Je le remercie également pour les nombreuses découvertes musicales qu'il a partagées avec moi.

Je tiens à remercier également le Dr. Mohamed Bellaredj pour ses nombreuses formations à l'utilisation des machines nécessaires à la fabrication des interfaces neurobiohybrides et pour le développement de méthodes de fabrication employées tout au long de ces travaux.

J’aimerais également remercier l’ensemble du personnel de la centrale de micro et nano-fabrication de l’IEMN pour leur aide et leurs conseils techniques pour la fabrication de dispositifs électroniques, et plus particulièrement le Dr. François Vaurette, le Dr. Pascal Tilmant, le Pr. Christophe Boyaval et le Dr. Saliha Ouendi.

J’adresse également mes remerciements à l’équipe administrative de l’IEMN, et plus particulièrement à Mme Nora Benbahlouli et à M. Andy Ledent pour leur accompagnement dans les démarches administratives réalisées tout au long de ma thèse ainsi qu’à Mme Laëtitia Debas, pour son aide précieuse dans la gestion et l’envoi des commandes.

Je souhaite également remercier le Dr. Anne-Charlotte Leniere ainsi que Mme Anna-Chakrya Chhuon pour leur camaraderie au sein du laboratoire, pour leur soutien moral et pour leur aide tout au long de ces travaux. Merci pour les nombreux échanges que nous avons pu avoir tout au long de ces trois dernières années.

J’aimerais également remercier les stagiaires qui ont contribué à ce projet : Hichem Benamara et Jiankang Qian. Merci pour l’intérêt qu’ils ont porté à nos travaux et pour leur participation à l’évolution de ce projet.

Je remercie également très chaleureusement tous mes amis qui m’ont soutenu moralement et m’ont permis de trouver la force d’aller au bout de ce projet malgré les difficultés. Merci Clément, Luc, Thomas, Pierre, Thomas, Marianne, Justin, Guillaume, Coraline, Quentin, Vianney, Marina, Chloé et Kilian pour avoir su m’accompagner dans cette épreuve par votre présence et vos encouragements.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma compagne, Céline Guillaume, pour avoir su rester à mes côtés malgré les moments difficiles et pour m’avoir apporté son soutien inconditionnel grâce auquel j’ai souvent trouvé la force de me surpasser.

J’aimerais enfin conclure ces remerciements en remerciant mes parents, Michèle et Raymond, ainsi que mon frère, Julien, pour avoir toujours été présents pour moi. De simples mots ne sauraient traduire l’immense reconnaissance que j’éprouve envers eux pour m’avoir mené jusqu’où j’en suis aujourd’hui.

Résumé

Les neurobiohybrides sont des systèmes composés d'un élément artificiel, d'une composante vivante et de l'interface qui les relie. Ces puissants outils permettent de connecter de manière fonctionnelle des éléments électroniques et des structures neuronales *in vitro* comme *in vivo*. De nombreux systèmes neurobiohybrides, plus communément appelés neuroprothèses, sont utilisés en médecine pour améliorer la qualité de vie de patients atteints de handicaps (surdité, déficits visuels, paralysie) en leur permettant de recouvrer partiellement les fonctions physiologiques perdues. Les neuroprothèses actuelles sont unidirectionnelles (elles stimulent OU enregistrent l'activité des neurones ciblés) et sont particulièrement énergivores. Intégrer une boucle de rétroaction de sorte que ces systèmes communiquent en temps réel de manière bidirectionnelle avec le tissu nerveux améliorerait leur efficacité tout en élargissant leur potentiel thérapeutique à d'autres conditions pathologiques. La principale difficulté à lever pour permettre l'établissement d'une telle boucle consiste à trouver un système de traitement de signal autonome et suffisamment miniaturisé. En 2017, le groupe Circuits Systèmes Applications des Micro-ondes (CSAM) de l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologies (IEMN) de Lille a publié un neurone artificiel ultra-efficace en termes de consommation énergétique qui pourrait répondre à ces besoins. Ce neurone émet des potentiels d'action biomimétiques en termes de forme, d'amplitude et de fréquence des signaux émis, et fonctionne de manière entièrement analogique. Dans un précédent doctorat, il a été démontré que ces potentiels d'action biomimétiques permettent bien de stimuler l'activité électrique de neurones vivants. Les travaux présentés ici font suite à cette démonstration et visent à établir une boucle de communication bidirectionnelle complète entre des neurones vivants et ces neurones artificiels. Dans cet objectif, trois axes principaux de travail ont été définis : 1- Optimiser le design et la technologie d'une interface neurobiohybride ; 2- Sélectionner et caractériser de manière morphologique et fonctionnelle des modèles cellulaires vivants maintenus *in vitro* ; 3- Etablir une première boucle de communication bidirectionnelle entre ces neurones vivants et les neurones artificiels par le biais de l'interface neurobiohybride. Ce manuscrit présente les étapes de fabrication et d'optimisation de l'interface dont la surface a été travaillée pour optimiser les conditions d'enregistrement en milieu électrolytique, notamment par l'ajout d'une couche de passivation isolant les lignes d'accès et un développement de méthodes afin d'optimiser le positionnement des cellules sur les électrodes. Les cellules électriquement actives choisies pour cette démonstration (cellules endocrines hypophysaires murines GH4C1 (lignée établie) et neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites) ont été caractérisées par patch-clamp, imagerie par fluorescence et imagerie calcique. Les premiers enregistrements de l'activité électrique de cellules GH4C1 cultivées dans une interface neurobiohybride ont été réalisés sur un banc d'enregistrement électronique conçu et optimisé au sein du laboratoire pour une détection de signaux de très faible amplitude. Ces travaux sont accompagnés par le développement d'un modèle électrique implémenté sous le logiciel LTSPICE intégrant le signal électrique émis par des cellules GH4C1 et enregistré via l'interface neurobiohybride. Ce faisant, il est possible d'établir une boucle de communication bidirectionnelle entre des neurones vivants et artificiels. En conclusion, ce travail permet d'ouvrir la voie vers une nouvelle génération de neuroprothèses bidirectionnelles.

Abstract

Neurobiohybrids are systems composed of an artificial element, a living component and their interface. These powerful tools enable the functional connection of electronic elements and neuronal structures both *in vitro* and *in vivo*. Many neurobiohybrid systems, more commonly known as neuroprostheses, are used in medicine to improve the quality of life of patients with disabilities (deafness, visual impairment, paralysis) by enabling them to recover, at least partly, lost physiological functions. Current neuroprostheses are unidirectional (they stimulate OR record the activity of targeted neurons) and are particularly energy-intensive. Integrating a feedback loop into these systems so that they could communicate bidirectionally in real time with nerve tissues would improve their efficiency and effectiveness, while broadening the range of their therapeutic potential. The main difficulty to overcome for enabling such a loop is to find an autonomous and sufficiently miniaturized signal processing system. In 2017, the *Circuits Systèmes Applications des Micro-ondes* (CSAM) group at Lille's Institute of Electronics, Microelectronics and Nanotechnologies (IEMN) published an ultra-efficient artificial neuron in terms of energy consumption that could meet these needs. This neuron generates biomimetic action potentials of similar shape, amplitude and frequency compared to living neurons, and is entirely analog. In a previous PhD work, it was shown that such biomimetic action potentials can trigger electric activity in living neurons. Following this demonstration, the present work aims to establish the proof-of-concept of the complete bidirectional communication loop between living neurons and these artificial neurons. To reach this goal, three main objectives were set: 1- Optimize the design and technology of a neurobiohybrid interface; 2- Select living cells for *in vitro* use and characterize them both morphologically and functionally; 3- Establish a first bidirectional communication loop between these living neurons and artificial neurons through the neurobiohybrid interface. This manuscript presents the manufacturing and optimization steps of the interface, whose surface has been enhanced to optimize recording conditions in an electrolytic environment, notably by adding a passivation layer to isolate the access lines and by developing methods to optimize cell position on the electrodes. The electrically active cells chosen for this demonstration (murine pituitary endocrine GH4C1 cells, an established cell line, and human glutamatergic neurons derived from induced pluripotent stem cells) were characterized by patch-clamp, fluorescence imaging and calcium imaging. The first recordings of the electrical activity of GH4C1 cells grown in a neurobiohybrid interface were carried out on an electronic recording bench designed and optimized in-house for detecting very low amplitude signals. This work also led to the development of an electrical model implemented in LTSPICE software, integrating electrical signals emitted by GH4C1 cells as recorded through the neurobiohybrid interface. This enabled the establishment of a bidirectional communication loop between living and artificial neurons. To conclude, this work opens the way to a new generation of bidirectional neuroprostheses.

A tous les enseignants qui ont éveillé en moi

la passion d'apprendre et de découvrir

Préambule

Les travaux de thèse présentés dans ce document 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) sous la direction de Virginie Hoël (Pr.), de Christel Vanbesien-Mailliot (MCF-HDR) et de Alexis Vlandas (CR-CNRS).

Cette thèse porte sur l'établissement d'une boucle de communication bidirectionnelle entre des neurones vivants et des neurones artificiels par le biais d'une interface fonctionnelle développée dans le cadre de précédents travaux du laboratoire, l'ensemble formant un système neurobiohybride. Cet objectif requiert des compétences interdisciplinaires issues de plusieurs domaines différents dont les neurosciences, l'électronique et les systèmes bio-micro-électro-mécaniques (BioMEMS). Les travaux présentés dans ce document résultent donc des efforts coordonnés de différents collaborateurs maitrisant au moins l'un de ces trois domaines d'expertise. A titre personnel, j'ai suivi une formation en biotechnologies (Master Biotechnologies de l'Université de Lille) m'ayant donné des bases théoriques généralistes en biologie qui m'ont permis d'acquérir rapidement les notions fondamentales des neurosciences sous la tutelle de mes encadrants. Cette formation m'a amené à développer de solides compétences pratiques grâce auxquelles j'ai pu rapidement m'adapter aux méthodologies en place dans le laboratoire. J'ai par ailleurs acquis, par le biais de formations au cours du doctorat, les compétences et connaissances complémentaires dans les autres champs disciplinaires ; celles-ci étant indispensables pour mener à bien le projet qui m'a été confié.

Ce manuscrit est divisé en 7 chapitres. Les deux premiers chapitres ont vocation à présenter le contexte et les enjeux du projet de thèse afin de positionner les objectifs spécifiques des travaux présentés dans ce document. Le chapitre 3 présente le positionnement de l'équipe de recherche dans laquelle j'ai mené mes travaux de thèse au regard de cet état de l'art, ainsi que les objectifs scientifiques visés par l'équipe et les travaux réalisés avant mon arrivée. Les chapitres 4, 5 et 6 ont vocation à présenter les évolutions et les résultats obtenus dans le cadre de ma thèse. Enfin, le chapitre 7 permet de mettre en perspective ces travaux en reprenant les conclusions principales des chapitres précédents.

Table des matières

Chapitre 1 Les systèmes neurobiohybrides 1

1.1 Introduction : les neurobiohybrides 2

1.1.1 Introduction générale 2

1.1.2 Définition générale d'un système neurobiohybride 2

1.1.3 La grande diversité de neurobiohybrides dans la littérature 3

1.2 La composante vivante des neurobiohybrides 4

1.3 Les interfaces neurobiohybrides 8

1.3.1 Les interfaces pour les cultures *in vitro* 8

1.3.2 Les interfaces pour le système nerveux *in vivo* 10

1.4 L'artefact neurobiohybride 15

1.5 L'émergence des neurotechnologies : de « *l'électricité animale* » aux premiers implants neurobiohybrides 16

1.5.1 Contribution des physiciens Volta et Galvani 16

1.5.2 Premiers essais de stimulation électrique du système nerveux comme approche thérapeutique 17

1.5.3 Les premiers neurobiohybrides à visée thérapeutique 17

1.6 Quelques exemples d'implants unidirectionnels 18

1.6.1 Implants cochléaires 18

1.6.2 Implants rétiniens 19

1.6.3 Implants du système nerveux périphérique 19

1.6.4 Implants corticaux 20

1.6.4. Implants sous-corticaux pour la maladie de Parkinson 22

1.6.5 Implants spinaux 22

1.7. Conclusion du chapitre 23

Chapitre 2 Enjeux et défis associés au développement de systèmes neurobiohybrides de nouvelle génération 25

2.1 Introduction du chapitre 26

2.2 Les défis technologiques à relever pour assurer un échange d'information avec le vivant 26

2.2.1 Les défis relatifs aux interfaces d'enregistrement 26

2.2.2 Les défis à relever pour les interfaces de stimulation 30

2.2.3 Les défis associés à la stabilité de l'interface *in vivo* dans le temps 32
2.2.4 Les enjeux liés aux électrodes des interfaces des neurobiohybrides 34
2.2.5 Les défis associés au traitement du signal 39
2.3 Les défis imposés par les caractéristiques des conditions pathologiques ciblées 43
2.3.1 Essais cliniques récents et en cours dans des contextes de section traumatique de la moelle épinière 44
2.3.2 Vers le développement d'implants bidirectionnels adaptatifs 46
2.3.3 Les enjeux et bénéfices des systèmes neurobiohybrides adaptatifs 49
2.4 De l'importance d'améliorer le traitement de l'information pour la prochaine génération de systèmes neurobiohybrides 51
2.4.1 L'apport de l'intelligence artificielle 52
2.4.2 Le traitement neuro-inspiré de l'information (ou *neurocomputing*) 53
2.5 Conclusion du chapitre 55
Chapitre 3 Positionnement du projet et objectifs du travail de doctorat 57
3.1 Introduction du chapitre 58
3.2 Le positionnement de notre équipe sur le sujet 58
3.3 Objectif de notre équipe et travaux passés 61
3.4 Mon projet de doctorat 63
Chapitre 4 Développement de l'interface neurobiohybride 65
4.1 Introduction du chapitre et enjeux de l'interface 66
4.1.1 L'interface neurobiohybride au début de mon doctorat 70
4.1.2 Les limites identifiées de cette interface 71
4.2 Améliorations apportées au design de l'interface 73
4.2.1 Optimisation du positionnement des cellules par amélioration du layout et modification des dimensions du puits de PDMS 73
4.2.2 Ajout d'une couche de passivation pour l'isolation des lignes 75
4.2.3 Amélioration de l'adhésion des cellules à la surface du réseau d'électrodes 75
4.3 Méthodes de fabrication de l'interface neurobiohybride 77
4.4 Composante vivante du neurobiohybride 85
4.4.1 Choix des modèles biologiques 86
4.5 Ensemencement des cellules dans les interfaces neurobiohybrides 91
4.5.1 Ensemencement des cellules GH4C1 91

4.5.2 Ensemencement et maintien des iCell® GlutaNeurons dans l'interface neurobiohybride 92
4.6 Perspectives d'amélioration 94
4.6.1 Dépôt localisé des cellules par photostructuration de l'enrobage des surfaces de culture 94
4.6.2 Etablissement d'un protocole de récupération des dispositifs 97
4.7 Conclusion du chapitre 98
Chapitre 5 Caractérisation des modèles vivants 99
5.1 Introduction du chapitre 100
5.2 Les techniques d'étude mises en œuvre 100
5.3 Principe et méthodes du patch-clamp 100
5.3.1 Principe du patch-clamp 100
5.3.2 Méthodes de patch-clamp pour caractériser l'activité électrique des cellules 103
5.4 Principe et méthodes de l'imagerie calcique 104
5.4.1 Principe de l'imagerie calcique 104
5.4.2 Méthode d'imagerie calcique 110
5.4.3 Recherche de molécules modulatrices des potentiels d'action 110
5.5 Caractérisation et modulation des signaux des cellules neurosécrétrices murines GH4C1 112
5.5.1 Mesures électrophysiologiques des cellules GH4C1 112
5.5.2 Effet de la 4-aminopyridine sur les cellules GH4C1 évalué en patch-clamp 118
5.5.3 Effet de la 4-AP sur la concentration intracellulaire de calcium évalué par imagerie calcique 122
5.5.4 Effet de la TRH 125
5.5.5 Synthèse des résultats obtenus sur les cellules GH4C1 127
5.6 Caractérisation et modulation des signaux des iCell® GlutaNeurons 128
5.6.1 Evaluation en patch-clamp de l'activité électrique des neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iCell® GlutaNeurons) 128
5.6.2 Vérification de l'activité électrique des iCell® GlutaNeurons par imagerie calcique 132
5.6.3 Caractérisation des courants des iCell® GlutaNeurons 132
5.6.4 Synthèse des données acquises avec les iCell® GlutaNeurons 137
5.7 Conclusion du chapitre 139

Chapitre 6 Etablissement d'une première boucle de communication bidirectionnelle 141
6.1 Introduction du chapitre 142
6.2 Stimulation électrique de l'activité des cellules GH4C1 143
6.3 Enregistrement de l'activité électrique des cellules GH4C1 148
6.3.1 Caractéristique du banc : méthode de détection et bruit intrinsèque 149
6.3.2 Description de la chaîne de mesure et principe de détection 149
6.3.3 Caractérisation de la chaîne d'enregistrement : artéfacts et mesure de bruit ... 154
6.4 Vérification de l'activité physiologique des cellules par imagerie de fluorescence 156
6.5 Enregistrements extracellulaires caractéristiques 160
6.5.1 Présentation des courbes 160
6.5.2 Comparaison des temps d'étalement des pics d'activité électrique avec des potentiels d'action enregistrés en patch-clamp 169
6.5.3 Analyse de l'amplitude du signal détecté et calcul du rapport signal sur bruit 171
6.5.4 Comparaison entre l'enregistrement de la campagne B et l'enregistrement de la tension sur un temps long sans activité électrique d'origine biologique 172
6.6 Simulation de la boucle de communication bidirectionnelle 174
6.7 Conclusion du chapitre 177
Chapitre 7 Conclusion générale du manuscrit 179
Annexes ……...185
Références ……...197

Liste des figures

Figure 1.1 : Interactions entre les éléments composant un système neurobiohybride 3
Figure 1.2 : Proposition de hiérarchisation des systèmes neurobiohybrides (= Brain-Machine Interfaces ; BMI) 4
Figure 1.3 : Représentation schématique d'un neurone dont l'axone est enrobé dans une gaine de myéline 5
Figure 1.4 : Les différents types de canaux ioniques contribuant au maintien du potentiel de membrane des neurones et à aux potentiels d'action 6
Figure 1.5 : Illustration des trois phases d'un potentiel d'action générique 7
Figure 1.6 : Exemple d'enregistrement de courants transmembranaires transitoires provoqués par une stimulation externe 9
Figure 1.7 : Plateforme microfluidique permettant la distribution sélective de molécules d'intérêt à des cellules cultivées sur un réseau d'électrodes 10
Figure 1.8 : La grande variété des interfaces invasives dans la littérature 11
Figure 1.9 : Les différents types d'interfaces pour la stimulation du système nerveux périphérique 12
Figure 1.10 : Variété des électrodes spinales semi-invasives et invasives 14
Figure 1.11 : Les différentes électrodes sous-corticales de stimulation cérébrale profonde actuellement disponibles sur le marché 15
Figure 1.12 : Définition de l'artefact - Représentation schématique de la chaîne d'acquisition et de stimulation d'un neurobiohybride 16
Figure 2.1 : Forme des signaux biologiques en fonction de l'interface d'enregistrement 27
Figure 2.2 : Schéma électrique d'une cellule positionnée sur une électrode en trois dimensions 28
Figure 2.3 : Les différentes formes d'électrodes permettant d'optimiser le couplage membrane-électrode 29
Figure 2.4 : Représentation schématique des différents modes de couplage sur l'environnement proche de l'électrode 31
Figure 2.5 : Les différentes étapes de la réponse inflammatoire menant à la formation de tissu cicatriciel autour des interfaces neurobiohybrides implantées dans le cerveau 33
Figure 2.6 : Chaine d'enregistrement de signal bioélectrique 35
Figure 2.7 : Illustration de l'apport d'une couche de polymère conducteur sur la qualité des signaux enregistrés *in vivo* 37
Figure 2.8 : La réaction immunitaire provoquée par la différence de texture entre l'implant et le tissu 38
Figure 2.9 : Représentation schématique de la succession d'événements menant à l'élaboration d'une réponse adaptée à un signal électrique enregistré *in vivo* au sein d'un système neurobiohybride bidirectionnel 40
Figure 2.10 : Les différentes positions des unités de traitement de signal au sein des neurobiohybrides *in vivo* 42

Figure 2.11 : Le principe de fonctionnement d'interfaces corticales et spinales permettant de transmettre des signaux stimulateurs au-delà d'une région spinale lésée 45
Figure 2.12 : Eléments composant un système neurobiohybride adaptatif *in vitro* 47
Figure 2.13 : Représentation schématique d'une boucle de dialogue entre un réseau de neurones biologiques (ou Biological Neural Network, BNN) et un réseau de neurones artificiels (ou Spiking Neural Network, SNN) 48
Figure 2.14 : Synthèse des différentes limites des implants neurobiohybrides actuels et liste des améliorations nécessaires qui en découlent 50
Figure 2.15 : Les voies d'amélioration envisagées pour les futures évolutions des systèmes computationnels 54
Figure 2.16 : Représentation schématique du fonctionnement d'un neurobiohybride bidirectionnel incluant un réseau de neurones artificiels sous forme logicielle (ANN) 55
Figure 3.1 : Schéma électrique équivalent d'un neurone artificiel biomimétique conçu à l'IEMN 59
Figure 3.2 : Le neurone artificiel analogique générant des signaux biomimétiques 60
Figure 3.3 : Schéma illustrant les éléments à respecter en vue d'une implantation *in vivo* 61
Figure 4.1 : Représentation conceptuelle de la mise au contact d'une puce de neurones artificiels et de neurones vivants en culture pour l'établissement d'une boucle de communication bidirectionnelle 66
Figure 4.2 : Synoptique du banc et photo de la dark-box qui contient les différents éléments développés dans la centrale CHOP de l'IEMN 67
Figure 4.3 : Schéma de principe illustrant l'environnement de la caractérisation et les différentes possibilités disponibles sur le banc 68
Figure 4.4 : Synoptique de la connexion entre l'interface neurobiohybride et la chaîne d'excitation ou de mesure grâce aux sondes multi-contact adaptées au dispositif 68
Figure 4.5 : Schéma de l'ensemble de la boucle et du dispositif avec des électrodes déportées 69
Figure 4.6 : Layout du réseau de microélectrodes développé précédemment au sein de notre équipe 71
Figure 4.7 : Représentation schématique du dispositif d'interfaçage neurobiohybride 74
Figure 4.8 : Modèle de circuit de l'interface neurone-électrode illustrant l'importance de l'adhésion des cellules au plot au travers de la résistance de jointure Rseal 75
Figure 4.9 : Substrat de verre résiné 78
Figure 4.10 : Résines révélées 78
Figure 4.11 : Echantillon métallisé 79
Figure 4.12 : Le dispositif après lift-off 79
Figure 4.13 : Dimensions des structures en or obtenues après lift-off 80
Figure 4.14 : Représentation schématique du dispositif après dépôt d'une couche de passivation de Si_3N_4 80
Figure 4.15 : Procédure de gravure physique par plasma O2 RIE 81

Figure 4.16 : Représentation schématique du dispositif après gravure physique avec masque de résine 81
Figure 4.17 : Photographie des surfaces dépassivées par gravure du nitrure de silicium 82
Figure 4.18 : Courbe obtenue lors du test de vérification de conformité de l'étape de gravure 82
Figure 4.19 : Photographie de l'assemblage permettant de mouler des puits de PDMS au format carré (2 × 2 cm de surface interne) 83
Figure 4.20 : Effet de l'activation de la surface de nitrure de silicium par plasma O_2 RIE (50W/1minute) 84
Figure 4.21 : Etat de la zone de contact en or après pose des pointe 85
Figure 4.22 : Apparence de la culture mère de cellules GH4C1 87
Figure 4.23 : Observation des cellules GH4C1 ensemencées sur des surfaces en verre par microscopie de fluorescence au grossissement 60X 88
Figure 4.24 : Evolution de la culture de neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites au cours du temps sur des lamelles de verre adaptées à la culture de neurones 90
Figure 4.25 : Cellules adhérées à la surface d'un dispositif RxTx 91
Figure 4.26 : Evolution de la culture de neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites au cours du temps sur les dispositifs 93
Figure 4.27 : principe général du procédé de photostructuration (photopatterning en anglais) 95
Figure 4.28 : Motifs photopatternés sur un dispositif passivé au PLPP-gel 96
Figure 4.29 : Répartition des cellules après trois heures dans le dispositif photopatterné 97
Figure 5.1 : Principe du patch-clamp et de la succession d'étapes menant à la configuration « cellule entière » 101
Figure 5.2 : Organisation d'une manipulation de patch-clamp en configuration « cellule entière » 102
Figure 5.3 : Diagramme de Jablonski présentant schématiquement le mécanisme de fluorescence 105
Figure 5.4 : Principe d'utilisation du Fura2-AM pour faire pénétrer le Fura2 dans les cellules 106
Figure 5.5 : Formule du Fura2 et site de fixation du calcium (Ca^{2+}) 107
Figure 5.6 : Spectres d'excitation et d'émission des formes liées et non liées au calcium du Fura2 107
Figure 5.7 : Variations antiparallèles de l'intensité de fluorescence relative des formes liée et non liée de la sonde Fura2 108
Figure 5.8 : Principe de la charge de Fura2-AM et de l'imagerie calcique avec sonde ratiométrique 109
Figure 5.9 : Caractéristiques de cellules neurosécrétrices murines GH4C1 113
Figure 5.10 : Exemples de potentiels d'action dans les cellules GH4C1 114

Figure 5.11 : Exemple d'enregistrement de potentiels d'action sur une cellule GH4C1 sur une longue durée 115
Figure 5.12 : Exemples de potentiels d'action stimulés sur une cellule GH4C1 enregistrés en patch-clamp configuration cellule entière, courant imposé..... 116
Figure 5.13 : Présence de courants voltage-dépendants mesurée par potentiel imposé..... 117
Figure 5.14 : Potentiels d'action spontanés émis par des GH4C1 sans (A et B) et avec (C et D) 4-aminopyridine 118
Figure 5.15 : Augmentation de la durée des bursts émis par dix cellules GH4C1..... 119
Figure 5.16 : Représentation des potentiels d'action et bursts émis par les cellules GH4C1 120
Figure 5.17 : Modification de la fréquence des bursts et potentiels d'action émis par dix cellules GH4C1 121
Figure 5.18 : Mise en évidence du caractère antiparallèle de la fluorescence émise à 380 et à 340 nm lors de la survenue d'une augmentation transitoire de calcium intracellulaire induite par les potentiels d'action de cellule GH4C1..... 122
Figure 5.19 : Effet de la 4-aminopyridine sur la concentration de calcium intracellulaire 123
Figure 5.20 : Illustration de la différence de durée entre un potentiel d'action enregistré par patch-clamp et un pic transitoire de calcium libre intracellulaire enregistré en imagerie calcique 124
Figure 5.21 : Enregistrement patch-clamp présentant l'action en deux temps de la *Thyrotropin Releasing Hormone* à 1 µmol.L^{-1} sur des cellules GH4C1 125
Figure 5.22 : Effet de la *Thyrotropin Releasing Hormone* sur les potentiels d'action émis par les cellules GH4C1..... 126
Figure 5.23 : Potentiels d'action de neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites enregistrés en patch-clamp en configuration cellule entière . 129
Figure 5.24 : Caractéristiques des neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites à différents stades de la culture 130
Figure 5.25 : Mesures du diamètre de neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites au (A) 7ème, (B) 14ème et (C) 20ème jour *in vitro* 131
Figure 5.26 : Mise en évidence du caractère antiparallèle de la fluorescence émise à 380 et à 340 nm lors de la survenue d'une augmentation transitoire de calcium intracellulaire potentiellement induite par l'activité électrique de neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites..... 132
Figure 5.27 : Caractérisation des courants voltage-dépendants en voltage-clamp des neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites 134
Figure 5.28 : Caractérisation des courants voltage-dépendants en présence de tétrodotoxine en voltage-clamp des neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites 136
Figure 5.29 : Effet de différents inhibiteurs de canaux ioniques sur le potentiel de repos (Vrepos) des neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites 137

Figure 6.1 : Représentation schématique du lien de causalité unissant l'émission de potentiels d'action issus de cellules vivantes et l'émission de potentiels d'action biomimétiques par les neurones artificiels 142
Figure 6.2 : Schéma du réseau d'électrodes traversantes pour la stimulation..... 144
Figure 6.3 : Représentation schématique de la configuration de la manipulation de stimulation des cellules GH4C1 placées dans un dispositif IMACA..... 145
Figure 6.4 : Impact de la stimulation électrique sur la concentration en calcium intracellulaire de cellules GH4C1 147
Figure 6.5 : Représentation schématique de la chaîne de mesures et des fonctions électroniques pour la partie enregistrement..... 150
Figure 6.6 : Principe de la méthode de détection mise en œuvre pour l'enregistrement des signaux extracellulaires 150
Figure 6.7 : Schéma électrique équivalent de l'interface électrode-cellule 151
Figure 6.8 : Mise en évidence du courant dirigé vers l'électrolyte par la résistance de jointure Rseal et de son impact sur les signaux détectés au niveau de l'électrode 152
Figure 6.9 : Enregistrement du signal dans un dispositif neurobiohybride sans activité biologique pendant une période de dix minutes afin de mettre en évidence l'absence d'artéfact significatif..... 155
Figure 6.10 : Photographies des cellules GH4C1 dans l'interface RxTx..... 157
Figure 6.11 : Impact du chlorure de potassium à 100 mmol.L^{-1} sur les oscillations calciques intracellulaires de cellules GH4C1 cultivées dans une interface neurobiohybride placée dans les conditions d'enregistrement électrique 158
Figure 6.12 : Impact de l'EGTA à 2 mmol.L^{-1} sur les oscillations calciques intracellulaires de cellules GH4C1 cultivées dans une interface neurobiohybride placée dans les conditions d'enregistrement électrique 159
Figure 6.13 : Enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure A pendant 2 minutes 55 secondes - BP (0,3 Hz - 100 Hz) - Gain 10000 161
Figure 6.14 : Analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure A. - BP (0,3 Hz - 100 Hz) - Gain 10000 161
Figure 6.15 : Agrandissements complémentaires pour l'analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure A. - BP (0,3 Hz - 100 Hz) - Gain 10000 162
Figure 6.16 : Enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure B pendant (3 minutes 20 secondes). - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000 163
Figure 6.17 : Comparaison des enregistrements de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) obtenus à partir de deux électrodes différentes recouvertes de cellules –

Validation et observation au microscope optique sur le banc d'enregistrement. - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000 163
Figure 6.18 : Analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure B. - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000. 164
Figure 6.19 : Série 1 d'agrandissements complémentaires pour l'analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure B. - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000 164
Figure 6.20 : Série 2 d'agrandissements complémentaires pour l'analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif de la campagne de mesure B. - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000 165
Figure 6.21 : Série 3 d'agrandissements complémentaires pour l'analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure B. - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000 165
Figure 6.22 : Enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif de la campagne de mesure C pendant (5 minutes 40 secondes). - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000 166
Figure 6.23 : Analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure C pendant 340 secondes. - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000 167
Figure 6.24 : Série 1 d'agrandissements complémentaires pour l'analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure C. - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000 167
Figure 6.25 : Série 2 d'agrandissements complémentaires pour l'analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure C. - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000 168
Figure 6.26 : Série 3 d'agrandissements complémentaires pour l'analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure C. - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000 168
Figure 6.27 : Potentiel d'action de cellule GH4C1 enregistré par patch-clamp 169
Figure 6.28 : Agrandissement sur des pics d'activité électrique tirés de la campagne d'enregistrement A de durée comparable à celle d'un potentiel d'action de cellule GH4C1 enregistré par patch-clamp 170
Figure 6.29 : Superposition du signal extrait de la campagne d'enregistrement B (courbes en rouge) et du signal enregistré dans un dispositif neurobiohybride sans activité biologique pendant une période de 10 minutes (courbes en violet) 173
Figure 6.30 : Représentation schématique de la boucle de communication bidirectionnelle simulée avec le logiciel LTSPICE 175
Figure 6.31 : Différents signaux intervenants dans la boucle de communication bidirectionnelle simulée 176

Figure 6.32 : Agrandissement autour de 45ms des différents signaux intervenants dans la boucle de communication bidirectionnelle simulée 176
Figure A.1 : Principe de mesure des paramètres électrophysiologiques 187
Figure A.2 : Ratio de fluorescence émise entre 340 et 380 nm en fonction de la concentration en calcium 191
Figure A.3 : Mécanisme d'action de la *Thyrotropin Releasing Hormone* 192
Figure A.4 : Résultat du test non paramétrique Wilcoxon réalisé par le biais du logiciel Origin 2022 sur l'ensemble des données de durée des bursts et potentiels d'action de GH4C1 exposées à la 4-aminopyridine 193
Figure A.5 : Résultat du test non paramétrique Wilcoxon réalisé par le biais du logiciel Origin 2022 sur l'ensemble des données de fréquence des bursts et potentiels d'action de GH4C1 exposées à la 4-aminopyridine 194
Figure A.6 : Mesure de bruit du banc : densité spectrale de tension (µV/SQR(Hz) en fonction de la fréquence en Hz 195

Liste des tableaux

Tableau 4.1 : Paramètres de dépôt PECVD de la couche de passivation 80
Tableau 4.2 : Paramètres de gravure RIE de la couche de passivation 81
Tableau 5.1 : Molécules candidates pour la modulation des caractéristiques électriques des cellules GH4C1 et des iCell® GlutaNeurons 111
Tableau 6.1 : analyse de l'amplitude du signal détecté et calcul du rapport signal sur bruit pour les enregistrements des campagnes A, B et C 171
Tableau A.1 : concentrations de chaque ion contenu dans les solutions intracellulaires et extracellulaires utilisées en patch-clamp 188
Tableau A.2 : Résultats du calcul du potentiel de jonction liquide mesuré 188

Liste des abréviations

4-AP ou 4AP : 4-aminopyridine

A/D : Convertisseur Analogique vers Digital

A_A : *Actuator of the Artefact* (actionneur de l'artefact)

AFB : Amplificateur Faible Bruit

AFE : *analog-front-end* (partie frontale analogique)

A_N : *Actuator of the Neuron(s)* (actionneur du/des neurone(s))

AN : *Artificial neurons* (neurones artificiels)

AM : Groupements AcetoxyMethyl ester

ASIC : *Application-Specific Integrated Circuit* (circuit intégré spécialisé)

BioMEMS : *Bio-Micro-Electro-Mechanic Systems* (systems bio-micro-électro-mécaniques)

BNN : *Biological Neural Network* (réseau de neurones biologiques)

BMI : *Brain-Machine Interface* (interface cerveau-machine)

C_a : Capacité de l'Amplificateur

CAD : Convertisseur Analogique-Digital

C_e : Capacité de l'Electrode

CHOP : Centrale Hyperfréquence Optique Photonique

C_i : Capacité d'Interface

C_j : Capacité de la membrane Jointe à l'électrode

Cm : Capacitance Membranaire

C_{nj} : Capacité de la membrane Non Jointe à l'électrode

CSAM : Circuits Systèmes Applications des Microondes

D/A = Convertisseur Digital vers Analogique

DAPI : 4′, 6-DiAmidino-2-PhénylIndole

DBS : *Deep Brain Stimulation* (stimulation cérébrale profonde)

ECoG : Signaux ElectroCorticoGraphiques

EEG : Signaux ElectroEncéphaloGraphiques

EES : *Epidural Electric Stimulation* (stimulation électrique épidurale)

EGTA : Acide EthylèneGlycol- bis(β-aminoéthyl)-N,N,N′,N′-Tétracétique

IEMN : Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologies

FITC : *Fluorescein IsoThioCyanate* (isothiocyanate de fluorescéine)

FET : *Field-Effect Transistor* (transistor à effet de champ)

FPGA : *Field Programmable Gate Array* (circuit logique programmable)

GDS : *Graphic Data System*

HBSS : *Hanks Balanced Salt Solution* (solution saline équilibrée de Hank)

HHBS : Solution saline équilibrée de Hank avec 20 $mmol.L^{-1}$ de tampon HEPES

HMDS : HexaMéthylDiSilazane

IC50 : *Inhibitory Concentration* 50% (concentration pour 50% d'inhibition)

Iin : Courant entrant transitoire

Iout : Courant sortant transitoire

IPA : IsoPropAnol

IPG : *Implanted Pulse Generator* (générateur d'impulsions implanté)

iPSC : *Induced Pluripotent Stem Cells* (cellules souches pluripotentes induites)

I_{stim} : courant stimulateur

LFP : *Local Field Potentials* (potentiels de champ locaux)

MEA : *MicroElectrode Array* (réseau de microélectrodes)

P_A : *Processing unit of the Artefact* (unité de traitement du signal de l'artefact)

PA : Potentiel d'Action

PDMS : PolyDiMethylSiloxane

PEG-SVA : Poly-Ethylene Glycol-Succinimidyl VAlerate

PLL : Poly-L-Lysine

PLO : Poly-L-Ornithine

P_N : *Processing unit of the Neuron(s)* (unité de traitement du signal du/des neurone(s))

R_a : Résistance de l'Amplificateur

Ra : Résistance d'Accès

R_e : Résistance de l'Electrode

RIE : *Reactive Ion etching*

R_j : Résistance de la membrane Jointe à l'électrode

R_{low} : Résistance de la membrane liée

Rm : Résistance Membranaire

R_{nj} : Résistance de la membrane Non Jointe à l'électrode

R_{seal} : *Sealing Resistance* (résistance de jointure)

R_{up} : Résistance de la membrane non liée

S_A : *Sensor element of the Artefact* (capteur de l'artefact)

S_N : *Sensor element of the Neuron(s)* (capteur du/des neurone(s))

SNC : Système Nerveux Central

SNN : *Spiking Neural Network* (réseau de neurones artificiels)

SNP : Système Nerveux Périphérique

SNpc : Substance noire *pars compacta*

SPINE : *SPIking NEuronal circuits and systems*

Stim : Stimulation

TEA : TetraEthyl Ammonium

TRH : *Thyrotropin Releasing Hormone* (ou thyréolibérine)

TSN : Traitement de Signal Numérique

TTX : TétrodoToXine

TX : Transmetteur

UV : UltraViolet

$V_i(t)$: Tension à l'interface

$V_{intra}(t)$: Potentiel intracellulaire

V_{up} : Potentiel membranaire

Chapitre 1 Les systèmes neurobiohybrides

1.1 Introduction : les neurobiohybrides

1.1.1 Introduction générale

Les travaux présentés dans ce document portent sur la conception de systèmes neurobiohybrides. Ces systèmes sont employés aussi bien en recherche fondamentale que dans le domaine médical en tant qu'interfaces cerveau-machines. Nous verrons dans ce chapitre quelles définitions s'appliquent à ce type de système et proposerons une série d'exemples contextualisés de leur utilisation. Nous verrons également quels sont les enjeux associés et quelles sont les difficultés inhérentes à leur développement. Nous insisterons plus particulièrement sur les notions liées à l'interfaçage de dispositifs électroniques avec des tissus vivants et sur les solutions apportées dans la littérature. Ce chapitre permettra de donner au lecteur un aperçu exhaustif des systèmes neurobiohybrides pour l'aider à mieux appréhender le positionnement de nos travaux. Nous y aborderons la grande variété des technologies mises au point ces dernières années pour répondre aux nombreuses problématiques inhérentes à chaque structure biologique ciblée.

1.1.2 Définition générale d'un système neurobiohybride

D'après la définition proposée par Vassanelli et Mahmud (2016), les systèmes neurobiohybrides sont des éléments qui permettent d'établir, par le biais d'une interface, une communication fonctionnelle entre des neurones vivants et des objets fabriqués appelés artefacts. Comme montré en figure 1.1., un neurobiohybride est composé d'un artefact, d'une interface et de neurones vivants. L'interface comporte trois éléments permettant d'établir le lien entre l'artefact et les neurones : des capteurs (*Sensor element of the Artefact/Neuron(s)* : S_A et S_N), des unités de traitement du signal (*Processing unit of the Artefact/Neuron(s)* : P_A et P_N) et des actionneurs (*Actuator of the Artefact/Neuron(s)* : A_A et A_N). La communication peut se réaliser soit de manière unidirectionnelle (neurones vivants => artefact ou artefact => neurones vivants), soit de manière bidirectionnelle (neurones vivants ⇔ artefact). Ce type de système peut prendre plusieurs formes et s'adapter à un interfaçage *in vitro* comme *in vivo*, rendant les applications possibles très variées pour la recherche et la médecine. Les neurobiohybrides sont composés de trois éléments majeurs : les neurones vivants sous forme de cultures, de tranches d'organes, de modèles de cerveaux maintenus *in vitro* (organoïdes cérébraux), ou directement dans le système nerveux *in vivo*, l'artefact servant à traiter les signaux enregistrés et/ou générer des signaux de stimulation, et enfin l'interface qui les relie. De manière générale, les conceptions des neurobiohybrides sont très spécifiques répondant à une problématique précise. Chacun des éléments composant un neurobiohybride est optimisé en fonction des besoins intrinsèques de ses composants et des contraintes imposées par les deux autres éléments dans le but de créer un ensemble tripartite harmonieux (Vassanelli & Mahmud, 2016a).

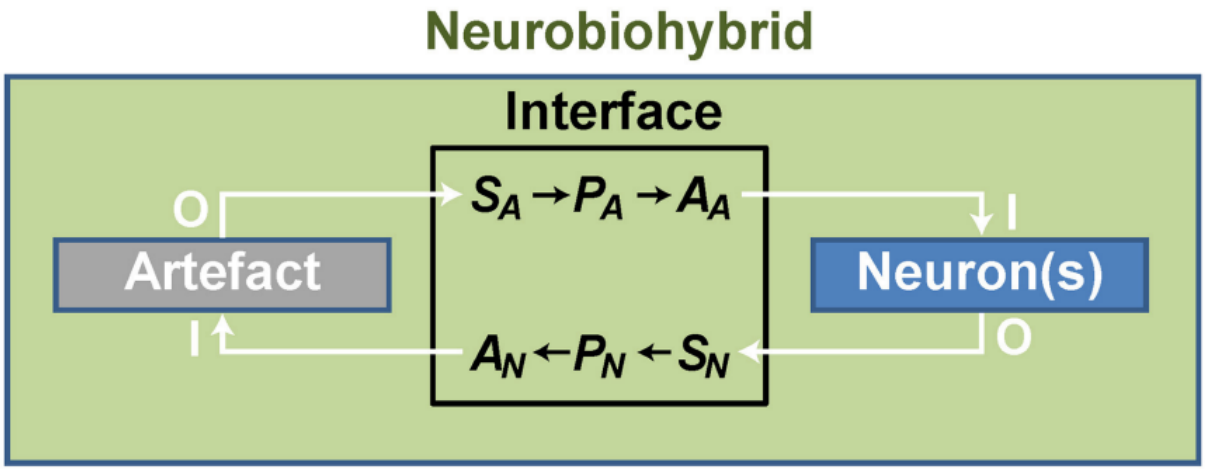


Figure 1.1 : Interactions entre les éléments composant un système neurobiohybride. Un système neurobiohybride est un système tripartite composé d'un artefact, de neuroens vivants et de l'interface permettant d'établir une connexion fonctionnelle entre les deux. L'interface est comporte différents éléments : des capteurs $S_{A/N}$ = Sensor element of the Artefact/Neuron(s), des unités de traitement de signal ($P_{A/N}$ = Processing unit of the Artefact/Neuron(s)) et des actionneurs ($A_{A/N}$ = Actuator of the Artefact/Neuron(s)). Figure issue de (Vassanelli & Mahmud, 2016a).

Au niveau de l'interface, il en existe une grande variété dans la littérature. Cette dernière permet un couplage physique entre les neurones vivants et l'artefact en transmettant des signaux, chimiques, magnétiques, lumineux ou électriques. Dans le cadre de nos travaux, nous nous intéresserons plus particulièrement au couplage électrique. De ce fait, l'architecture de l'interface doit s'adapter aux contraintes des neurones à interfacer de même qu'à la technologie de stimulation envisagée. *In vitro* comme *in vivo*, la forme et la technologie des interfaces varient selon le tissu à interfacer et l'objectif l'application visée pour le neurobiohybride.

1.1.3 La grande diversité de neurobiohybrides dans la littérature

La définition des neurobiohybrides est très large et recouvre une grande variété de systèmes différents. Les termes tels que « interface cerveau-machine », « interface cerveau-ordinateur », « neuroprothèse » et « implants neuronaux » se rapportent tous à des systèmes neurobiohybrides. Il semble exister une confusion entre certains termes rendant la recherche bibliographique plus complexe. Cette confusion symptomatique des difficultés inhérentes à la nature interdisciplinaire du domaine des neurotechnologies est probablement la raison qui a poussé Vassanelli et Mahmud à proposer une définition suffisamment large pour regrouper tous les termes en un seul : « les neurobiohybrides ». Entrent donc dans cette définition toutes les méthodes d'enregistrement et/ou de stimulation de neurones nécessitant une interface et impliquant un artefact, et ce quelle que soit leur nature. Une proposition de hiérarchisation des termes se rapportant aux neurobiohybrides est disponible en figure 1.2. D'après (Salahuddin and Gao, 2021), les systèmes neurobiohybrides peuvent être classés selon leur localisation spatiale (donc leur degré d'invasivité) ou leur application.

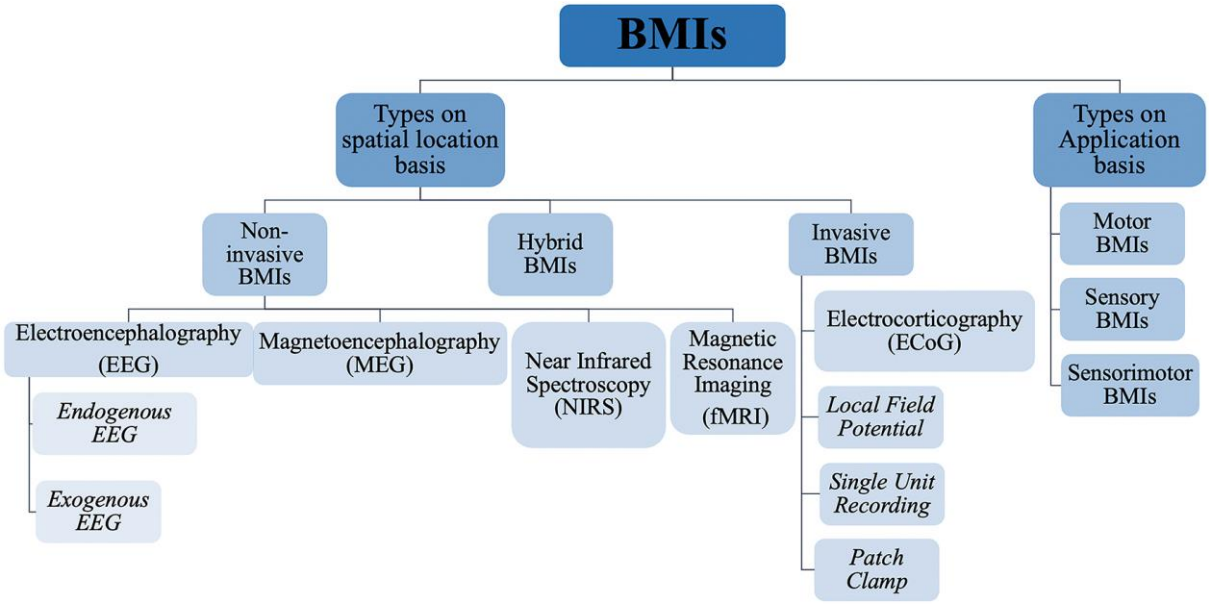


Figure 1.2 : Proposition de hiérarchisation des systèmes neurobiohybrides (= Brain-Machine Interfaces ; BMI). Différents types de neurobiohybrides peuvent être définis selon leur localisation spatiale ou leur application. Figure issue (Salahuddin & Gao, 2021).

1.2 La composante vivante des neurobiohybrides

La composante vivante des neurobiohybrides est constituée de neurones. Un neurone est une cellule spécialisée dans la transmission d'informations électrochimiques. Le phénotype général de ces cellules est présenté en figure 1.3. Il se caractérise par un corps cellulaire appelé soma où convergent de nombreux prolongements très ramifiés appelés dendrites, et d'où part un prolongement plus grand et généralement unique appelé axone. Les neurones établissent des connexions fonctionnelles entre eux et forment ainsi de vastes réseaux (Ludwig et al., 2023). Ces interactions sont réalisées par le biais de boutons synaptiques localisés à l'extrémité des axones et connectés aux dendrites ou au soma des neurones à exciter (dans le cas de synapses excitatrices) ou inhiber (dans le cas de synapses inhibitrices). Les dendrites reçoivent les informations transmises par les nombreux neurones présynaptiques et les transmettent au soma au niveau duquel se fera l'intégration des très nombreux messages, excitateurs et inhibiteurs, qui arrivent simultanément sur un même neurone. Certains neurones possèdent une gaine de myéline au niveau de l'axone, ayant pour effet d'accélérer la vitesse du transfert d'information (Stadelmann et al., 2019). Associés aux différents organes du corps, les neurones sont impliqués dans la majorité des fonctions biologiques (perception de l'environnement, régulation des sécrétions hormonales, mouvement…). On considère que le cerveau humain en compte approximativement 100 milliards (Herculano-Houzel, 2009).

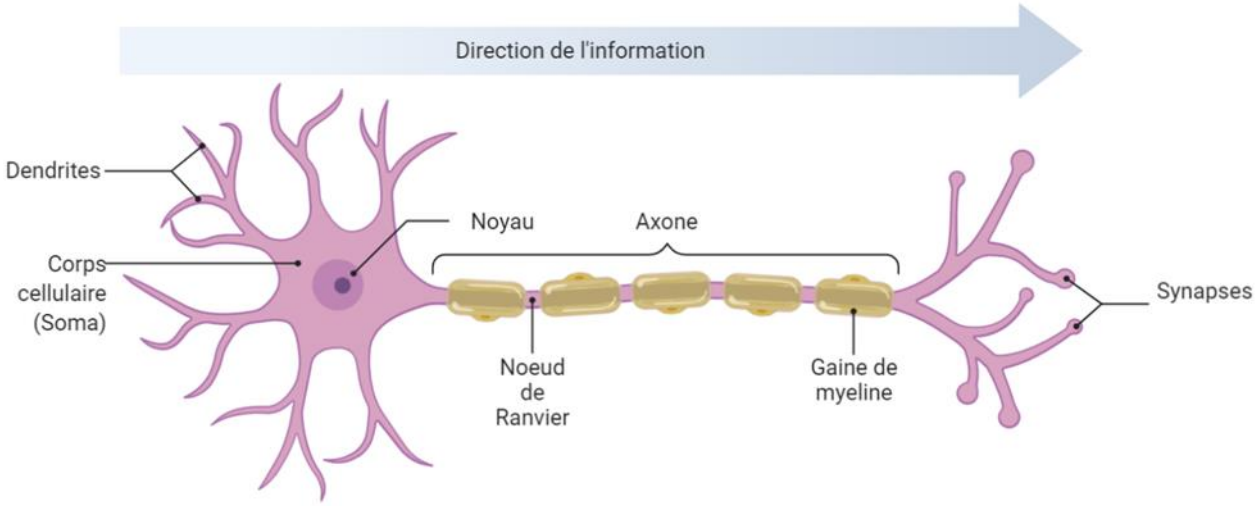


Figure 1.3 : Représentation schématique d'un neurone dont l'axone est enrobé dans une gaine de myéline. La gaine de myéline est discontinue. Chaque arrêt de la gaine est appelé « nœud de Ranvier », l'épaisseur de la gaine et l'espacement des nœuds définissent la vitesse de propagation des potentiels d'action (pour explications approfondies, voir Grider et al., 2023). Figure réalisée à l'aide du logiciel BioRender.com 2023.

L'activité électrique des neurones résulte de variations du potentiel de leur membrane. La membrane des neurones est une bicouche constituée de phospholipides isolant chimiquement et électriquement le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire (Lehninger, 1968). Cette membrane est rendue semi-perméable par la présence de protéines canaux transmembranaires qui permettent le transport sélectif d'ions contenus dans les milieux situés de part et d'autre de la membrane. L'ouverture des canaux peut être provoquée chimiquement par la fixation d'un neurotransmetteur (canaux ligand-dépendants, *cf.* figure 1.4.), physiquement par une modification du potentiel électrique à proximité de la protéine (canaux voltage-dépendants, *cf.* figure 1.4.) ou encore par une stimulation mécanique qui va étirer la membrane plasmique (canaux tension-dépendants) (Hille, 2001). Il existe également des canaux de fuite toujours ouverts permettant la diffusion passive d'ions selon leur gradient de concentration (les ions allant toujours du compartiment le plus concentré vers le compartiment le moins concentré selon le principe de l'équilibre osmotique ; *cf.* figure 1.4.). Au repos, la différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la membrane des neurones chez l'humain est maintenue à environ -70 mV grâce à une modulation fine par les protéines canaux des concentrations d'ions des milieux de part et d'autre de la membrane plasmique. L'intérieur de la cellule est ainsi plus négatif que l'extérieur (Merrill et al., 2005).

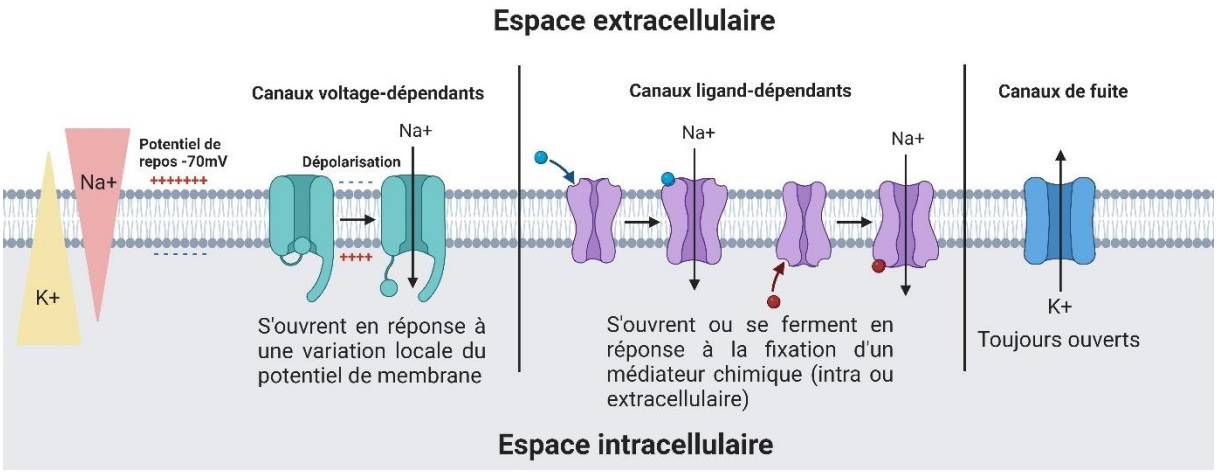


Figure 1.4 : Les différents types de canaux ioniques contribuant au maintien du potentiel de membrane des neurones et aux potentiels d'action. Les canaux voltage-dépendants (à gauche) s'ouvrent en réponse à une variation locale du potentiel de membrane survenant notamment au passage d'un potentiel d'action. Les canaux ligand-dépendants (au centre) s'ouvrent ou se ferment en réponse à la fixation d'un médiateur chimique. Les canaux de fuite (à droite) sont toujours ouverts. Figure réalisée à l'aide du logiciel BioRender.com 2023.

Lorsqu'un neurone en stimule un autre, il libère dans la fente synaptique des neuromédiateurs qui se fixent sur des sites récepteurs spécifiques, localisés soit directement sur des canaux ioniques dont ils vont moduler le degré d'ouverture, soit sur des protéines-récepteurs elles-mêmes directement ou indirectement couplées à des canaux ioniques. L'action directe des neuromédiateurs sur des canaux sodiques est illustrée en figure 1.4. Les canaux ainsi activés s'ouvrent et laissent alors entrer (ou sortir) des ions spécifiques à l'intérieur (ou à l'extérieur) de la cellule. Si ces phénomènes aboutissent à une entrée de cations dans la cellule, une dépolarisation transitoire et localisée de la membrane va se produire. Lorsque la dépolarisation atteint un certain seuil à la base de l'axone (aussi appelée cône d'émergence), un potentiel d'action est généré.

Le potentiel d'action est un signal de forme, d'amplitude et de durée fixes se propageant le long de l'axone. Son arrivée au niveau des boutons synaptiques provoque la libération de neuromédiateurs et donc la transmission ou la modulation d'information aux neurones suivants au sein d'un même réseau. L'entrée d'anions, ou la sortie de cations, va au contraire hyperpolariser la membrane et donc supprimer tout potentiel d'action.

La forme particulière du potentiel d'action résulte de l'ouverture successive de plusieurs canaux ioniques voltage dépendants. La forme générique d'un potentiel d'action est décrite en figure 1.5. La première phase est une dépolarisation de la membrane provoquée par une entrée massive d'ions Na^+ suite à l'ouverture des canaux sodiques voltage-dépendants. La deuxième phase est une repolarisation de la membrane provoquée par la fermeture des canaux sodiques, et l'ouverture retardée des canaux potassiques ce qui provoque une sortie d'ion K^+ (dans le sens de leur gradient de concentration). L'inertie de fermeture des canaux potassiques provoque une légère hyperpolarisation de la membrane à cause d'un excès d'ions K^+ ayant quitté la cellule. Immédiatement après l'émission d'un potentiel d'action, les canaux ioniques sont inactivés,

induisant une période réfractaire pendant laquelle les canaux inactivés ne peuvent pas contribuer au déclenchement d'un nouveau potentiel d'action. La période réfractaire garantit la direction du potentiel d'action (M. W. Barnett & Larkman, 2007).

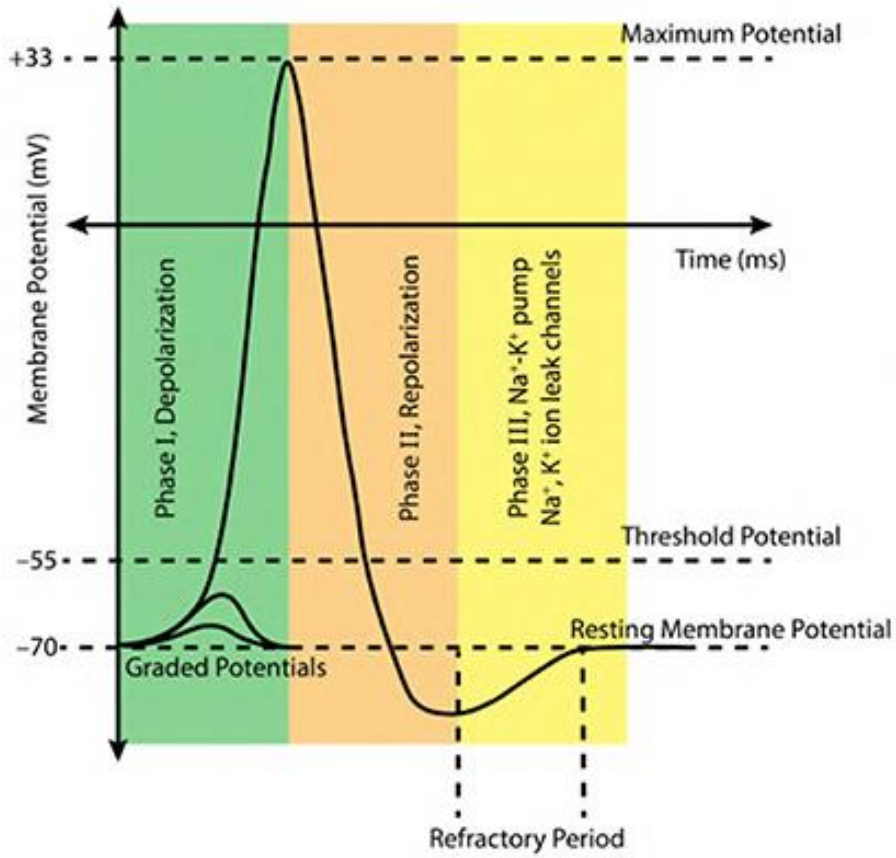


Figure 1.5 : Illustration des trois phases d'un potentiel d'action générique. La première phase correspond à la dépolarisation de la membrane neuronale due à une entrée massive de cations dans l'espace intracellulaire (principalement Na^+). La deuxième phase correspond à la repolarisation de la membrane neuronale due à une sortie massive de cations (principalement K^+). La troisième phase correspond au retour au potentiel de repos de la membrane. Une légère hyperpolarisation de la membrane due au délai de fermeture des canaux permettant la repolarisation est observée. Pendant la période réfractaire, les canaux ioniques sont inactivés et ne peuvent pas s'ouvrir pour initier de nouveaux potentiels d'action. Figure issue de (Sattigeri, 2020).

Les neurones sont donc des cellules électrogéniques dont les signaux peuvent être détectés par le biais d'électrodes. Le principal enjeu des interfaces neurobiohybrides est de permettre l'enregistrement et/ou la stimulation des potentiels d'action, ou trains de potentiels d'action (appelés « *bursts* » en anglais) générés par les neurones. Les contraintes auxquelles ces interfaces doivent répondre varient beaucoup selon le type de neurones ou le tissu interfacé. Le principal enjeu des neurobiohybrides consiste à trouver la meilleure interface pour permettre un enregistrement et une stimulation optimaux des neurones vivants sans nuire à leur physiologie, c'est-à-dire en permettant les conditions de leur survie *in vitro*/*ex vivo* ou *in vivo*. La forme et les composants de cette interface sont ainsi sélectionnés principalement selon les besoins du type cellulaire ou du tissu interfacé. Dans la section suivante, nous aborderons les

différentes interfaces permettant d'interfacer les composantes vivantes d'un système neurobiohybride.

1.3 Les interfaces neurobiohybrides

1.3.1 Les interfaces pour les cultures *in vitro*

Depuis la fin du XIXème siècle, il est possible de maintenir des cellules vivantes *in vitro* pendant des durées plus ou moins longues dans des conditions stériles avec des milieux et environnements strictement contrôlés reproduisant la physiologie des organismes dont elles proviennent. Les techniques de culture cellulaire varient selon les types cellulaires et leur origine (Verma et al., 2020). Ainsi, les cellules de mammifères, dont font partie les neurones et autres cellules électriquement actives qui nous intéresseront plus loin, peuvent être adhérentes à la boîte de culture ou bien pousser en suspension dans le milieu de culture. Concernant leur origine, elles peuvent :

- provenir de la dissociation d'un organe obtenu d'un être vivant, on parle alors de cultures primaires ; ces cultures sont considérées reproduire assez fidèlement une grande partie des caractéristiques pathophysiologiques du tissu/organe dont elles proviennent, mais elles contiennent souvent plusieurs types cellulaires et leur durée de vie est limitée dans le temps ;
- être issues de lignées établies, elles sont alors dotées de capacités de croissances quasi illimitées dans le temps, sous réserve d'entretien correct de la lignée ;
- être dérivées de cellules souches pluripotentes induites (ou *induced pluripotent stem cells*, iPSC) selon des protocoles stricts leur permettant d'acquérir un phénotype majoritaire (mais d'autres types cellulaires minoritaires peuvent également s'exprimer), leur durée de vie en culture est également limitée mais peut dépasser celle des cultures primaires dans certains cas.

Ces différents types de cultures en monocouche (c'est-à-dire que les cellules occupent toute la surface du dispositif de culture qui leur est alloué, mais ne se superposent pas) ou en suspension ont été largement utilisés en recherche fondamentale et préclinique. Des cultures plus complexes ont été développées à partir des années 1990, permettant de reproduire les interactions intercellulaires, inter-tissulaires et tridimensionnelles des organismes vivants : ce sont les cultures organotypiques (obtenues à partir d'une tranche d'organe maintenue en survie dans des conditions stériles avec un milieu et un environnement strictement contrôlés), les sphéroïdes ou organoïdes (qui reproduisent certains éléments des organes dont sont issues les cellules souches utilisées), ou encore les organes-sur-puces (organoïdes cultivés dans des dispositifs microfluidiques) (Verma et al., 2020). Seules les cellules électriquement actives (neurones, cellules neurosécrétrices, certaines cellules endocrines sécrétrices, cellules

musculaires), les tranches de cerveau ou les organoïdes dérivés de cellules électriquement actives présentent un intérêt pour les interfaces neurobiohybrides.

Les interfaces neurobiohybrides *in vitro* consistent en des réseaux de microélectrodes (*MicroElectrode Arrays*, ou MEA en anglais) sur lesquels les cellules sont maintenues en culture. Elles sont conçues afin de maintenir ces dernières dans des conditions les plus physiologiques possibles. Ainsi, les MEA sont des plateformes largement étudiées permettant de moduler l'activité électrique spontanée des neurones vivants ou pour permettre l'enregistrement simultané de signaux électriques d'un grand nombre de neurones individuels. Une grande variété d'approches existe, comme des dispositifs incluant des transistors à effets de champ (« *field-effect transistors* » ou FETs) (Kruskal et al., 2015), des microélectrodes d'or en forme de champignons (Ojovan et al., 2015) ou de micro-piliers (Spanu et al., 2020), des MEA transparents (Susloparova et al., 2021) ou encore des memristors (Mikhaylov et al., 2020). Un exemple de ce type de réseau d'électrodes est présenté en figure 1.6. Ce réseau d'électrodes permet d'enregistrer les courants membranaires transitoires provoqués par une stimulation extérieure au neurone. Afin de permettre un meilleur couplage avec la membrane des neurones, des travaux sont menés sur la forme des électrodes qui peuvent être plates ou bien tridimensionnelles (Geramifard et al., 2022) ainsi que sur la fonctionnalisation de surface (*cf.* Chapitre 2, §2.2.1.2 et §2.2.4.3).

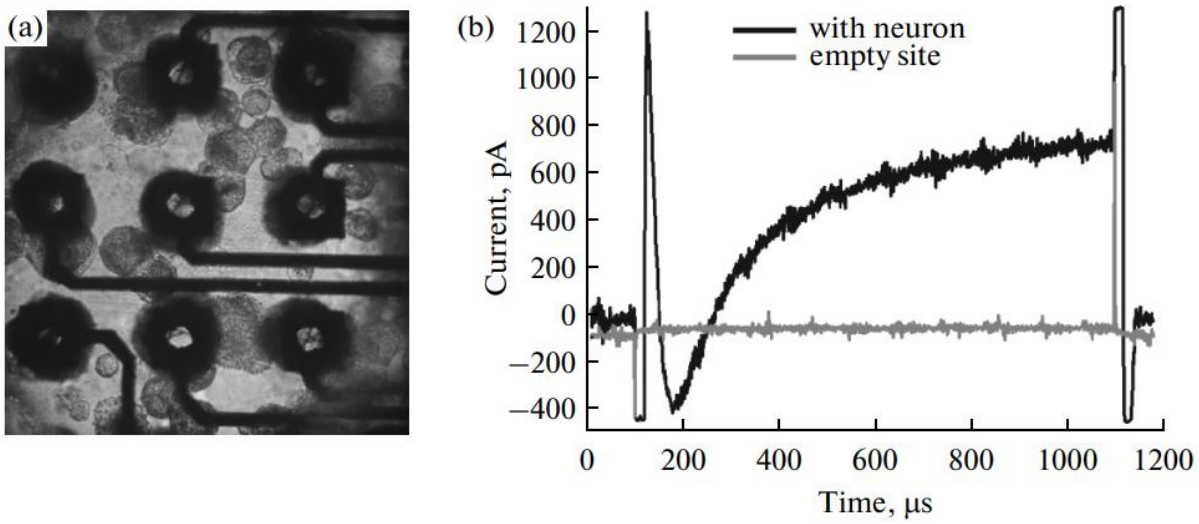


Figure 1.6 : Exemple d'enregistrement de courants transmembranaires transitoires provoqués par une stimulation externe. (A) Neurones d'escargots *Lymnaea stagnalis* cultivés sur un réseau de 60 microélectrodes en or plates. (B) En noir : le signal enregistré sur une électrode occupée par un neurone, en gris : le signal enregistré sur une électrode vide. Figure issue de (Rechkunov et al., 2015).

La conception des interfaces fait souvent appel à des techniques de microfluidique permettant de délivrer sélectivement des molécules d'intérêt comme illustré en figure 1.7. Dans cet exemple, les molécules à distribuer transitent par des canaux microfluidiques avant d'être appliquées aux cellules par le biais de nanotubes incorporés dans les électrodes. Ce système assure la distribution des molécules à des cellules uniques ce qui permet de ne pas affecter

directement l'ensemble de la culture. Le réseau d'électrodes permet aussi d'enregistrer l'activité électrique des cellules cultivées à leur surface. Un système microfluidique permet également de connecter de manière contrôlée des populations neuronales isolées par des canaux microscopiques (Bruno et al., 2020; Cardoso et al., 2023). Ces interfaces peuvent servir de plateformes pour la recherche fondamentale et/ou de support de développement de systèmes *in vivo*. Ces plateformes sont par exemple utilisées en pharmacologie pour évaluer le potentiel thérapeutique de molécules.

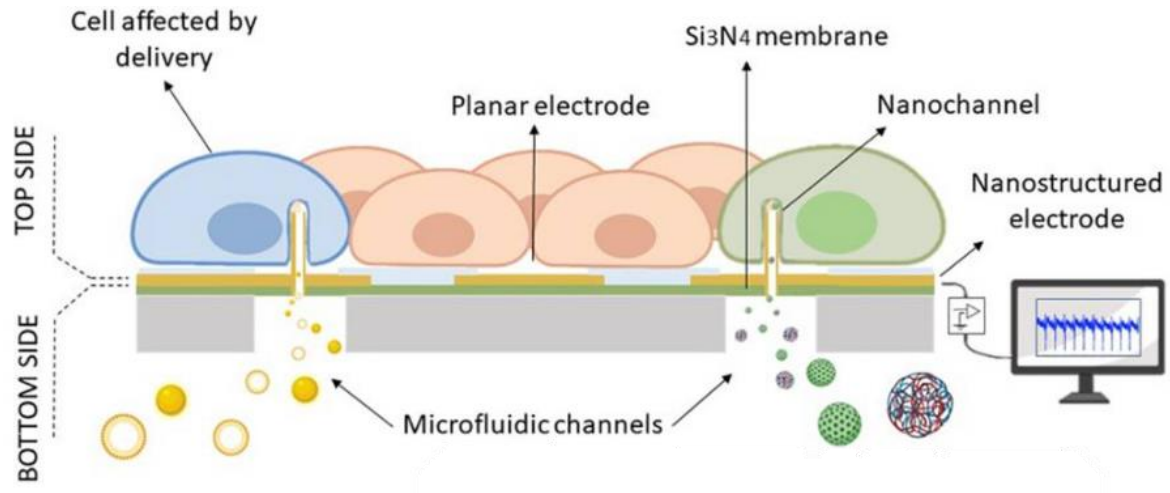


Figure 1.7 : Plateforme microfluidique permettant la distribution sélective de molécules d'intérêt à des cellules cultivées sur un réseau d'électrodes. Dans cet exemple, les cellules sont placées sur des électrodes plates équipées de nanocanaux reliés à des canaux microfluidiques. Ce type d'approche permet d'appliquer différents traitements en parallèle sur des cellules d'une même culture tout en enregistrant simultanément leurs activités électriques respectives. Figure issue de (Bruno et al., 2020).

1.3.2 Les interfaces pour le système nerveux *in vivo*

Sur le plan anatomique, le système nerveux comprend le système nerveux central et le système nerveux périphérique. Le système nerveux central (SNC) correspond à l'encéphale (constitué du cerveau, du cervelet et du tronc cérébral) et à la moelle épinière. Le système nerveux périphérique (SNP) se réfère à toutes les structures nerveuses n'appartenant pas au SNC, nerfs crâniens, spinaux, périphériques, sensitifs, moteurs, et ganglions (Mai & Paxinos, 2011). Il existe une très grande variété d'interfaces, plus ou moins invasives en fonction des applications visées. Selon le degré de pénétration dans le corps humain et/ou l'organe ciblé, les interfaces sont dites invasives, semi-invasives ou non invasives (Peksa & Mamchur, 2023). A titre d'exemple, plusieurs interfaces invasives sont présentées en figure 1.8. Selon le tissu à interfacer, la forme, la taille et le nombre d'électrodes varient. Pour un même tissu ou une même application, il peut exister différentes formes d'électrodes. Une distinction peut être faite entre les interfaces permettant d'interfacer le système nerveux périphérique et celles permettant d'interfacer le système nerveux central en raison de la différence de la morphologie des tissus et de la complexité pour accéder au site d'implantation.

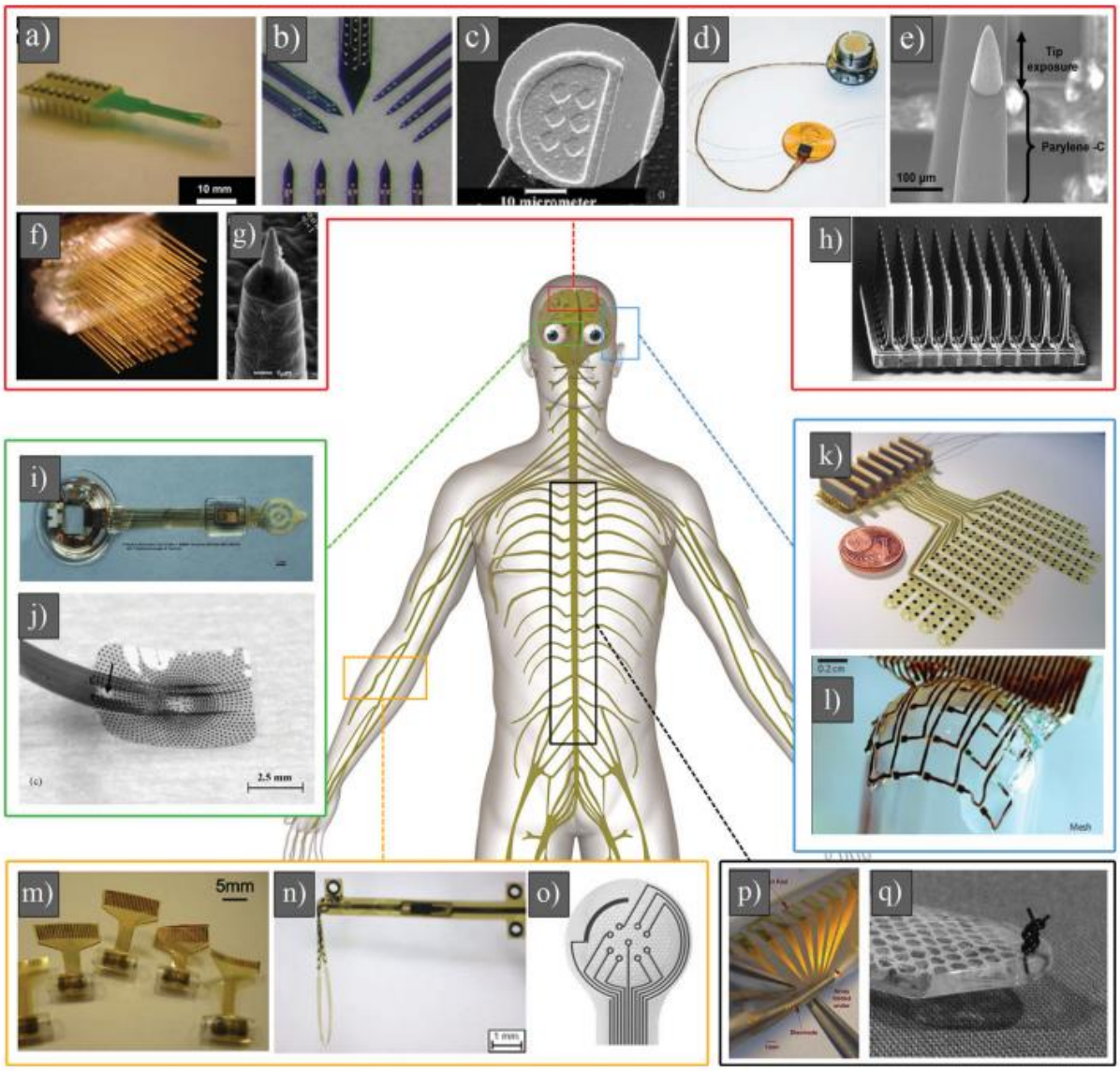


Figure 1.8 : La grande variété des interfaces invasives dans la littérature. Il existe des réseaux d'électrodes pour les structures corticales (a, b, c, d, f, g, h, k et l), pour la rétine (i et j), pour le système nerveux périphérique (m, n et o) et pour la moelle épinière (p et q). Figure issue de (Fattahi et al., 2014).

1.3.2.1 Les interfaces pour le Système Nerveux Périphérique

Les interfaces pour le SNP sont conçues en fonction de la morphologie des nerfs à interfacer. Les nerfs sont des faisceaux d'axones issus de différents neurones. En plaçant une interface au niveau des nerfs, il est donc possible d'enregistrer ou stimuler directement l'activité électrique des neurones les constituant. Ces interfaces peuvent prendre différentes formes et sont regroupées en différentes catégories selon qu'elles sont invasives (c'est-à-dire implantées au cœur de la structure biologique), semi-invasives (c'est-à-dire implantées à la surface de la structure biologique elle-même localisée dans le corps), ou non-invasives (c'est-à-dire placées à l'extérieur du corps, par exemple à la surface de la peau), et selon leur spécificité (Adewole et al., 2016). Comme le montre la figure 1.9., les stimulations transcutanées et percutanées

permettent de stimuler à travers les tissus. Elles sont donc peu invasives car elles ne nécessitent pas d'implantation profonde mais également peu spécifiques car elles vont stimuler indistinctement tous les éléments du système nerveux présents dans le rayon d'action de l'interface (Scarpelli et al., 2020).

Les interfaces semi-invasives sont constituées de stimulateurs enroulés autour des nerfs (*cf*. figure 1.9) et mettent en jeu des électrodes extra neurales, par exemple en forme de menottes entourant le nerf (Naples et al., 1988). Ces dernières présentent l'avantage de préserver le nerf lors de l'implantation tout en étant plus spécifiques que celles des stimulateurs non invasifs décrits précédemment.

Enfin, les méthodes de stimulations invasives emploient des électrodes intra neurales placées au cœur des nerfs. Ainsi, les électrodes régénératrices ou électrodes à tamis prennent la forme de filets et sont implantées directement dans les nerfs en les sectionnant de telle sorte que lors de leur régénération, les axones du nerf passent au travers des trous de l'électrode (Kawada et al., 2004). Les interfaces intra-fasciculaires pénètrent à l'intérieur du faisceau d'axones composant le nerf : (i) à l'aide d'électrodes en forme d'aiguilles (McDonnall et al., 2004), (ii) d'électrodes longitudinales (L.-J. Li et al., 2005), ou bien (iii) d'électrodes transversales (Boretius et al., 2010).

Chacune de ces électrodes présente des caractéristiques différentes, notamment en terme de seuil d'activation, les électrodes les plus invasives permettant une activation plus efficace des nerfs (Badia et al., 2011).

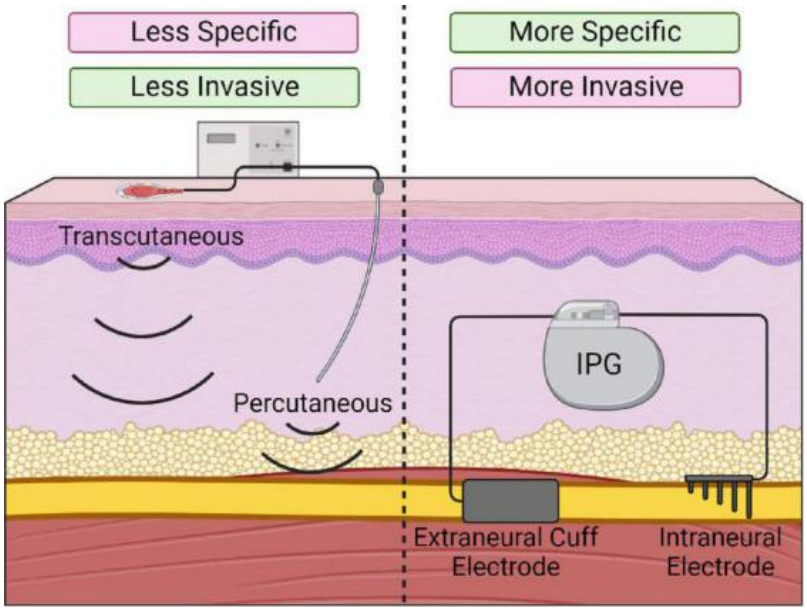


Figure 1.9 : Les différents types d'interfaces pour la stimulation du système nerveux périphérique. La spécificité de la stimulation dépend de la distance séparant l'électrode du tissu neural cible. Les électrodes transcutanées et percutanées permettent d'appliquer au tissu cible des impulsions électriques issues d'un générateur externe. Des électrodes plus invasives associées à un générateur d'impulsions implanté (IPG = *Implanted Pulse Generator*) permettent une plus grande spécificité de stimulation. Figure issue de (Dorrian et al., 2023).

1.3.2.2 Les interfaces pour le Système Nerveux Central

Les interfaces invasives à destination du SNC doivent répondre à des contraintes plus poussées que les interfaces du SNP en raison de la morphologie différente des tissus et de la plus grande difficulté à accéder au site d'implantation : il faut en effet qu'elles passent au-delà de la boîte crânienne ou de la colonne vertébrale, et parfois qu'elles atteignent des structures sous-corticales profondes. En raison de l'organisation des neurones au sein du système nerveux central (et plus particulièrement dans le cas du cerveau), une interface implantée ne stimulera donc pas uniquement les axones comme les interfaces périphériques, mais elle impactera également les corps cellulaires des neurones localisés au voisinage de l'électrode (Brocker & Grill, 2013) ainsi que le réseau des neurones connectés aux neurones ciblés par le stimulateur, que l'on appelle le connectome (Horn & Fox, 2020). Cette différence neuroanatomique implique d'adapter davantage l'interface au tissu cible pour optimiser le couplage électrique entre les neurones et les électrodes, même si certaines architectures des surfaces de contact des électrodes peuvent être transposées du SNP au SNC.

Les interfaces pour le SNC sont donc souvent des réseaux de microélectrodes conçus selon la même logique que les interfaces du SNP. Leur architecture varie toutefois selon la localisation plus ou moins profonde (corticale *versus* sous-corticale) des neurones ciblés et la morphologie de la structure nerveuse à interfacer (Jiang et al., 2022), notamment pour la cochlée ou la rétine dont l'organisation des tissus impose une conception très spécifique qui sera détaillée plus loin. Il existe également des stimulateurs/enregistreurs non invasifs pour le SNC, comme la stimulation magnétique transcrânienne qui ne seront pas développés ici.

Il est possible de classer les électrodes à destination du SNC en deux catégories : pénétrantes sous forme de pointes (Nanivadekar et al., 2019) et non pénétrantes sous forme plates (Gaunt et al., 2011). Les électrodes pénétrantes présentent un meilleur rapport signal/bruit lors de l'enregistrement que les électrodes non-pénétrantes, cependant leur contact étroit avec le tissu en raison de leur forme dégrade l'interface sur le long terme (Kashkoush et al., 2019). A titre d'exemple, la forme des électrodes spinales est à adapter en fonction de la position et de la profondeur des neurones cibles à interfacer ; la variété de ce type d'interfaces est illustrée en figure 1.10. Les implants interfaçant la moelle épinière, ou implants spinaux, peuvent cibler différentes structures selon l'objectif thérapeutique visé. Pour enregistrer des signaux sensoriels, le réseau d'électrodes doit être placé au niveau de la colonne dorsale de la moelle épinière ou de sa racine dorsale, ou encore des tractus spinothalamiques (qui véhiculent des informations sensitives de la moelle épinière vers le thalamus). Les informations motrices transitent quant à elles par les tractus corticospinaux et les racines ventrales de la moelle épinière. Les mêmes types de réseaux de microélectrodes que ceux employés pour l'interfaçage de la moelle épinière sont employés pour interfacer la surface du cortex. Il existe également des réseaux de microélectrodes spécifiques pour l'interfaçage avec les neurones de la cochlée (oreille interne) ou les neurones rétiniens.

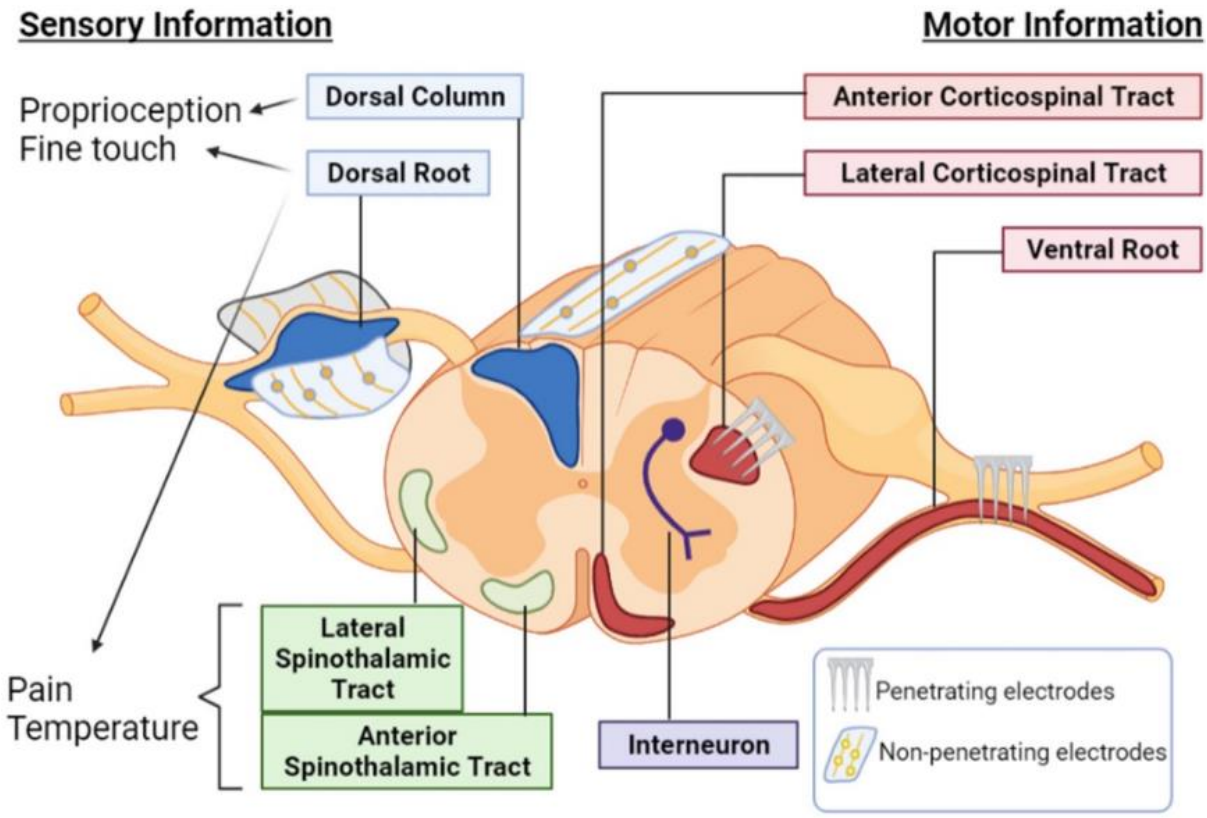


Figure 1.10 : Variété des électrodes spinales semi-invasives et invasives. Parmi les électrodes spinales semi-invasives, notez les électrodes de stimulation électrique épidurale (*Epidural Electric Stimulation*, ou EES en anglais) apposées au-dessus de la colonne dorsale de la moelle épinière, utilisées pour la stimulation motrice comme exposé au §1.6.6. Figure issue de (Jiang et al., 2022).

L'interfaçage avec des structures sous-corticales (aussi appelées structures intraparenchymiennes) est nécessairement invasif. C'est le cas rencontré notamment dans la stimulation cérébrale profonde (*Deep Brain Stimulation,* ou DBS en anglais), une technique de neurostimulation développée initialement pour réduire la symptomatologie motrice dans la maladie de Parkinson et détaillée plus loin (*cf.* Chapitre 1, §1.6.5. p.22). Les interfaces invasives commercialisées pour la DBS sont toutes conçues selon le même principe : les plots de contact sont placés au bout d'une tige cylindrique insérée dans le cerveau jusqu'à la région sous-corticale à interfacer comme présenté en figure 1.11. Les plots de contact sont des anneaux métalliques permettant d'enregistrer/stimuler les tissus vivants placés à la surface de la tige. Ils peuvent en faire le tour (ou non) et plusieurs anneaux sont répartis sur la surface de la tige (Frey et al., 2022). La manière dont sont organisées et architecturées les électrodes influence la portée de la stimulation au niveau de la structure ciblée (Butson and McIntyre, 2006).

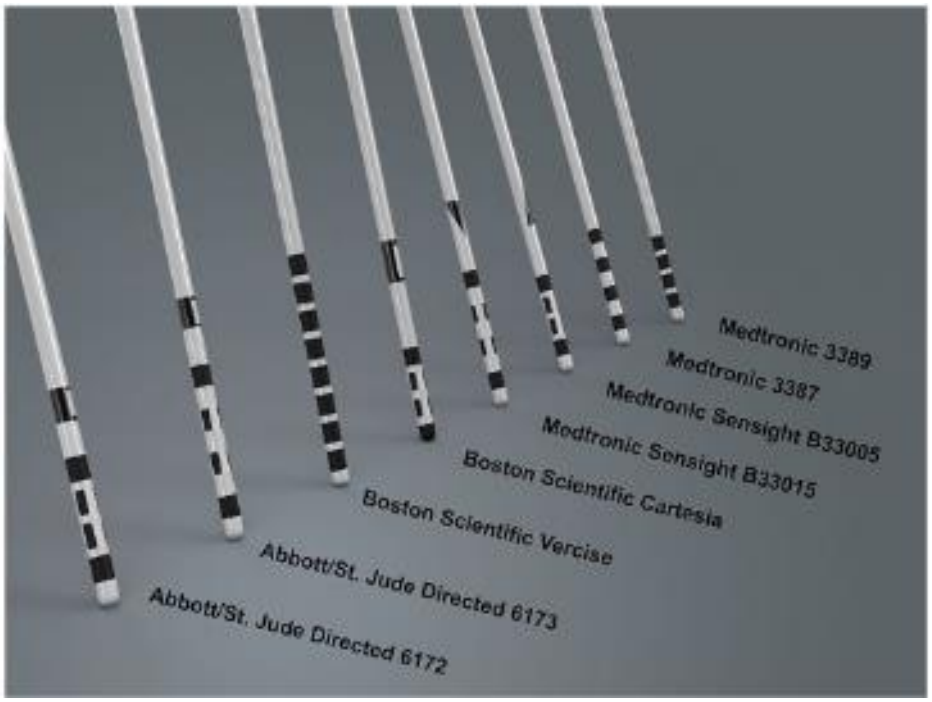


Figure 1.11 : Les différentes électrodes sous-corticales de stimulation cérébrale profonde actuellement disponibles sur le marché. Les surfaces de contact permettant de stimuler correspondent aux parties noires. La tige blanche sert de support aux plots métalliques et contient la connectique permettant de relier tous les éléments du neurobiohybride. Figure issue de (Frey et al., 2022).

1.4 L'artefact neurobiohybride

L'artefact est composé principalement d'un ensemble d'équipements électroniques et informatiques permettant de traiter les signaux enregistrés et/ou de générer des signaux de stimulation par le biais de l'interface. L'organisation des éléments qui la composent est très souvent similaire. Une partie « *analog-front-end* » fonctionne de manière analogique et comporte un amplificateur dont le rôle est d'augmenter l'intensité des signaux enregistrés le plus tôt possible dans la chaîne d'enregistrement. Les signaux sont ensuite convertis au format numérique puis traités par un logiciel présent sur un ordinateur et intégrant parfois une intelligence artificielle, un FPGA (*Field Programmable Gate Array*, circuit intégré standard programmable) ou un processeur. Ces unités de traitement requièrent un stockage de données et une source d'alimentation. Les signaux qui servent à la stimulation des éléments biologiques sont également générés à l'aide d'ordinateurs, de FPGA ou de processeurs. Ils sont convertis au format analogique avant d'être envoyés aux neurones à stimuler (Denison et al., 2007; Greenwald et al., 2016).

Un schéma présentant l'organisation des différents composants de l'artefact et leurs interactions avec l'interface et les neurones est disponible en figure 1.12. Les signaux émis par des neurones vivants sont enregistrés par le biais de l'interface et sont traités par l'artefact. Les signaux sont amplifiés par un Amplificateur Faible Bruit (AFB) puis sont convertis au format

numérique par un Convertisseur Analogique-Digital (CAD). Une unité de Traitement de Signal Numérique (TSN) permet d'identifier les signaux pertinents dans le spectre enregistré et communique les informations pertinentes par un Transmetteur (TX). Cette unité de traitement numérique du signal pilote un Stimulateur (Stim) capable de générer des signaux qui sont appliqués aux neurones par le biais de l'interface. L'artefact peut donc enregistrer et/ou stimuler au travers de cette chaîne de traitement de l'information.

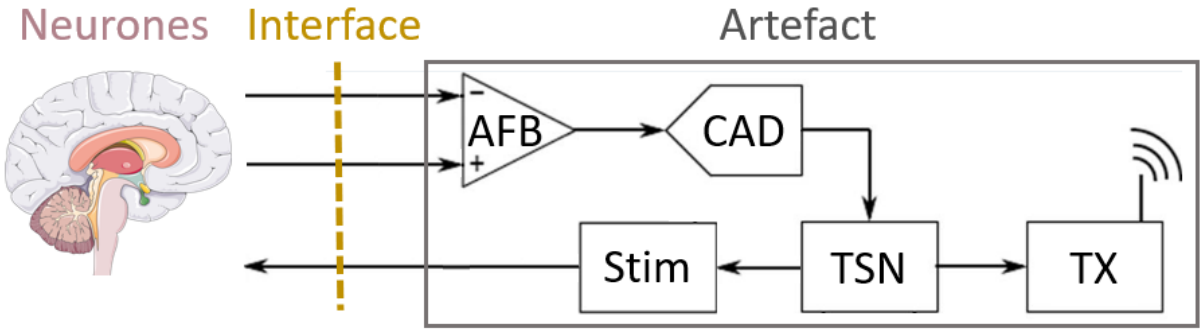


Figure 1.12 : Définition de l'artefact - Représentation schématique de la chaîne d'acquisition et de stimulation d'un neurobiohybride. Les signaux neuronaux enregistrés par le biais de l'interface sont amplifiés à l'aide d'un amplificateur à faible bruit (AFB). Les signaux sont ensuite numérisés par un convertisseur analogique/digital (CAD) puis analysés par une unité de traitement de signal numérique (TSN) connectée à un générateur de signaux électriques stimulateurs (Stim). Un système de transmission (TX) permet de piloter l'unité TSN. Figure adaptée de (Greenwald et al., 2016).

Nous avons défini dans la première partie de ce chapitre les trois éléments composant un système neurobiohybride complet. Nous présenterons dans la section suivante l'origine des premiers appareils se rapportant à cette technologie.

1.5 L'émergence des neurotechnologies : de « *l'électricité animale* » aux premiers implants neurobiohybrides

1.5.1 Contribution des physiciens Volta et Galvani

Les neurotechnologies se réfèrent à l'ensemble des systèmes, applications et méthodes employées pour détecter ou influencer l'activité neuronale (Valeriani et al., 2022). Les premières tentatives d'utilisation de l'électricité pour traiter des affections du système nerveux remontent à l'Antiquité chez les Romains et les Grecs qui employaient des poissons électriques pour délivrer des décharges soulageant la douleur de manière empirique (Tsagkaris et al., 2023). Ce n'est qu'au XVIIIème siècle que les bases théoriques de la stimulation électrique du système nerveux (ou neurostimulation) sont posées grâce aux travaux de deux physiciens italiens : Alessandro Volta et Luigi Galvani. Luigi Galvani est connu pour avoir été le premier à identifier la nature électrique des signaux biologiques en provoquant la contraction de muscles de grenouilles en les faisant entrer en contact avec différents métaux. En se basant sur les travaux

de Galvani, Alessandro Volta comprit que l'origine de la contraction provenait de la nature des métaux employés et non du tissu en lui-même. Ses recherches aboutirent à la création de la première pile électrochimique et ouvrirent la porte d'un nouveau domaine d'étude pour les neurosciences en posant les premières bases de l'électrophysiologie (Isler, 1992).

1.5.2 Premiers essais de stimulation électrique du système nerveux comme approche thérapeutique

L'accumulation progressive des connaissances en électrophysiologie a mené aux premières applications médicales de stimulations électriques par Giovanni Aldini, connu pour avoir traité par électrochocs des patients victimes de troubles de la personnalité au XVIIIème siècle. Ses travaux ont été à la base de traitements par électrothérapie développés à partir du XIXème siècle (Parent, 2004). En 1934, l'électroconvulsivothérapie a été introduite comme pratique de traitement psychiatrique permettant de soigner la schizophrénie et les troubles affectifs en provoquant des convulsions chez les patients (Rosenquist & McCall, 2003). Cette approche a été remplacée par des approches médicamenteuses entre les années 1950 et 1960 avant d'être employée à nouveau uniquement chez les patients résistants aux traitements pharmacologiques. Ces traitements toutefois controversés reposaient largement sur des expérimentations empiriques (Fink, 2001). Des tentatives pour traiter les douleurs chroniques ont également été réalisées dans le courant des années 1950 par stimulation de différentes cibles sous-corticales, sans grand succès (Hariz et al., 2010).

1.5.3 Les premiers neurobiohybrides à visée thérapeutique

Sur cette même période, des tentatives de stimulation cérébrale ont été menées par un scientifique espagnol nommé José Manuel Rodriguez Delgado. Ses travaux l'ont mené à inventer une machine portative permettant de stimuler et recevoir des ondes électroencéphalographiques appelée « Stimocepteur » qui a été utilisée pour stimuler diverses régions du cerveau, contribuant ainsi largement à enrichir les connaissances dans le domaine (Lorusso et al., 2022). Ce scientifique est également connu pour ses tentatives de contrôle de l'esprit par stimulation du cerveau (Delgado, 1969). La version moderne de la stimulation cérébrale profonde découle des observations d'Alim-Louis Benabid et de son équipe à Grenoble dans les années 1980 lors d'interventions neurochirurgicales destinées à soulager les symptômes moteurs de patients parkinsoniens ou atteints de dystonie, et résistants à la DOPA-thérapie conventionnelle, par ablation de la zone cérébrale en cause. Pour identifier avec certitude la zone à retirer, les neurochirurgiens la stimulaient électriquement pendant l'intervention. Cette pratique a permis de constater que des stimulations à haute fréquence de différentes régions sous-corticales réduisaient les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson. Ce constat a été le point de départ de plusieurs essais cliniques de stimulation cérébrale profonde pour la maladie de Parkinson (Benabid et al., 1987; Gardner, 2013). Suite à

ce succès, la stimulation cérébrale profonde a été largement adoptée en médecine, et ses applications se sont étendues à d'autres contextes pathologiques comme le tremblement essentiel, l'épilepsie, les syndromes dépressifs ou la douleur chronique réfractaire (Hariz et al., 2010; Sugiyama et al., 2015). Cette technique neurochirurgicale fait actuellement l'objet d'investigations dans le cadre d'autres indications thérapeutiques telles que les troubles de l'humeur ou la schizophrénie, avec toutefois des effets plus limités ; l'apport des technologies émergentes dans ce domaine pourrait cependant contribuer à l'amélioration des systèmes de stimulation cérébrale profonde actuels et ainsi permettre d'accroître le potentiel thérapeutique de cette méthode de neurostimulation (Cagnan et al., 2019).

1.6 Quelques exemples d'implants unidirectionnels

Au XXIème siècle, les implants neurobiohybrides sont devenus des outils thérapeutiques efficaces pour permettre de traiter les symptômes de diverses affections du système nerveux. De nombreux exemples de systèmes unidirectionnels permettent de répondre à une grande variété de conditions pathologiques bien que leur efficacité soit encore limitée. Nous aborderons dans cette section quelques exemples de systèmes neurobiohybrides complets fonctionnant de manière unidirectionnelle. Les plus emblématiques de ces systèmes unidirectionnels, notamment en termes d'impact thérapeutique et d'amélioration de la qualité de vie des patients, ont été choisis pour illustrer les différentes tendances recensées dans la littérature à ce jour.

1.6.1 Implants cochléaires

Les implants cochléaires sont utilisés pour restaurer l'audition. Leur principe consiste à stimuler directement le nerf auditif présent dans la cochlée à l'aide d'un réseau d'électrodes implanté, ce sont donc des implants invasifs selon la dénomination précisée au paragraphe 1.3.2. Dans des conditions physiologiques, la stimulation du nerf auditif est réalisée par les cellules ciliées. Les cils de ces cellules servent d'antennes au son. Plus les cellules sont localisées au fond de la cochlée, plus la taille des cils est faible, permettant ainsi à ces cellules de capter des sons de plus hautes fréquences donc plus aigus. Chaque son résulte en une stimulation locale du nerf auditif, ce qui permet au cerveau d'interpréter les signaux en sons de différentes fréquences. Au cours de la vie d'un individu, ces cellules ciliées peuvent se retrouver lésées à la suite d'une trop forte exposition au bruit ou avec l'âge. Elles n'assurent alors plus leur rôle d'antennes et ne peuvent plus stimuler correctement le nerf auditif sous-jacent (Ades & Engström, 1974). Dans un contexte de perte auditive, le réseau d'électrodes implanté permet de contourner ces cellules lésées et de stimuler directement et localement le nerf auditif. Les sons de l'environnement sont captés par un micro extérieur puis un processeur sélectionne les électrodes à partir desquelles les signaux stimulateurs devront être envoyés à l'aide d'un

algorithme embarqué. Les signaux stimulateurs sont interprétés par le cerveau de la même manière que si la stimulation avait été réalisée par les cellules ciliées. La variété de fréquences audibles est conditionnée par le nombre d'électrodes que comporte l'implant. Ce type d'implant est déjà largement commercialisé et plusieurs entreprises vendent des systèmes reposant sur le même principe (Lenarz, 2018).

1.6.2 Implants rétiniens

Les implants rétiniens visent à pallier les symptômes des maladies oculaires affectant la qualité de la vision. Parmi ces affections, la dégénérescence maculaire liée à l'âge, une maladie chronique évolutive caractérisée par la dégénérescence de la zone centrale de la rétine, présente la prévalence la plus élevée parmi les populations âgées des pays développés (Vyawahare & Shinde, 2022). Les implants rétiniens fonctionnent selon un principe similaire à celui des implants cochléaires. En conditions physiologiques, la lumière dans le champ de vision est focalisée et projetée sur la rétine par le cristallin. La rétine est tapissée de cellules photoréceptrices permettant de capter la lumière et de stimuler des neurones situés sous la rétine lorsqu'un rayon lumineux les atteint. Il existe plusieurs types de photorécepteurs : les cônes permettant de détecter les couleurs (divisés en trois catégories pour l'humain) et les bâtonnets servant à déterminer l'intensité lumineuse. Chaque cellule ainsi activée va stimuler localement des neurones du nerf optique. Le cortex visuel du cerveau centralise toutes les stimulations unitaires et reconstruit une image à partir de ces informations (Mahabadi & Al Khalili, 2023). Dans le cas d'une dégénérescence maculaire liée à l'âge, les cellules photoréceptrices deviennent progressivement inefficaces et ne peuvent plus stimuler les neurones ganglionnaires chargés de transmettre l'information au cerveau via le nerf optique (Vyawahare & Shinde, 2022). Le principe des implants rétiniens consiste à apposer au niveau de la rétine un réseau de microélectrodes qui viendra stimuler localement les neurones sous-rétiniens en passant outre les photorécepteurs lésés. Les images à transmettre au cerveau sont captées par une caméra (souvent placée sur des lunettes) puis encodées par un processeur embarqué. Le cerveau utilise alors ces informations pour reconstruire une image dont la précision dépend du nombre d'électrodes (Chenais et al., 2021; Palanker et al., 2022).

1.6.3 Implants du système nerveux périphérique

1.6.3.1 Implants pour le contrôle de prothèses robotiques

Les implants permettant de contrôler des dispositifs robotiques font souvent appel à des interfaces périphériques unidirectionnelles. Dans leur étude, (Vu et al., 2020) ont permis à quatre patients amputés d'un bras de contrôler une main artificielle. Les signaux moteurs ont été enregistrés à l'aide d'un ensemble d'interfaces régénératrices implantées dans les nerfs ulnaire, médian et radial résiduels. Les signaux sont transmis à un processeur neural capable de filtrer les signaux neuronaux des signaux musculaires. Les données filtrées sont ensuite

transmises à un programme MATLAB sur ordinateur capable de piloter la main artificielle en fonction des signaux enregistrés.

1.6.3.2 Implants pour restaurer la sensation de toucher

Il existe également des implants utilisés pour restaurer la sensation de toucher. Ces implants consistent souvent à stimuler le système nerveux périphérique à l'aide d'électrodes en forme de menottes enroulées autour des nerfs. Ces implants permettent principalement à des patients ayant perdu un de leur membre de retrouver la sensation de toucher au niveau de l'extrémité de leur prothèse, en stimulant le nerf dès que le capteur de pression est activé (Shlomy et al., 2021). Ce type d'implant améliore le contrôle des prothèses par l'implémentation d'une première forme de boucle de rétroaction (J. A. George et al., 2019).

1.6.3.3. Implants résorbables pour préserver l'activité électrique de nerfs périphériques lésés

Le traitement des lésions sévères des nerfs périphériques a longtemps impliqué des stimulations électriques peropératoires (*i.e.* réalisées durant l'intervention chirurgicale permettant la réparation du nerf lésé). Le bénéfice thérapeutique de protocoles de stimulation étendus au-delà de cette courte fenêtre d'intervention chirurgicale a été établi chez le rat. Ainsi, les équipes de Wilson Z. Ray et John A. Rogers, de l'université médicale de Washington à Saint Louis (USA) ont créé un implant de stimulation biorésorbable sans fil (*wireless*) permettant de délivrer une stimulation électrique monophasique post-opératoire, à raison d'une heure par jour pendant six jours (Koo et al., 2018). Le dispositif utilisé est constitué d'un ruban d'électrodes enroulé autour du nerf lésé et d'une antenne réceptrice de radiofréquences de petite taille implantée à proximité en position sous-cutanée, ce qui permet d'alimenter et de contrôler l'implant à l'aide d'un transmetteur extérieur. L'ensemble de ce dispositif se résorbe en 4 à 8 semaines après l'implantation. Ce protocole appliqué chez des rats dont le nerf sciatique avait été sectionné expérimentalement a permis une nette amélioration de la régénération nerveuse après chirurgie.

1.6.4 Implants corticaux

1.6.4.1 Implants pour l'épilepsie

Plusieurs implants corticaux ont été développés pour des applications dans le cadre de l'épilepsie. Certaines interfaces corticales permettent en effet d'anticiper la survenue d'une crise d'épilepsie en enregistrant l'activité électrique cérébrale. Le but de ce type d'implants d'enregistrement est de permettre à l'individu de se préparer à la survenue d'une crise. Il a été démontré qu'à l'aide d'enregistrements chroniques des signaux corticaux, une crise pouvait être anticipée avec une très grande fiabilité quelques heures en avance. Dans certains cas, les crises ont pu être anticipées jusqu'à trois jours en avance (Proix et al., 2021). D'autres interfaces

corticales stimulatrices ont quant à elles été développées pour prendre en charge certains cas d'épilepsie focale réfractaire aux traitements médicamenteux disponibles (Foutz & Wong, 2022; Schulze-Bonhage et al., 2023). Les bénéfices thérapeutiques sont étroitement liés aux caractéristiques anatomiques du réseau neuronal épileptogène (épilepsie restreinte à un ou plusieurs foyer(s) épileptique(s) localisé(s) *versus* épilepsie généralisée, voire épilepsie focale et généralisée concomitantes) ainsi que des cibles neuroanatomiques choisies pour la stimulation. Certaines cibles peuvent d'ailleurs être sous-corticales et la stimulation cérébrale profonde développée plus bas a été approuvée dans cette indication thérapeutique.

1.6.4.2 Implants pour la restauration de la parole

Les interfaces corticales ont également été utilisées pour restaurer un usage de la parole chez des personnes incapables de vocalisation (Denby et al., 2010). Dans leur étude, les auteurs ont enregistré les signaux issus du cortex sensorimoteur du patient à l'aide d'un réseau de microélectrodes implanté à sa surface. Les chercheurs ont entrainé un algorithme à reconnaitre les schémas d'activité électrique corticale de sorte qu'il puisse les associer à des mots. Cet entrainement a été réalisé en demandant au patient de formuler mentalement une liste de mots prédéterminée. Au terme de leur étude, après 50 sessions réparties sur 81 semaines, le système permettait au patient de communiquer avec une précision de 98% (Moses et al., 2021). Jusqu'à très récemment, les implants les plus performants permettent au patient de communiquer à une vitesse d'environ 60 mots par minute (Willett et al., 2023), un dialogue conversationnel classique étant réalisé à une vitesse d'environ 150 mots par minute (Chang & Anumanchipalli, 2020). Fin août dernier, deux articles parus concomitamment dans le journal *Nature* font état d'implants corticaux permettant d'atteindre la vitesse de 62 et 78 mots par minute respectivement (Metzger et al., 2023; Willett et al., 2023). Les performances accrues de ces implants permettant la communication reposent sur le recours à des algorithmes de traitement du signal de plus en plus sophistiqués et entraînés.

1.6.4.3 Implants corticaux permettant de contourner des lésions nerveuses périphériques

Il peut parfois être compliqué voire impossible d'interfacer le système nerveux périphérique. Cela peut être le cas lorsque les nerfs sont endommagés et ne peuvent plus transmettre d'information jusqu'au cerveau. Une solution est alors d'employer des implants corticaux pour venir stimuler directement la région associée au trouble fonctionnel constaté. Il existe ainsi des implants corticaux visant à restaurer la vision à l'aide de réseaux de microélectrodes implantés au niveau du cortex visuel (Fernández & Normann, 2017) ou encore des implants permettant de restaurer la sensation de toucher à l'aide d'électrodes implantées au niveau du cortex somatosensoriel (Fifer et al., 2022). Ces approches sont plus récentes et leurs bénéfices thérapeutiques reposent largement sur la plasticité du cerveau en présence de ce type

d'implants. Il y a donc une phase d'apprentissage qui est nécessaire et qui peut apporter des résultats variables selon les individus.

1.6.4. Implants sous-corticaux pour la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative progressive provoquée par la mort des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* (SNpc), une structure appartenant au système des ganglions de la base. Cette maladie se caractérise par des symptômes moteurs très invalidants avec notamment des tremblements, une rigidité musculaire et un ralentissement moteur. Cette maladie s'accompagne de symptômes non moteurs tels que des troubles gastro-intestinaux, une anosmie, des troubles du sommeil paradoxal, et des atteintes cognitives (Tolosa et al., 2021). Son diagnostic est complexe, notamment en raison de l'apparition tardive des symptômes moteurs par rapport à la mort neuronale dopaminergique sous-jacente. L'origine de la dégénérescence neuronale est encore mal comprise. Il n'existe donc aucun traitement curatif à l'heure actuelle, mais des traitements symptomatiques sont disponibles et consistent principalement à administrer le précurseur de la dopamine, la L-DOPA. Ils ont toutefois un impact variable selon les individus et présentent des effets indésirables à long terme. De plus, ils n'annulent jamais complètement les symptômes moteurs et leur effet tend à diminuer avec le temps en raison du caractère progressif de la neurodégénérescence dopaminergique au sein de la SNpc : moins il reste de neurones dopaminergiques, plus il faut augmenter les doses de L-DOPA, et plus il y a d'effets secondaires indésirables. La stimulation cérébrale profonde (DBS) est une alternative thérapeutique chirurgicale proposée aux patients dont les symptômes moteurs ne sont pas soulagés par la L-DOPA-thérapie. Le principe consiste à implanter des électrodes afin d'appliquer une stimulation à 130 Hz (Benabid, 2003) dans différentes régions du système des ganglions de la base, afin de compenser la perte dopaminergique. Les principales cibles de la DBS sont le globus palidus et les noyaux sous-thalamiques. Cette méthode offre de bons résultats mais requiert un ajustement régulier des paramètres de stimulation en fonction de la progression de la maladie. Cet ajustement demeure à ce jour empirique (le neurologue constate les symptômes et modifie les paramètres de stimulation). Elle implique en outre des interventions chirurgicales régulières pour remplacer les batteries du stimulateur (Bloem et al., 2021). De futurs systèmes économes en énergie et capables d'adapter les paramètres de stimulation aux caractéristiques de la zone enregistrée seraient un atout indéniable dans ce contexte.

1.6.5 Implants spinaux

Les implants spinaux actuellement disponibles sont des implants de stimulation qui peuvent être utilisés dans différents contextes pathologiques. Ainsi plusieurs auteurs ont utilisé avec succès des stimulations électriques épidurales sur les segments spinaux L1 à S1-S2 (selon les cas cliniques) afin de restaurer une activité motrice coordonnée chez des patients paralysés des jambes (*cf.* figure 1.10) (Angeli et al., 2018; Grahn et al., 2017). Ces premiers travaux

nécessitaient toutefois un maintien du soutien physique (par un système de suspension, un exosquelette ou un accompagnateur valide) pour permettre l'activité motrice chez les patients implantés. Le même type d'implant de stimulation spinale couplé à une fusion nerveuse (par intervention neurochirurgicale) entre les étages supérieurs et inférieurs de part et d'autre de la lésion de la moelle épinière a permis de restaurer une marche indépendante (*i.e.* sans aucun soutien) chez un patient paraplégique : dans ce contexte, un réseau de 16 électrodes implantées à la surface épidurale dorsale de la moelle épinière dans la région lombo-sacrale accidentée associé à une rééducation intensive a permis à un patient de 26 ans de recouvrer une marche bilatérale sur tapis roulant sans assistance ni par un exosquelette, ni par un accompagnateur (Gill et al., 2018). Les derniers travaux publiés dans ce domaine indiquent que les neurones impliqués dans ces récupérations fonctionnelles après stimulation électrique épidurale pendant la période de rééducation neurologique sont de petits interneurones excitateurs qui n'interviennent normalement pas dans la motricité « traditionnelle » des membres postérieurs (*i.e.* motricité avant la lésion spinale), ce qui traduit l'extraordinaire capacité de plasticité du système nerveux dans ces contextes lésionnels avec neurostimulation (Kathe et al., 2022).

1.7. Conclusion du chapitre

Nous avons vu dans ce chapitre l'état de l'art des systèmes neurobiohybrides avec un focus sur les implants fonctionnant de manière unidirectionnelle. Ces implants sont utilisés en médecine pour restaurer partiellement des fonctions physiologiques défaillantes en enregistrant ou en stimulant l'activité des neurones associés. La conception des interfaces de ces implants est conditionnée par la position et la profondeur des neurones ciblés au sein du tissu à interfacer. Plusieurs exemples d'implants unidirectionnels emblématiques ont été présentés afin d'illustrer la variété des approches existantes pour adapter les systèmes aux diverses conditions pathologiques. Ces systèmes unidirectionnels, bien que déjà employés cliniquement, présentent toutefois plusieurs limites qui seront détaillées dans le chapitre suivant.

Chapitre 2 Enjeux et défis associés au développement de systèmes neurobiohybrides de nouvelle génération

2.1 Introduction du chapitre

Les systèmes neurobiohybrides à visée thérapeutique présentés dans le chapitre 1 sont les plus couramment utilisés en clinique à l'heure actuelle. Si ces systèmes permettent aux patients de recouvrer partiellement les fonctions physiologiques perdues, leur impact reste toutefois limité en raison de leur fonctionnement unidirectionnel : soit en mode enregistrement comme dans le cas de certains implants corticaux pour l'épilepsie (*cf.* Chapitre 2, §1.6.4.1), soit en mode stimulation comme dans le cas des implants cochléaires ou rétiniens (*cf.* Chapitre 2, §1.6.1 et §1.6.2 respectivement). Dans certains contextes pathologiques, le plus souvent lésionnels, un unique implant ne suffit pas à restaurer les capacités physiologiques perdues ou endommagées. Plusieurs équipes ont ainsi travaillé à développer d'autres solutions pour aller vers une boucle de communication bidirectionnelle fermée. Toutefois, la conception d'un système neurobiohybride fait appel à des connaissances relevant de plusieurs domaines scientifiques différents, parmi lesquels les neurosciences, l'électronique, la bio-ingénierie, les sciences du traitement de l'information ou encore les systèmes micro-électro-mécaniques biomédicaux (*Biomedical micro-electro-mechanical systems* en anglais, ou BioMEMS). La variété des compétences à acquérir rend le développement de ces systèmes ardu et nécessite des équipes pluridisciplinaires ainsi qu'une acculturation des/aux différentes communautés scientifiques (Cullen & Pfister, 2011). Chacun des domaines présente ses propres défis et les neurobiohybrides doivent répondre à l'ensemble des contraintes pour fonctionner. Il existe notamment des défis technologiques liés à l'échange d'informations entre le vivant et les machines, ainsi que des défis associés à la longévité des implants exposés à des environnements biologiques. Nous verrons dans cette section que ces défis conditionnent les choix de conception en matière de matériaux et d'architecture.

2.2 Les défis technologiques à relever pour assurer un échange d'information avec le vivant

2.2.1 Les défis relatifs aux interfaces d'enregistrement

2.2.1.1 Les différents types de signaux électriques d'origine biologique

Il existe de nombreux défis dans ce domaine. Ainsi, l'enregistrement de signaux électriques d'origine biologique est un défi technique en raison de leur variabilité d'amplitudes et de formes. Cette difficulté existe quel que soit le tissu interfacé, et que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Selon la position des électrodes permettant d'enregistrer les signaux issus de neurones « émetteurs », trois types de traces peuvent être enregistrés. Des électrodes placées sur le cuir chevelu, donc à l'extérieur du corps, permettent en effet d'enregistrer de façon non invasive des signaux électroencéphalographiques (ou EEG) d'amplitude variant entre 5 et 300µV et de

fréquence inférieure à 100 Hz. Des électrodes placées directement à la surface du cortex permettent d'enregistrer des signaux électro-corticographiques (ou ECoG) d'amplitude variant entre 0.1 et 5 mV et de fréquence inférieure à 200 Hz. Des électrodes intraparenchymales invasives donnent accès à l'enregistrement des potentiels de champ locaux (ou LFP) ou des potentiels d'action unitaires (ou PA, appelés « *spikes* » dans la figure 2.1) dont l'amplitude est inférieure à 1 mV (Fattahi et al., 2014). Les types de signaux enregistrés par ces différents types d'interfaces sont présentés en figure 2.1. La faible amplitude de ces signaux rend leur détection difficile nécessitant l'utilisation de traitement du signal pour extraire les informations pertinentes du bruit. Plus les électrodes sont éloignées de leur cible, plus les signaux qu'elles enregistrent proviennent d'une grande quantité de neurones.

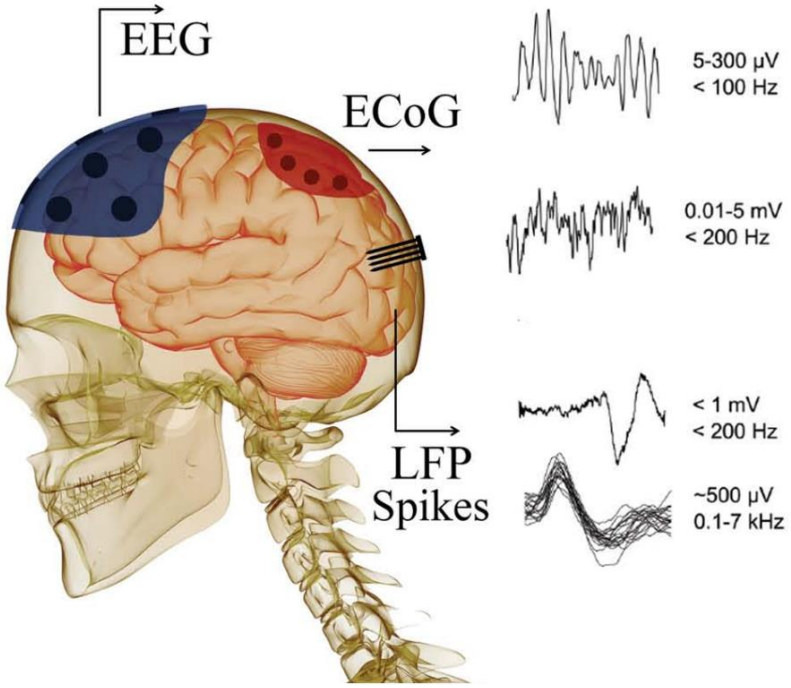


Figure 2.1 : Forme des signaux biologiques en fonction de l'interface d'enregistrement. Les signaux ElectroEncéphaloGraphiques (EEG) sont enregistrés à l'aide d'électrodes transcrâniennes posées directement sur le cuir chevelu. Les signaux ElectroCorticoGraphiques (ECoG) sont enregistrés à l'aide d'électrodes placées à la surface du cortex. Les Potentiels de Champ Locaux (en anglais : *Local Field Potentials*, LFP) et les potentiels d'action (*Spikes*) sont enregistrés à l'aide d'électrodes pénétrantes placées à l'intérieur de l'encéphale. Figure issue de (Fattahi et al., 2014).

2.2.1.2 Le positionnement et le couplage des cellules par rapport à l'électrode

Les travaux de doctorat menés antérieurement dans notre équipe par M. Dimitri Henniquau concernant des expérimentations *in vitro* ont démontré que la qualité du couplage entre le neurone et l'électrode influence l'amplitude du signal enregistré. Cela relève de deux paramètres fondamentaux qui sont le taux de recouvrement du plot par le(s) neurone(s) et le couplage (adhésion) entre le neurone et le plot. Il a été montré qu'une électrode intégralement recouverte par un (voire plusieurs) corps cellulaire(s) de neurone(s) permettra d'enregistrer des

signaux avec une amplitude jusqu'à 10 fois plus importante qu'une électrode partiellement recouverte (Henniquau, 2021). Dans le cas d'une électrode entièrement recouverte, c'est la distance entre le neurone et la surface du métal qui devient le facteur le plus influençant mettant en lumière l'importance de l'adhésion des cellules. La valeur « R_{seal} » définit la résistance du courant de fuite résultant de l'espacement entre la membrane plasmique neuronale et le métal. Elle peut également être qualifiée de « résistance de jointure ». Cette notion est illustrée en figure 2.2 dans le cas d'un neurone positionné sur une électrode en trois dimensions et dont une partie de la membrane plasmique du soma recouvre intégralement la surface métallique de l'électrode. Ce courant de fuite correspond à une perte d'information dans l'électrolyte, aussi la résistance de jointure R_{seal} doit être la plus élevée possible. Pour cela, les neurones doivent être positionnés de façon à ce que leurs corps cellulaires recouvrent toute la surface des électrodes pour établir le contact le plus intime possible avec leurs surfaces. Sans stratégie de positionnement précis des cellules *in vitro*, et à fortiori *in vivo*, il est toutefois rare qu'un seul neurone soit positionné sur une électrode. Les signaux enregistrés sont donc la plupart du temps la résultante de l'activité de plusieurs cellules localisées dans l'environnement proche de l'électrode. Idéalement, il faudrait tenir compte de la position exacte des cellules sur l'électrode pour traiter le signal, mais cela n'est réalisable qu'*in vitro* (Bestel et al., 2020).

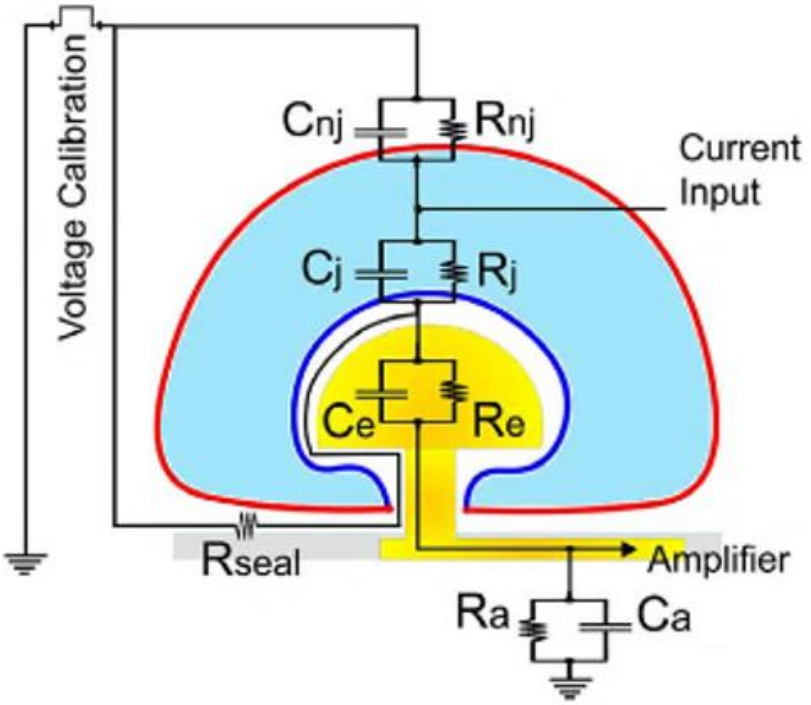


Figure 2.2 : Schéma électrique d'une cellule positionnée sur une électrode en trois dimensions. Gris : substrat de verre. Jaune : électrode en or en forme de champignon. Rouge : membrane plasmique neuronale en regard de l'électrolyte. Bleu foncé : membrane plasmique en regard de l'électrode et de l'électrolyte. Bleu ciel : milieu intracellulaire du neurone (= cytoplasme). R_{seal} : résistance de jointure. Résistance (R_a) et Capacité (C_a) de l'amplificateur (*amplifier*). Résistance (R_e) et Capacité (C_e) de l'électrode. Résistance (R_j) et Capacité (C_j) de la membrane jointe à l'électrode. Résistance (R_{nj}) et Capacité (C_{nj}) de la membrane non jointe à l'électrode. Certains auteurs parlent également de membrane « liée » ou non à l'électrode ou encore de membrane « attachée » ou non à l'électrode. Figure issue de (Nachshon-Fendyur et al., 2011).

Afin d'améliorer la qualité des signaux enregistrés par le biais de réseaux d'électrodes, il est possible de travailler la forme des électrodes au contact des neurones de sorte à permettre un contact plus intime entre la membrane plasmique et l'électrode. Plusieurs formes d'électrodes tridimensionnelles peuvent être trouvées dans la littérature. Les électrodes protubérantes en forme de pointes ou de colonnes permettent d'accéder au milieu intracellulaire et de réaliser des enregistrements de qualité similaire à ceux obtenus par la technique de patch-clamp ; elles offrent ainsi un bien meilleur couplage que des électrodes plates (Ferguson et al., 2012). Malgré la qualité de ces enregistrements, la forme de ces électrodes pénalise la survie des neurones sur le long terme et affecte leur viabilité ; en outre, elles ne sont pas adaptées aux cibles sous-corticales dans des applications *in vivo*. Des électrodes tridimensionnelles en forme de champignons offrent un meilleur couplage sans nuire à la viabilité de neurones primaires d'hippocampes de rat comme le montre la figure 2.3 mais n'ont pas été testées *in vivo* à notre connaissance (Ojovan et al., 2015). Les électrodes en trois dimensions présentent donc de meilleures propriétés pour le couplage direct avec des membranes neuronales. Cependant, leur utilisation *in vivo* doit être opérée avec précaution car de telles structures provoquent des microlésions après implantation ce qui nuit fortement à l'intégrité du tissu implanté. Toutes les structures nerveuses ne sont donc pas adaptées à de telles électrodes.

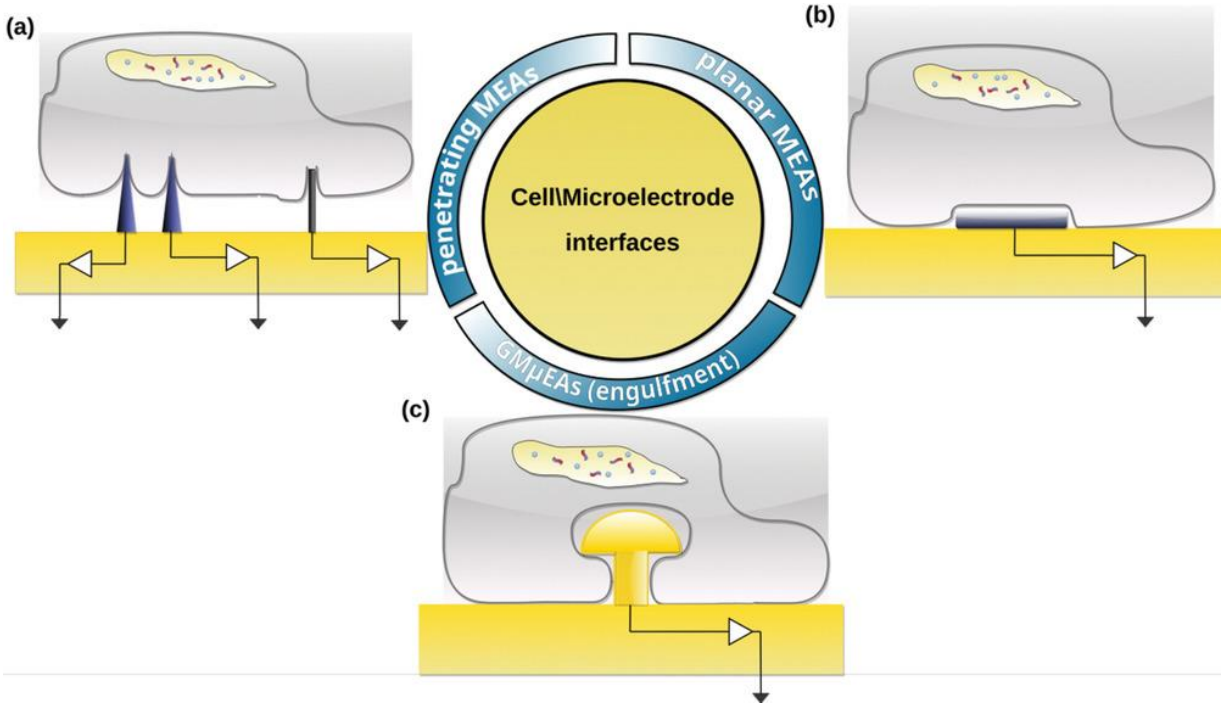


Figure 2.3 : Les différentes formes d'électrodes permettant d'optimiser le couplage membrane-électrode. (a) Electrodes en forme de pointes et de colonnes. (b) Electrodes planes. (c) Electrodes en forme de champignons. Figure issue de (Teixeira et al., 2021).

2.2.2 Les défis à relever pour les interfaces de stimulation

2.2.2.1 Le choix des paramètres de stimulation

Au repos, les neurones maintiennent une différence de potentiel de part et d'autre de leur membrane plasmique en modulant la concentration d'ions présents à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule (*cf*. Chapitre 1, §1.2.). En conditions physiologiques, les neurones peuvent être activés notamment par la fixation de neuromédiateurs sur des récepteurs spécifiques (dont certains récepteurs-canaux ioniques) présents au niveau dendritique ou du corps cellulaire (*cf*. Chapitre 1, §1.2). Pour pouvoir stimuler des neurones vivants sans utiliser de neurotransmetteurs, il est nécessaire de provoquer une dépolarisation membranaire qui activera les canaux ioniques voltage-dépendants localisés à proximité de la zone de stimulation, ce qui déclenchera un potentiel d'action sous réserve de dépasser le seuil d'activation du neurone (Robinson, 1985). Dans la littérature, les méthodes les plus communes de stimulation des neurones emploient des stimulations électriques. Il existe également des techniques d'optogénétique s'appuyant sur des manipulations génétiques qui rendent les neurones sensibles à des stimulations par voie lumineuse. Ces techniques ne sont toutefois pas adaptées pour une utilisation en clinique humaine et ne seront donc pas détaillées dans ce manuscrit.

Lors d'une stimulation électrique, une réorganisation des charges s'opère dans l'espace extracellulaire à portée du champ d'action de l'électrode (Plonsey & Barr, 2007). Cette réorganisation a pour effet de perturber localement la polarisation des membranes neuronales, et donc de provoquer la stimulation des neurones. Il existe deux méthodes permettant de stimuler des neurones vivants de manière électrique. La première consiste à appliquer un courant stimulateur permettant d'injecter directement des charges à la surface de l'électrode, assurant ainsi un couplage faradique entre l'électrode et la membrane. Cette technique permet un contrôle précis des paramètres de stimulation car les charges injectées dépendent directement du courant appliqué (Merrill et al., 2005). Cette méthode est cependant peu efficace en terme de consommation énergétique (Arfin & Sarpeshkar, 2012) et peut s'avérer nocive pour le tissu : si l'injection de charges n'est pas correctement équilibrée, elle risque d'endommager les neurones interfacés et d'augmenter l'intensité de la réponse inflammatoire (Mortimer et al., 1970). Plus les neurones cibles sont éloignés de l'électrode, plus le courant à injecter est important, les neurones les plus simples à stimuler étant ceux dont les axones sont les plus larges (Brocker & Grill, 2013). Il a ainsi été démontré que dans le cas d'une stimulation par courant, employer des signaux biphasiques est moins nocif pour les tissus vivants (Fung et al., 1998; Pudenz et al., 1975).

Une seconde méthode permettant de stimuler électriquement les neurones se base sur l'application d'une tension à la surface de l'électrode, permettant ainsi de réaliser un couplage capacitif ne nécessitant pas d'injection de charges dans le milieu pour provoquer la dépolarisation de la membrane. Les différences entre le couplage faradique et capacitif sont illustrées en figure 2.4. Le couplage faradique consiste à injecter des charges depuis le métal de l'électrode vers le milieu électrolytique. Il peut être irréversible si des ions métalliques quittent

l'électrode, ou réversible si l'injection de charges est modérée. Chaque matériau présente sa propre limite d'injection de charges. Le couplage capacitif consiste à appliquer une tension à la surface de l'électrode, ce qui a pour effet de trier les ions dans le milieu électrolytique en accumulant les charges opposées à la surface de l'électrode et en éloignant les charges du même signe vers la membrane du neurone. La stimulation par application de tension est plus efficace en terme de consommation énergétique mais les paramètres de stimulation sont plus difficiles à contrôler et plus sensibles aux variations de l'impédance de l'électrode (Arfin & Sarpeshkar, 2012; Simpson & Ghovanloo, 2007). L'impédance est définie par l'équation Z = R + jX, où Z représente l'impédance exprimée en ohm, R est la composante réelle, et X est la composante imaginaire. La partie imaginaire est liée à des comportements électriques du type capacitif et/ou inductif, influençant la réponse du circuit.

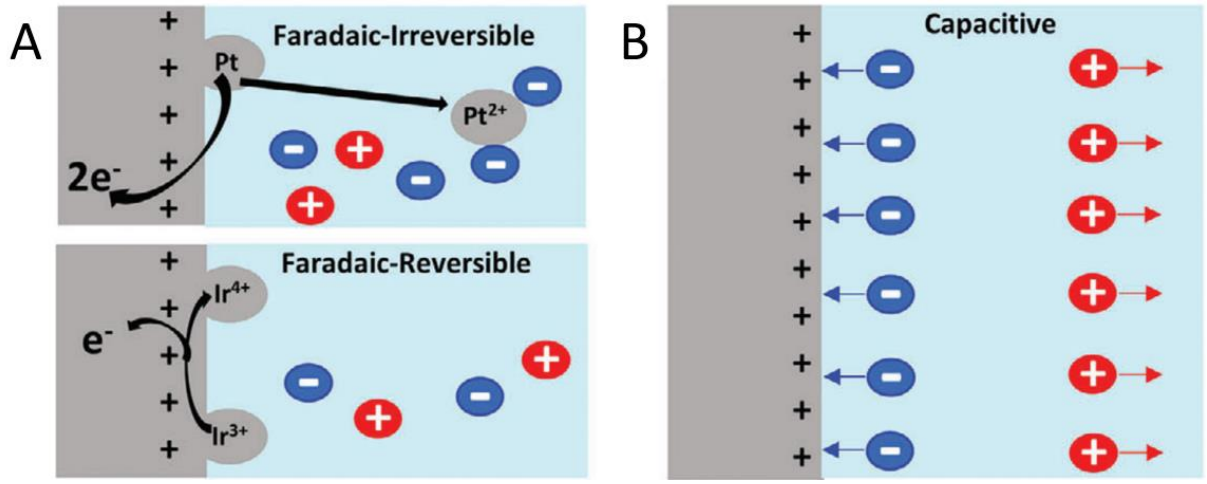


Figure 2.4 : Représentation schématique des différents modes de couplage sur l'environnement proche de l'électrode. (A) Injection de charges faradique : ce type de couplage correspond à une réaction d'oxydo-réduction menant à un transfert d'électrons de l'espèce en solution vers l'électrode (ou vice-versa). Ce type de couplage peut être réversible ou irréversible. (B) Modèle d'une interface capacitive : le couplage est réalisé en chargeant (et déchargeant) la capacité d'interface formée par l'accumulation d'ions de charge opposée à celle appliquée à la surface de l'électrode. Dans ce type de couplage, il n'y a aucun transfert d'électrons. Figure issue de (Zheng et al., 2021).

2.2.2.2 L'impact du couplage faradique sur les métaux

L'application de courants de stimulation par le biais d'une injection de charges dans le milieu (aussi appelé couplage faradique) catalyse des réactions électrochimiques ayant pour effet de dissoudre progressivement le métal de l'électrode dans le milieu, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Harris et al., 2022; Shepherd et al., 2021). L'occurrence de ces réactions électrochimiques est associée à une augmentation de la présence d'espèces réactives de l'oxygène, connues notamment pour nuire à l'intégrité des gaines de myéline (Chan et al., 1982; Chia et al., 1983; Griot et al., 1990; Konat & Wiggins, 1985). Une partie de ces réactions étant réversible, certains auteurs proposent donc d'utiliser des signaux de stimulation biphasiques. Une première phase, positive, permet d'initier la stimulation et provoque les réactions

électrolytiques. La seconde phase négative permet quant à elle d'inverser les réactions réversibles et donc de les ramener à leur état originel. Cette méthode permet d'améliorer la stabilité de l'interface dans le temps. L'état de l'interface peut être vérifié après implantation par mesure de son impédance (Prasad & Sanchez, 2012).

2.2.3 Les défis associés à la stabilité de l'interface *in vivo* dans le temps

Il est à noter que l'interface entre les neurones et les électrodes est un environnement propice aux réactions électrochimiques permettant un transfert de charges entre les éléments métalliques et l'environnement biologique (Merrill et al., 2005). Ainsi, la présence d'un électrolyte (qui correspond *in vivo* au liquide extracellulaire, et *in vitro* au milieu de culture présent dans le dispositif) provoque la corrosion passive du métal de l'électrode, ce qui peut affecter la détection des signaux à long terme. Ce point est un défi majeur, qui peut en outre être amplifié par la réponse inflammatoire du tissu implanté. A terme, cette dernière peut créer une barrière s'opposant à la bonne détection des signaux biologiques.

En effet, comme nous l'avons vu au §2.2.1.2., afin d'obtenir un couplage efficace entre les neurones et les électrodes, il est primordial que la distance séparant la membrane neuronale de la surface du métal soit la plus faible possible. Pour ce faire, l'implant doit répondre à un cahier des charges extrêmement précis dont les paramètres sont majoritairement conditionnés par les réactions de défense du tissu vivant survenant à la suite de l'implantation. Ces réactions sont particulièrement importantes dans le cas d'implants sous-corticaux (qui nécessitent de traverser plusieurs zones cérébrales avant d'atteindre leur cible, et qui se retrouvent donc entourés de tissu cérébral) ou d'implants protubérants (de type MEA corticaux ou spinaux à électrodes en pointes protubérantes). Sur le long terme, ces réactions atténuent l'efficacité de l'implant en détériorant l'interface et en éloignant les électrodes des neurones ciblés (Prodanov & Delbeke, 2016). L'un des facteurs les plus problématiques pour le maintien de cette proximité *in vivo* est la survenue d'une réaction immunitaire due à la présence d'un corps étranger dans l'organisme vivant et aux dommages tissulaires potentiellement infligés lors de l'implantation. Ces derniers peuvent en outre être amplifié par les micromouvements provoqués par les déplacements de l'individu implanté (Luan et al., 2020). Dès l'implantation d'une neuroprothèse sous-corticale ou protubérante (donc invasive), des protéines viennent s'adsorber à la surface de l'implant (Ratner & Bryant, 2004) et une migration des cellules gliales et des astrocytes vers la zone de la lésion est observée (Szarowski et al., 2003). Le déroulement de cette réaction immunitaire dirigée contre l'implant est présenté en figure 2.5. Cette réaction immunitaire provoque une dégénérescence locale des neurones (McConnell et al., 2009), et aboutit à la formation d'une couche de tissu cicatriciel ayant pour effet d'isoler électriquement l'électrode des neurones cibles à stimuler ou enregistrer. Il en résulte une réduction de la performance de l'électrode, ce qui affecte fortement la fonctionnalité de l'interfaçage en diminuant l'amplitude des signaux enregistrés ou délivrés par l'implant (Gulino et al., 2019). Ce phénomène survient également pour des implants corticaux (Norton et al., 1992). Cette

réaction immunitaire semble être l'une des raisons pour lesquelles la plupart des dispositifs sont encore aux étapes préliminaires de leur développement (Tresco & Winslow, 2011). Il est possible de limiter l'impact de la réponse inflammatoire par l'administration régulière de molécules anti-inflammatoires telles que la dexamethasone (de la Oliva et al., 2019), bien qu'il soit préférable d'éviter complètement sa survenue par un choix judicieux des paramètres de stimulation et des matériaux constituant l'implant.

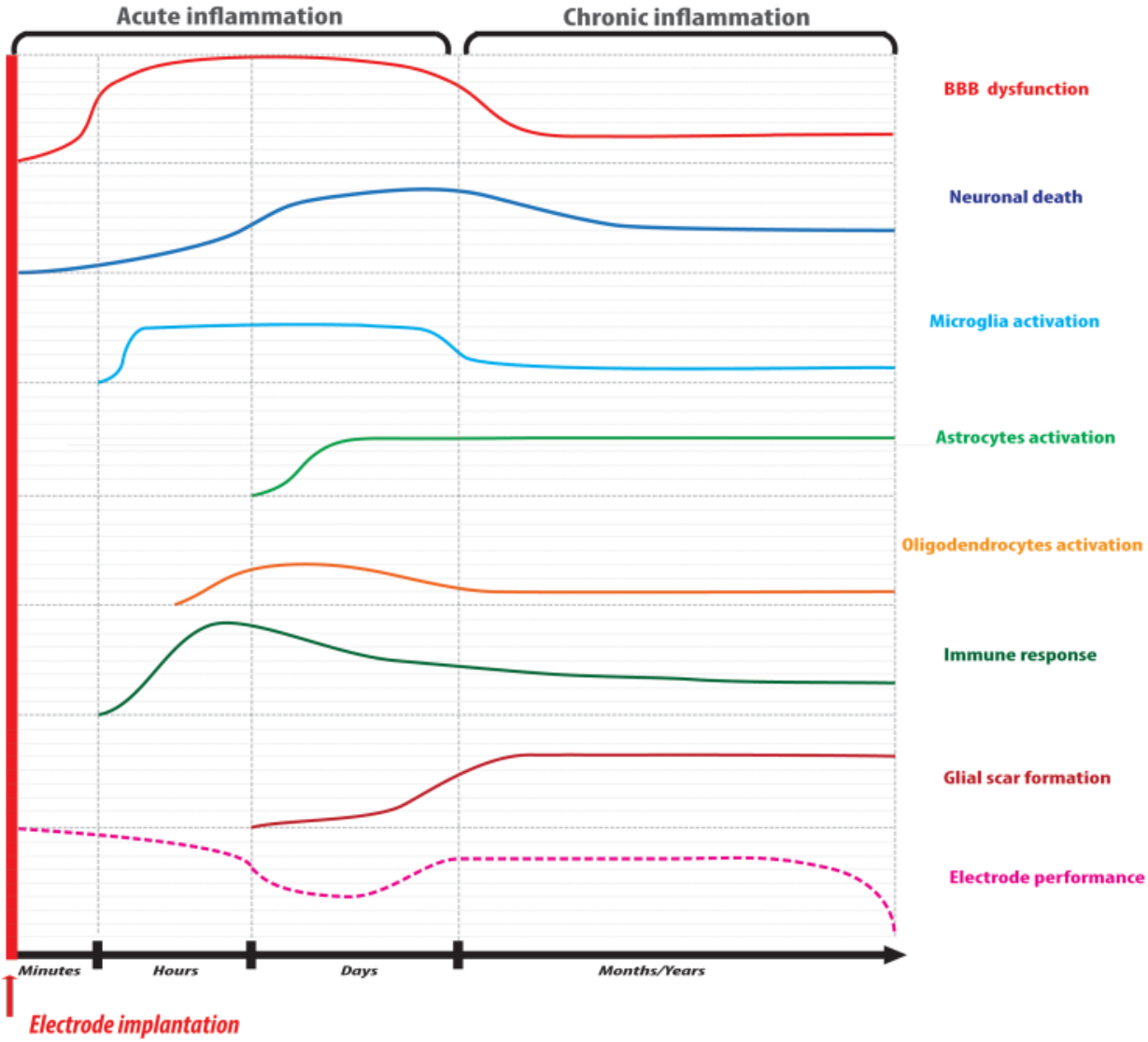


Figure 2.5 : Les différentes étapes de la réponse inflammatoire menant à la formation de tissu cicatriciel autour des interfaces neurobiohybrides implantées dans le cerveau. La réaction inflammatoire se déroule en deux étapes majeures : la réaction inflammatoire aigue (*acute inflammation*) survenant dans les premiers jours suivant l'implantation puis la réaction inflammatoire chronique (*chronic inflammation*) pouvant s'étendre sur plusieurs années. L'impact sur la performance de l'électrode est représenté par la courbe en pointillés roses. Figure issue de (Gulino et al., 2019).

2.2.4 Les enjeux liés aux électrodes des interfaces des neurobiohybrides

2.2.4.1 Les matériaux pour les électrodes

Dans la littérature, la liste des matériaux permettant de répondre aux contraintes listées précédemment est relativement limitée. Ainsi, plusieurs métaux sont couramment utilisés pour la conception d'électrodes, avec notamment le platine (Etemadi et al., 2016), l'iridium (Otto et al., 2006), l'or (Agorelius et al., 2015), le tungstène (Yeon et al., 2016) et l'acier inoxydable (Desai et al., 2014). Certaines équipes emploient des alliages de métaux qui présentent des propriétés plus adaptées que les matériaux purs (Cassar et al., 2019) ou des versions oxydées des matériaux cités précédemment (Frederick et al., 2022). Le choix du matériau pour les électrodes est crucial car il détermine le comportement à long terme des électrodes. Un dispositif trop détérioré finira par perdre son efficacité si les matériaux choisis ne résistent pas aux stress mécaniques et électrochimiques auxquels ils sont exposés (Schmitt et al., 2000). En résumé, les matériaux ne doivent pas être nocifs pour le tissu vivant de quelque manière que ce soit, ils doivent présenter une limite d'injection de charges élevée pour résister aux paramètres de stimulation et être stables dans le temps (Zheng et al., 2021).

Enfin, les lignes d'accès aux électrodes des dispositifs sont généralement isolées de sorte à ne laisser que le site actif de l'électrode au contact des neurones pour éviter les stimulations et enregistrements non spécifiques. Cette isolation est réalisée à l'aide de couches de passivation. Les matériaux utilisés pour ces couches de passivation doivent permettre une bonne isolation électrique, ne doivent pas induire de réaction immunitaire et doivent résister aux protocoles de stérilisation des implants (W. Yang et al., 2021). Des couches de diélectriques basées sur du silicium sont fréquemment utilisées dans cet objectif, notamment sous la forme de SiO_2 (Guardamagna et al., 2022) et de Si_3N_4 (Zhao et al., 2019). D'autres matériaux tels que le parylène C (Caldwell et al., 2020; Y. Zhang et al., 2022) ou encore le SU-8 (Kim et al., 2017) peuvent répondre à ce besoin tout en servant d'enveloppe et/ou de support à l'ensemble de l'implant. Ces couches de passivation peuvent également être architecturées pour améliorer l'intégration tissulaire de l'implant (Kuo et al., 2013).

2.2.4.2 La structuration des électrodes pour l'enregistrement

Comme nous l'avons vu précédemment (*cf.* Chapitre 1, §1.3), il existe une grande variété d'électrodes. La performance d'enregistrement des électrodes extracellulaires est influencée par trois éléments principaux : le type de neurone interfacé, l'électrode d'enregistrement (sa taille et sa morphologie) et le matériel assurant le traitement du signal. A partir de manipulations réalisées *in vitro* sur différents types de cultures, les travaux de l'équipe d'A. Hierlemann ont montré que des électrodes de diamètre compris entre 1 et 8 µm permettent d'enregistrer les potentiels d'action se propageant le long des axones ; des électrodes de diamètre entre 8 et 30 µm permettent d'enregistrer la signature électrique extracellulaire des potentiels d'action de neurones individuels et des électrodes de plus de 16 µm de diamètre

permettent d'enregistrer des LFP (Viswam et al., 2018a, 2019). En plus de la taille des électrodes, il a été montré qu'une augmentation de la rugosité de leur surface par application d'un plasma de tetrafluorométhane sur des électrodes en or de 30 µm de diamètre permettait d'augmenter la sensibilité de l'électrode. Ainsi, des électrodes modifiées par cette technique ont été implantées chez le rat au niveau du cortex cingulaire antérieur. La sensibilité des électrodes modifiées était deux fois supérieure à celles des électrodes classiques pour l'enregistrement de LFP (Chung et al., 2015). La question du choix des matériaux des électrodes ainsi que celle de leur surfaçage n'étant pas spécifique aux électrodes d'enregistrement, ces aspects sont détaillés plus loin (*cf*. Chapitre 2, §2.2.4.3). Enfin, il est à noter que, indépendamment de la taille des électrodes d'enregistrement, les signaux bioélectriques captés sont à nouveau atténués lors de leur propagation dans la chaîne d'enregistrement (Viswam et al., 2018b). Plus la chaîne d'enregistrement et de traitement du signal est longue, plus les signaux neuronaux sont noyés dans le bruit, comme illustré en figure 2.6.

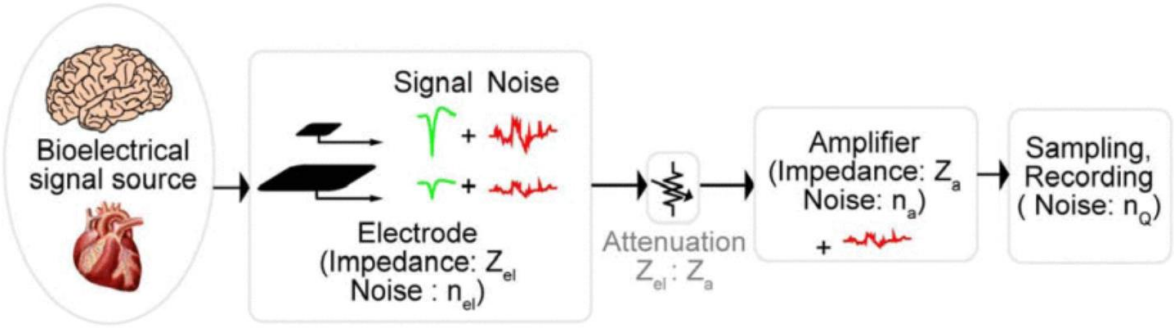


Figure 2.6 : Chaine d'enregistrement de signal bioélectrique. Les spectres enregistrés par le biais de l'interface correspondent à la somme des signaux d'intérêt et du bruit mesuré au niveau de l'électrode. L'amplitude des signaux et du bruit varie selon la surface de l'électrode et s'atténue lors de sa propagation dans la chaine d'enregistrement. L'amplificateur présent dans la chaine d'enregistrement est une source de bruit. Figure issue de (Viswam et al., 2018b).

2.2.4.3 La fonctionnalisation de surface

Afin de limiter l'intensité de la réaction immunitaire et d'améliorer le contact entre les électrodes et les neurones, il est classique de fonctionnaliser les surfaces des implants pour améliorer les propriétés des matériaux de sorte à masquer la surface du dispositif pour le système immunitaire. La fonctionnalisation de surface concerne tout ajout de matériau réalisé à la surface d'éléments implantés (nanotubes, silanes, enduis, …). Dans leur étude, (He et al., 2007) ont par exemple immobilisé sur la surface des électrodes un peptide appelé alpha-MSH connu pour inhiber la production des cytokines et donc limiter la réaction immunitaire. La fonctionnalisation de surface permet également d'améliorer l'efficacité de l'interfaçage en facilitant le transfert de signal entre la membrane du neurone et la surface de l'électrode ou en optimisant leur adhésion à la surface des métaux. Ces matériaux permettent en outre de réduire les différences de densité et d'élasticité entre l'implant et le tissu. Seront présentés ci-après trois

types différents de fonctionnalisations : les *coatings*, les polymères conducteurs et les hydrogels.

a) Les *coatings*

Afin d'améliorer l'adhésion des cellules aux surfaces métalliques, une approche classique consiste à enduire ces dernières de molécules de la matrice extracellulaire. Cette dernière correspond à un ensemble de macromolécules qui lient les cellules entre elles et les organisent en tissus/organes. Elle est composée de protéines (collagène, fibronectine, laminine, élastine…) et de glucides (hémicellulose, pectine…) organisés sous la forme d'un gel amorphe tridimensionnel qui assure le maintien structural des organes et contribue à divers processus physiologiques (Kular et al., 2014). Ainsi, la culture de neurones *in vitro*, en particulier dans des dispositifs neurobiohybrides, implique de travailler les substrats sur lesquels les cellules sont ensemencées : classiquement, les surfaces de culture sont tapissées de molécules de la matrice extracellulaire, chaque type neuronal requérant un type de molécules (voire une combinaison) spécifiques (Gordon et al., 2013). On parle de « *coating* » des surfaces de culture. De la même manière, des travaux ont exploré cette solution pour améliorer l'intégration des implants dans les tissus ciblés ainsi que la tolérance des tissus implantés en enduisant les électrodes de molécules de la matrice extracellulaire (Chen & Allen, 2012). Toutefois, les *coatings* composés de molécules de la matrice extracellulaire présentent l'inconvénient de se résorber rapidement après implantation (Ceyssens et al., 2017). Jusqu'à présent, les tentatives les plus prometteuses s'appuient sur des *coatings* biomimétiques plus stables et présentant les mêmes avantages que leur équivalent naturel (Vitale et al., 2018).

b) Les polymères conducteurs

Les polymères conducteurs sont des matériaux particulièrement pertinents pour la conception de systèmes neurobiohybrides. Leur capacité à conduire le courant combinée à leur densité proche de celle d'un tissu vivant permet d'améliorer le couplage entre la surface des électrodes et la membrane des neurones. L'un des principaux avantages des polymères conducteurs est la possibilité de greffer sur leur structure des groupements chimiques et/ou biologiques. Ce procédé de fonctionnalisation permet d'améliorer les performances électrochimiques de ces polymères (Qian et al., 2023). L'incorporation de molécules anti-inflammatoires permet également de réduire l'intensité de la réaction immunitaire (Vallejo-Giraldo et al., 2014). L'ajout de polymères conducteurs sur l'implant permet ainsi de réduire la formation de tissu cicatriciel et améliore l'amplitude des signaux enregistrés. L'apport d'un polymère conducteur sur la qualité des signaux enregistrés est illustré en figure 2.7.

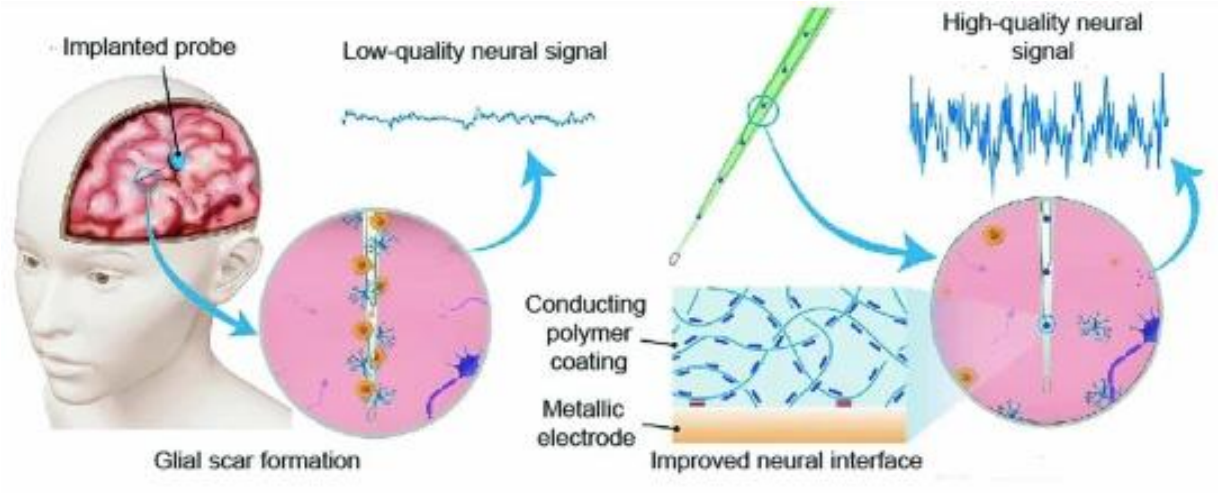


Figure 2.7 : Illustration de l'apport d'une couche de polymère conducteur sur la qualité des signaux enregistrés *in vivo*. Sans polymère conducteur, une couche isolante de cellules gliales se forme autour de l'électrode (les auteurs parlent de tissus cicatriciels ou *glial scar*). La présence de polymère conducteur limite la formation de la cicatrice gliale et permet donc l'enregistrement de signaux électriques de meilleure qualité. Figure issue de (Sagdic et al., 2023).

c) Les hydrogels

Les hydrogels sont des substances conductrices de rigidité comparable à celle des tissus nerveux vivants (Keogh, 2020). Cette propriété permet de les utiliser pour mimer les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire. Ils diffèrent des polymères conducteurs par leur capacité à retenir l'eau. Les hydrogels s'avèrent particulièrement intéressants pour optimiser l'interfaçage avec les structures sous-corticales. En effet, leur présence limite la formation de tissu cicatriciel, permettant ainsi d'améliorer la qualité des signaux enregistrés (Sagdic et al., 2023). La réaction immunitaire déclenchée par les implants peut également être limitée en incluant dans l'hydrogel une élution de molécules antiinflammatoires (Barone et al., 2022; FitzGerald, 2016) ou de facteurs de croissance (Kikkawa et al., 2014). Les hydrogels contribuent par ailleurs à améliorer l'impédance des électrodes *in vivo* (Hyakumura et al., 2021).

Il existe différentes méthodes pour produire des hydrogels. Leur composition peut être basée sur des sels ioniques concentrés (C. Yang & Suo, 2018), des métaux (argent, or ou platine) (Tringides et al., 2023), des nanomatériaux à base de carbone (graphène, nanotubes de carbone, etc…) (Tringides et al., 2021) ou encore des polymères conducteurs (Cuttaz et al., 2019) (PEDOT :PSS). Chaque hydrogel présente des propriétés mécaniques et électriques différentes selon les matériaux utilisés, une grande conductivité étant obtenue au détriment des propriétés mécaniques. Il faut également noter que l'utilisation de telles substances est complexe car elle fait appel à des techniques de microfabrication spécifiques nécessitant des équipements adaptés (la plupart des hydrogels ne sont par exemple pas déposables par le biais d'imprimantes 3D) (Zhou et al., 2023). L'épaisseur des hydrogels peut varier de quelques micromètres à quelques nanomètres pour les plus fins (H. H. Barnett et al., 2019). Leur stabilité après implantation

dépend de la disponibilité en eau au niveau du site d'implantation. Un manque d'eau rigidifie l'hydrogel lui faisant perdre ses propriétés viscoélastiques (Shur et al., 2023).

2.2.4.4 Protection physique du dispositif vis-à-vis de la réaction gliale

Afin d'améliorer l'intégration du dispositif complet *in vivo*, il est possible de l'envelopper de manière hermétique sous une fine couche de matériau résistant à l'ensemble des stress pouvant affecter l'implant tout en réduisant la réaction immunitaire. En effet, il a été démontré que l'un des principaux facteurs provoquant la formation de tissu cicatriciel autour de l'implant est la différence de texture entre le neurobiohybride et le tissu implanté (Lacour et al., 2016). Ce phénomène est illustré en figure 2.8. Un implant souple provoque une réaction immunitaire de moindre envergure comparé à un implant rigide qui provoque une encapsulation gliale. Pour limiter ce phénomène, plusieurs équipes ont utilisé avec succès des substrats à base de matériaux souples.

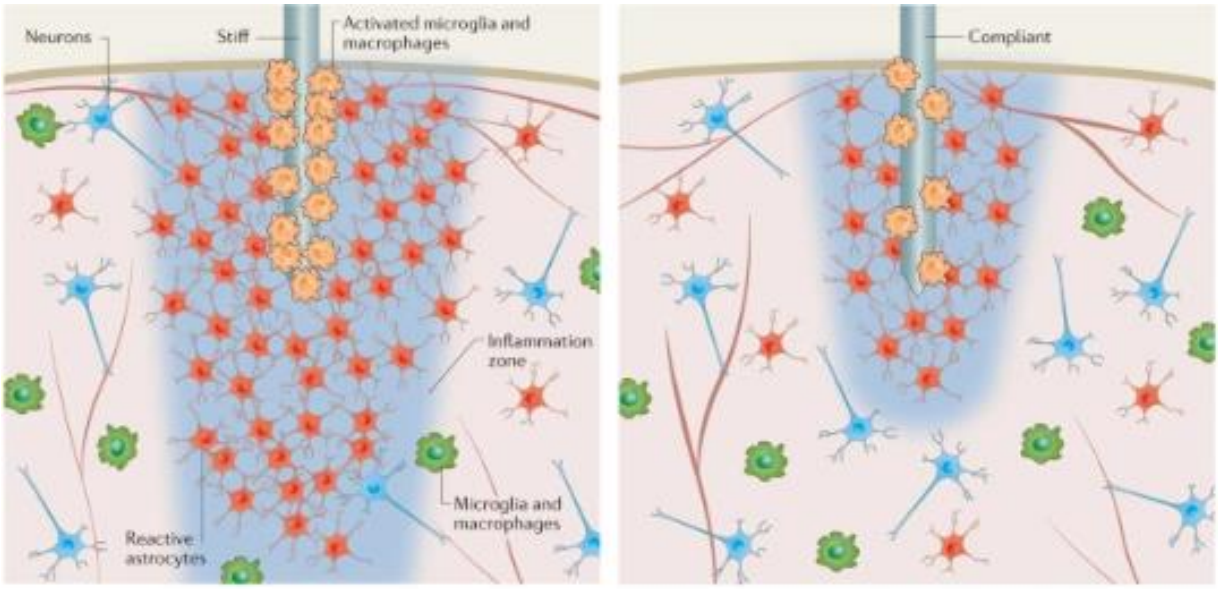


Figure 2.8 : La réaction immunitaire provoquée par la différence de texture entre l'implant et le tissu. A gauche, l'implant utilisé est rigide et induit une réaction immunitaire plus importante qu'à droite où l'implant est souple. Figure issue de (Lacour et al., 2016).

Il est également essentiel que les matériaux qui recouvrent l'implant afin de le protéger soient suffisamment hermétiques pour assurer une protection optimale. Dans ce cadre, les architectures composées de multicouches mêlant des molécules organiques et inorganiques semblent apporter des performances prometteuses (Mariello et al., 2022). Le polydimethylsiloxane (Rao et al., 2022), les matériaux céramiques (Shen & Maharbiz, 2021), les diélectriques (Chiang et al., 2020) ainsi que les matériaux de passivation classiquement utilisés pour l'isolation des lignes d'accès semblent également apporter des résultats

satisfaisants (Song et al., 2019). Cependant, quand bien même tous les constituants des électrodes et de l'implant auraient été sélectionnés de façon à permettre une intégration optimale dans le tissu nerveux, les signaux enregistrés (ou émis dans le cas de la stimulation) impliquent de résoudre des enjeux relatifs au traitement du signal.

2.2.5 Les défis associés au traitement du signal

2.2.5.1 Nécessité de traiter le signal enregistré par l'interface

Comme nous l'avons vu précédemment., les signaux enregistrés par le biais de l'interface résultent généralement de l'activité de plusieurs neurones (*cf.* Chapitre 2, §2.2.1.1). Afin d'en tirer une interprétation, il est indispensable de systématiquement filtrer et traiter le signal. Ce traitement de signal consiste en une succession d'étapes menant à l'obtention des informations recherchées pour poser un diagnostic ou établir une boucle de rétroaction au sein du système. Après l'acquisition du signal brut par le biais de l'interface, une première étape consiste à l'amplifier et à le filtrer pour améliorer le rapport signal/bruit. Un algorithme (ou un programme) installé sur des processeurs, des ordinateurs ou des FPGA permet ensuite d'isoler les signaux pertinents du bruit, de les classifier et de les traiter dans le but de fournir une réponse adaptée au tissu vivant comme illustré en figure 2.9. Cet enchainement d'étapes vise à adapter le comportement du dispositif et à fournir une réponse appropriée au tissu vivant. L'une des principales difficultés du traitement de signal réside dans l'extraction du signal noyé dans le bruit généré par l'ensemble des neurones actifs à portée d'enregistrement de l'électrode et dont les signaux ne sont pas pertinents. De plus, les effets électrochimiques survenant à l'interface électrode-neurone provoquent des décalages des amplitudes des signaux enregistrés par des interfaces extracellulaires ; ces décalages, de 1 à 2V, sont supérieurs à l'amplitude du signal lui-même qui varie de 50 à 500µV. De même, la fréquence des ondes cérébrales s'étend sur une plage variant de 700 Hz à 7 kHz alors que la fréquence des LFP est de l'ordre de 1 Hz maximum. Les signaux doivent donc être filtrés de sorte à rejeter le décalage d'amplitude tout en sélectionnant les signaux d'intérêt (Bashirullah et al., 2007). De plus, tout mouvement de l'individu implanté peut venir rajouter du bruit et altérer le signal enregistré, rendant l'extraction encore plus complexe (Salahuddin & Gao, 2021). L'algorithme doit donc permettre d'interpréter les signaux enregistrés quelle que soit leur qualité, et ce de manière invariable au cours du temps.

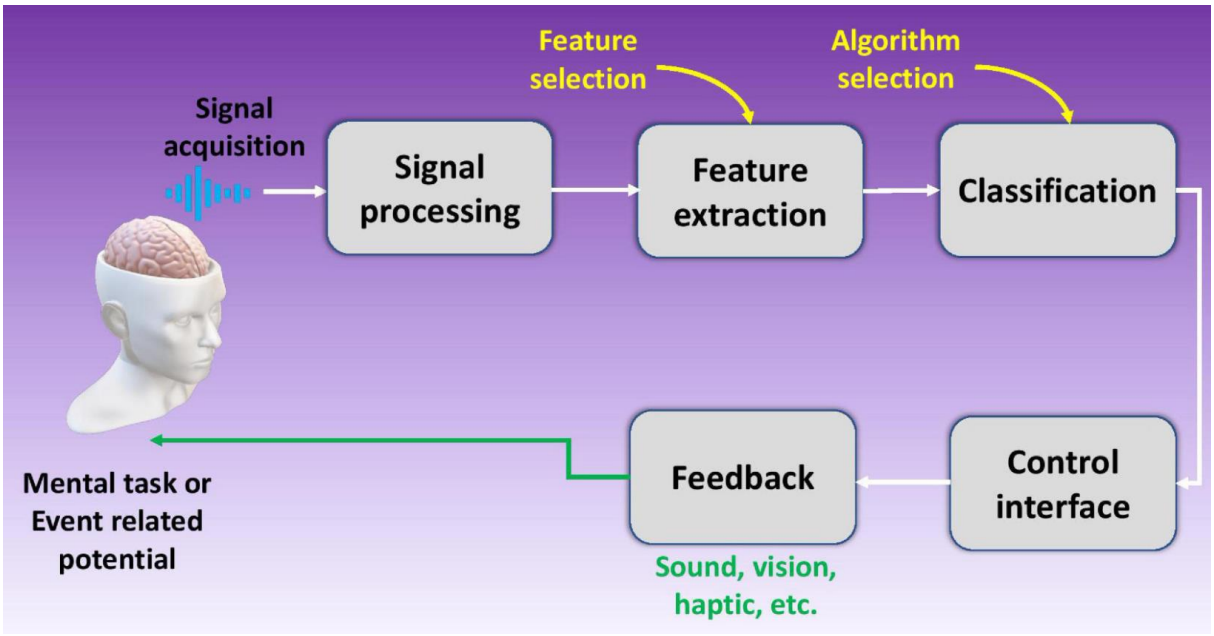


Figure 2.9 : Représentation schématique de la succession d'événements menant à l'élaboration d'une réponse adaptée à un signal électrique enregistré *in vivo* au sein d'un système neurobiohybride bidirectionnel. Les signaux enregistrés sont analysés (*signal processing*) puis les paramètres importants sont extraits du spectre (*feature extraction*) et classifiés (*classification*). Le résultat obtenu permet de piloter une interface (*control interface*) afin de fournir un retour au système nerveux de l'individu (*feedback*). Figure issue de (Salahuddin & Gao, 2021).

2.2.5.2 Les contraintes du matériel permettant le traitement des signaux

Actuellement, pour répondre aux besoins relatifs au traitement du signal, il est nécessaire que la boucle de traitement contienne au moins un ordinateur, un FPGA ou un processeur relié à une unité de stockage de données. Ces éléments étant souvent trop encombrants pour être implantés au même endroit que l'interface neuronale, ils sont soit implantés dans un autre endroit du corps (Sun & Morrell, 2014), soit directement déportés à l'extérieur du corps (Moses et al., 2021). Il est à noter que, dans tous les cas, l'utilisation d'un ordinateur non implanté est nécessaire. Les signaux enregistrés au niveau de l'interface doivent être transférés à l'unité de traitement du signal pour qu'elle puisse analyser et extraire les informations nécessaires. Cela peut être réalisé soit à l'aide de câbles pour les processeurs implantés, soit par une communication sans fil (Hashemi Noshahr et al., 2020). Le débit de transfert entre l'interface et l'unité de traitement du signal est limité, de même que la vitesse des systèmes de traitement de données actuels. Ces éléments sont illustrés en figure 2.10. Le traitement des signaux peut être réalisé sur une station déportée et fixe comprenant un ordinateur relié à l'interface par une connexion directe de haut débit par câble (entre 50 et 500 Mbits/seconde). Dans cette situation, les déplacements de l'individu sont fortement contraints par le branchement et limités à la longueur du câble. Le transfert d'information peut également être réalisé avec une connexion sans fil de haut débit (de 50 à 500 Mbits par seconde), auquel cas les déplacements de l'individu sont libres mais limités à la portée du transfert d'information sans fil. Le traitement des signaux peut être directement réalisé au niveau de l'implant par une

unité implantée auquel cas le transfert d'informations entre l'interface et l'unité de traitement peut être réalisé par connexion filaire ou non à un débit inférieur à 2.5 kBits par seconde. Dans cette situation, l'individu est entièrement libre de ses mouvements. Le paramétrage de l'implant est dans tous les cas toujours réalisé à l'aide d'une station déportée comprenant un ordinateur. La conception d'implants neurobiohybrides relève toujours d'un compromis entre les performances, la taille, la puissance consommée, l'échauffement des tissus, le délai de réponse et la portabilité du neurobiohybride. La consommation énergétique de l'unité de traitement de signal va varier selon son positionnement et son degré d'activité : selon qu'elle est inactive, selon qu'elle transmet des informations ou selon qu'elle traite les données.

La plupart des systèmes actuels permet un taux de transfert des données de bout en bout (en prenant la chaine dans son intégralité, depuis l'enregistrement de l'activité des neurones jusqu'à la réponse finale de l'implant) de 0.5 à 10 bits par seconde (Rapeaux & Constandinou, 2021). Ce taux de transfert fait l'objet d'intenses recherches pour être amélioré car il définit directement l'efficacité du système et conditionne ses possibilités. Il n'est cependant pas possible de simplement améliorer la puissance des algorithmes pour permettre de lever cette limitation car pour rester implantables ou transportables, les unités de traitement sont contraintes en terme de consommation énergétique et d'encombrement stérique (Z. Zhang et al., 2022). De plus, dans le cas où l'unité de traitement de signal est implantée, il est indispensable que l'énergie dissipée soit contrôlée afin de ne pas surchauffer le tissu vivant environnant, ce qui pourrait également contribuer à la survenue d'une réaction immunitaire (Harrison, 2008).

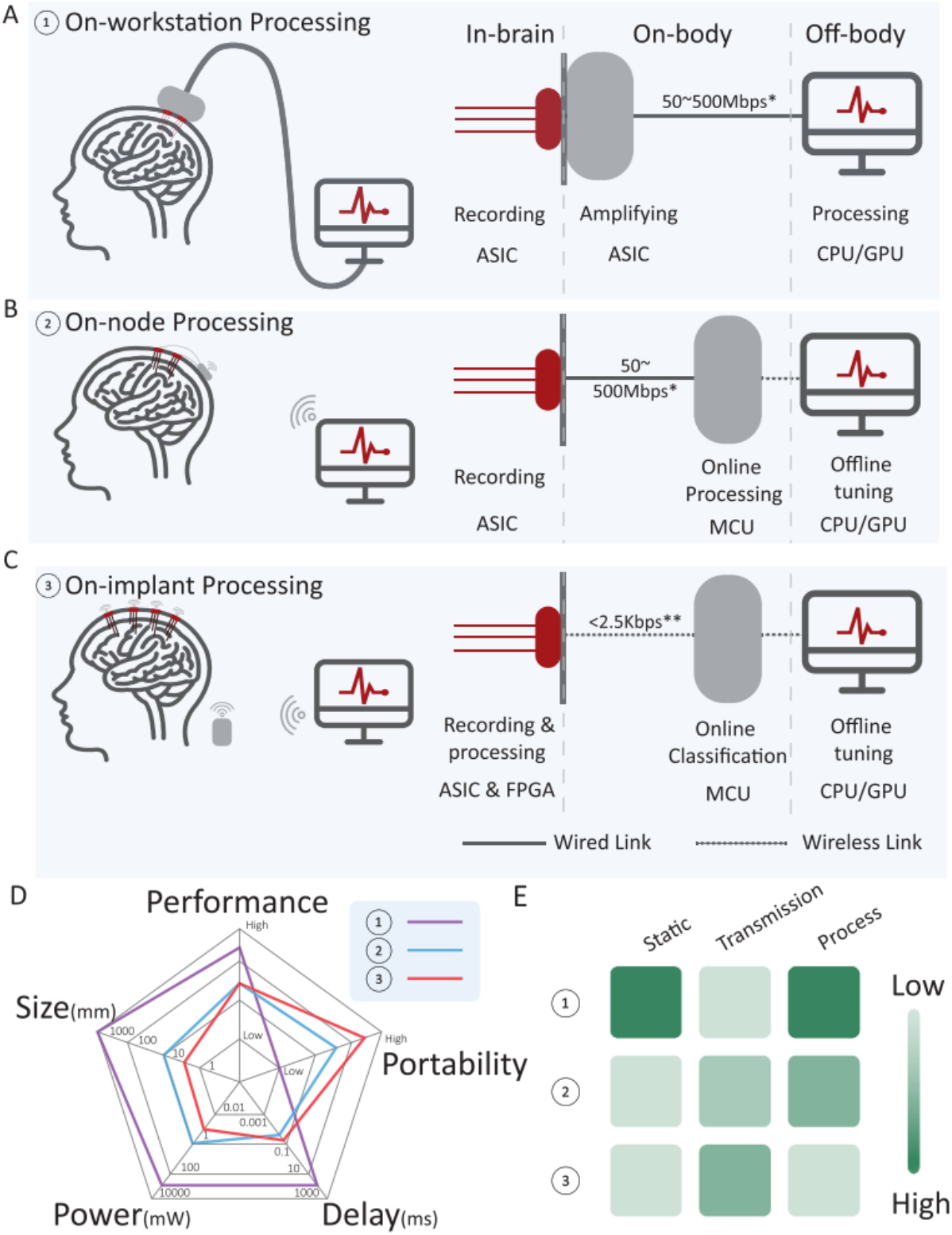


Figure 2.10 : Les différentes positions des unités de traitement de signal au sein des neurobiohybrides *in vivo*. (A) Le traitement des signaux est réalisé sur une station déportée et fixe avec connexion filaire. (B) Le traitement des signaux est réalisé sur une station déportée et fixe avec transfert d'informations sans fil. (C) Le traitement des signaux est réalisé au niveau de l'implant par une unité implantée. (D) Diagramme illustrant les avantages et inconvénients de chaque positionnement de l'unité de traitement de signal. (E) Comparaison de la consommation énergétique induite par les différents positionnements de l'unité de traitement. Figure issue de (Z. Zhang et al., 2022).

2.2.5.3 Le défi de la consommation énergétique

En plus des limitations concernant l'efficacité de traitement des données enregistrées, il est important de noter que la consommation énergétique des appareils numériques est élevée. Cette limite impose de prévoir une source d'énergie suffisante pour alimenter les unités de traitement sur toute la période de fonctionnement. Les batteries sont en général placées au niveau des unités de traitement du signal (implantées ou non). Dans le cas d'un système complètement implanté, il est nécessaire de changer la batterie au bout de quelques années. Une autre solution consiste à prévoir un moyen de la recharger par transfert d'énergie sans fil comme dans le cas des implants cochléaires (Yip et al., 2015). La faible autonomie des implants complique le quotidien des personnes implantées. L'optimisation énergétique est donc au cœur de nombreuses recherches (Roy et al., 2022). De plus, il est important de préciser que les machines servant de support aux algorithmes de traitement du signal fonctionnent de manière numérique alors que les signaux des neurones vivants sont purement analogiques. Il est donc nécessaire de convertir le signal analogique en un signal numérique et vice-versa. Cette opération est énergivore et augmente la consommation énergétique du système.

Pour tous les implants, un compromis est donc réalisé entre la taille, les performances, la portabilité, le délai de réponse et la puissance consommée (Z. Zhang et al., 2022). Toutes ces limitations ne permettent pas à ce jour d'établir une boucle de communication bidirectionnelle en temps réel dans un système qui réponde de manière satisfaisante à l'ensemble des besoins d'un patient. Trouver de nouvelles méthodes de traitement du signal plus efficaces, miniaturisées et à moindre coût énergétique est donc indispensable pour améliorer l'efficacité des systèmes actuels.

2.3 Les défis imposés par les caractéristiques des conditions pathologiques ciblées

Au-delà des défis techniques à relever pour permettre un échange optimal d'informations entre les interfaces neurobiohybrides et le vivant, certaines contraintes sont directement imposées par les maladies dans lesquelles ces implants ont vocation à être utilisés. En effet, dans certains contextes pathologiques, les implants unidirectionnels sont insuffisants pour restaurer tout ou partie des fonctions physiologiques perdues. C'est le cas en particulier des lésions de la moelle épinière suite à des accidents qui rendent les personnes para- ou tétraplégiques. Nous avons vu dans le chapitre 1 que certains implants permettant de stimuler les deux extrémités sectionnées d'un nerf contribuent à l'amélioration significative de la récupération fonctionnelle en cas de chirurgie nerveuse (*cf.* Chapitre 1, §1.6.3.3). Toutefois, cela ne suffit pas à restaurer la motricité des membres postérieurs et/ou supérieurs en cas de section complète au niveau spinal. Dans ce contexte, la stratégie consistant à établir une boucle fermée entre plusieurs implants disposés à différents niveaux du système nerveux est très

prometteuse. Plusieurs travaux récents publiés cette année sont particulièrement encourageants dans ces contextes de section de la moelle épinière et sont exposés dans la suite de ce propos.

2.3.1 Essais cliniques récents et en cours dans des contextes de section traumatique de la moelle épinière

Un des tous premiers succès dans le domaine des sections de la moelle épinière a été obtenu chez un patient de 24 ans rendu quadriplégique suite à une lésion de la moelle épinière au niveau cervical entre les vertèbres C5 et C6. Dans ce contexte clinique, l'utilisation d'une combinaison de deux implants, l'un invasif implanté dans le cortex moteur pour enregistrer les intentions de mouvement, l'autre non invasif apposé sur l'avant-bras du patient pour stimuler les muscles sous-jacents, a permis à ce patient de recouvrer la motricité indépendante des doigts, de la main et du poignet contribuant ainsi à une récupération fonctionnelle pour des gestes de la vie courante (Bouton et al., 2016). Plus récemment, une stratégie analogue de « *pontage neural électronique pour contourner des voies déconnectées du système nerveux* » (Bouton et al., 2016) a permis de restituer l'usage de ses jambes à un patient partiellement paralysé à la suite d'un accident (Lorach et al., 2023). L'accident ayant provoqué une lésion partielle de la moelle épinière au niveau cervical (entre les vertèbres C5 et C6), les influx nerveux provenant du cerveau n'étaient plus transmis jusqu'aux jambes. Le principe adopté ici a donc consisté à rétablir une communication entre les étages supérieurs et inférieurs à la lésion à l'aide de deux jeux d'électrodes : un premier implanté à la surface du cortex moteur et un second en position épidurale au niveau des racines dorsales de la moelle épinière au niveau lombaire. Le premier jeu d'électrodes enregistre les signaux en amont de la zone lésée (directement à la surface du cortex dans notre exemple) lorsque le patient pense à exécuter un mouvement des jambes. Les signaux enregistrés sont transmis à une unité de traitement non implantée portable chargée d'interpréter les signaux permettant de prédire les intentions motrices du patient. En fonction des informations collectées, l'unité de traitement pilote ensuite un générateur de signaux qui stimule électriquement les zones d'entrées ciblées des racines dorsales de la moelle épinière à l'aide d'un second jeu d'électrodes implanté en aval de la lésion, résultant ainsi en une activation sélective des muscles des jambes (Lorach et al., 2023).

D'autres approches, illustrées en figure 2.11, sont envisagées dans la littérature pour des implants visant à rétablir une communication entre les étages supérieurs et inférieurs d'une région lésée de la moelle épinière. Le principe de fonctionnement de ces implants s'appuie sur le même principe que l'essai clinique présenté précédemment. Une intention de mouvement est formulée dans le cerveau et est enregistrée en amont de la région lésée (soit directement à la surface du cortex, soit au niveau de la moelle épinière) (Burke et al., 2021). L'information est ensuite transférée à une interface stimulatrice implantée en aval de la région lésée, permettant ainsi de faire le lien entre le cerveau et les membres (ou des éléments prosthétiques) ; les auteurs évoquent un « *pont digital entre le cerveau et la moelle épinière* » pour qualifier ce principe (Lorach et al., 2023).

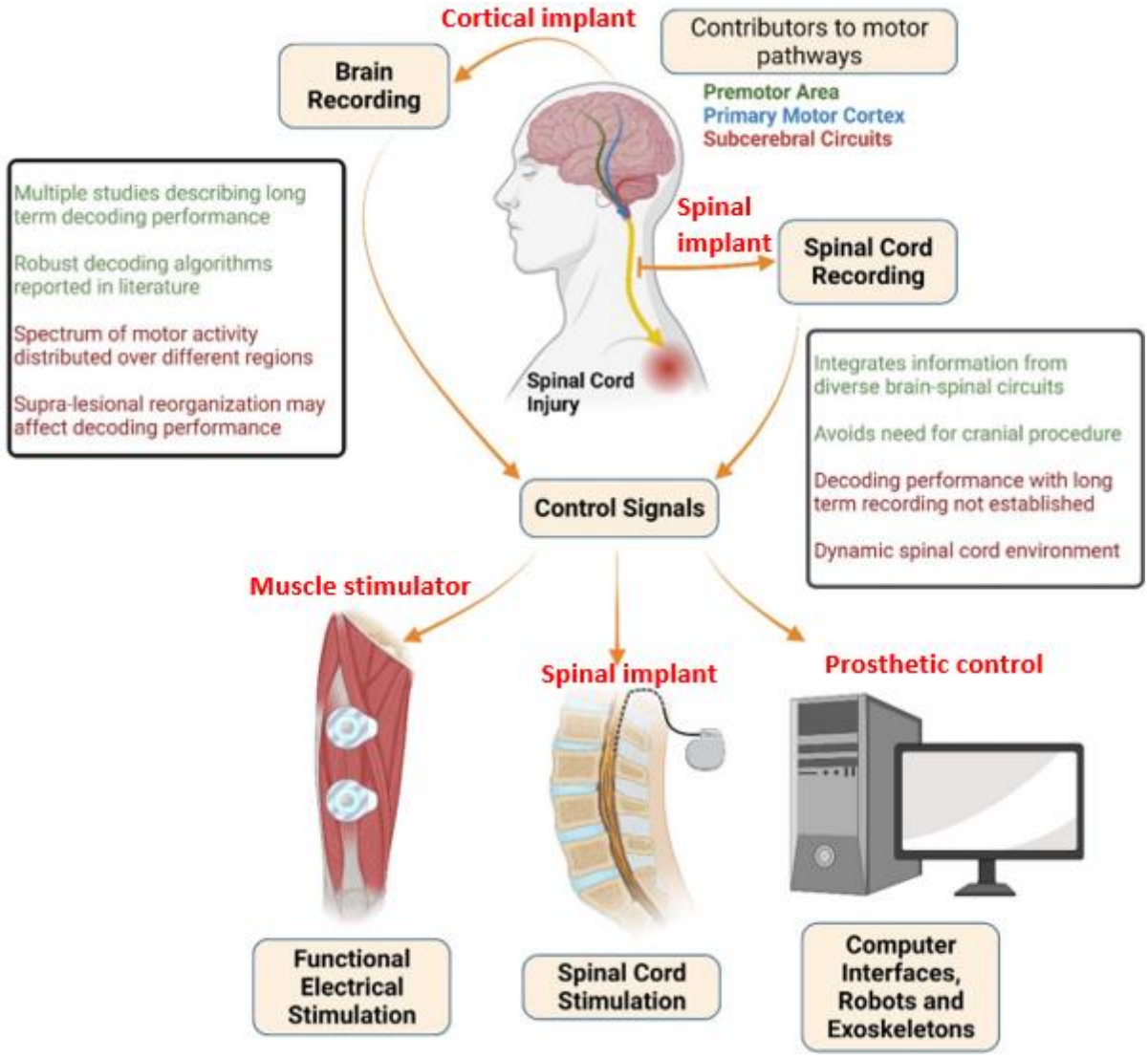


Figure 2.11 : Le principe de fonctionnement d'interfaces corticales et spinales permettant de transmettre des signaux stimulateurs au-delà d'une région spinale lésée. Les intentions motrices du patient sont enregistrées au niveau cortical ou spinal (en amont de la lésion spinale) et permettent de piloter des stimulateurs musculaires, un implant spinal implanté en aval de la blessure ou une prothèse robotique selon le contexte clinique. Figure adaptée de (Jiang et al., 2022).

Ces travaux très encourageants ont été reproduits tout récemment en vue de restaurer l'usage des membres supérieurs chez un patient suisse de 46 ans (*cf.* article paru le 28/09/2023 dans la revue médicale Le Quotidien du Médecin « *Traumatisme médullaire : après les jambes, une interface cerveau-machine testée pour retrouver l'usage des bras* », https://www.lequotidiendumedecin.fr/actu-medicale/recherche-science/traumatisme-medullaire-apres-les-jambes-une-interface-cerveau-machine-testee-pour-retrouver-lusage). Les enjeux sont toutefois ici plus complexes, puisque la motricité fine des mains et surtout des doigts met en œuvre beaucoup plus de muscles que la motricité des jambes. A ce jour, les équipes de Jocelyne Bloch et Grégoire Courtine indiquent avoir prévu d'opérer deux autres

patients pour les membres supérieurs avant de publier leurs données complètes dans une revue scientifique. Ce domaine en plein essor est donc à surveiller de près. Ces travaux soulignent la pertinence des approches impliquant la création d'une boucle de communication entre l'encéphale (siège des commandes de la motricité volontaire) et les étages inférieurs aux lésions spinales. Une approche alternative consiste à développer des implants bidirectionnels adaptatifs, c'est-à-dire des implants qui soient capables de procéder concomitamment à l'enregistrement des zones ciblées et à leur stimulation, de façon à pouvoir ajuster en temps réel les paramètres de stimulation aux caractéristiques électriques enregistrées dans la/les zone(s) ciblée(s). Les essais dans ce domaine concernent plus particulièrement les implants sous-corticaux et sont exposés dans la suite du propos.

2.3.2 Vers le développement d'implants bidirectionnels adaptatifs

2.3.2.1 La preuve de concept *in vitro*

Les systèmes adaptatifs, capables de moduler leur activité en temps réel en fonction des conditions pathophysiologiques du tissu interfacé, sont peu présents dans la littérature. La plupart de ces systèmes sont en phase de développement, à l'exception de l'essai clinique en cours ADAPT-PD (https://www.michaeljfox.org/grant/adaptive-closed-loop-neuromodulation-and-neural-signatures-parkinsons-disease, (Bronte-Stewart et al., 2023); voir aussi §2.3.3.1 ci-dessous). Toutefois, leur conception est majoritairement validée *in vitro* (Keren et al., 2019). L'organisation générale d'un système neurobiohybride adaptatif *in vitro* est décrite en figure 2.12. La composante biologique émet des signaux qui sont enregistrés à l'aide de l'interface électrophysiologique. Ces signaux sont amplifiés puis convertis dans un format numérique. Le traitement des données est réalisé à l'aide d'une unité de traitement qui pilote également un générateur de stimuli en temps réel en fonction des informations tirées de l'analyse des données. Le signal issu du générateur est ensuite converti au format analogique puis appliqué à la composante biologique à l'aide d'un amplificateur. La boucle de communication permet au système d'agir de manière rétroactive sur le tissu vivant à l'aide des enregistrements réalisés afin d'adapter son fonctionnement au contexte pathophysiologique donné.

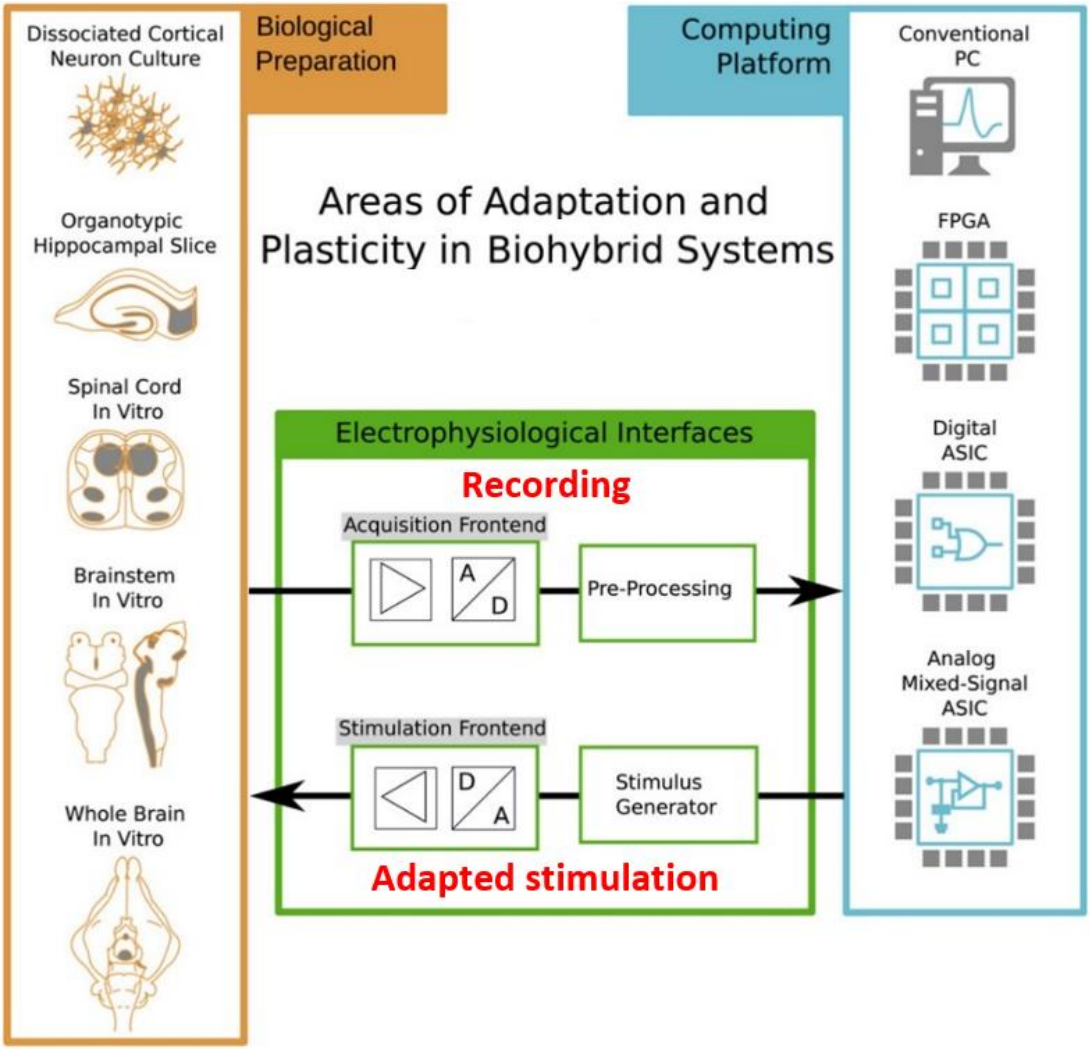


Figure 2.12 : Eléments composant un système neurobiohybride adaptatif *in vitro*. La préparation biologique (*biological preparation*) est reliée à un système de calcul (*computing system*) par le biais d'interfaces électrophysiologiques (*electrophysiological interfaces*). FPGA = *Field Programmable Gate Array* ; ASIC = *Application-Specific Integrated Circuit* ; A/D = convertisseur Analogique vers Digital ; D/A = convertisseur Digital vers Analogique. Figure adaptée de (R. George et al., 2020).

Plusieurs exemples d'expérimentations dans le cadre de la communication bidirectionnelle entre des cellules vivantes et des interfaces électroniques *in vitro* existent. Ainsi, le Dr. Hierlemann a, en 2017, ciblé une micro-stimulation sélective de neurones et un enregistrement local des potentiels d'action sur une surface plane à l'aide d'un commutateur qui a permis de piloter 1024 canaux d'enregistrement avec conversion A/N 10 bits 20 kS/s et 32 unités de stimulation à la périphérie du réseau (Hierlemann, 2017). Par ailleurs, pour étudier les lésions cérébrales, (Buccelli et al., 2019) a présenté un système de prothèse neuronale interfacée de manière bidirectionnelle en temps-réel avec une culture *in vitro* par le biais d'une configuration de MEA incluant un circuit FPGA contrôlé par ordinateur. Une représentation schématique de ce système est donnée en figure 2.13.

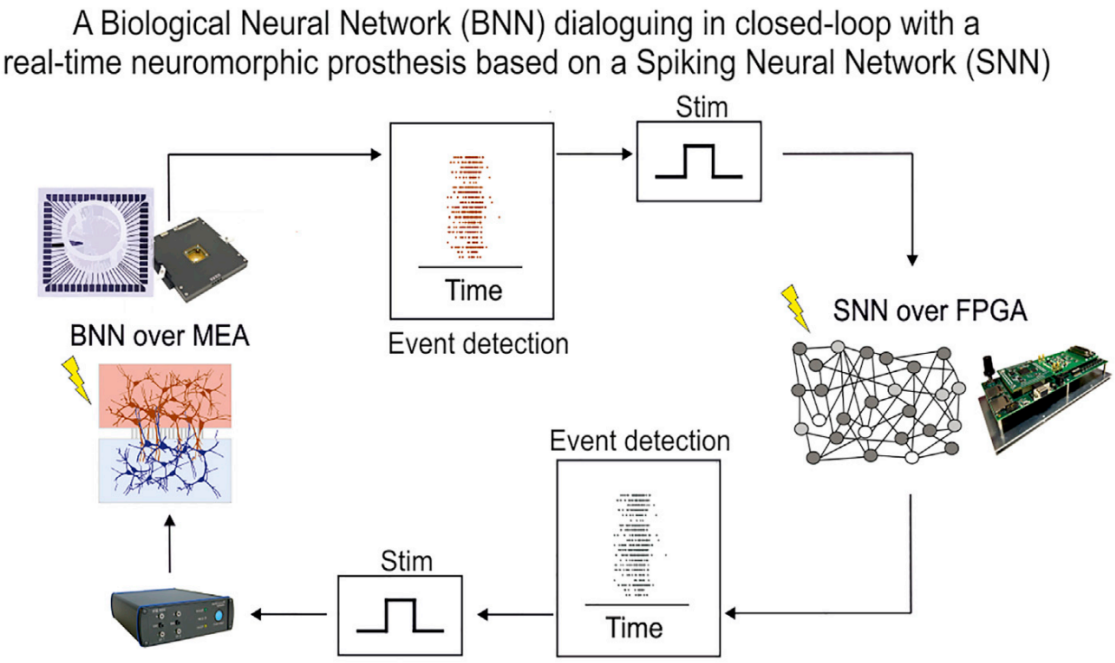


Figure 2.13 : Représentation schématique d'une boucle de dialogue entre un réseau de neurones biologiques (ou *Biological Neural Network*, BNN) et un réseau de neurones artificiels (ou *Spiking Neural Network*, SNN). La détection d'un événement au sein du réseau de neurones biologiques déclenche la stimulation (Stim) du réseau de neurones artificiels et vice-versa. Le BNN est cultivé à la surface d'un réseau de microélectrodes (MEA). Figure issue de (Buccelli et al., 2019).

La tendance se dégageant de ces travaux indique que le dialogue entre les neurones vivants et artificiels est soit unidirectionnel, soit il nécessite l'inclusion d'un ordinateur dans au moins une des parties du système pour réaliser une forme de boucle de rétroaction. Les configurations publiées comportent des convertisseurs digitaux, du stockage de paramètres dans des bases de données, des circuits FPGA pour contrôler les circuits électroniques ou encore un pré- et/ou post-traitement numérique. Ces expérimentations fournissent une plateforme de prototypage rapide pour un modèle *in vitro*, mais ne correspondent pas aux attendus pour des applications *in vivo* nécessitant une intégration dans le corps humain, une faible consommation d'énergie et un grand nombre de neurones de silicium (Broccard et al., 2017).

Dans l'optique de développer des neurobiohybrides bidirectionnels adaptatifs, basés sur une organisation similaire à celle des systèmes unidirectionnels déjà utilisés cliniquement et évoqués dans les paragraphes précédents, il faut inclure une boucle de rétroaction au sein du système. La présence de cette boucle rend le système plus complexe et implique de trouver des solutions pour gérer concomitamment l'enregistrement, le traitement des signaux enregistrés et les paramètres de stimulation. Bien que ces défis ne soient pas encore tous résolus de façon optimale, l'inclusion d'une telle boucle de rétroaction dans quelques systèmes en cours de développement permettra de proposer des systèmes plus efficaces sur le long terme et ne nécessitant pas de réadaptation des paramètres de stimulation par le neurologue après implantation. Ce type de système devrait contribuer à l'amélioration d'un grand nombre des applications citées précédemment.

2.3.2.2 Une implémentation *in vivo* pour la stimulation cérébrale profonde dans la maladie de Parkinson

En s'appuyant sur des dispositifs de DBS déjà utilisés en pratique clinique courante, l'équipe d'Helen Bronte-Stewart à l'université Stanford aux Etats-Unis est parvenue à établir, dans le cadre de l'essai clinique ADAPT-PD déjà mentionné, un prototype de boucle de communication bidirectionnelle *in vivo*. L'idée sous-jacente à ce travail était, à partir de l'identification d'une signature électrique spécifique du « *freezing* » (manifestation clinique typique des phases avancées voire tardives de la maladie de Parkinson qui se caractérise par une impossibilité à initier un mouvement), d'adapter en temps réel les paramètres de stimulation des neurones du noyau sous-thalamique selon cette signature électrique spécifique, à savoir les ß-*bursts* enregistrés (Whitmer et al., 2012). Ces auteurs ont pour cela développé un nouvel algorithme à double seuil en fonction de la fenêtre thérapeutique du patient (Velisar et al., 2019). Ce type d'implant adaptatif permet une meilleure gestion des symptômes tardifs de la maladie. Il est toutefois limité par le délai séparant l'enregistrement des ß-*bursts* et la stimulation du noyau sous-thalamique due au temps nécessaire au traitement de l'information par l'algorithme. De plus, le défi de la consommation énergétique n'est pas du tout adressé par ce type de solution. Cet essai clinique, unique à notre connaissance, laisse augurer des nombreux bénéfices que ce type d'implant bidirectionnel pourrait apporter dans le cadre de maladies ou de traumatismes du système nerveux. En effet, l'adaptation des paramètres de stimulation en temps réel aux besoins du tissu ciblé est un atout considérable dans le cas de maladies chroniques évolutives comme les maladies neurodégénératives, ce que ne fait actuellement aucun système unidirectionnel puisqu'il n'est pas renseigné sur l'état pathophysiologique du tissu interfacé. Implémenter ce type de communication dans les neurobiohybrides médicaux actuels permettrait d'améliorer grandement leur efficacité comme nous allons le voir ci-après. Nous aborderons dans une section suivante les solutions qui s'appliquent.

2.3.3 Les enjeux et bénéfices des systèmes neurobiohybrides adaptatifs

2.3.3.1 Enjeux thérapeutiques

Les exemples que nous avons vus jusqu'à présent apportent la preuve du réel bénéfice thérapeutique, au moins sur le plan symptomatique, des implants neuronaux et plus particulièrement des stratégies qui consistent à établir une boucle de rétroaction. Il existe cependant des enjeux non encore résolus concernant le caractère adaptatif de ces implants ; leur résolution permettrait d'améliorer l'efficacité des neurobiohybrides utilisés en pratique clinique notamment concernant :

- L'adaptation de l'activité du neurobiohybride pour répondre aux variations des conditions physiologiques de l'organe interfacé qui, pour les dispositifs implantés présentés jusqu'ici, se fait au travers d'algorithmes et/ou d'une conversion

analogique/numérique ; ceci induit nécessairement un délai de réponse entre l'enregistrement et la stimulation adaptative. Il est à noter que le système doit régulièrement être recalibré pour ne pas perdre en efficacité thérapeutique ni endommager le tissu.

- Les coûts énergétiques qui doivent être réduits au maximum pour allonger l'autonomie des systèmes tout en tenant compte de la chaleur dégagée par ces implants.
- L'efficacité thérapeutique du neurobiohybride sur le long terme : le bénéfice thérapeutique peut en effet se réduire avec le temps en raison d'une détérioration progressive de la qualité de l'interface (Limousin & Foltynie, 2019) ce qui pourrait de plus être délétère pour les tissus implantés.

L'ensemble des limites et des enjeux des systèmes actuels sont résumés dans la figure 2.14. Des implants qui permettraient de lever l'ensemble des limites identifiées pour les implants actuels pourraient être qualifiés d'implants de nouvelle génération. Les axes d'amélioration auxquels les travaux présentés dans ce manuscrit peuvent contribuer sont identifiés en gras. L'établissement d'une boucle de communication bidirectionnelle dans un système neurobiohybride à visée thérapeutique lui permettrait d'adapter son activité en temps réel aux besoins des neurones et/ou tissus interfacés, ce qui contribuerait à améliorer significativement la qualité de vie des patients concernés (Belkacem et al., 2023).

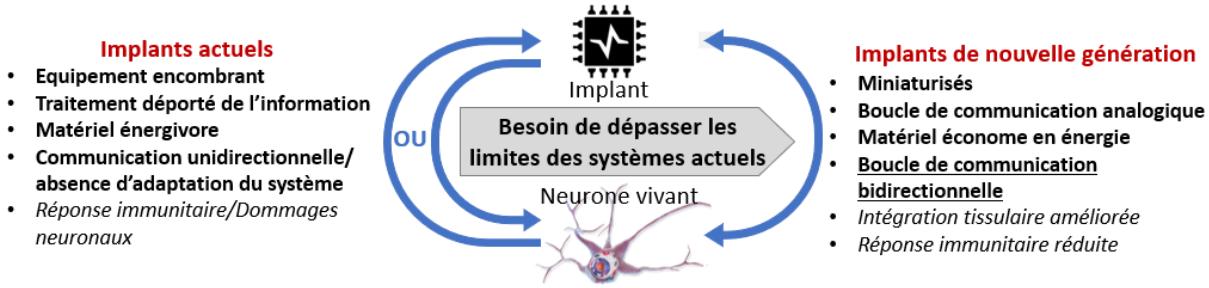


Figure 2.14 : Synthèse des différentes limites des implants neurobiohybrides actuels et liste des améliorations nécessaires qui en découlent. Les éléments en gras sont ceux pour lesquels les travaux présentés dans ce document contribuent à apporter une réponse. Les éléments en italique sont ceux que ces travaux ne permettront pas de résoudre. Figure réalisée avec le logiciel Powerpoint.

Ainsi, pour développer une boucle de communication bidirectionnelle adaptative, il faut répondre au fait que les systèmes actuels sont encombrants, qu'ils utilisent majoritairement un traitement déporté de l'information et que l'équipement nécessaire implique une consommation extensive d'énergie. De plus, la majorité des systèmes actuels s'appuie sur une communication unidirectionnelle ce qui implique une intervention externe pour reprogrammer régulièrement le dispositif électronique et adapter les paramètres de stimulation dans le cas de maladies chroniques évolutives.

Certains systèmes tels que les traditionnelles électrodes de DBS modifiées dans le cadre de l'essai clinique ADAPT-PD mené par l'équipe de H. Bronte-Stewart (*cf*. Chapitre 2, §2.2.2.1) emploient déjà une forme de boucle de rétroaction au sein d'un système neurobiohybride visant à réduire les troubles paroxystiques de la marche aux stades avancés de la maladie de Parkinson. Il est à noter cependant que ce type d'implémentation clinique des systèmes neurobiohybrides adaptatifs est à ce jour très rare, et que leur développement est entravé par de nombreuses difficultés.

2.3.3.2 Enjeux éthiques et économiques

Dans d'autres périmètres, bien qu'encore purement théoriques et à l'état d'idées, les neurobiohybrides pourraient également trouver des applications dans le domaine du jeu et du divertissement, de l'éducation, de la sécurité ou encore de l'augmentation des facultés physiologiques (Cinel et al., 2019; van Erp et al., 2012). Ces potentielles nouvelles applications soulèvent des questions éthiques largement discutées dans la littérature (Coin & Dubljević, 2023).

Enfin, l'utilisation des neuroprothèses permet de réduire les coûts associés aux handicaps en rendant les patients plus autonomes (Creasey et al., 2000). Rendre les systèmes plus performants aurait donc logiquement un impact encore plus positif sur cet aspect économique des systèmes de santé concernés. Le marché des systèmes neurobiohybrides est en pleine expansion et pesait 1.27 milliards de dollars américains en 2022. Ce marché est estimé croître à 2.52 milliards de dollars américains d'ici 2026 (*Brain Computer Interface Global Market Report 2022*, 2022). Ces prévisions soulignent tout l'intérêt et les enjeux économiques sous-jacents au développement de neuroprothèses de nouvelle génération.

2.4 De l'importance d'améliorer le traitement de l'information pour la prochaine génération de systèmes neurobiohybrides

L'établissement d'une boucle de rétroaction *in vivo* et le développement d'implants de nouvelle génération nécessite des systèmes ultra miniaturisés ce qui est rendu difficile par l'utilisation d'unités de traitement de signal convertissant des signaux analogiques en signaux numériques et vice-versa. Actuellement, la majorité des travaux existants visant à établir une boucle de communication adaptative au sein d'un système neurobiohybride sont conduits dans le cas de plateformes *in vitro*. Les chaînes qui traitent l'information sont très encombrantes et consomment beaucoup d'énergie en raison de la nécessaire conversion des signaux. Ainsi, l'amélioration de l'efficacité des unités de traitement est une étape indispensable au développement de neurobiohybrides de nouvelle génération.

Pour situer les enjeux et le positionnement de ces travaux, il est important de rappeler que les neurones vivants émettent des signaux analogiques de très faible amplitude (de l'ordre de 100 mV) et que leur signature électrique extracellulaire est de l'ordre de 50 à 500 µV (*cf.* Chapitre 2, §2.2.5.1) (Bashirullah et al., 2007), ce qui constitue un défi pour la détection des signaux dans un environnement comprenant différentes sources de bruit électromagnétique pouvant venir parasiter les enregistrements. Ainsi, pour gagner en efficacité énergétique, en rapidité de traitement de l'information, en encombrement, et pour développer une nouvelle génération d'implants neurobiohybrides, il est impératif de tenir compte de cet aspect.

Les pistes d'amélioration possibles en la matière pour le développement de systèmes neurobiohybrides de nouvelle génération sont présentées dans la suite du propos. Concernant le traitement de signal, nous allons nous intéresser à l'apport de l'intelligence artificielle qui bénéficie de nombreuses innovations récentes. En parallèle, des progrès notables dans le domaine du traitement neuro-inspiré de l'information (ou *neurocomputing*) et plus particulièrement de l'ingénierie neuromorphique ont été réalisés grâce aux réseaux de neurones artificiels émettant des potentiels d'action : ces puces électroniques arborent un fonctionnement calqué sur celui de neurones vivants. En réseau, ce type de neurones artificiels permet de traiter l'information en restant intégralement dans le domaine des signaux analogiques.

2.4.1 L'apport de l'intelligence artificielle

La notion d'intelligence artificielle se réfère à des systèmes modélisant un comportement intelligent sans ou avec très peu d'intervention humaine. Ce type de système est d'ores et déjà présent en médecine sous forme virtuelle (par le biais d'algorithmes mathématiques capables d'autoapprentissage) et/ou implémentés sur des dispositifs capables d'assister les chirurgiens dans leurs interventions par exemple (Hamet & Tremblay, 2017). Le principal avantage de l'intelligence artificielle est qu'elle permet d'automatiser des tâches complexes. Les solutions logicielles trouvent donc leur place dans la conception des neurobiohybrides où elles peuvent être employées pour automatiser le traitement de signal ou pour l'établissement d'une boucle de rétroaction automatisée (Lorach et al., 2023; Subasi, 2022). Les algorithmes d'intelligence artificielle sont applicables à tous les types de neurobiohybrides, quelle que soit l'application visée (X. Zhang et al., 2020). Comparés aux méthodes de computation classiques, les algorithmes de *deep learning* (une sous-catégorie des méthodes classiques d'apprentissage automatisé de *machine learning* qui consistent à permettre à un algorithme d'adapter par lui-même son fonctionnement) permettent un traitement de données plus efficace même dans le cas où la puissance du matériel est limitée (Rokai et al., 2023).

Par ailleurs, sur le plan des solutions matérielles, ces dernières années ont vu émerger un nouveau champ de recherche dans le domaine des circuits électroniques intégrant des modules d'intelligence artificielle. En effet, le traitement bio-inspiré de l'information, ou «

ingénierie neuromorphique », est un champ émergeant qui vise au développement de solutions matérielles (*hardware*) s'inspirant des propriétés physiques des réseaux de neurones vivants. A partir des connaissances issues des neurosciences sur la façon dont le cerveau traite les informations et donc dont les neurones vivants communiquent, la conception de systèmes électroniques dits intelligents (cognitifs et apprenants) est désormais possible ; ces nouveaux systèmes bioinspirés sont au cœur de la révolution en cours dans le domaine de l'intelligence artificielle (Merolla et al., 2014). Associé aux évolutions dans le domaine des « neuro-biosystèmes », cela ouvre donc un nouveau champ de recherche en plein essor visant à améliorer ou à remplacer des fonctions neuronales défaillantes à l'aide de dispositifs matériels tels que les biocapteurs, les puces multi-électrodes ou même des prothèses neuronales (Panuccio et al., 2016; Vassanelli & Mahmud, 2016b).

2.4.2 Le traitement neuro-inspiré de l'information (ou *neurocomputing*)

La loi de Moore est un modèle techno-économique établi en 1965 par Gordon Moore stipulant que les performances et la fonctionnalité des systèmes informatiques doublerait tous les deux ans de manière durable (Moore, 2006). Jusqu'à récemment, cette loi était vérifiée grâce aux efforts de miniaturisation des transistors en silicium servant de brique élémentaire aux processeurs. De nos jours, cette loi semble atteindre ses limites. En effet, la taille des transistors ayant été diminuée au point d'atteindre des dimensions nanométriques (2-3 nm), les techniques de lithographie actuelles atteignent leurs limites et ne permettent plus de réduire encore davantage les dimensions. La poursuite des améliorations des systèmes informatiques ne passera vraisemblablement plus par la réduction de la taille des transistors (Lundstrom & Alam, 2022).

Trois voies d'améliorations sont désormais explorées pour maintenir le rythme d'évolution des systèmes de traitement de l'information efficaces en énergie. Une première consiste à employer des matériaux de nouvelle génération pour concevoir des nouveaux microprocesseurs, une deuxième tente d'améliorer l'existant, et une troisième cherche à développer de nouveau modèles de traitement de l'information et de nouvelles architectures (Shalf, 2020). Ces trois voies sont illustrées en figure 2.15 ci-dessous.

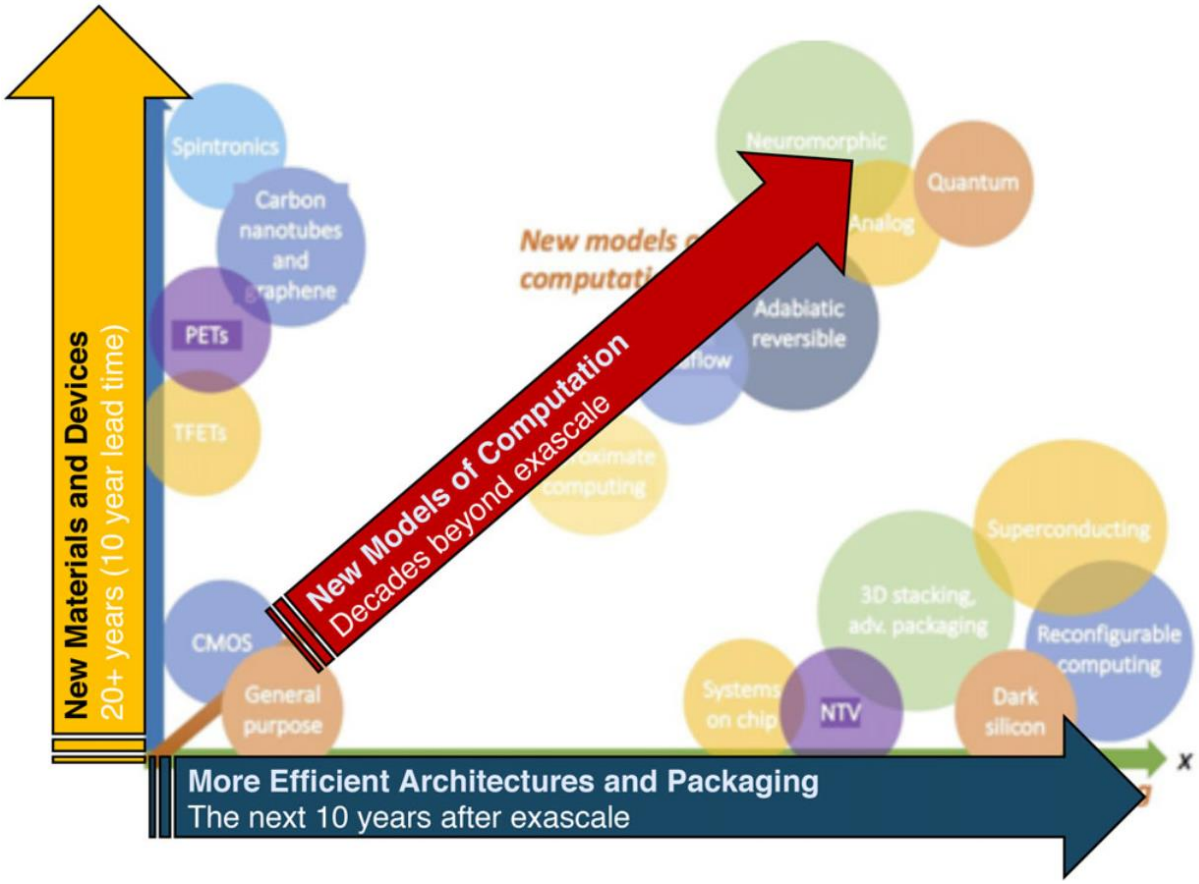


Figure 2.15 : Les voies d'amélioration envisagées pour les futures évolutions des systèmes computationnels. L'axe vertical jaune présente les nouveaux matériaux disponibles. L'axe horizontal bleu présente les nouvelles architectures en cours de développement. L'axe diagonal présente les nouveaux modèles de computation dont fait partie le traitement neuro-inspiré de l'information (ou *neurocomputing*). Figure issue de (Shalf, 2020).

L'une des approches employées pour poursuivre l'amélioration des systèmes computationnels consiste donc à s'inspirer du fonctionnement du cerveau et des neurones humains (Peper, 2017). Intégrer la mémoire et l'unité de traitement de données dans un même module, de la même manière que la mémoire d'un organisme vivant est répartie sur des réseaux de neurones distribués dans plusieurs régions cérébrales, permet d'apporter de nouvelles fonctionnalités au système computationnel (Sengupta et al., 2018). Il est à noter que les neurones humains sont capables d'opérations complexes (Gidon et al., 2020). Mimer leur fonctionnement pourrait dès lors permettre d'améliorer l'efficacité computationnelle des systèmes informatiques (Herz et al., 2006). Dans cet objectif, les chercheurs ont conçu des réseaux de neurones à impulsion simulés *in silico* (Maass, 1997) capables de traiter efficacement des informations spatio-temporelles telles que les enregistrements neuronaux (Dethier et al., 2013; Lee et al., 2020). Par ailleurs, l'implémentation matérielle de ce type de système requiert moins d'énergie que les processeurs classiques et offre de nouvelles opportunités d'amélioration aux systèmes neurobiohybrides de par leur efficacité et leur fonctionnement biomimétique (c'est-à-dire qui s'inspire du vivant) (Chiappalone et al., 2022). Ce type de traitement de l'information a déjà été implémenté avec succès au sein d'une interface

neurobiohybride bidirectionnelle avec 252 neurones simulés (Boi et al., 2016). La figure 2.16 ci-dessous présente l'organisation d'un neurobiohybride bidirectionnel incluant un réseau de neurones artificiels sous forme logicielle.

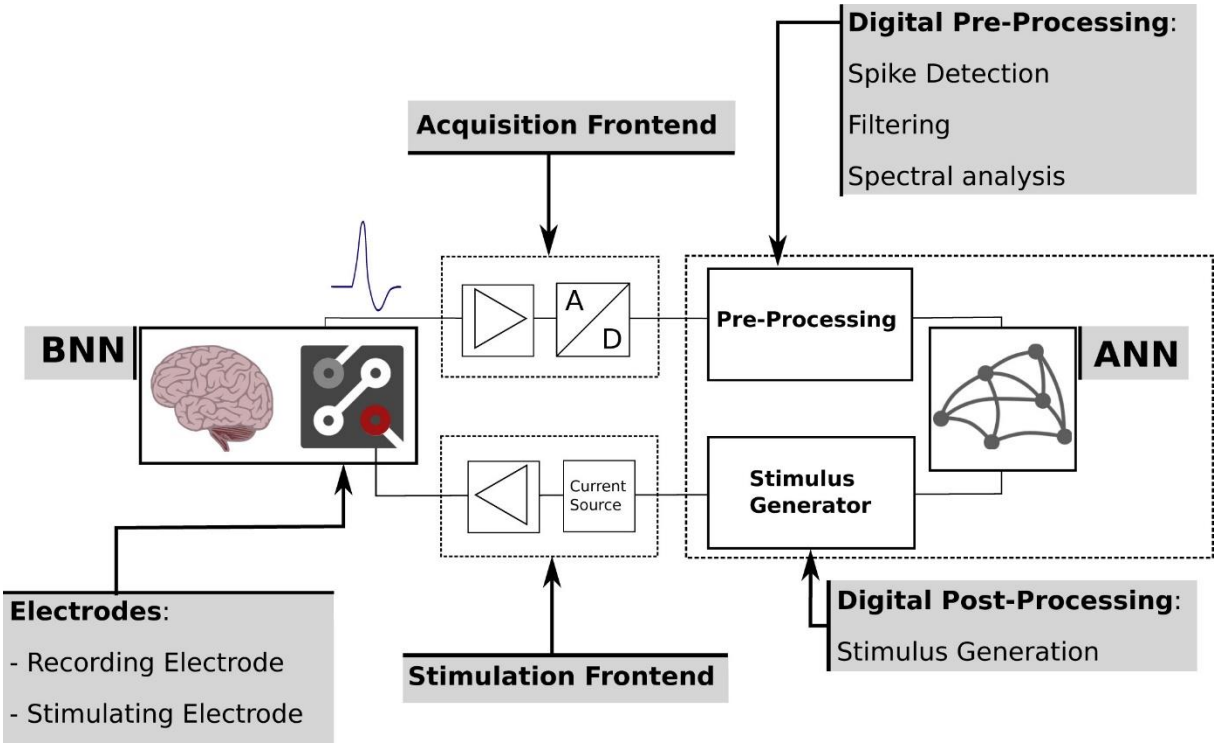


Figure 2.16 : Représentation schématique du fonctionnement d'un neurobiohybride bidirectionnel incluant un réseau de neurones artificiels sous forme logicielle (ANN). Un réseau d'électrodes enregistre l'activité d'un réseau de neurones biologiques (BNN) qui est numérisée et appliquée au réseau de neurones artificiels simulé dans un ordinateur. Le réseau de neurones artificiels pilote en retour un générateur de courant pour stimuler le réseau de neurones biologiques par le biais du réseau d'électrodes. Figure issue de (R. George et al., 2020).

2.5 Conclusion du chapitre

Ce deuxième chapitre a présenté l'ensemble des défis technologiques à relever pour permettre un transfert d'informations durable entre une interface neurobiohybride et les neurones vivants ciblés *in vivo*. Ces défis concernent notamment la stabilité du couplage électrique dans le temps, qui peut être affecté par la détérioration de l'interface neurobiohybride implantée et par la survenue d'une réaction immunitaire ayant pour effet d'englober cette interface dans une couche de tissu cicatriciel nuisant fortement au transfert des signaux entre les électrodes et les neurones ciblés. Pour limiter ce phénomène, divers ajustements peuvent être réalisés notamment concernant le choix des matériaux employés pour la fabrication de l'interface et l'ajout de molécules de fonctionnalisation de surface. Dans le cas d'implants enregistreurs de l'activité électrique des neurones, les défis à relever concernent également le traitement des signaux enregistrés. Les traces obtenues résultent de l'activité simultanée de

plusieurs neurones, ce qui implique la nécessité d'extraire des signatures enregistrées les informations recherchées à l'aide d'une unité de traitement de signal encombrante et énergivore.

Ce chapitre a également illustré la nécessité d'améliorer les systèmes neurobiohybrides unidirectionnels à visée thérapeutique actuels afin qu'ils soient capables de prendre en compte en temps réel les conditions pathophysiologiques du tissu interfacé par l'établissement d'une boucle de rétroaction. L'établissement d'une telle boucle est cependant complexe et seuls de rares exemples d'implémentations *in vivo* existent dans la littérature. De récentes avancées technologiques concernant l'intelligence artificielle et le traitement neuro-inspiré de l'information ouvrent cependant de nouvelles opportunités de conception qui pourraient venir accélérer le développement de nouveaux neurobiohybrides adaptatifs.

Chapitre 3 Positionnement du projet et objectifs du travail de doctorat

3.1 Introduction du chapitre

L'objectif de ce chapitre est de présenter le positionnement du projet scientifique développé au sein de l'équipe CSAM à l'IEMN dans le contexte du développement d'interfaces neurobiohybrides adaptatives à visée thérapeutique. L'apport du travail de doctorat présenté dans ce manuscrit sera également explicité et contextualisé par rapport aux autres travaux réalisés antérieurement et à ceux en cours contribuant à ce même objectif. Ce projet se différencie de la littérature par son approche innovante s'appuyant sur deux innovations technologiques brevetées comportant entre autres un neurone artificiel biomimétique dont les propriétés présentent un intérêt pour le développement d'unités de traitement de signal novatrices.

3.2 Le positionnement de notre équipe sur le sujet

La prochaine génération de systèmes neurobiohybrides devrait répondre à toutes les contraintes des systèmes actuels listées au chapitre 2, notamment en termes d'encombrement et d'énergie consommée. Dans ce sens, une solution pour développer des systèmes nettement moins énergivores serait de s'affranchir complètement des composants à base d'électronique numérique en proposant un système de traitement de signal implantable fonctionnant exclusivement de manière analogique (Broccard et al., 2017). En effet, la conversion des signaux analogique/numérique est très consommatrice d'énergie et produit de surcroît de la chaleur, ce qui est peu compatible avec les besoins de préservation des tissus à implanter.

Les systèmes neuroinspirés permettent un traitement de signal différent des microprocesseurs classiques qui s'avère plus efficace sur des tâches correspondant à celles réalisées par le cerveau : classification, catégorisation visuelle ou encore apprentissage. Basés sur cette approche, des membres de l'équipe, regroupés avec d'autres chercheurs au sein du projet *Spiking Neuronal Circuits and Systems* (SPINE, https://www.iemn.fr/la-recherche/les-groupes/groupe-anode/iii-v-materials-for-more-moore-activity#toggle-id-4), ont conçu en 2017 des neurones artificiels entièrement analogiques, miniaturisés et ultra-efficaces en terme de consommation énergétique (Sourikopoulos et al., 2017). Leur schéma électrique équivalent, présenté en figure 3.1., comporte un ensemble de 6 transistors permettant de reproduire le fonctionnement des canaux ioniques sodiques et potassiques de la membrane plasmique neuronale ainsi qu'une capacité permettant de mimer la membrane phospholipidique (*cf.* Chapitre 1, §1.2 pour les détails relatifs au fonctionnement des neurones biologiques).

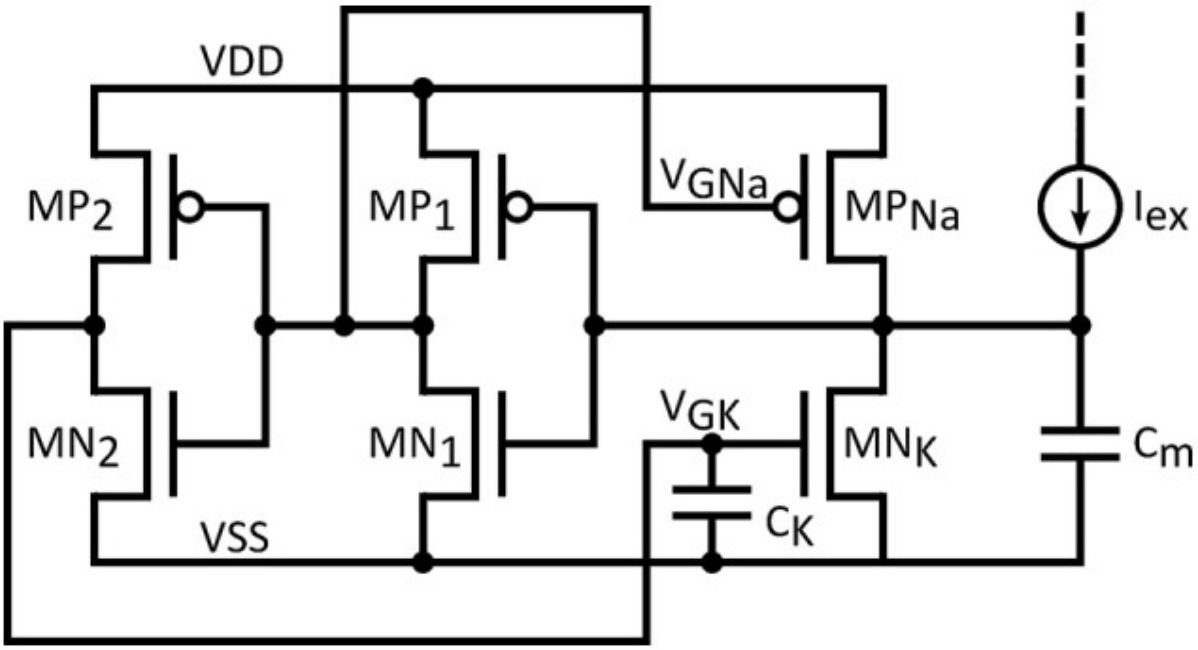


Figure 3.1 : Schéma électrique équivalent d'un neurone artificiel biomimétique conçu à l'IEMN. Ce schéma est basé sur le modèle théorique de fonctionnement de la membrane neuronale de Morris-Lecar ; pour plus de détails, se référer à la publication princeps. Plusieurs de ces neurones artificiels biomimétiques conçus en technologie CMOS 65 nm étaient disponibles au laboratoire avant les travaux présentés dans ce manuscrit. Cm = capacité mimant la capacitance membranaire. Les transistors imitant les pompes sodiques et potassiques sont identifiés respectivement par « Na » et « K ». Figure issue de (Sourikopoulos et al., 2017).

Le fonctionnement de ces neurones artificiels reproduit celui de neurones vivants en termes d'amplitude, de durée et de fréquence des potentiels d'action émis, comme illustré en figure 3.2. Ces neurones artificiels à potentiels d'action biomimétiques peuvent être connectés en réseau en utilisant des synapses artificielles excitatrices ou inhibitrices. En réseau, ces neurones sont capables d'autoapprentissage et seraient pertinents pour servir de base à la conception d'une nouvelle génération de neurobiohybrides s'affranchissant des contraintes des composants à base d'électronique numérique. Les neurones artificiels sont conçus à partir d'une technologie industrielle CMOS 65 nm. Lorsqu'ils sont excités par un courant, ils génèrent donc en réponse des signaux biomimétiques analogues à des potentiels d'action en termes de forme, d'amplitude et de fréquence. Ces neurones artificiels sont miniaturisés (40 × 40 µm de surface) de sorte que leur taille est du même ordre de grandeur que celle du corps cellulaire des neurones. La figure 3.2. présente ces neurones artificiels et illustre la similitude des signaux qu'ils émettent avec ceux émis par différents neurones de mammifères. Ces neurones artificiels fabriqués sur un substrat de silicium ont vocation à être connectés au sein d'un banc électronique développé au laboratoire pendant ma thèse en vue d'être interfacés avec divers neurones vivants pour établir la boucle de communication bidirectionnelle visée.

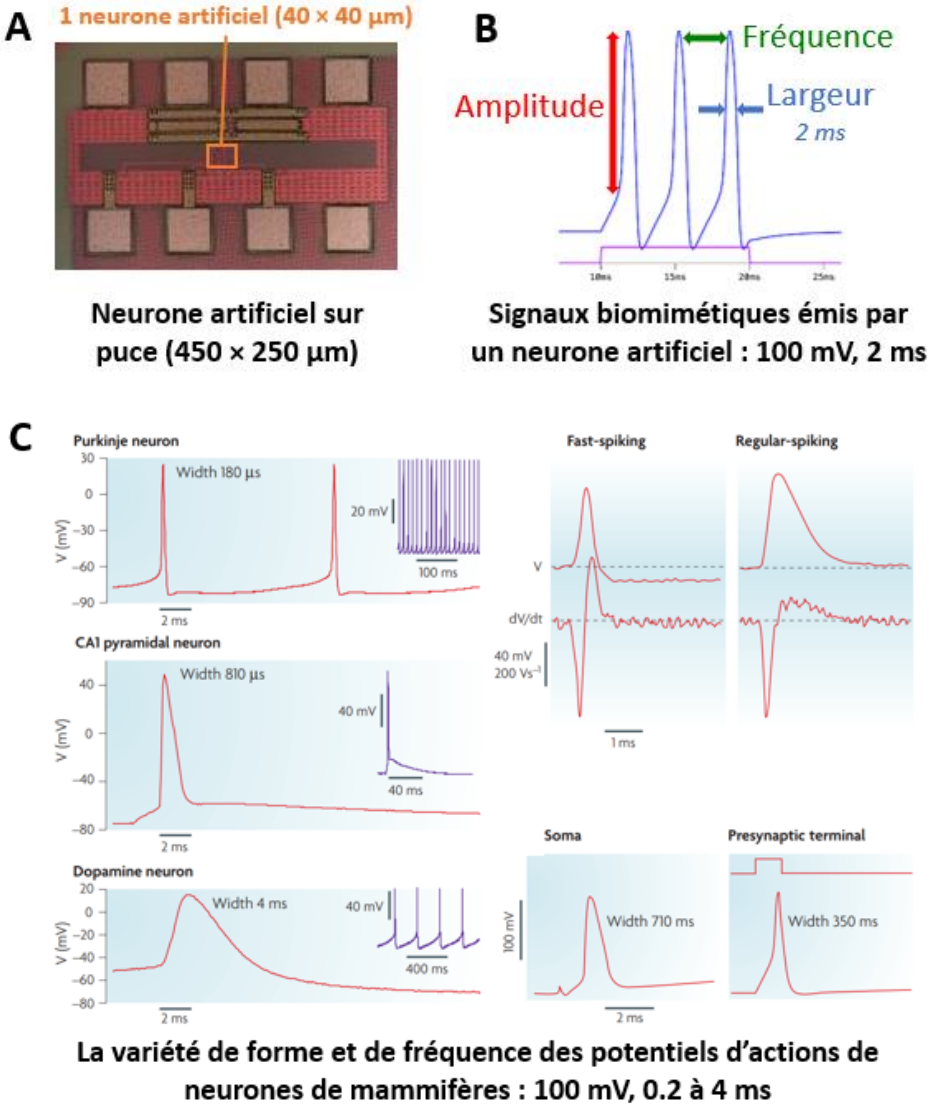


Figure 3.2 : Le neurone artificiel analogique générant des signaux biomimétiques. (A) Photographie du neurone artificiel sur une puce. (B) Les signaux biomimétiques émis par les neurones artificiels, similaires aux signaux de neurones vivants en termes de forme, d'amplitude de fréquence et de largeur de signal. (C) La variété de forme et de fréquence des potentiels d'action de différents neurones de souris. Figure issue de (Bean, 2007).

Les synapses nécessaires pour la réalisation et la fabrication de circuits neuronaux capables d'apprentissage ont été développées dans le cadre du projet SPINE. Cela permet de disposer d'une boite à outils complète pour la mise en réseau des neurones artificiels. La caractéristique la plus importante des neurones artificiels fabriqués par ce groupe de chercheurs est leur très faible énergie dissipée de quelques femtojoules par potentiel d'action biomimétique. Cette énergie est de plusieurs ordres de grandeur inférieure à celle de neurones biologiques dont l'efficacité énergétique est estimée à 10 picojoules par potentiel d'action (Hedayat, 2018). En comparaison de l'existant, cela représente une amélioration par rapport à l'état de l'art de deux ordres de grandeur pour les neurones artificiels et de trois ordres de grandeur par rapport aux neurones biologiques (Hedayat, 2018). Cela représente un avantage majeur pour relever différents défis dans diverses applications telles que le calcul neuro-inspiré,

ou bien les applications médicales. Il est à noter que les travaux ayant permis la conception du neurone artificiel et d'un capteur optique sont protégés par les brevets FR20160053175 et FR20170060062 respectivement.

3.3 Objectif de notre équipe et travaux passés

Dans le contexte exposé jusqu'ici, l'équipe au sein de laquelle j'ai réalisé mes travaux de thèse a pour objectif de rapprocher les domaines de l'ingénierie neuromorphique et celui des neurosystèmes en développant une nouvelle classe de systèmes neurobiohybrides grâce aux neurones et synapses artificiels originaux qu'elle a conçus et créés en technologie CMOS. Cette approche est prometteuse puisqu'elle s'appuie sur des circuits neuromorphiques émettant des potentiels d'action biomimétiques les rendant très intéressants pour être interfacés avec des neurones vivants dans un objectif d'applications biomédicales (Broccard et al., 2017; Vassanelli & Mahmud, 2016b). Cette approche remplit les critères de conception de nouvelles neuroprothèses intégrables *in vivo* qui doivent répondre aux nombreuses contraintes exposées au chapitre 2. En particulier, ces futures neuroprothèses doivent permettre une communication bidirectionnelle en temps réel tout en démontrant une faible consommation d'énergie sur une surface la plus petite possible. Dans ce but, l'emploi d'un signal entièrement analogique est indispensable pour éviter le recours à une conversion vers un signal numérique et vice-versa (R. George et al., 2020; Serruya, 2017; Sourikopoulos et al., 2017) (FR20160053175 et FR20170060062). La figure 3.3. reprend de manière schématique la boucle de dialogue visée et précise comment le traitement localisé de l'information sera assuré par les réseaux de neurones artificiels conçus en technologie CMOS pour la conception d'un dispositif implantable.

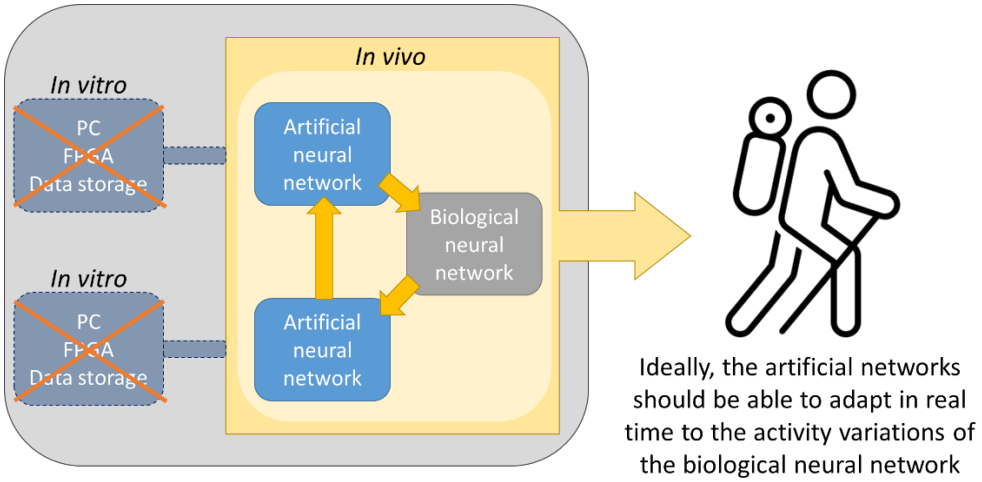


Figure 3.3 : Schéma illustrant les éléments à respecter en vue d'une implantation *in vivo*. Le système doit s'affranchir de l'ensemble des composants numériques trop volumineux et énergivores pour être implantés. Cela peut être réalisé par la conception de réseaux de neurones artificiels capables de communiquer en temps réel avec un réseau de neurones biologiques.

L'objectif à long terme de l'équipe dans laquelle j'ai réalisé mes travaux de doctorat suit les éléments de la figure ci-dessus. Ce projet vise au développement d'une toute nouvelle génération d'implants neuronaux embarqués destinés au traitement de maladies du système nerveux dans lesquelles la communication neuronale est perturbée suite à un accident traumatique ou bien dans un contexte de neurodégénérescence progressive et évolutive. Ce type de développement implique de répondre à de nombreux défis pour lesquels il n'y a pas de solutions actuellement. Ces neuroprothèses embarquées *in vivo* présenteront un caractère adaptatif biomimétique, c'est-à-dire qu'elles seront dotées de capacités d'apprentissage, ainsi que d'adaptation en temps réel des paramètres de stimulation aux conditions pathophysiologiques en tenant compte de l'évolution de la maladie le cas échéant. Elles seront par ailleurs autoalimentées (autorisant les déplacements et le rechargement en mobilité), et ultra efficaces en énergie : leur très faible consommation énergétique contribuera ainsi à la réduction du nombre d'interventions chirurgicales « juste » pour changer les batteries. Les apports pour la qualité de vie du patient sont prometteurs ; nous pouvons citer non seulement un meilleur traitement des symptômes en temps réel (soulagement constant, administration réduite de médicaments, mobilité du patient améliorée par un allègement du dispositif), mais aussi une aide au diagnostic pour le praticien (l'enregistrement de l'activité électrique de la zone implantée permettant de suivre l'évolution de la maladie) ainsi qu'une adaptation automatique en temps réel, limitant ainsi les ajustements des paramètres de stimulations actuellement réalisés de manière empirique par le praticien dans le cas de systèmes unidirectionnels. Pour y parvenir, il convient de développer un modèle physiologique *in vitro*, c'est-à-dire une interface neurobiohybride, reproduisant l'environnement du cerveau afin de démontrer qu'une communication bidirectionnelle en temps réel et économe en énergie entre des neurones vivants et ces neurones artificiels de conception originale et brevetés à l'international est possible.

Les travaux présentés dans ce document font suite à ceux réalisés par M. Dimitri Henniquau dans le cadre de son doctorat soutenu en décembre 2021. Ses recherches ont abouti à la conception d'interfaces neurobiohybrides *in vitro* ayant permis non seulement de démontrer que les signaux biomimétiques émis par les neurones artificiels peuvent stimuler des neurones vivants, mais aussi de caractériser la stimulation de neurones catécholaminergiques différenciés à partir de cellules PC12 de rat. Les interfaces réalisées dans ce cadre ont été conçues de sorte à permettre la culture cellulaire de neurones tout en tenant compte des futures contraintes auxquelles sera exposé l'implant une fois finalisé. Ces interfaces sont donc des réseaux d'électrodes plates en or de dimensions proches de celles des cellules (20 µm de diamètre). Deux types de dispositifs ont été initialement conçus par M. Henniquau : un premier, baptisé « IMACA », était exclusivement prévu pour stimuler l'activité de neurones vivants avec des *stimuli* excitateurs envoyés par un générateur de signal, et un second, baptisé « RxTx », était prévu pour enregistrer électriquement l'activité de neurones vivants en culture *in vitro*. Ces deux dispositifs ont été réutilisés dans le cadre des travaux de doctorat présentés dans ce manuscrit ; le dispositif « RxTx » a notamment été sensiblement amélioré. Leurs caractéristiques seront détaillées de manière plus exhaustive dans la suite du manuscrit. M.

Henniquau avait également mené des travaux de simulation qui ont permis d'élaborer un modèle électronique du neurone vivant et de son environnement physiologique dans le logiciel LTSPICE. Cette approche de modélisation permet ainsi d'optimiser *in silico* la conception des dispositifs et la méthode de stimulation qui sera ensuite appliquée *in vitro*. Ce modèle a également été réutilisé dans le cadre des travaux présentés dans ce manuscrit. Ces travaux antérieurs à mon arrivée avaient abouti aux premières tentatives de détection de l'activité électrique de neurones vivants maintenus en culture dans des dispositifs neurobiohybrides. A ce stade, le projet en était donc encore aux étapes préliminaires du point de vue de la détection de l'activité électrique de neurones vivants. Les paramètres de stimulation étaient quant à eux en cours d'optimisation.

3.4 Mon projet de doctorat

Dans la continuité directe des travaux évoqués ci-dessus, l'objectif de mes travaux de doctorat a consisté à établir une boucle de communication bidirectionnelle entre des neurones artificiels et des neurones vivants, en travaillant notamment à l'enregistrement des signaux émis par des neurones en culture. Ainsi, pour atteindre ce but, trois objectifs principaux ont été définis au départ de mon projet doctoral :

1- Améliorer l'interfaçage entre les neurones artificiels analogiques et les neurones vivants mis en place dans les travaux précédents, en travaillant plus particulièrement la question de l'adhésion des cellules vivantes sur les réseaux de microélectrodes servant d'interface. Cet objectif a conduit à une optimisation des processus de fabrication des interfaces neurobiohybrides ainsi qu'à un développement important relatif aux questions des *coatings* appliqués sur les dispositifs électroniques dans le but de permettre la survie optimale *in vitro* des neurones vivants.

2- Poursuivre la caractérisation de cette communication entre neurones artificiels et neurones biologiques-par l'utilisation des techniques d'imagerie calcique et d'électrophysiologie.

3- Démontrer la capacité des neurones biologiques à activer les neurones artificiels analogiques afin d'établir une boucle de communication bidirectionnelle au sein de ces nouvelles interfaces neurobiohybrides et apporter ainsi la preuve de concept de la capacité diagnostique de ces nouveaux dispositifs électroniques.

La suite du document présentera les travaux réalisés afin de répondre à ces trois objectifs.

Chapitre 4 Développement de l'interface neurobiohybride

4.1 Introduction du chapitre et enjeux de l'interface

Notre objectif est donc de concevoir, de fabriquer et de caractériser une interface qui permette d'établir une communication bidirectionnelle entre les neurones vivants et les neurones artificiels au travers d'un couplage capacitif comme le montre la figure 4.1. Ce travail fait appel au caractère très interdisciplinaire du sujet. Comme nous le verrons dans la suite de ce chapitre, il y a des règles de design à suivre pour répondre aux différents enjeux liés au domaine de l'électronique (chaîne excitation/mesure et interconnexion) et également au domaine de la biologie (cellules vivantes et positionnement). Cette interface doit par ailleurs présenter un état de surface spécifique sans toxicité et favorisant l'adhésion des cellules ce qui nécessite de faire appel aux connaissances dans le domaine des BioMEMS.

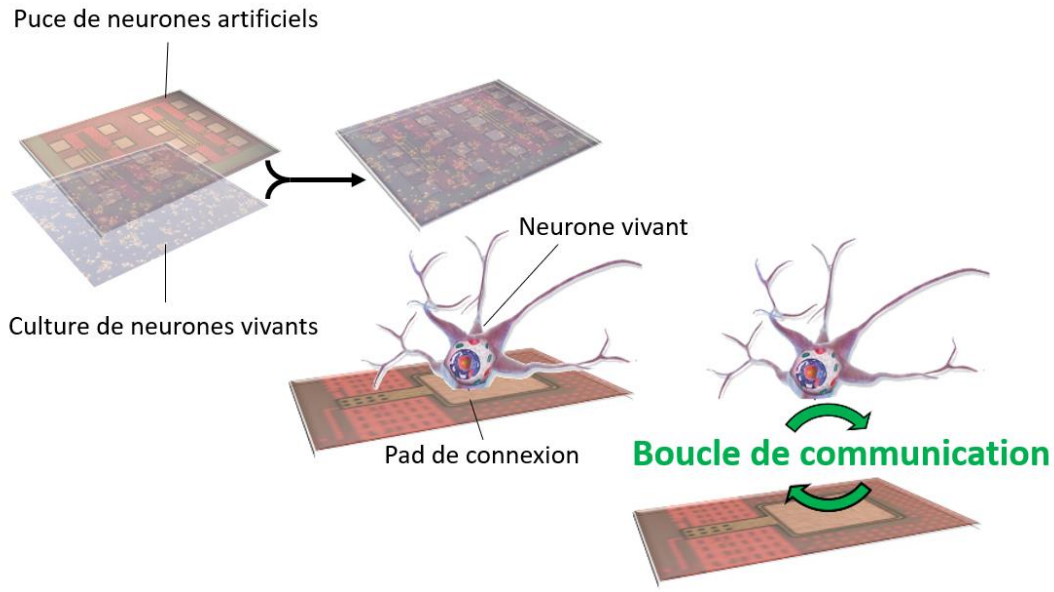
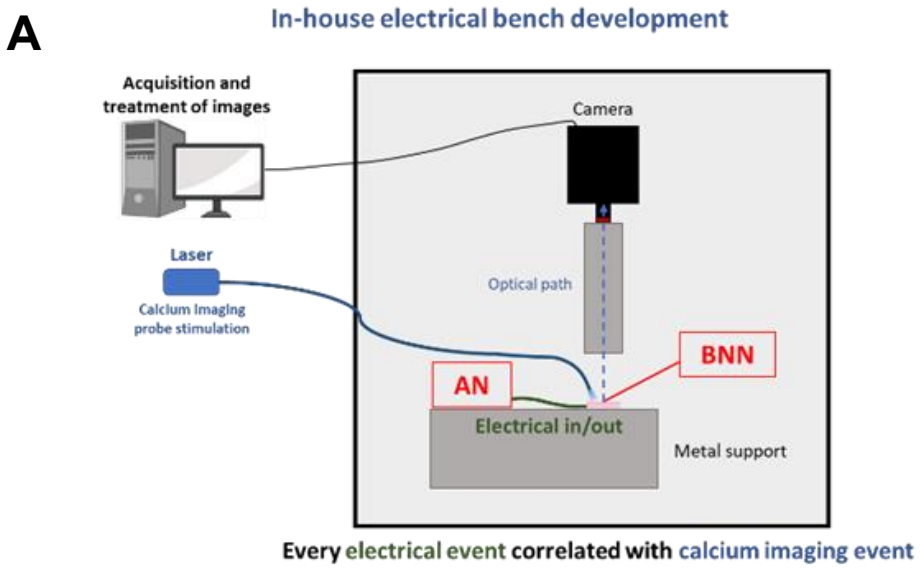


Figure 4.1 : Représentation conceptuelle de la mise au contact d'une puce de neurones artificiels et de neurones vivants en culture pour l'établissement d'une boucle de communication bidirectionnelle. Le principe est de maintenir en culture des neurones vivants fonctionnels sur des puces de neurones artificiels afin d'établir une boucle de communication bidirectionnelle par le biais de pads de connexion.

Le banc (*dark-box*), son environnement de caractérisation ainsi que la configuration schématique illustrant l'ensemble de la manipulation sont présentés figure 4.2, figure 4.3 et figure 4.4. Il s'agit d'un banc développé en interne qui nous sert pour valider toutes les étapes du projet en tenant compte des spécificités telles que la dimension des éléments manipulés ou bien encore la validation biologique de l'activité des neurones vivants (comportement électrophysiologique, viabilité, etc …). La *dark-box* ainsi que la caméra permettent de réaliser les expériences d'imagerie calcique, la visualisation au microscope des cellules dans le neurobiohybride, et enfin les enregistrements en direct sur des temps longs (quelques minutes) de l'activité électrique émises par les neurones vivants à l'aide de l'équipement *National Instruments*.

Actuellement nous avons opté pour une solution où les neurones artificiels sont déportés et connectés à l'aide d'électrodes comme l'indique la figure 4.2. Nous observons sur ces figures les modalités de couplage actuel au reste du banc de mesures. Les dispositifs permettant l'interfaçage direct entre les cellules électriquement actives mises en culture et ce banc électronique sont conçus de telle sorte que nous puissions utiliser des sondes multi-contacts. Cela permet d'assurer la continuité électrique entre ces cellules électriquement actives et le banc électronique comprenant une chaine d'enregistrement et un générateur de signaux pour l'excitation.



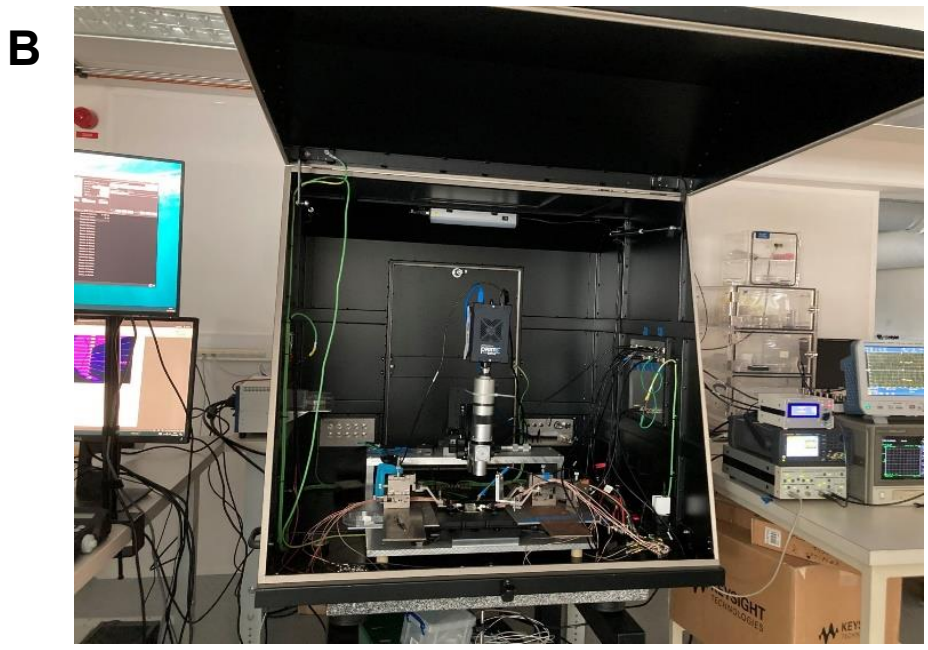


Figure 4.2 : Synoptique du banc et photographie de la *dark-box* qui contient les différents éléments développés dans la centrale CHOP de l'IEMN. (A) Un réseau de neurones artificiels (AN pour *Artificial Neurons*) est connecté électriquement à un réseau de neurones biologiques (BNN pour *Biological Neuronal Network*). (B) Vue du banc tel qu'utilisé dans les expérimentations décrites dans ce manuscrit.

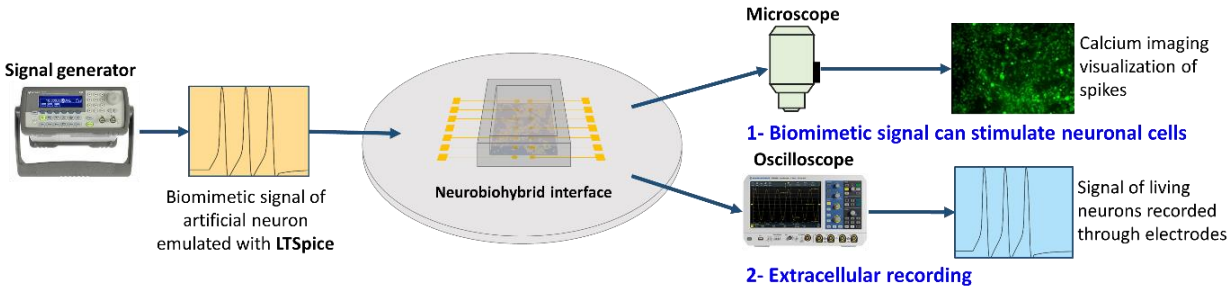


Figure 4.3 : Schéma de principe illustrant l'environnement de la caractérisation et les différentes possibilités disponibles sur le banc associant l'imagerie calcique et l'enregistrement des signaux grâce aux matériels de chez *National Instrument*. Les signaux électriques biomimétiques du neurone artificiel sont appliqués à des neurones vivants cultivés à la surface d'un réseau de microélectrodes. Les potentiels d'action stimulés sont enregistrés par le biais des électrodes et visualisés de manière concomitante par imagerie calcique.

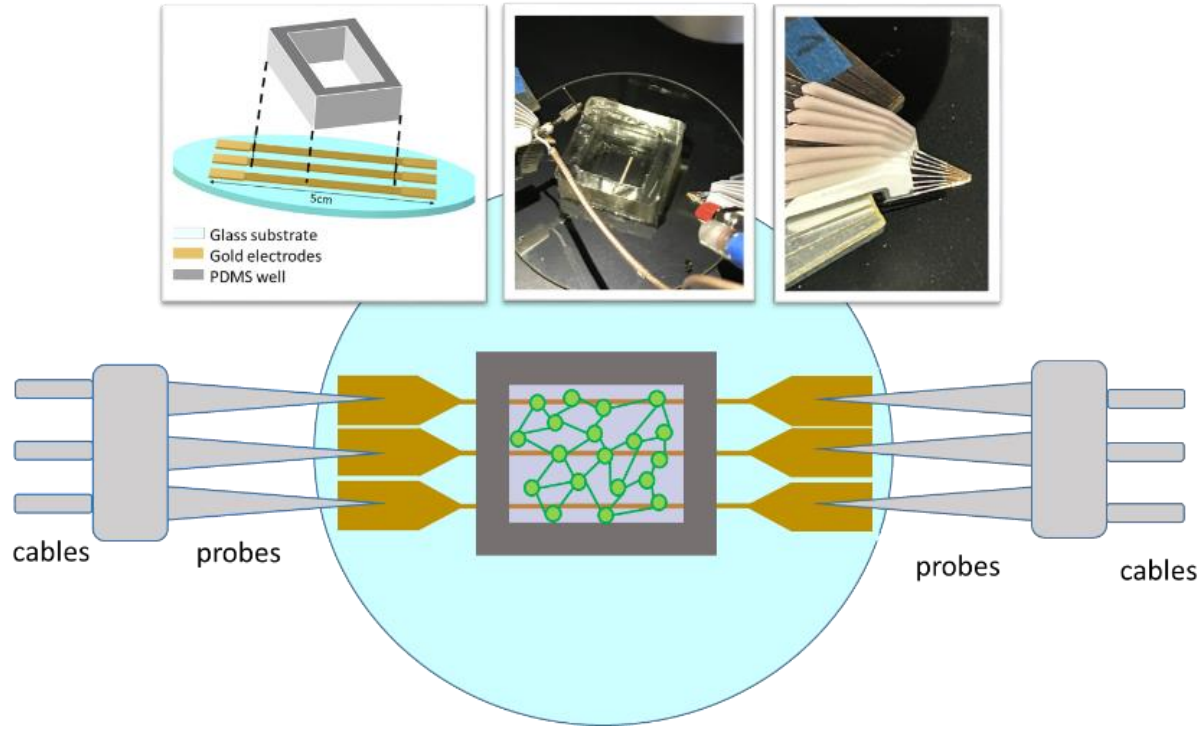


Figure 4.4 : Synoptique de la connexion entre l'interface neurobiohybride et la chaîne d'excitation ou de mesure grâce aux sondes multi-contact adaptées au dispositif. Le dispositif neurobiohybride faisant office d'interface entre les neurones vivants en culture (schématisés en vert) et les puces de neurones artificiels est un réseau de microélectrodes en or plates (représentées en jaune foncé) déposées à la surface d'un substrat de verre. *Probes* : sondes ; *PDMS well* : puits de Polydimethylsiloxane.

La figure 4.5 présente les différents éléments et leur emplacement prévu pour réaliser la boucle de communication. On peut voir l'emplacement des neurones artificiels (AN) et vivants (BNN), ainsi que l'interface entre l'artificiel et le vivant. Le signal peut être émulé avec un générateur de signaux qui reproduit de façon similaire les caractéristiques du signal émis par le neurone artificiel.

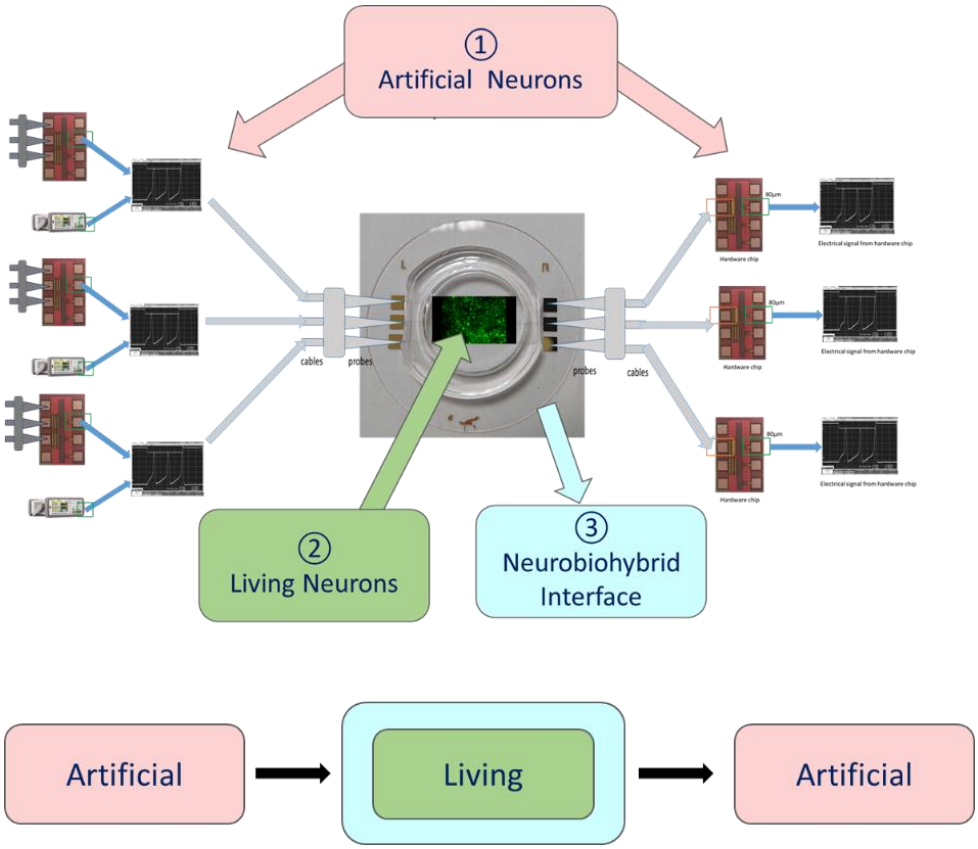


Figure 4.5 : Schéma de l'ensemble de la boucle et du dispositif avec des électrodes déportées illustrant les interconnections entre les différents éléments et la mise en évidence de la communication bidirectionnelle entre neurones artificiels et neurones vivants. Illustration du positionnement du neurone artificiel et du signal émulateur similaire en termes de signature électrique.

Pour nos manipulations, l'interface neurobiohybride consiste donc en un réseau de microélectrodes déposé sur un wafer en verre. Cette interface a été conçue afin de permettre à la fois des enregistrements extracellulaires des signaux électriques émis et également d'appliquer une stimulation électrique aux cellules en culture. Ces interfaces sont conçues en tenant compte des contraintes imposées par la culture cellulaire. Classiquement, les observations de cellules vivantes se font en microscopie inversée pour permettre d'observer ces échantillons biologiques spécifiques sur un plan focal en lumière transmise ou à fluorescence dans leurs conditions réelles de culture. Les interfaces sont donc en grande partie transparentes et sont réalisées à partir de matériaux non toxiques pour la culture cellulaire.

Un puits de PolyDiMethylSiloxane (PDMS) permet de maintenir des cellules en culture sur le réseau d'électrodes dans un milieu de survie compatible avec la durée de la culture (variable selon le type de cellules) comme le montre la figure 3.5 ci-dessus. L'application des signaux stimulateurs par le biais des électrodes se fait par couplage capacitif (application d'une tension) (Merrill et al., 2005).

Les systèmes MEA (Multi-Electrodes Array) conventionnels sont très chers et pas assez adaptables pour les applications que nous visons (*MEA Amplifiers* |

Www.Multichannelsystems.Com, 2023). De plus, ils incluent une grande partie d'opérations mathématiques et de traitement de signal ne permettant pas d'avoir accès directement à la forme du signal en temps réel. Notre projet nécessite de développer un volet métrologie important, ce qui le différencie des solutions existantes à l'heure actuelle.

D'une part, une grande flexibilité est nécessaire dans notre cas au niveau du setup pour permettre le dialogue direct entre les neurones artificiels (de très petite taille : 80µm) et les neurones vivants (de taille similaire, *cf*. la taille moyenne du soma chez les mammifères : 5-100µm). Le banc doit être adapté à ces basses dimensions et le modèle physiologique également. Cela explique nos choix de fabrication à façon en termes de banc de mesures, de technologies, de procédé de fabrication, développés au sein des plateformes de l'IEMN. Nous souhaitons développer un système polyvalent et simple permettant d'obtenir le plus rapidement possible les réponses aux enjeux scientifiques.

D'autre part, afin de démontrer la boucle de communication, l'identification en temps réel de façon objective des potentiels d'action (*spike*) émis par les cellules neuronales vivantes qui serviront à déclencher les potentiels d'action biomimétiques des neurones artificiels (et vice-versa) est indispensable. Afin de caractériser la communication entre ces deux types de neurones, nous devons vérifier que le signal d'excitation du neurone artificiel est bien un potentiel d'action émis par une cellule électriquement active vivante. Il est indispensable d'établir la corrélation et la causalité entre les différents évènements. Le travail sur la détection du potentiel d'action émis par la cellule neuronale vivante et sur sa caractérisation fine à l'aide de méthodes d'imagerie calcique et de patch-clamp est incontournable.

Nous verrons dans ce chapitre les différentes étapes du développement de l'interface neurobiohybride développée à cet effet, notamment l'ensemble du procédé de fabrication. Nous verrons également les difficultés auxquelles nous avons dû faire face et les solutions apportées face aux contraintes inhérentes à chaque approche de ce travail interdisciplinaire par nature (caractérisation électrique analogique, microélectronique, technologie des composants, culture cellulaire, chimie des matériaux, électrophysiologie en patch-clamp, ou imagerie calcique, …).

4.1.1 L'interface neurobiohybride au début de mon doctorat

Les premiers travaux sur l'interface neurobiohybride permettant de répondre aux différents défis exposés plus haut ont été menés dans le cadre du doctorat de M. Dimitri Henniquau (Henniquau, 2021). Le design initial des interfaces développées dans ce contexte et représentées en figure 4.6 était relativement simple. Il s'agissait de réseaux de microélectrodes en or de 100 nm d'épaisseur déposées sur des surfaces de verre à l'aide d'une couche d'accroche de 10 nm de titane. Les électrodes étaient entourées d'une piste en or de 130 µm de large faisant office de référence électrique (potentiel zéro) pour les enregistrements. Cette piste en or servait donc comme la « masse » du circuit. La connexion avec le banc électronique était réalisée à l'aide de sondes multicontacts posées sur les plots d'accès aussi appelés couramment « pads ».

Les jeux de sondes multicontacts comprenaient 8 pointes métalliques, l'organisation des électrodes a donc été définie en prenant en compte de ce paramètre : elles sont regroupées par faisceaux de 7 + 1 piste de référence. Les lignes d'accès reliant les pads aux électrodes ont une longueur de 2 cm. Un puits de culture circulaire en PDMS de 35 mm de diamètre interne est fixé sur le dispositif finalisé pour permettre la culture de cellules à la surface du réseau d'électrodes.

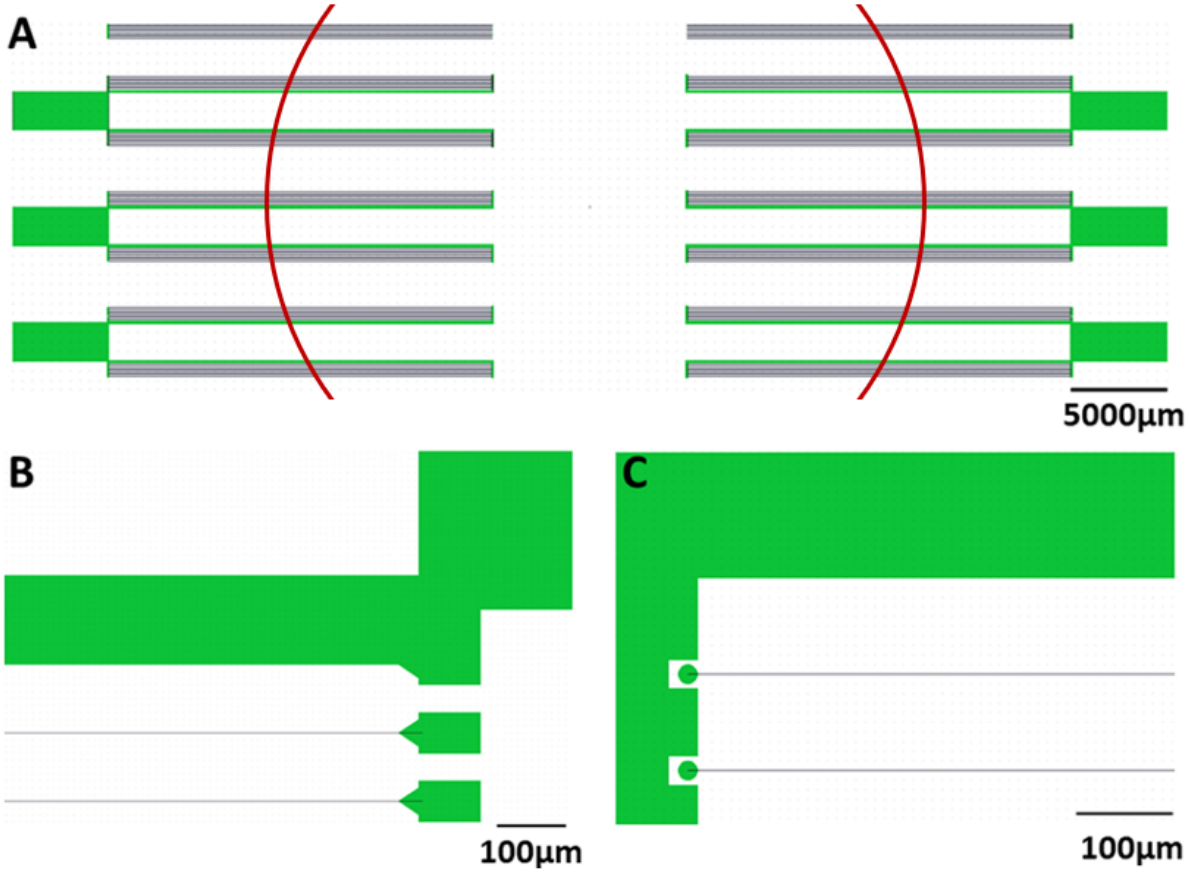


Figure 4.6 : Layout du réseau de microélectrodes développé précédemment au sein de notre équipe. (A) Layout complet du réseau d'électrodes. Des ensembles de 7 électrodes de 20 µm de diamètre sont reliés à des pads de connexion par une ligne de 10 µm de large et de 2 cm de long. Une piste d'or de 130 µm de large permet d'amener la référence de potentiel au plus proche des électrodes (= surface de masse). La limite intérieure du puits de PDMS est indiquée par deux arcs rouges. (B) Détail des pads d'accès des lignes menant aux électrodes et de la piste de référence. (C) Détail des électrodes de 20 µm de diamètre enserrées par la piste de référence des potentiels. Figure issue et adaptée de (Henniquau, 2021).

4.1.2 Les limites identifiées de cette interface

L'utilisation des dispositifs conçus selon ce modèle initial nous a permis d'identifier plusieurs limites et problématiques affectant leur efficacité.

1- Les cellules ensemencées dans ces dispositifs se placent majoritairement au centre du puits, ce qui implique que le placement des électrodes déportées par rapport au centre

du puits ne favorise pas le positionnement de cellules sur ces dernières. Dans le cadre des travaux de M. Henniquau, les signaux de stimulation étaient appliqués de manière capacitive (*cf*. Chapitre 2, §2.2.2.1). Idéalement, pour ce type de couplage, les cellules doivent être positionnées le plus au centre possible des électrodes et recouvrir un maximum de la surface de l'électrode.

2- Les cellules adhèrent préférentiellement sur les surfaces en or, ce qui implique que la majorité d'entre elles sont placées sur les pistes de référence, ce qui n'est pas souhaitable (*cf*. Chapitre 4, §4.1.1). De plus, nous avons noté que cette adhésion des cellules revêt un caractère aléatoire lié très probablement à la nature hydrophile ou hydrophobe de la surface. Cela engendre des difficultés de reproductibilité des manipulations.

3- Les lignes d'accès reliant les pads de connexion aux électrodes en bout de lignes sont en contact direct avec l'électrolyte et les cellules. Cela implique que les cellules positionnées sur ces lignes contribuent aux signaux enregistrés de la même manière que des cellules correctement positionnées sur le bout des lignes (électrodes). De ce fait, les signaux extraits résultent d'une grande population de cellules ce qui rend l'enregistrement plus complexe à analyser. Cela implique également des considérations au niveau de l'excitation des cellules. Le fait que l'ensemble des lignes d'or soit au contact direct de l'électrolyte ne permet pas de stimuler/enregistrer un groupe réduit de cellules qui serait localisé à proximité de l'électrode (Buitenweg et al., 2000; C. Choi & You, 2012).

4- La longueur des lignes est un autre élément à prendre en considération pour différentes raisons. Ces lignes sont très longues et leur distribution est très dense à certains endroits. Cette situation au début de mes travaux de doctorat n'était pas optimale pour une révélation homogène de la résine sur toute la dimension du motif et pour la tenue des métallisations sur le verre. Nous avons observé des faisceaux entiers cassés suite à des problèmes de lift-off liés notamment à des tensions dans le film de métallisation. Il est à noter que la longueur des lignes répond aux contraintes fixées par la dimension du puits de PDMS qui doit permettre des mesures de patch-clamp. Cela entraîne aussi des difficultés pour se repérer entre l'intérieur et l'extérieur du puits, ce qui rend fastidieuse l'identification des pads associés aux électrodes qui sont recouvertes par un groupe de cellules (le risque étant d'enregistrer la mauvaise ligne). Enfin, la longueur des lignes implique également une augmentation de la résistance Rligne qu'il convenait de chercher à diminuer.

5- Ce design par faisceaux présente aussi des difficultés pour augmenter le nombre de voies enregistrées en parallèle. La disposition actuelle des faisceaux ne permet d'enregistrer que 7 électrodes en parallèle. Enfin, les faisceaux étant très éloigné les uns des autres, ce design n'est pas favorable au déploiement de réseaux de neurones vivants qui font intervenir la croissance d'axones et de neurites assurant l'interconnexion entre les différents éléments.

4.2 Améliorations apportées au design de l'interface

Dans le cadre de mes travaux de doctorat, j'ai cherché au travers d'un travail collaboratif avec les membres de l'équipe et les ingénieurs du laboratoire à améliorer l'interface neurobiohybride en intégrant les avancées sur le volet du design et de la technologie des dispositifs pour développer une interface fonctionnelle aux caractéristiques reproductibles et répondant aux difficultés listées précédemment. Ainsi, nous verrons ainsi notamment qu'une couche de passivation a été ajoutée au niveau des lignes pour les isoler de l'électrolyte et limiter l'impact des cellules sur les lignes en termes de bruits parasites lors d'un enregistrement électrique. Une deuxième amélioration a été le rapprochement des plots de masse des électrodes, les travaux de simulation menés en parallèle ayant en effet démontré l'importance d'avoir une référence physiquement proche de la zone d'écoute et de stimulation. Une nouvelle distribution/espacement des lignes a également été opérée pour assurer un enregistrement sur plusieurs voies en simultané.

4.2.1 Optimisation du positionnement des cellules par amélioration du layout et modification des dimensions du puits de PDMS

Afin de répondre aux problématiques concernant le positionnement des cellules après ensemencement, une modification du layout est nécessaire. L'objectif est de placer les électrodes là où les cellules se déposent préférentiellement : au centre du puits. Cette modification est accompagnée d'une réduction de la taille du puits ainsi que d'une modification de sa forme qui est rendue rectangulaire ou carrée pour correspondre à la disposition des électrodes. Cette réduction des dimensions du puits de culture permet également de limiter l'usage de matériel biologique humain précieux. En plus de ces modifications, des repères numériques sont ajoutés dans le layout au niveau des pads pour simplifier l'identification des électrodes pendant les expérimentations. La piste de masse est également remplacée par une grille répartie sur l'ensemble de la surface du dispositif assurant le même potentiel dans l'ensemble du bain d'électrolyte. Un pad sur deux est connecté à la masse ce qui permet que chaque électrode soit entourée par la masse de la même manière et donc que les conditions d'enregistrement soient rigoureusement identiques sur l'ensemble du réseau d'électrodes (même taille d'électrodes, même longueur de lignes et même positionnement par rapport à la référence).

Le layout résultant de ces modifications est présenté en figure 4.7. Les dimensions des lignes d'accès et des électrodes ne sont pas modifiées par rapport aux dimensions du layout initial. Des lignes d'or de 10 µm de large et de 2 cm de long permettent donc de relier des électrodes de 20 µm de diamètre aux pads permettant la connexion au banc d'enregistrement et de stimulation par le biais de sondes multi-contact. La référence de masse est devenue un réseau de lignes d'or de 10 µm de large réparti sur l'ensemble de la surface du puits. Les lignes sont identifiées par des numéros romains à l'intérieur et à l'extérieur du puits. Afin de réduire la

résistance des lignes, l'épaisseur de métallisation est augmentée de 100 nm à 200 nm d'or. Cette modification n'implique pas d'ajustement complémentaire sur le layout.

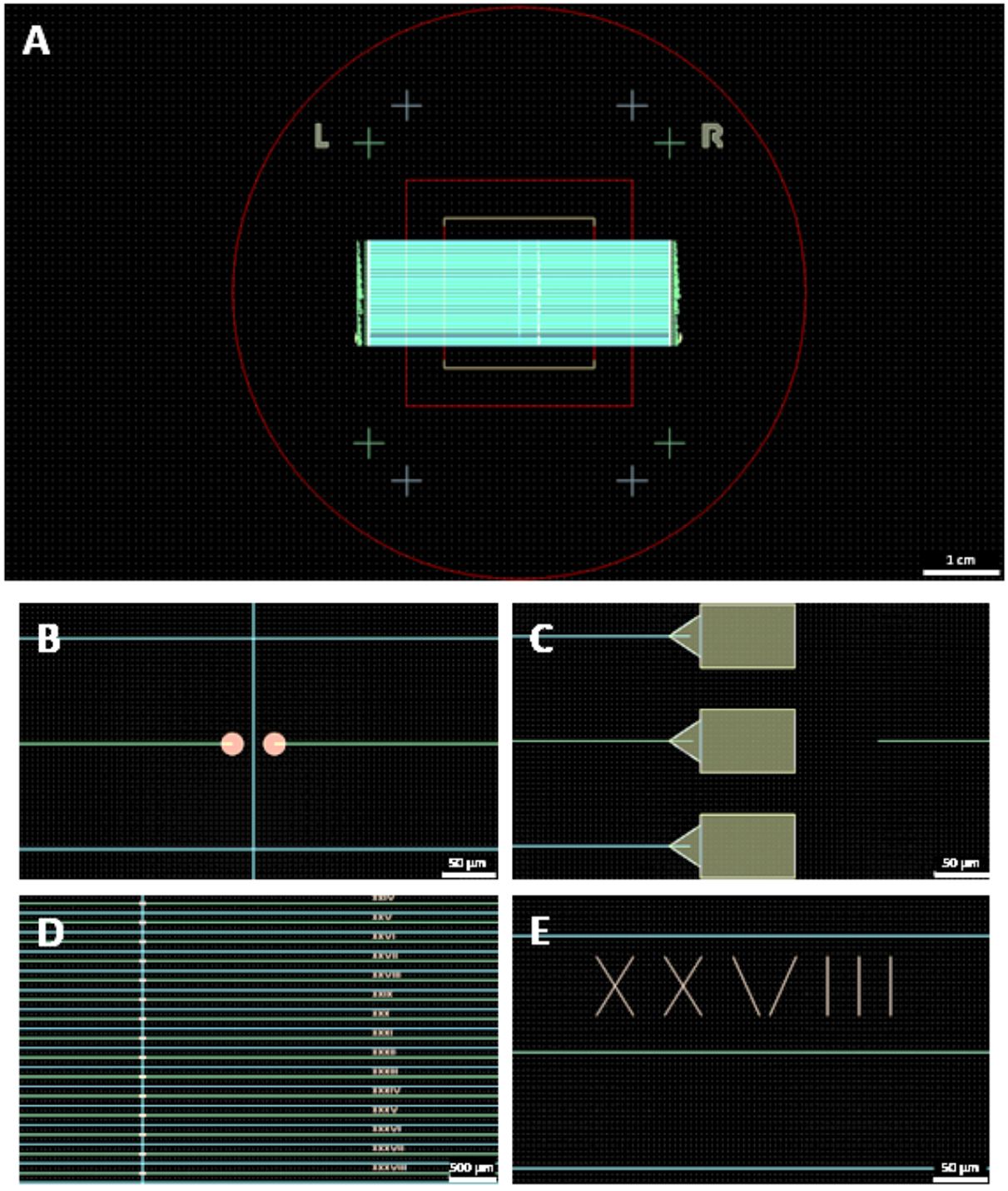


Figure 4.7 : Représentation schématique du dispositif d'interfaçage neurobiohybride. (A) Vue globale du schéma. (B) Agrandissement sur les électrodes. (C) Agrandissement sur les pads. (D) Agrandissement sur la zone centrale du dispositif avec repères visibles. (E) Agrandissement sur les repères. Ce schéma est reporté dans une couche de résine photo-activable à l'aide d'un spot laser de 10 µm de large. Les électrodes sont reportées à l'aide d'un spot de laser de 1 µm de diamètre. En bleu ciel sont représentées les lignes de masse. En vert sont représentées les lignes d'accès et les repères extérieurs au puits. En orange sont représentés les repères à l'intérieur du puits. En jaune sont représentés les pads. Différents repères inclus dans le schéma sont utilisés pendant la fabrication (croix et repères L et R).

4.2.2 Ajout d'une couche de passivation pour l'isolation des lignes

Afin d'isoler le métal des lignes d'accès de l'électrolyte, nous avons ajouté une couche de matériau diélectrique (nitrure de silicium, Si_3N_4) de 300 nm à la surface du réseau d'électrodes. Ce matériau est classiquement utilisé pour l'isolation de lignes de réseaux d'électrodes (Karttu et al., 2022). Cette couche de passivation est déposée sur l'ensemble de la surface du dispositif. A l'aide d'un masque de résine, la passivation est gravée de sorte à réouvrir les zones d'intérêts, à savoir les électrodes, les masses et les pads afin de permettre des conditions d'enregistrement optimales *in vitro* (*i.e.* le plus faible nombre de cellules occupant toute la surface d'un même plot). Au final, excepté les ouvertures, toute la surface en verre ainsi que les lignes d'accès sont recouvertes de Si_3N_4. Le Si_3N_4 présente l'avantage d'être transparent une fois déposé. Il ne pénalise donc pas l'observation des cellules (*cf.* Chapitre 4, §4.1).

4.2.3 Amélioration de l'adhésion des cellules à la surface du réseau d'électrodes

Une mauvaise adhésion des cellules à la surface du réseau d'électrodes a pour conséquence une plus grande difficulté à les cultiver et une mauvaise répartition de ces dernières sur la surface du dispositif. Cela impacte aussi le couplage avec le plot et donc la qualité de la stimulation ou de l'enregistrement en raison de la résistance de jointure R_{seal} identifiée sur la figure 4.8. Plus la cellule est adhérente au plot et plus la résistance de jointure R_{seal} est élevée, assurant ainsi une concentration optimale des lignes de courant (ou de tension) appliquées directement à la cellule vivante.

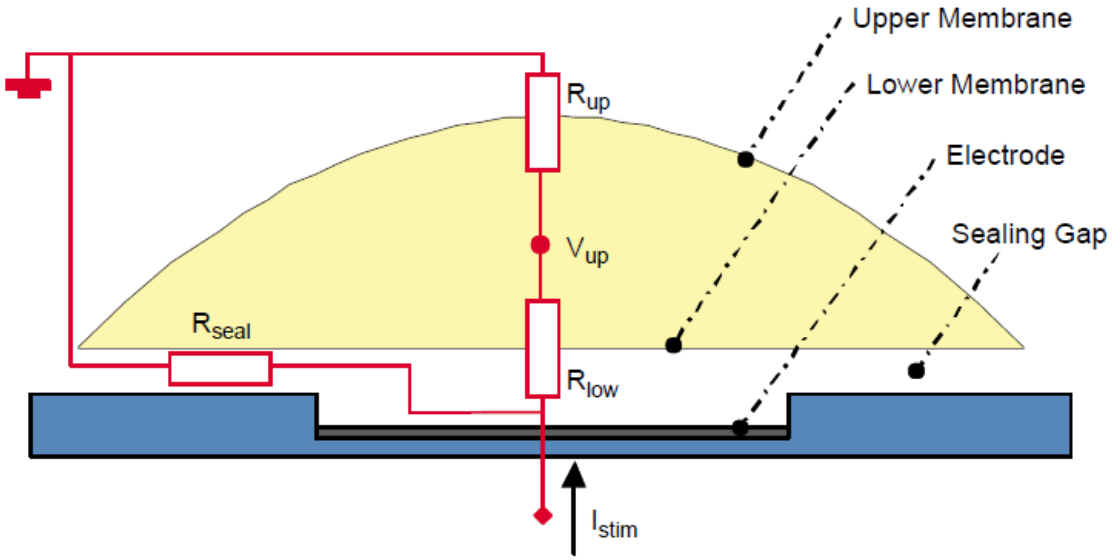


Figure 4.8 : Modèle de circuit de l'interface neurone-électrode illustrant l'importance de l'adhésion des cellules au plot au travers de la résistance de jointure Rseal. Le modèle inclus la membrane liée (*lower membrane*) et la membrane non liée (*upper membrane*) à l'électrode ainsi que l'espace séparant la membrane liée à l'électrode de la surface de cette dernière (*sealing gap*). Le circuit équivalent comprend la résistance de la membrane liée (R_{low}), la résistance de la membrane non liée (R_{up}) ainsi que la résistance de jointure (R_{seal}). Le courant stimulateur (I_{stim}) est appliqué par le biais de l'électrode afin de modifier le potentiel membranaire (V_{up}). Figure issue de (Buitenweg et al., 2000).

Dans le cadre de nos différentes expérimentations, nous avons observé que les cellules adhéraient préférentiellement sur l'or et avaient donc tendance à se placer en majorité sur les pistes de masse (ce qui n'est pas souhaitable). Afin de comprendre et de passer d'un caractère aléatoire à un procédé technologique maîtrisé et reproductible, nous avons mené une recherche bibliographique sur les états de surface du nitrure de silicium. En effet, le Si_3N_4 recouvre très majoritairement la surface de nos dispositifs. Sans traitement, nous avons observé que la surface de nitrure de silicium était particulièrement hydrophobe, ce qui pénalise fortement l'adhésion de molécules biologiques. Rendre la surface hydrophile de façon certaine, et cela quel que soit le temps de stockage de nos échantillons, est une étape essentielle si nous souhaitons poursuivre avec ce matériau. Nous n'avons à ce jour pas tenté d'améliorer l'adhésion sur l'or, les cellules semblant déjà s'y accrocher de manière satisfaisante.

L'exposition à l'air d'une surface de nitrure de silicium provoque la formation progressive d'oxyniture à sa surface (Raider et al., 1976). Ces informations sont confirmées par les travaux récents de Marine Brunet (Brunet, 2016) dans le cadre de sa thèse soutenue en 2016 dont le titre est : « *Conditionnement et fonctionnalisation de la surface du nitrure de silicium* ». L'objectif de son travail de thèse était de caractériser et de contrôler la surface de nitrure de silicium puis d'optimiser et de comprendre la modification de sa surface par le greffage covalent de molécules organiques. Elle détaille dans son manuscrit les états de surface du nitrure de silicium et travaille sur le décapage de la surface de SiN par différentes voies. Dans cette thèse, M. Brunet montre qu'il reste encore de nombreuses questions sur le sujet. Il est rappelé que *« toute couche de nitrure de silicium laissée à l'air libre est couverte d'un oxyde de type oxynitrure formée par la réaction des groupements de surface avec l'air environnant* (Brunet, 2016) ».

Cela indique que nous pouvons améliorer notre procédé de fabrication puisque nous avions l'habitude de laisser à l'air libre nos dispositifs recouvert de Si_3N_4 de façon plus au moins longue suivant le rythme des expériences programmées avec l'équipe. En poussant plus loin la lecture des travaux de M. Brunet, il s'avère que même après décapage à l'aide de différentes solutions chimiques : « *Les mesures d'XPS montrent qu'une petite quantité d'oxygène provenant de la couche reste présente en surface après le décapage. A priori, cet oxygène peut se trouver principalement sous deux formes : des groupements silanols Si-OH ou des ponts siloxanes »*. Il est intéressant de noter que les ponts siloxanes peuvent éventuellement être formés par la condensation de groupements silanols. Par ailleurs, les ponts siloxanes, notamment lorsqu'ils sont polymérisés, sont appelés « silicones ». Leur présence en surface rend par conséquent une surface très hydrophobe.

En poursuivant nos recherches bibliographiques, il s'avère que dans leurs travaux, (Usenko & Senawiratne, 2010) rendent une surface de Si_3N_4 hydrophile en l'exposant à un plasma d'oxygène. Ce plasma a pour effet de convertir la surface de nitrure de silicium en oxyde de silicium (SiO_2) sur une faible profondeur. Cette solution est celle que nous avons sélectionnée et introduite dans notre procédé de fabrication. Comme nous le verrons avec le test

de la goutte d'eau, nous avons réussi à mettre au point une étape, aisément contrôlable au cours de notre processus de fabrication, faisant intervenir un plasma d'oxygène qui nous assure une bonne reproductibilité et une adhésion des cellules sur le dispositif.

4.3 Méthodes de fabrication de l'interface neurobiohybride

Cette section présente le matériel et les méthodes employés pour la fabrication des interfaces neurobiohybrides. La fabrication est réalisée en salle blanche selon un procédé employant des techniques de micro-fabrication par lithographie laser classiques. Le procédé, optimisé au cours de mes travaux de thèse en fonction des résultats obtenus et présentés dans ce document, a été initialement développé dans le cadre des travaux de doctorat de M. Dimitri Henniquau (Henniquau, 2021). Les interfaces sont conçues en tenant compte des contraintes imposées par les trois domaines impliqués : la culture cellulaire, l'électronique et les BioMEMS.

4.3.1.1 Photolithographie pour métallisation

Des substrats de verre borosilicatés de 3 pouces/1mm d'épaisseur avec deux faces polies et bords adoucis sont achetés chez le fournisseur Neyco. Le procédé de fabrication débute par trois étapes de nettoyage successives des substrats afin d'éliminer un maximum de poussières et de pollution en surface. La première étape consiste à les nettoyer manuellement avec un détergent (Elma™ Lab Clean N10) dilué au 1/10ème dans de l'eau. La deuxième étape consiste à les exposer aux ultrasons pendant 5 minutes dans un bain d'acétone. La dernière étape consiste à les exposer aux ultrasons pendant 5 minutes dans un bain d'isopropanol (IPA). Les substrats sont ensuite séchés à l'aide d'un flux d'azote.

Les substrats sont ensuite déshydratés en les plaçant sur une plaque chauffante réglée à 100°C pendant 10 minutes. Du hexaméthyldisilazane (HMDS) est ensuite appliqué à une vitesse de 2000 tr/min avec une accélération de 1000 (tr/min)/s capot ouvert pendant 15 secondes avec une tournette RCD8. Le HMDS permet de promouvoir l'adhésion des résines sur la surface en verre. Une première couche de 800 nm d'épaisseur de résine LOR10A est immédiatement appliquée à une vitesse de 2200 tr/min avec une accélération de 1000 (tr/min)/s pendant 15 secondes capot fermé. Un recuit de 4 minutes est réalisé à 180°C à l'aide d'une plaque chauffante. Une seconde couche de résine S1805 de 400 nm d'épaisseur est appliquée à une vitesse de 2700 tr/min avec une accélération de 1000 (tr/min)/s pendant 10 secondes capot fermé. Un deuxième recuit est alors réalisé à 110°C pendant 1 minute sur une plaque chauffante. Le résultat à cette étape du procédé de fabrication est illustré en figure 4.9. Ces résines sont positives, c'est-à-dire qu'elles sont éliminées là où elles sont exposées.

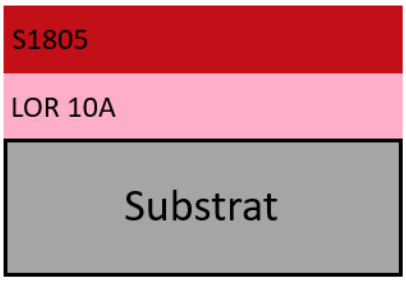


Figure 4.9 : Substrat de verre résiné. Le procédé permet l'obtention d'une bicouche de résines positives uniformément réparties.

Le substrat résiné est ensuite exposé aux UV à l'aide d'une machine Dilase® 650 en suivant le schéma intégré dans un fichier au format « *Graphic Data System* » (GDS). Les lignes de 10 µm de large, les pads et les caractères alphanumériques sont exposés avec le spot de 10 µm réglé à 30% de sa puissance maximale à une vélocité réglée à 50. Les lignes de 1 µm de large et les électrodes circulaires de 20 µm de diamètre sont exposées à l'aide du spot de 1 µm réglé à 20% de sa puissance maximale et à une vélocité réglée à 20. Cette technique de lithographie laser est préférée à la réalisation d'un masque en quartz en raison de sa polyvalence puisqu'elle permet de modifier à volonté les designs à transférer dans la résine.

Une fois la résine exposée, les motifs sont révélés en plongeant le substrat à la verticale dans 500 mL de produit développeur adapté aux résines positives (MF319) pendant 1 minute. La révélation est arrêtée en plongeant le substrat dans 500 mL d'eau désionisée pendant 45 secondes. Un séchage extrêmement minutieux est ensuite réalisé à l'aide d'un flux d'azote orienté dans le sens des lignes révélées. Cette étape est critique et s'avère déterminante pour la qualité du dispositif. Une vérification minutieuse est réalisée à ce stade au microscope pour décider de la poursuite ou non du processus de fabrication sur le substrat concerné. Cette étape permet de libérer la résine à certains endroits faisant apparaître le substrat de verre comme illustré en figure 3.10. Elle permet aussi de profiter d'un profil casquette afin de réaliser aisément l'étape du lift-off consécutif à la métallisation du dispositif.

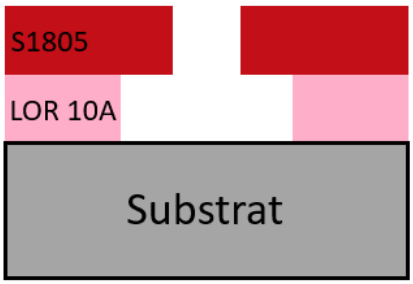


Figure 4.10 : Résines révélées. La révélation permet l'obtention d'un profil « casquette » indispensable à la réalisation du lift-off (voir ci-après).

4.3.1.2 Métallisation et lift-off

Les substrats sont ensuite métallisés par évaporation dans une machine Plassys® MEB 550 SL 2018. L'adhésion est améliorée par un etching de 200 V pendant 5 minutes. Une première couche de 50 nm de titane est ensuite appliquée sur l'intégralité de la surface à une vitesse de dépôt de 0.5 nm/s. Cette couche de titane permet l'accroche d'une seconde couche de 200 nm d'or appliquée également sur l'intégralité de la plaque à une vitesse de 1.0 nm/s. Le résultat est schématisé en figure 4.11.

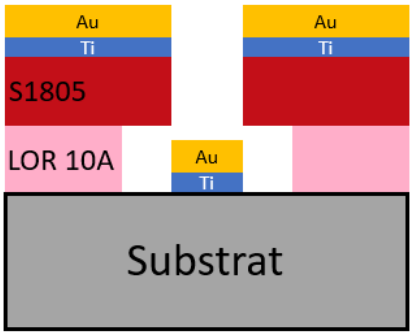


Figure 4.11 : Echantillon métallisé. Une bicouche de métallisation Titane/Or recouvre l'intégralité de la surface du dispositif.

Un lift off est ensuite réalisé dans un bain de décapant adapté aux résines photosensibles (SVC-14) chauffé à 100°C pendant 1 heure, permettant ainsi d'éliminer la résine restante (et donc le métal déposé à sa surface). A ce stade, il ne reste sur le substrat que le métal déposé dans les emplacements initialement créés dans la résine par l'exposition UV (voir figure 3.12). Les motifs métallisés correspondent donc au schéma exposé et dessiné dans le fichier GDS. Un nettoyage à l'acétone et à l'IPA est réalisé pour éliminer les traces de SVC-14 pouvant subsister.

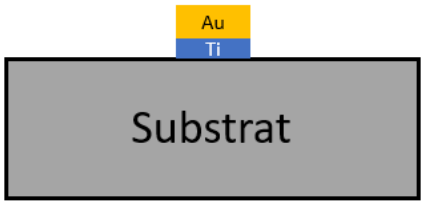


Figure 4.12 : Le dispositif après lift-off. Toute la résine est dissoute par le SVC-14 emportant dans le bain le métal déposé à sa surface. Seul reste le métal directement adhéré à la surface du verre.

A l'issue de cette étape, les dimensions des structures en or sont vérifiées à l'aide d'un microscope droit. Cette vérification permet également de s'assurer de l'absence de courts-circuits. Un exemple de dispositif métallisé est présenté en figure 4.13.

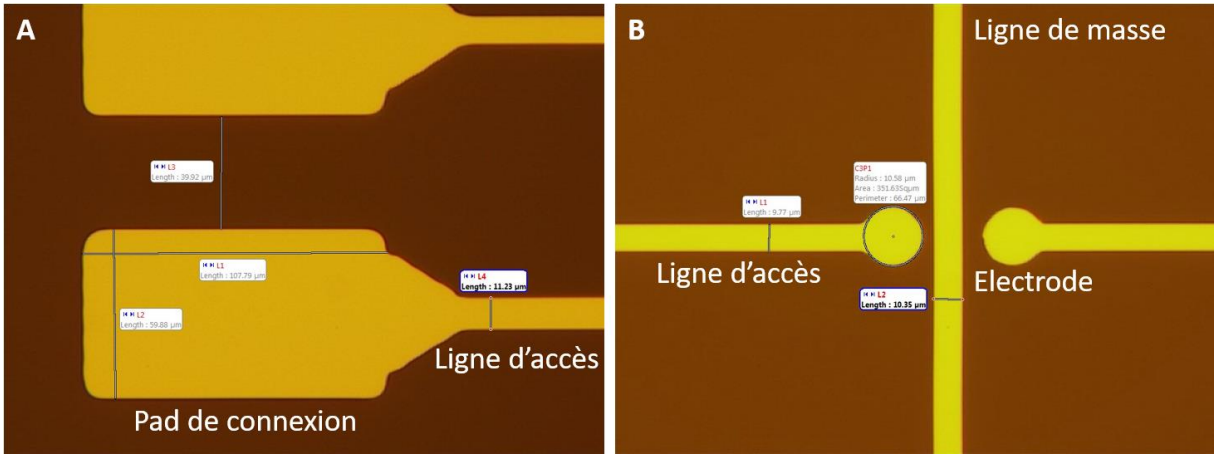


Figure 4.13 : Dimensions des structures en or obtenues après lift-off. Le procédé permet l'obtention de structures bien séparées, sans court-circuit et aux dimensions voulues.

4.3.1.3 Passivation

Les dispositifs sont ensuite passivés sur l'ensemble de leur surface par application d'une couche de 300 nm de nitrure de silicium à l'aide d'un dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (Plasmalab80Plus, Oxford Instruments). Le dépôt est réalisé pendant 21 min 45 s selon les paramètres indiqués dans le tableau 4.1. La répartition du nitrure de silicium sur le dispositif est illustrée en figure 4.14.

Tableau 4.1 : Paramètres de dépôt PECVD de la couche de passivation

SiH_6 (sccm)	NH_3 (sccm)	Pression (mTorr)	Puissance HF (W)	Puissance LF (W)	Température (C°)	Durée (s)	Epaisseur (nm)
18	20	1000	10	0	300	1305	300

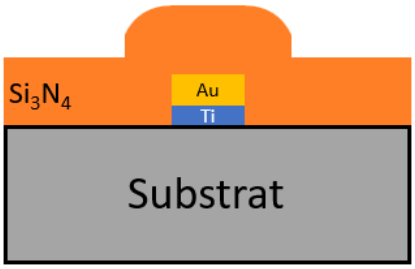


Figure 4.14 : Représentation schématique du dispositif après dépôt d'une couche de passivation de Si_3N_4. Le Si_3N_4 est un diélectrique classiquement utilisé pour isoler électriquement les lignes métalliques d'un électrolyte.

4.3.1.4 Gravure nitrure de silicium

Une deuxième photolithographie, en tout point identique à la première lithographie (même résine, même procédé de résinage, exposition et développement etc.), est ensuite effectuée afin de définir les motifs de gravure de la couche de passivation. Un alignement est nécessaire avec les électrodes avant l'exposition de la résine. La procédure d'alignement est réalisée à l'aide de trois croix métallisées de 1 µm de largeur de trait dont les coordonnées sont

renseignées dans le programme de la Dilase® 650. Une fois le masque de résine structuré avec les ouvertures souhaitées, la couche mince de nitrure de silicium de 300 nm est gravée par RIE (*Reactive Ion etching*) (PlasmaLab 80 Plus, Oxford Instruments) dans un plasma de CHF_3 pendant 3 minutes. La procédure est illustrée en figure 4.15. Les paramètres de gravure sont résumés dans le tableau 4.2.

Tableau 4.2 : Paramètres de gravure RIE de la couche de passivation

CHF_3 (sccm)	O_2 (sccm)	Pression (mTorr)	Puissance (W)	Durée (s)	Vitesse de gravure (nm/s)
50	5	55	100	300	33

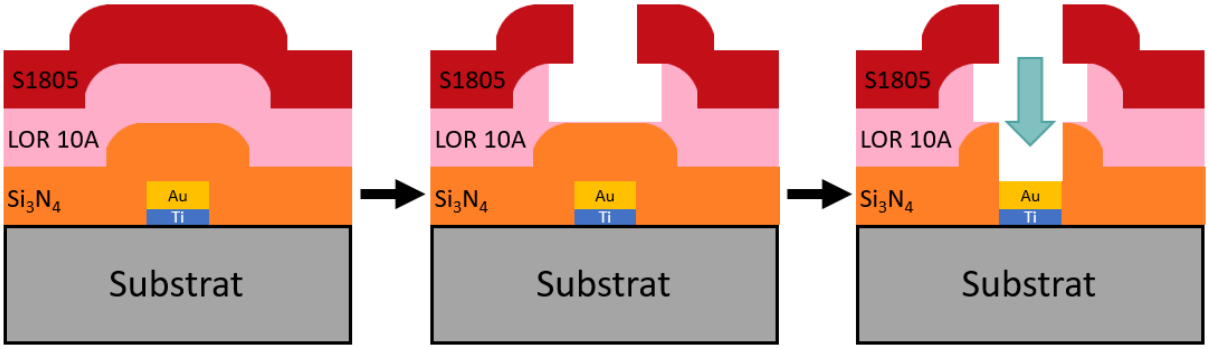


Figure 4.15 : Procédure de gravure physique par plasma O2 RIE. Le plasma O2 RIE est unidirectionnel gravant verticalement le diélectrique déposé à la surface du dispositif. Les parties recouvertes de résine sont protégées pendant la gravure.

Le dispositif est finalement plongé à nouveau dans du SVC-14 chauffé à 100°C pendant 15 minutes pour éliminer la résine ayant servi de masque pour la gravure. Il est ensuite nettoyé par deux bains successifs d'acétone puis d'IPA. Le dispositif gravé est représenté de manière schématique en figure 4.16.

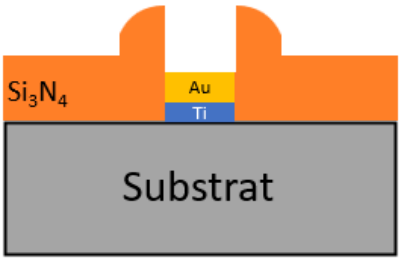


Figure 4.16 : Représentation schématique du dispositif après gravure physique avec masque de résine. La couche de passivation est ouverte localement au niveau des électrodes. Les pads permettant la pose des pointes et les masses sont intégralement dépassivées.

L'effet de la gravure est visible au microscope. Sur la figure 4.17, il est possible de voir une démarcation entre les surfaces gravées (donc dépassivées : pads, électrodes et masse) et les surfaces non gravées (les lignes d'accès aux électrodes). Un léger décalage est visible entre la métallisation et la gravure. Ce décalage est lié à l'alignement réalisé à l'aide de la Dilase® 650

qui peut varier légèrement d'un dispositif à l'autre. Cela ne pénalise en rien les enregistrements réalisés avec les interfaces concernées.

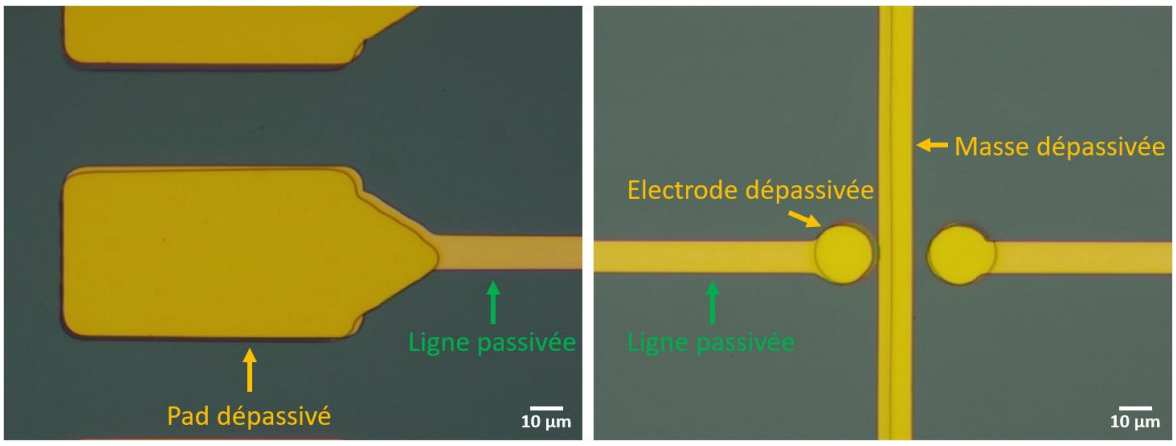


Figure 4.17 : Photographie des surfaces dépassivées par gravure du nitrure de silicium. Le texte en jaune indique les structures métalliques dépassivées, le texte en vert les structures métalliques encore passivées.

A ce stade, la conformité et la qualité du dispositif sont évaluées au microscope. Les lignes coupées, court-circuitées ou abimées sont consignées et ne sont pas utilisées pour les manipulations ultérieures. Une mesure du courant circulant dans les lignes est également réalisée par pose de pointes sur deux pads de masse voisins. Une tension est appliquée entre ces deux plots qui sont séparés par une ligne de longueur totale de 4,02 cm. L'application de cette tension implique la circulation d'un courant qui est relevé en salle blanche en cours de process comme le montre la figure 4.18. Si du nitrure de silicium était encore présent sur les pads, la tension ne serait pas appliquée puisque le contact « pointe-plot » ne pourrait pas être réalisé entre les deux pads et le courant ne circulerait pas. Le fait que le courant soit non nul indique clairement que la gravure a bien fonctionné sur l'échantillon et que les électrodes sont bien libérées pour l'excitation et/ou l'enregistrement des cellules.

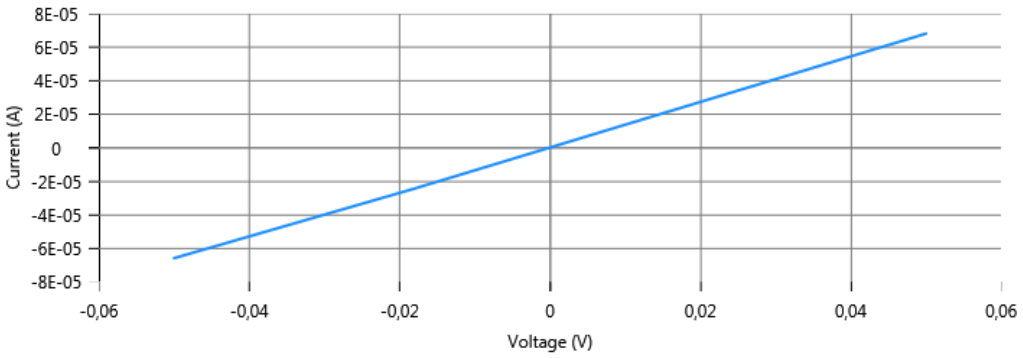


Figure 4.18 : Courbe obtenue lors du test de vérification de conformité de l'étape de gravure. Le passage du courant indique que les pointes utilisées pour la mesure ont bien été en contact direct avec les pads, ce qui indique que la couche de Si_3N_4 a bien été éliminée à leur surface. La gravure étant homogène, les électrodes sont donc également dépassivées. Cette courbe est réalisée régulièrement sur différents dispositifs.

4.3.1.5 Confection et assemblage du puits de culture

Afin de modeler un puits de culture, du PolyDiMethylSiloxane (SYLGARD™ 184) est mélangé avec le produit réticulant correspondant (SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer Curing Agent) de telle sorte que le mélange obtenu contienne 10% de réticulant. L'ensemble est ensuite mélangé et dégazé pendant 1 minute à l'aide d'un mélangeur rotatif planétaire sous vide (Thinky Mixer, ARV 310). Le PDMS dégazé est ensuite coulé dans des moules en aluminium réalisés à façon posés sur un fond de boite de Petri en plastique. Les moules sont réalisés de telle sorte que le PDMS soit coulé directement au contact du plastique selon l'assemblage présenté en figure 4.19. Le PDMS est ensuite placé dans un four réglé à 70°C et laissé pendant 4 heures. Les puits ainsi créés permettent d'obtenir une surface de culture carrée de 2 × 2 cm (4 cm² au total) ou rectangulaire de 2 × 1,5 cm (3 cm² au total) selon les besoins. Les puits ont une hauteur de 1 cm et peuvent donc contenir un maximum de 4 mL de milieu de culture pour les carrés et 3 mL pour les rectangulaires. Ces dimensions sont suffisantes pour permettre la culture de cellules.

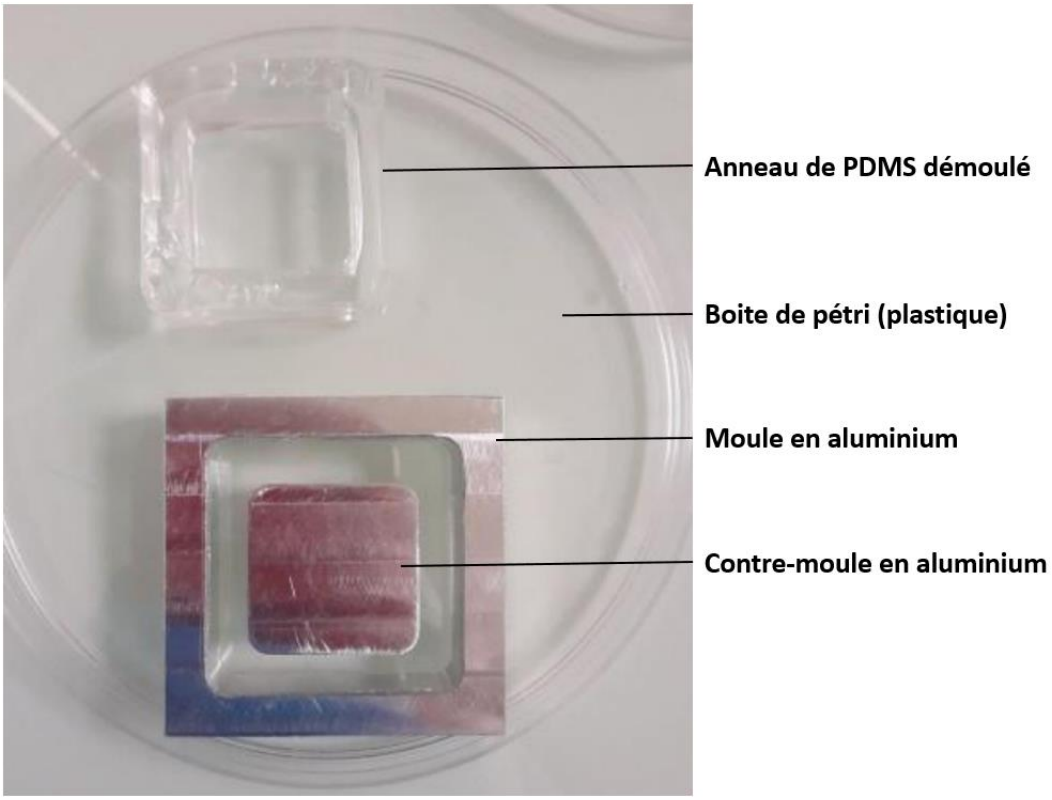


Figure 4.19 : Photographie de l'assemblage permettant de mouler des puits de PDMS au format carré (2 × 2 cm de surface interne). Le PDMS réticule à la surface du plastique de la boite de Petri. L'ensemble est maintenu par des poids en laiton qui ne sont pas présentés sur la photographie.

Une fois le puits réticulé, il est extrait précautionneusement des moules sous une hotte ventilée. Une attention particulière est portée à l'intégrité de la surface de PDMS qui était au contact du plastique de la boite de Petri pendant la réticulation : elle ne doit pas être touchée ni

abîmée pour assurer une bonne adhésion du puits sur la surface du dispositif, et donc son étanchéité, le moindre débris pouvant provoquer à terme des fuites et nuire sévèrement à la qualité des manipulations. La surface de PDMS est activée à l'aide d'un plasma Corona appliqué manuellement pendant 2 minutes (l'électrode du Corona étant placée le plus proche possible du PDMS). La surface du substrat est quant à elle activée par un plasma O_2 de 100W pendant 5 minutes à une pression en O_2 de 0.7 mbar (Bati Pico). Le Corona et le plasma O_2 génèrent des radicaux libres à la surface des matériaux, ce qui permet lorsqu'ils sont mis en contact de créer une liaison durable entre les deux surfaces. Le puits de PDMS est donc placé autour des électrodes du dispositif et une pression mécanique est appliquée à la main de manière uniforme. Les dispositifs assemblés sont ensuite placés à 70°C dans un four pendant 4 heures.

4.3.1.6 Préparation du dispositif pour un ensemencement de cellules

Une fois le dispositif terminé, l'étape suivante consiste en la mise en culture des cellules dans le puits de PDMS. Il est à noter que la surface de l'interface neurobiohybride est très hydrophobe à ce stade et que cela est en lien direct avec le recuit précédent qui sert à fixer le puits de PDMS. De nombreux essais ont été conduits afin de remédier à cet état de surface qui n'est pas propice à l'adhésion des objets biologiques et ne permet donc pas un bon ensemencement des cellules. Après une série de nombreux tests que j'ai menés en salle blanche en faisant varier les différents paramètres du plasma et les enchaînements des étapes technologiques, nous avons convergé vers les conditions de plasma exposées ci-après. Afin de rendre la surface hydrophile, la surface des dispositifs est activée à l'aide d'un plasma O_2 RIE de 50 W appliqué à une pression de 100 mTorr pendant 1 minute (PlasmaLab 80 Plus, Oxford Instruments). L'impact de cette activation est illustré en figure 4.20. Il est à noter que nous avons vérifié que ces paramètres assurent une bonne adhésion des cellules dans le puits.

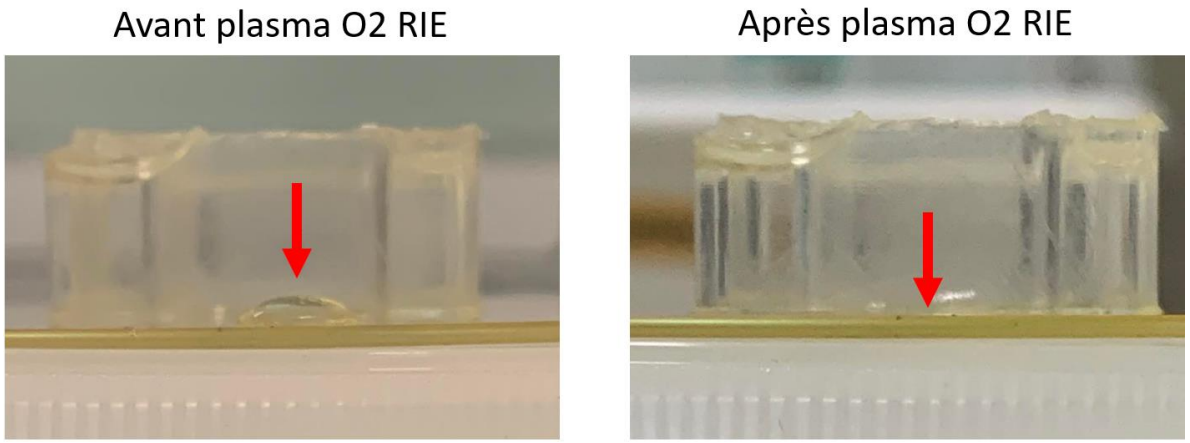


Figure 4.20 : Effet de l'activation de la surface de nitrure de silicium par plasma O_2 RIE (50W/1minute). Une goutte d'eau est déposée à la pipette pour observer sa répartition sur la surface du dispositif. Le dépôt de cette goutte est réalisé à l'extérieur du puits ce qui permet d'illustrer ce qui se passe à l'intérieur de ce dernier. La position de la goutte est indiquée par une flèche rouge. L'angle formé à la bordure de la goutte informe sur le degré d'hydrophobicité de la surface. Une goutte bien étalée indique une faible hydrophobicité de la surface.

Nous avons observé qu'un plasma trop puissant pénalisait la pose des pointes sur les pads. L'or exposé au plasma semble modifié ce qui rend la prise de contact avec les pointes moins bonne. Lors de nos manipulations, nous vérifions systématiquement que le contact réalisé entre les pointes et les pads soit de bonne qualité en vérifiant que ces dernières laissent une trace dans l'or après avoir été posées. Nous avons observé que les pads exposés à un plasma puissant étaient très difficilement « mordus » par les pointes par rapport à des pads qui n'avaient pas été exposés à ce plasma. Réduire la puissance du plasma nous a permis de retrouver une meilleure prise de contact, comme illustré en figure 4.21.

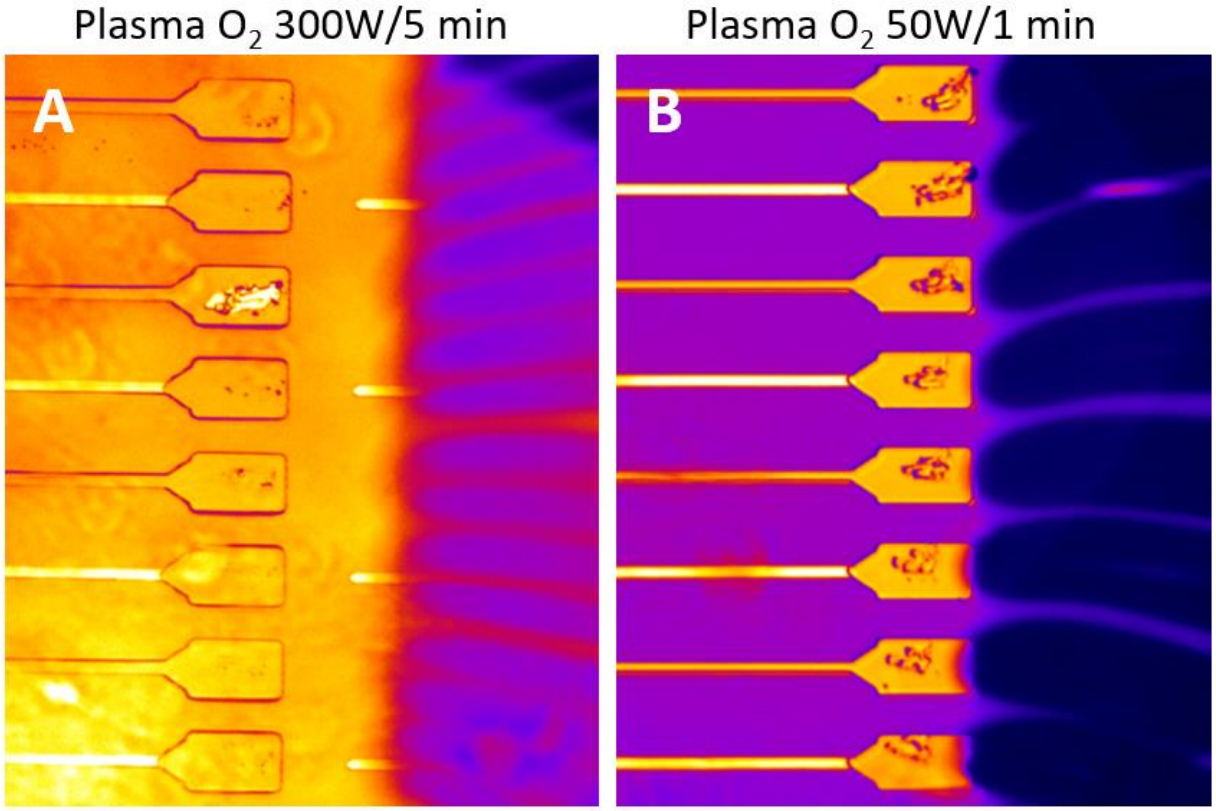


Figure 4.21 : Etat de la zone de contact en or après pose des pointes sur (A) des pads exposés à un plasma O_2 de 300 W pendant 5 minutes et (B) des pads exposés à un plasma O_2 de 50 W pendant 1 minute. Les pads exposés au plasma plus puissant sont faiblement impactés par la pose des pointes. Les pads exposés au plasma plus faible sont marqués après pose des pointes. Ces marques témoignent d'un bon contact.

4.4 Composante vivante du neurobiohybride

Cette section a vocation à présenter au lecteur les cellules électriquement actives employées dans les dispositifs au cours de mon travail de thèse. Ces cellules correspondent à la composante vivante du neurobiohybride que nous concevons. Nous avons opéré un changement de type cellulaire au début de ma thèse. En effet, les enregistrements électrophysiologiques en patch-clamp réalisés à la fin de la thèse de M. Henniquau nous ont permis de constater que, contrairement à une notion répandue dans la littérature, les neurones catécholaminergiques

différenciés à partir PC12 ont une activité électrique peu compatible avec nos objectifs, en raison notamment de la faible amplitude des potentiels d'action qu'ils émettent (de l'ordre de 40 mV ; (Henniquau, 2021)). Nous nous sommes ainsi orientés dans un premier temps vers les cellules endocrines hypophysaires murines GH4C1. Ces cellules électriquement actives émettent en effet des potentiels d'action spontanés et leur morphologie dépourvue de prolongement axonal facilite les expérimentations à notre stade de l'étude. J'ai mis en place le protocole afin de pouvoir les enregistrer dans les dispositifs neurobiohybrides et afin de mener les différentes caractérisations. Le choix de ces nouvelles cellules, différentes de celles utilisées jusqu'alors dans l'équipe, permet aussi de diversifier les types cellulaires cultivés dans les dispositifs neurobiohybrides, afin de valider les premières observations. Dans cette même optique, j'ai également développé des cultures de neurones glutamatergiques humains issus de cellules souches pluripotentes induites qui présentent des caractéristiques très intéressantes pour notre étude comme nous le verrons dans la suite de ce paragraphe.

4.4.1 Choix des modèles biologiques

4.4.1.1 Cellules endocrines hypophysaires murines GH4C1

Les cellules endocrines hypophysaires murines GH4C1 (ATCC CCL-82.2) ont été sélectionnées pour notre étude en raison de leur capacité à générer des potentiels d'action spontanés et de leur facilité de culture *in vitro*. Cette lignée établie en 1972 dérive d'une lignée tumorale appelée GH3 qui a été initialement extraite de la glande pituitaire d'une ratte (*Rattus norvegicus*) âgée de 7 mois.

Selon les données de l'ATCC, les cellules GH4C1 sont faiblement adhérentes et présentent des regroupements (appelés « *clusters* ») flottants en suspension dans le milieu de culture. Grâce aux observations que nous avons pu mener tout au long de ce travail, nous confirmons que l'aspect morphologique de ces cellules est très hétérogène et se compose de cellules adhérentes et de cellules flottantes de forme et de taille variables poussant en agrégats (voir figure 4.22). Ces cellules sont en outre largement caractérisées par des études d'électrophysiologie dans la littérature (Brady et al., 1994; Peri et al., 2001; Wagner et al., 1993). Ces cellules servent ainsi principalement de modèle pour des études électrophysiologiques portant sur les canaux calciques et pour des études sur l'homéostasie du calcium intracellulaire. Il n'y a cependant pas de résultats de caractérisation de ces cellules dans des dispositifs de type MEA dans la littérature. L'annexe 1 de ce chapitre présente les méthodes de culture appliquées pour ces cellules.

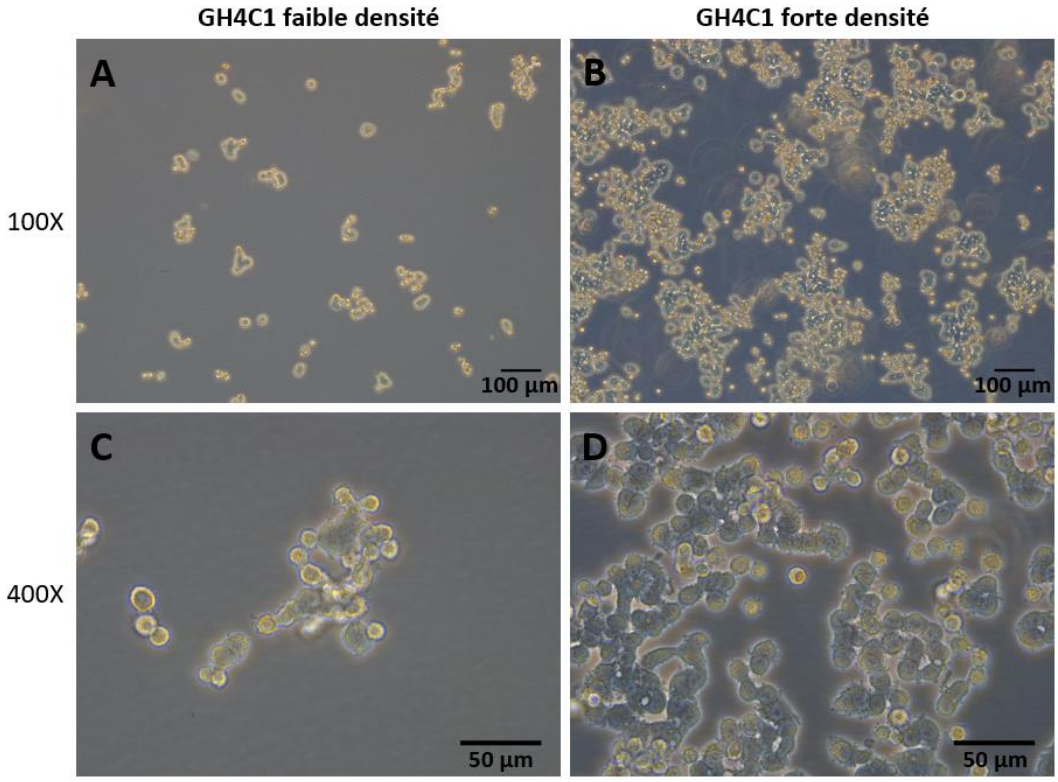


Figure 4.22 : Apparence de la culture mère de cellules GH4C1. Les photographies présentées sont prises au grossissement 100X (A et B) et au grossissement 400X (C et D) dans une culture à faible (A et C) et forte (B et D) densités.

La caractérisation morphologique des cellules GH4C1 a été complétée par un marquage fluorescent de protéines intracellulaires. Le principe du marquage fluorescent de protéines intracellulaires consiste à introduire dans la cellule des molécules ayant une affinité pour des structures intracellulaires. Ces molécules comportant un fluorophore, il est possible de les illuminer et de rendre visibles les structures auxquelles elles sont accrochées une fois fixées sur leur cible. Le principe de la fluorescence et du fonctionnement des fluorophores sont explicités de manière plus détaillée dans le chapitre suivant (*cf.* Chapitre 5, §5.4.1.2).

Pour ce marquage, les cellules GH4C1 sont ensemencées dans des chambres Labtek® à fond en verre avec 4 puits amovibles (Nalge Nunc International ; 154526 ; lot n° 031014-4-0). La surface des chambres Labtek® est traitée par application d'un *coating*, des molécules constituant la matrice extracellulaire qui servent de support et de protection aux cellules dans des conditions physiologiques. Le *coating* permet donc l'adhésion des cellules au fond des puits de culture *in vitro* ; sans ce *coating*, les cellules ne pourraient pas adhérer directement sur le verre. Pour les cellules GH4C1, le *coating* est réalisé en recouvrant la surface de Poly-L-Ornithine (PLO ; Sigma ; P4957 ; lot n° RNBK9934) laissée incuber pendant une heure à température de la pièce (~20°C). Après élimination de la PLO, trois rinçages au D-PBS (Stemcell Technologies ; 37350 ; lot n° 10000067272) sont effectués, après quoi les cellules sont ensemencées en goutte-à-goutte au centre des puits selon les procédures décrites dans l'annexe 1. La densité d'ensemencement est de 37500 cellules/cm², ce qui représente un total

de 75000 cellules par puits. L'ensemencement et le maintien des cellules dans les chambres Labtek® sont réalisés sans antibiotique pour ne pas risquer d'altérer leur physiologie.

Pour caractériser notre modèle GH4C1, nous avons fait le choix de marquer les noyaux avec un produit intercalant de l'ADN (le 4′, 6-diamidino-2-phénylindole (DAPI)) et les protéines de tubuline à l'aide d'une toxine appelée phalloïdine (cette dernière étant couplée à un fluorophore d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) excitable à 488 nm ; Alexa Fluor 488). Le marquage est observé à l'aide d'un microscope à épifluorescence Leica DMi8. Les longueurs d'onde d'excitation employées sont 365 nm pour le DAPI et 490 nm pour la phalloïdine couplée au fluorophore FITC. La procédure exacte du marquage est détaillée en annexe 2 de ce chapitre. Les images obtenues sont présentées en figure 4.23. Ces dernières nous permettent d'avoir un meilleur aperçu du phénotype des GH4C1. Le protocole a bien fonctionné et nous permet d'identifier facilement les noyaux et la tubuline. L'aspect des cellules est très similaire à la description donnée par le fournisseur. La réalisation de cette manipulation nous a permis de mettre en place des procédures de marquage fluorescent qui seront utilisées de nouveau pour caractériser à moyen terme les marqueurs des iCell® GlutaNeurons.

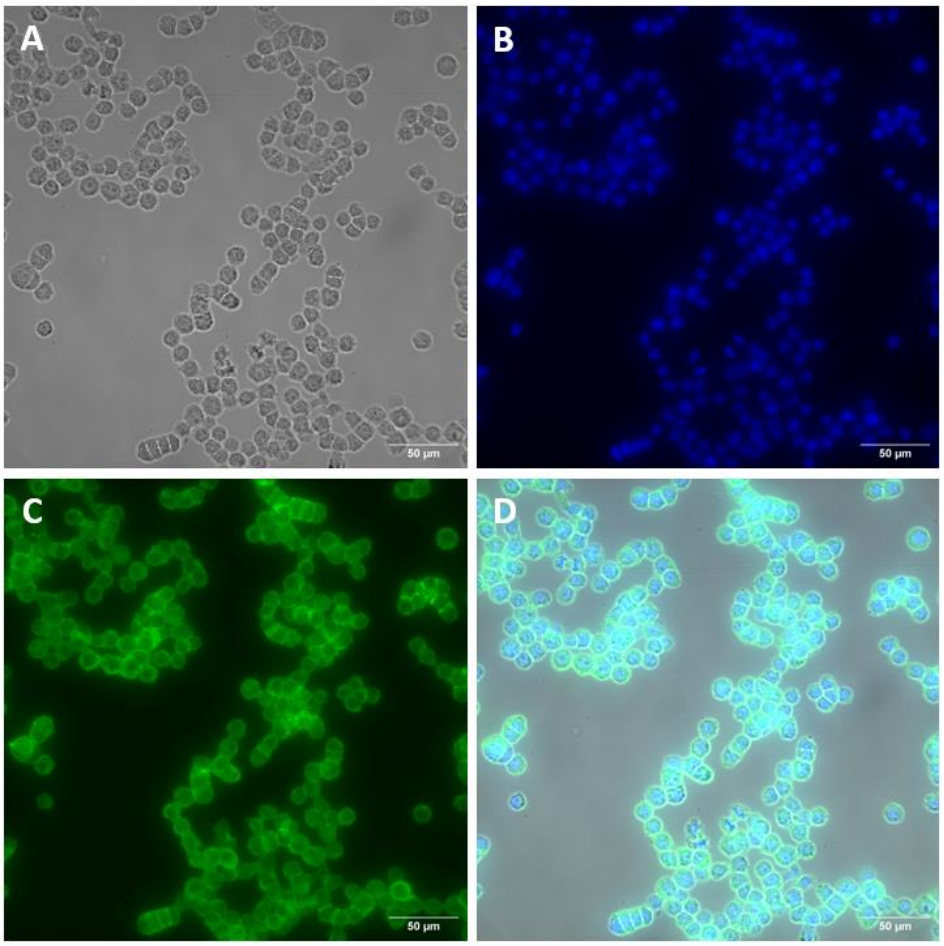


Figure 4.23 : Observation des cellules GH4C1 ensemencées sur des surfaces en verre par microscopie de fluorescence au grossissement 60X. (A) Photographie en champ clair. (B) Marquage du matériel génétique au DAPI (noyaux). (C) Marquage de la tubuline à la phalloidine. (D) Fusion de la photographie en champ clair, du marquage au DAPI et du marquage à la phalloidine.

4.4.1.2 Neurones glutamatergiques humains issus de cellules souches pluripotentes induites

En plus des cellules endocrines hypophysaires murines, un second type cellulaire plus proche de la physiologie des neurones excitateurs humains a été sélectionné : les iCell® GlutaNeurons (Fujifilm ; iCell® GlutaNeurons C1060 ; donneur 01279 ; lot n°106059). Ce sont des neurones glutamatergiques dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) humaines obtenues chez un sujet de sexe masculin, de type causasien, dépourvu de maladie, âgé entre 50 et 59 ans. Pour la suite de ce manuscrit, ces neurones seront appelés par leur nom commercial « iCell® GlutaNeurons ». Ces neurones sont particulièrement pertinents pour notre étude car le glutamate est le neurotransmetteur majoritaire des neurones excitateurs dans le cerveau humain. Après mise en culture selon les recommandations du fournisseur, les iCell® GlutaNeurons dérivés de ces iPSC adoptent au bout de 3 jours un phénotype neuronal classique avec de longs axones et se développent en formant des réseaux. Au bout de 7 jours, ces neurones sont suffisamment matures et capables de générer des potentiels d'action.

Les procédures d'ensemencement et de maintien des iCell® GlutaNeurons sont réalisées en suivant rigoureusement les recommandations du fournisseur. La figure 4.24 présente des iCell® GlutaNeurons ensemencés sur des lamelles en verre de 14 mm de diamètre (Electron Microscopy Sciences ; 72291-03 ; lot n°210805) placées dans des puits de plaque 24 puits. La surface de ces lamelles a été traitée pour optimiser la croissance de neurones. Les lamelles sont vendues stériles. La surface des lamelles est enrobée de Poly-L-Ornithine selon le même protocole que pour l'ensemencement des cellules GH4C1 décrit en 3.4.1.1. Pour les iCell® GlutaNeurons, la procédure se poursuit avec l'ajout de matrigel à 0.028 mg/mL (Corning ; 354230 ; lot n°9294001) pendant 1h00 dans un incubateur réglé à 37°C/5% CO_2. Ces traitements (PLO + Matrigel) permettent aux cellules d'adhérer aux surfaces en verre. Après décongélation d'une ampoule neuve, les iCell® GlutaNeurons sont directement ensemencés sur quatre ou cinq lamelles différentes selon la quantité de cellules contenues dans l'ampoule de sorte à avoir un minimum de 100 000 cellules/cm² ce qui correspond aux recommandations du fournisseur. La culture est réalisée dans un volume total de 1 mL de milieu Brainphys (Stemcell Technologies) contenant 2% de iCell® Nervous System supplement (Fujifilm ; M1031 ; lot n°106003), 1% de iCell® Neural Supplement B (Fujifilm, M1029, lots : 105479), 1% de supplément N2 à 100X (Gibco ; 17502-048 ; lot n°2415420), 1% de Pénicilline-Streptomycine et 1 µg/mL de laminine (Sigma ; L2020 ; source 0000084470 ; batch 0000084482). Un premier changement de l'intégralité du milieu est réalisé dès le lendemain de la décongélation. La moitié du milieu est remplacée par du milieu frais toutes les 48h. Les changements de milieu sont réalisés avec une extrême précaution contre la paroi des puits pour éviter tout décollement du tapis cellulaire. Ces conditions de culture nous ont permis de maintenir ces neurones jusqu'à 21 jours ; après quoi, la santé des cellules se dégradait fortement jusqu'à décollement du tapis.

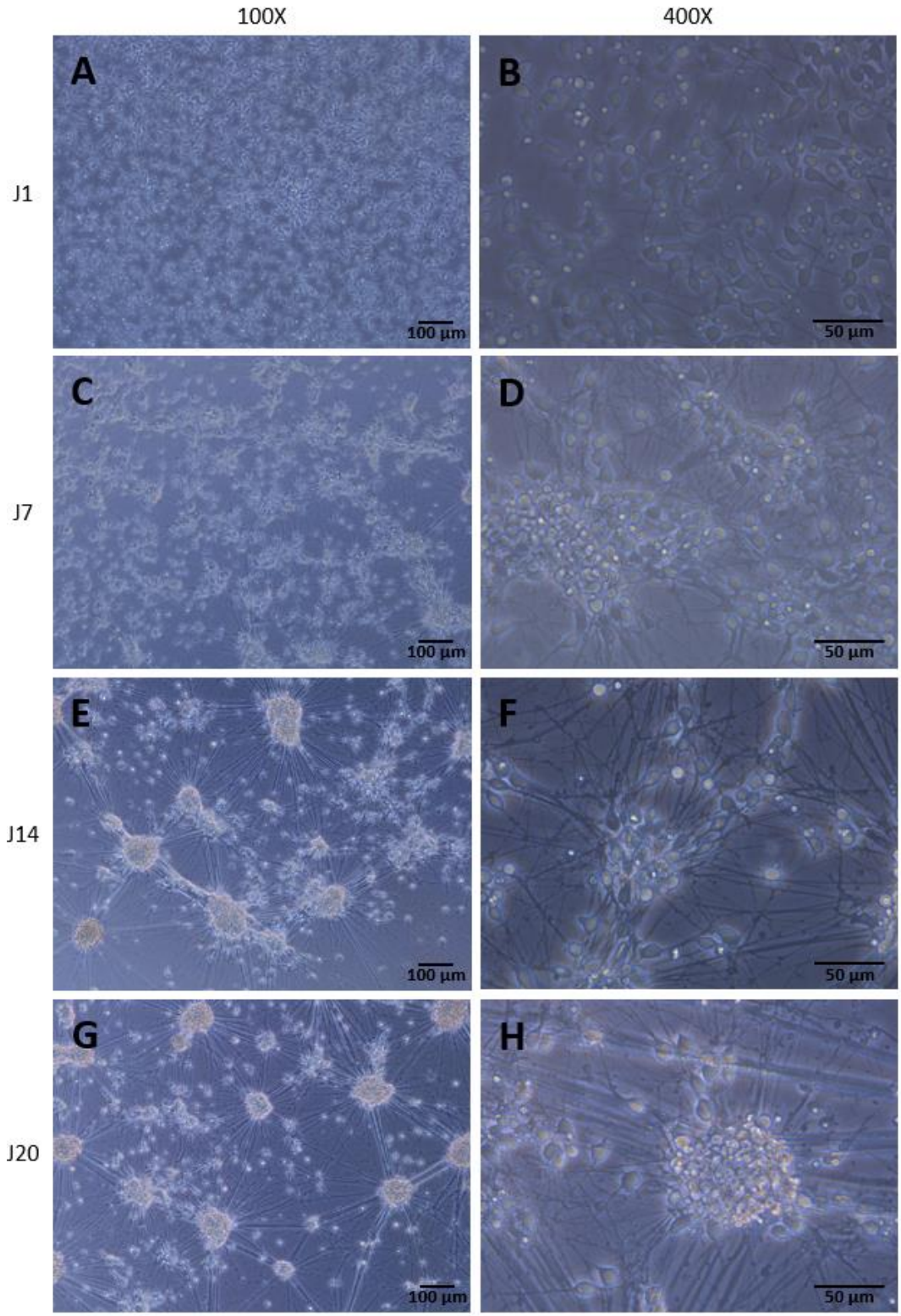


Figure 4.24 : Evolution de la culture de neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites au cours du temps sur des lamelles de verre adaptées à la culture de neurones. Les photographies sont prises au 1er jour après ensemencement (A et B), au 7ème jour après ensemencement (C et D), au 14ème jour après ensemencement (E et F) et au 20ème jour après ensemencement (G et H). Les photographies présentées sont prises avec un grossissement total de 100X (A, C, E et G) ou 400X (C, D, F et H) sur un microscope à contraste de phase Leica. Les cellules sont stables sur les 7 premiers jours de culture. Entre le 7ème et le 14ème jour, des clusters se forment progressivement. La quantité de clusters évolue peu après le 14ème jour et une perte d'adhérence des faisceaux d'axones est observée au 20ème jour de culture, l'ensemble du réseau n'adhère alors plus que par les corps cellulaires au sein des clusters.

4.5 Ensemencement des cellules dans les interfaces neurobiohybrides

4.5.1 Ensemencement des cellules GH4C1

Pour assurer le passage entre la salle blanche et le laboratoire L2 de biologie dans de bonnes conditions, le dispositif est stérilisé par immersion pendant 2h dans un bain d'éthanol à 70%. Après stérilisation, le dispositif est sorti du bain d'éthanol, rincé trois fois à l'eau stérile (Sigma ; W3500 ; lot n°RNBJ4424) puis séché pendant 15 minutes sous un poste de sécurité microbiologique.

La surface des dispositifs est ensuite préparée en suivant exactement la même procédure que pour l'ensemencement de cellules GH4C1 dans des chambres Labtek®. La surface des dispositifs est donc enrobée avec un *coating* de PLO puis, après les rinçages au D-PBS les cellules sont ensemencées en goutte-à-goutte au niveau des électrodes d'enregistrement. La densité d'ensemencement est de 37500 cellules/cm², ce qui représente un total de 112500 cellules par dispositif RxTx. Les cellules sont ensuite laissées 48h dans l'incubateur à 37°C/5%CO_2. Dès le lendemain, les cellules adhèrent à la surface du dispositif sans préférence apparente pour le métal ou pour la passivation. La répartition des cellules sur la surface du dispositif est donc assez uniforme malgré une densité plus importante au centre du puits comme le montre la figure 4.25. Il est à noter que ces photos sont prises en face arrière (*i.e.* au microscope inversé), ce qui illustre la pertinence des choix technologiques que nous avons menés jusqu'à cette étape. En effet, il est aisé d'observer sur l'ensemble du dispositif le positionnement des cellules. Cela permet de faire une première estimation du nombre d'électrodes potentiellement recouvertes par des cellules pour la manipulation sur la *dark box*.

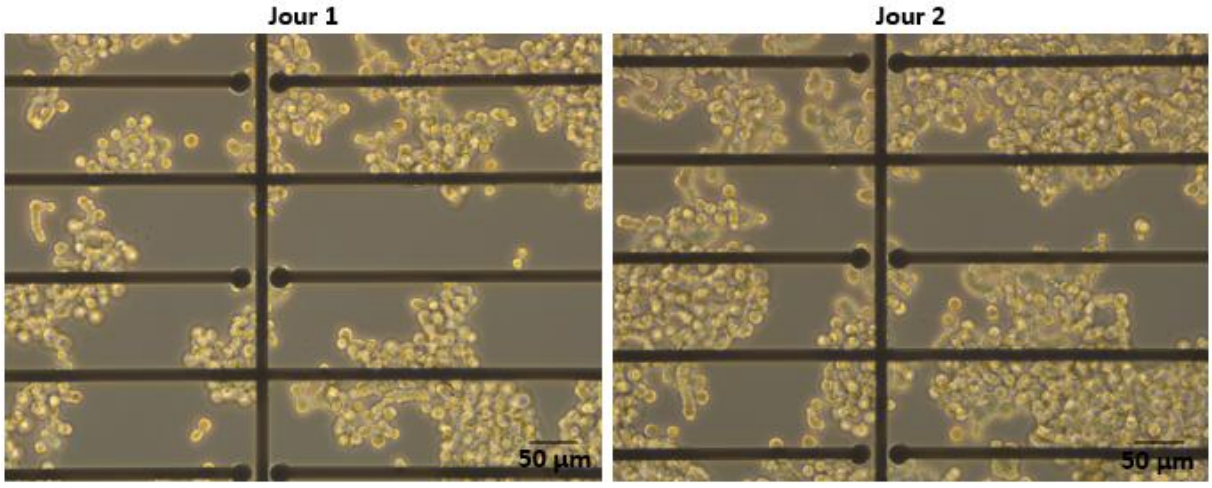


Figure 4.25 : Cellules adhérées à la surface d'un dispositif RxTx. Les cellules n'ont pas de préférence pour les surfaces de métal ou de passivation et poursuivent leur croissance une fois ensemencées dans le dispositif. Les deux photographies ont été prises au même endroit à 24 h d'intervalle et en face arrière.

4.5.2 Ensemencement et maintien des iCell® GlutaNeurons dans l'interface neurobiohybride

Comme cela a été mentionné précédemment les neurones étant des cellules post-mitotiques (*i.e.* qui ne se divisent pas), chaque ensemencement est réalisé à partir d'une nouvelle ampoule achetée directement chez le fournisseur. Les essais réalisés avec des iCell® GlutaNeurons ont été menés **avant** l'ajout de l'étape de plasma-O2 d'activation dans notre processus de fabrication. Les états de surfaces des dispositifs employés étaient donc toujours sujets à variation.

Les dispositifs sont stérilisés exactement de la même manière que pour les cellules GH4C1 (*cf*. Chapitre 4, §4.5.1), puis leur surface est préparée selon la même procédure que celle décrite précédemment pour l'ensemencement d'iCell® GlutaNeurons sur des lamelles en verre (avec double *coating* PLO + Matrigel). Une ampoule permet d'ensemencer entre deux et trois dispositifs selon la quantité de cellules disponibles.

Notre objectif initial était de maintenir les iCell® GlutaNeurons entre 14 et 21 jours au sein de l'interface. Cependant, bien que nous ayons scrupuleusement suivi les recommandations du fournisseur, nous ne sommes pour l'instant pas parvenus à maintenir les cellules suffisamment longtemps pour pouvoir les enregistrer dans les dispositifs neurobiohybrides. Les essais présentés ici sont préliminaires et ont vocation à illustrer le comportement des iCell® GlutaNeurons dans un dispositif dont la surface n'a pas été activée par plasma O_2. L'évolution de l'aspect des iCell® GlutaNeurons au cours du temps dans ces conditions est présentée en figure 4.26. Les travaux sur ces cellules vont être poursuivis, notamment en incluant les nouvelles étapes suite à l'optimisation du processus de fabrication pour rendre la surface hydrophile. Ces optimisations sont de nature à favoriser l'adhésion et le maintien des iCell® GlutaNeurons sur des temps de culture nettement plus longs que ceux impliqués pour les cellules GH4C1 (~48h).

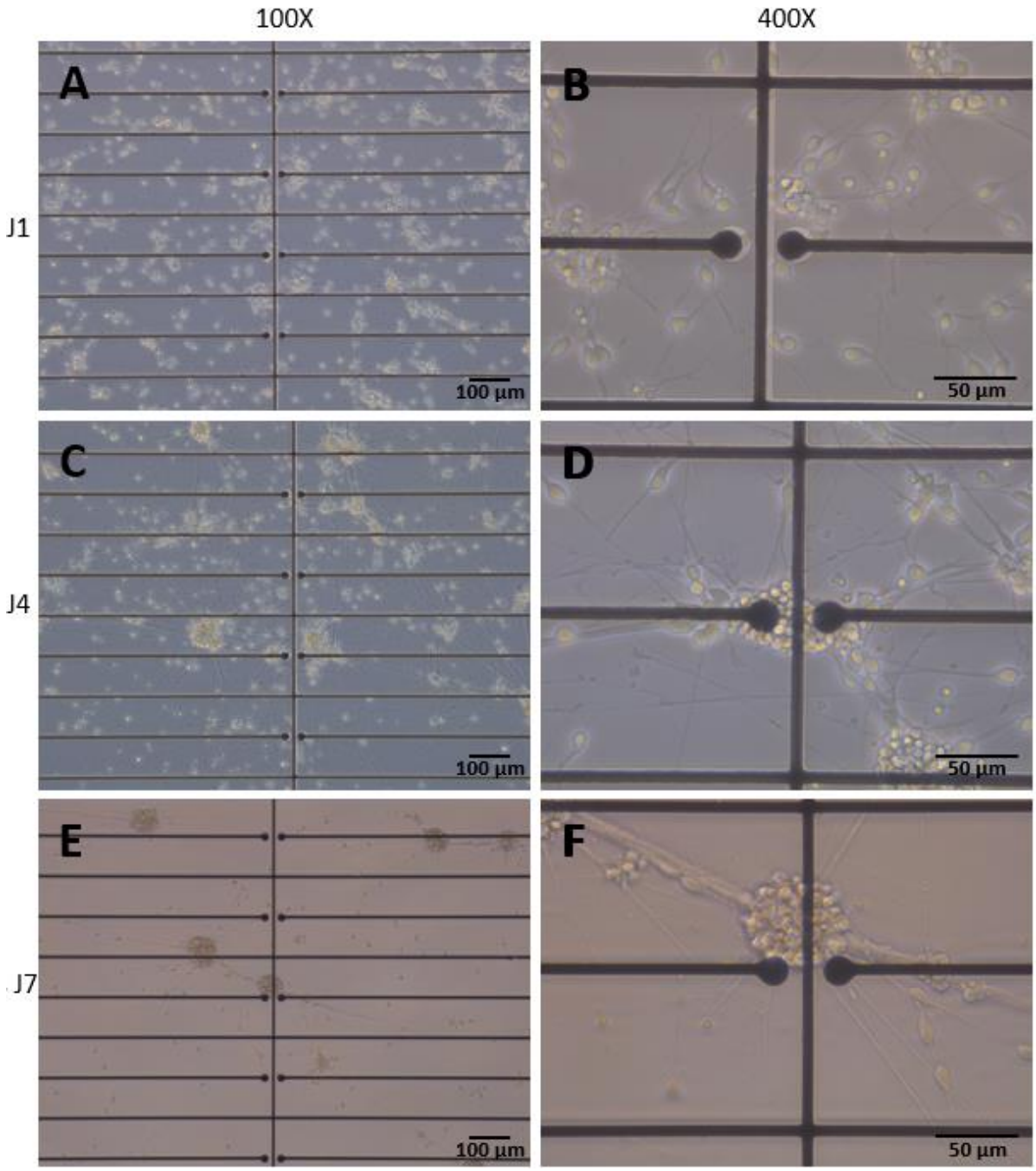


Figure 4.26 : Evolution de la culture de neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites au cours du temps sur les dispositifs. Les photographies sont prises au 1er jour après ensemencement (A et B), au 4ème jour après ensemencement (C et D), au 7ème jour après ensemencement (E et F) et au 20ème jour après ensemencement (G et H). Les photographies présentées sont prises avec un grossissement total de 100X (A, C, E et G) ou 400X (C, D, F et H). Les cellules se sont correctement réparties sur la surface du dispositif le premier jour, cependant leur mauvaise adhésion a pénalisé le maintien de la culture et dès le premier changement de milieu un fort décollement du tapis a été observé. Ce décollement de tapis a engendré une perte significative du nombre de cellules présentes dans le dispositif. Les cellules restantes se sont très rapidement regroupées en clusters et au 7ème jour il ne restait plus (ou presque) de cellules isolées.

4.6 Perspectives d'amélioration

4.6.1 Dépôt localisé des cellules par photostructuration de l'enrobage des surfaces de culture

Afin d'optimiser davantage le positionnement des cellules sur les électrodes et dans le but de maitriser la quantité de matériel biologique à l'intérieur d'un dispositif neurobiohybride, nous travaillons à l'emploi de techniques de structuration (ou *patterning*) des surfaces de culture. Cela consiste à déposer la matrice permettant l'adhésion des cellules (le *coating*) en des endroits bien précis des dispositifs et non plus sur toute leur surface, comme par exemple uniquement sur les électrodes. Cela permettra également à terme de favoriser l'établissement de réseaux neuronaux orientés.

La méthode de structuration que nous avons choisie repose sur l'utilisation d'un laser pour dessiner les zones à privilégier. La procédure comprend plusieurs étapes qui sont schématisées dans la figure 4.27. Un premier dépôt de Poly-L-Lysine (PLL ; Sigma-Aldrich P8920 ; lot n°SLCM0307) à 0.1 mg/mL rendant la surface hydrophile est réalisé. Après trois rinçages au tampon HEPES pH 8 (Thermoscientific ; J63578 ; lot n°N08J501) à 0.1 M, un second dépôt de Poly-Ethylene Glycol-Succinimidyl VAlerate (PEG-SVA ; Laysan Bio, mPEG-SVA, lot n°173-147) à 100 mg/mL est ensuite appliqué sur la surface. Le PEG-SVA a pour effet de rendre la surface hydrophobe (donc inadaptée à l'adhésion des objets biologiques). Du PLPP-gel (Primo-Alveole ; B005) est ensuite appliqué sur l'intégralité de la surface. Le PLPP-gel est un réactif photo-activable aux UV permettant une dégradation locale du PEG-SVA sous-jacent. L'exposition au laser permet donc d'éliminer le PLPP-gel et le PEG-SVA localement. La PLL du premier dépôt redevient à nouveau accessible dans les zones exposées. La surface est donc localement hydrophile et le *coating* de PLO nécessaire à l'adhésion des cellules GH4C1 ne peut adhérer qu'aux endroits illuminés.

Après préparation de la surface, le *coating* de PLO est réalisé avec une incubation à température de la pièce de 5 minutes selon la même procédure que pour l'ensemencement des dispositifs (*cf.* Chapitre 4, §4.5.1). La durée d'incubation est volontairement fortement réduite pour limiter le risque d'adhésion non spécifique de la PLO sur des surfaces non exposées au laser (et donc des cellules). Des cellules GH4C1 sont finalement ensemencées à une densité de 80000 cellules/cm². La densité d'ensemencement est très élevée pour optimiser les chances que des cellules soient positionnées sur les surfaces exposées. Les cellules en excès sont éliminées après 3h passées dans l'incubateur à 37°C/5% CO_2 par un remplacement intégral du milieu de culture. Les méthodes de culture sont strictement identiques à celles employées classiquement pour la culture des cellules GH4C1 en dispositif.

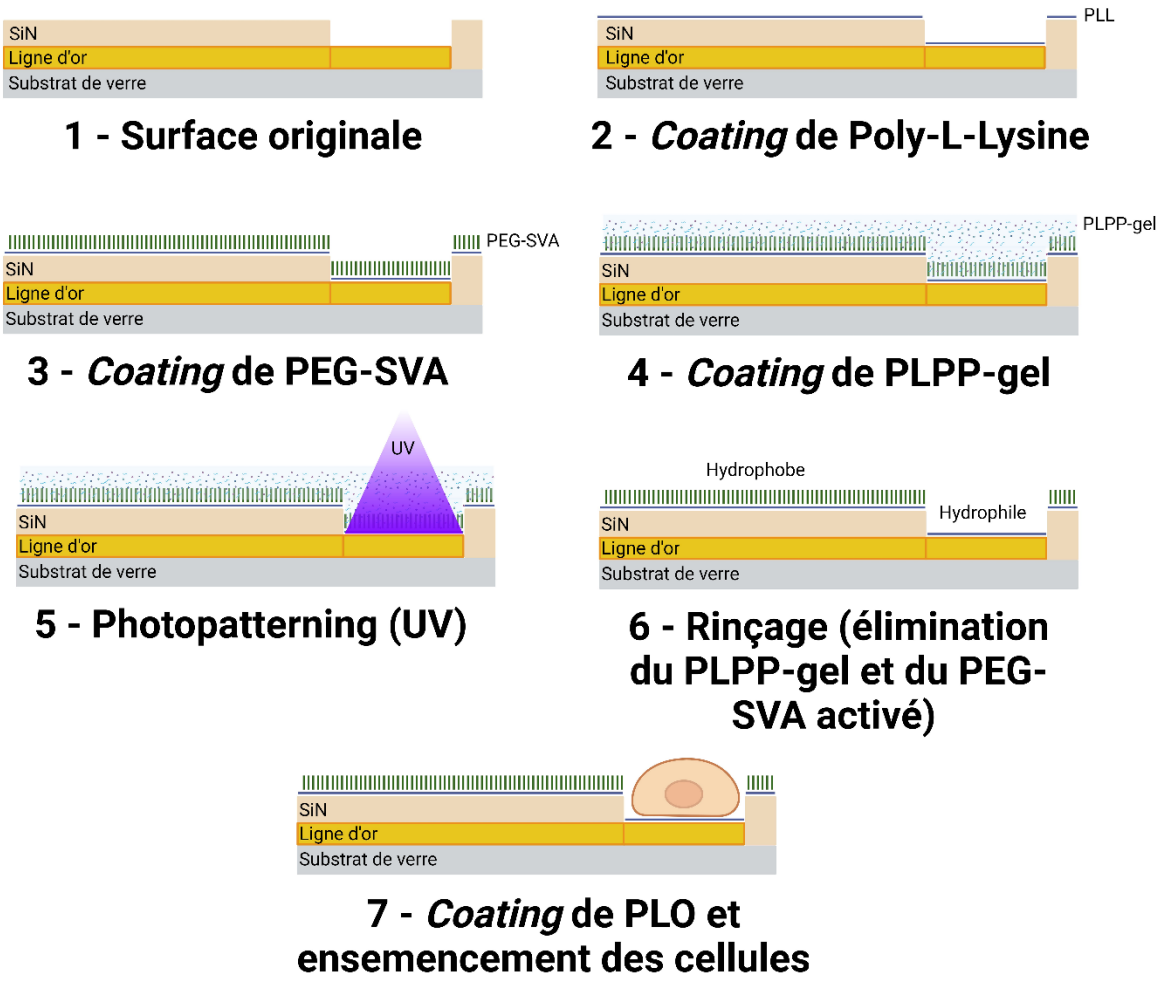


Figure 4.27 : principe général du procédé de photostructuration (*photopatterning* en anglais). La surface est enduite avec de la PLL, permettant l'adhésion d'un second enduis de PEG-SVA. Du PLPP-Gel est appliqué. Ce gel contient des protéines capables de se fixer aux brins de PEG-SVA en présence de lumière ultraviolette (UV). Les PEG-SVA auxquels se sont fixées des protéines sont éliminés spécifiquement par un rinçage. Les cellules ne peuvent adhérer que là où les PEG-SVA ont été supprimés. Figure réalisée à l'aide du logiciel BioRender.com 2023.

Le premier test de photopatterning a été réalisé afin de limiter la quantité de cellules GH4C1 dans le dispositif en ne conservant que celles placées dans des zones d'intérêt après ensemencement (*i.e.* sur et à proximité des électrodes). Cette manipulation est un premier essai réalisé en collaboration avec la Dr. Aude Sivery qui nous a fourni le matériel et la procédure à suivre présentée ci-dessus. L'exposition est réalisée à l'aide d'un microscope Leica DMi8. Le schéma de l'exposition est illustré en figure 4.28.



Figure 4.28 : Motifs photopatternés sur un dispositif passivé au PLPP-gel. A gauche, seules les électrodes sont photopatternées. A droite, de multiples spots larges sont alignés de sorte à former une bande large rectangulaire. Les cellules sont supposées adhérer uniquement sur les surfaces orange.

Après 3h passées dans le dispositif et élimination de la majorité des cellules non adhérées, la disposition des cellules semble suivre le patterning. La figure 4.29 présente une photographie de la répartition de ces dernières dans le dispositif. Une « bande » de cellules est facilement identifiable à droite de la masse centrale, ce qui correspond à ce qui était attendu. Il est plus compliqué de conclure concernant la répartition des cellules à gauche car les spots photopatternés faisaient exactement la taille des électrodes. Le microscope employé pour cette vérification étant inversé, il n'est pas possible de voir entièrement les cellules qui auraient bien adhéré bien qu'il semble que certaines soient bien positionnées sur les électrodes. Le protocole fonctionne donc correctement, ce qui ouvre de nombreuses perspectives très intéressantes pour la suite. Il est à noter que de l'adhésion non spécifique est malgré tout observée à certains endroits. Un développement complémentaire avec des tests supplémentaires sera nécessaire pour voir si cela a un réel impact, ou si nous pouvons d'ores et déjà implémenter cette technique en routine dans notre procédure.

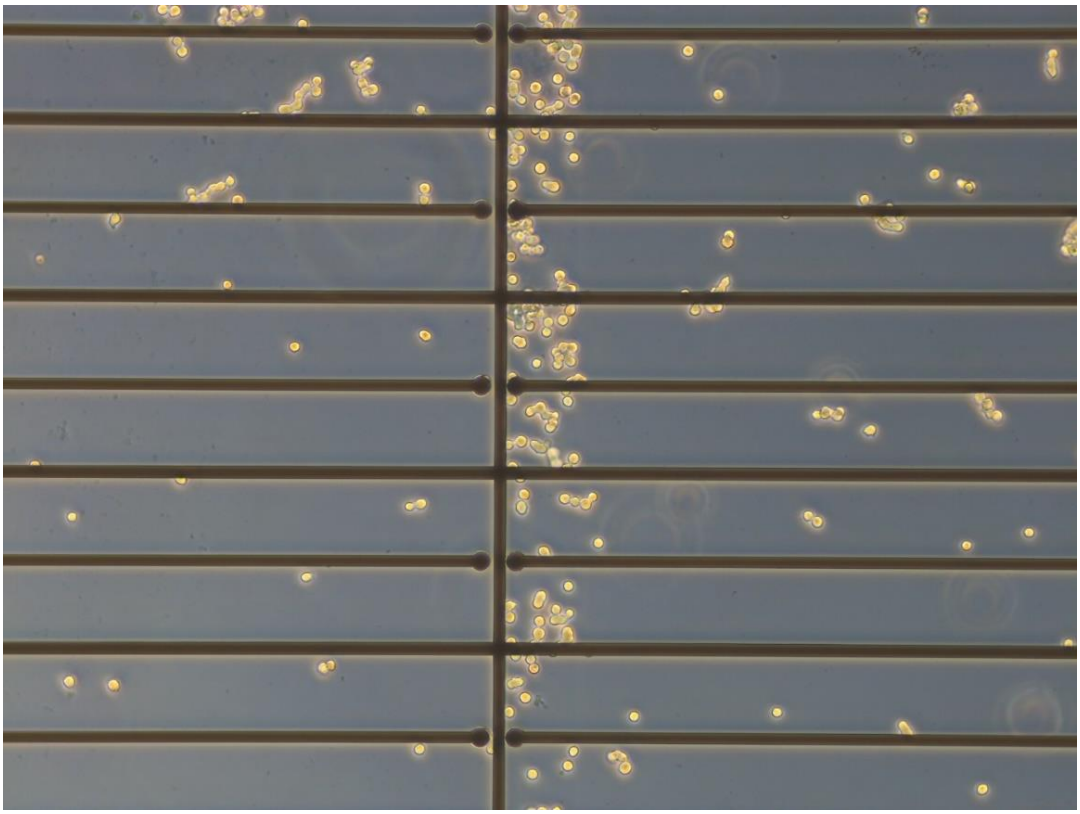


Figure 4.29 : Répartition des cellules après trois heures dans le dispositif photopatterné. Certaines cellules visibles sont des cellules non adhérées qui ont été conservées dans le puits malgré les rinçages ayant vocation à les éliminer. Toutes ces cellules sont sur des zones non patternées.

4.6.2 Etablissement d'un protocole de récupération des dispositifs

A ce jour, les dispositifs fabriqués ne sont utilisés que pour un unique ensemencement de cellules ce qui est extrêmement chronophage et coûteux. Il y a donc un sujet concernant le développement de procédures de récupération des dispositifs. Cela s'avèrerait très rentable pour réduire le coût global de nos manipulations ainsi que pour réduire le temps passé en salle blanche. A ce stade du développement du projet, cela fait sens. Les dispositifs ont subi de nombreuses évolutions guidées par nos observations réalisées lors des différentes expériences. Ils ont atteint un degré de maturité sur le versant du design et de la technologie ouvrant la question d'une réutilisation possible des dispositifs. Une piste envisagée consiste à supprimer le *coating* et les cellules par l'emploi de Tergazyme®, un cocktail enzymatique permettant d'éliminer toute trace de molécules biologiques. Des essais sont en cours pour apporter des réponses et des solutions.

4.7 Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons vu qu'elles étaient les améliorations à apporter aux interfaces déjà utilisées au sein de notre équipe. Les développements réalisés pendant mon doctorat ont permis de répondre à la plupart des problématiques énoncées. Nos interfaces neurobiohybrides présentent aujourd'hui les caractéristiques nécessaires pour permettre l'enregistrement et la stimulation de neurones vivants notamment grâce à l'ajout d'une couche de passivation et à l'amélioration de l'état de surface du dispositif permettant de maintenir des cellules GH4C1 en vie pour la durée nécessaire de nos manipulations. Quelques ajustements devraient permettre à court terme de maintenir également des iCell® GlutaNeurons. De nouvelles approches viendront prochainement compléter nos méthodes pour permettre un ensemencement précis de cellules dans des zones d'intérêt.

Chapitre 5 Caractérisation des modèles vivants

5.1 Introduction du chapitre

Connaître la signature biologique et électrique des cellules neuronales utilisées dans le système neurobiohybride est indispensable pour s'assurer de la pertinence des résultats expérimentaux obtenus lors de la mise en place de la boucle de communication bidirectionnelle. C'est également un critère très important dans le cadre des simulations électriques réalisées à l'aide du logiciel LTSPICE. Ce chapitre a donc pour objectif la caractérisation fonctionnelle de l'activité électrique des cellules neurosécrétrices murines (GH4C1) et des neurones glutamatergiques humains dérivés d'iPSCs (iCell® GlutaNeurons). En effet, la forme, la fréquence et la durée des potentiels d'action émis par les différents types cellulaires utilisés en dispositifs neurobiohybrides ont été déterminées expérimentalement. Nous avons également cherché à vérifier si les cellules étaient capables d'émettre des potentiels d'action spontanés (sans stimulation préalable) afin de pouvoir réaliser des enregistrements électriques. L'acquisition de ces données à l'aide de techniques d'électrophysiologie doit aider à l'analyse des enregistrements réalisés par le biais de l'interface neurobiohybride et du banc électronique. Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec le docteur Pascal Mariot et le docteur Valerio Farfariello de l'unité INSERM 1003.

5.2 Les techniques d'étude mises en œuvre

Pour caractériser les différents types cellulaires utilisés dans ce travail, et pour nous assurer que leurs activités électriques étaient compatibles avec les seuils de détection en dispositif neurobiohybride, nous avons choisi d'étudier la réactivité électrique des cellules GH4C1 et des iCell® GlutaNeurons par une approche d'électrophysiologie en patch-clamp. En parallèle, et dans le but de pouvoir objectiver la réalité des phénomènes électriques enregistrés en dispositifs neurobiohybrides sur le banc de caractérisation développé au sein de notre laboratoire (*cf*. Chapitre 6, §6.3.2), nous avons également mené une étude en imagerie calcique des variations des taux de calcium intracellulaires concomitants à l'activité électrique dans ces deux types cellulaires.

5.3 Principe et méthodes du patch-clamp

5.3.1 Principe du patch-clamp

Le patch-clamp est une technique d'électrophysiologie dérivée de la technique de microélectrode intracellulaire, permettant de mesurer le potentiel de membrane des cellules (technique de courant imposé ou *current-clamp*) ou alternativement de mesurer les courants

ioniques transmembranaires (technique de potentiel imposé ou[1] voltage-clamp) (Hamill et al., 1981). Le principe, illustré en figure 5.1, consiste à mettre en contact la membrane d'une cellule vivante et une micropipette en verre (dont le diamètre à la pointe est de l'ordre du micromètre et de résistance de l'ordre de quelques MOhms (entre 2 et 10 MOhms généralement)) contenant une solution ionique isotonique à celle du milieu intracellulaire. Avant de poser la micropipette sur la cellule, le potentiel de jonction éventuel est annulé entre l'électrode de mesure et l'électrode de référence. Une fois la pointe de la pipette au contact de la membrane, une aspiration douce est réalisée de manière à faire adhérer la membrane plasmique au verre. A ce stade, la membrane plasmique est fortement collée au verre et forme une zone de très forte résistance (de quelques GigaOhms), qu'on appelle le *Gigaseal*. En utilisant des micropipettes polies à la chaleur, il est possible d'obtenir des *Gigaseals* de plusieurs dizaines de GigaOhms. Cette configuration s'appelle la configuration « cellule attachée ». La qualité du *Gigaseal* permet d'une part d'éviter toute fuite entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule comme nous le verrons à l'étape suivante et d'autre part d'isoler électriquement un fragment de membrane dans lequel il est possible de mesurer l'activité d'une seule protéine canal (d'où le nom de patch-clamp). A la suite de cette étape, en appliquant une succion très brève associée ou non à un choc électrique très bref (650 mV pendant 100 µsec), il est possible de casser le fragment de membrane situé sous la micropipette, tout en conservant le *Gigaseal* et de mettre ainsi en continuité le liquide intracellulaire avec le liquide contenu dans la pipette. Cette méthode, appelée « cellule entière » permet d'établir une continuité électrique et ionique entre l'ensemble de la membrane cellulaire et une électrode en argent chlorurée plongée dans le liquide de la pipette.

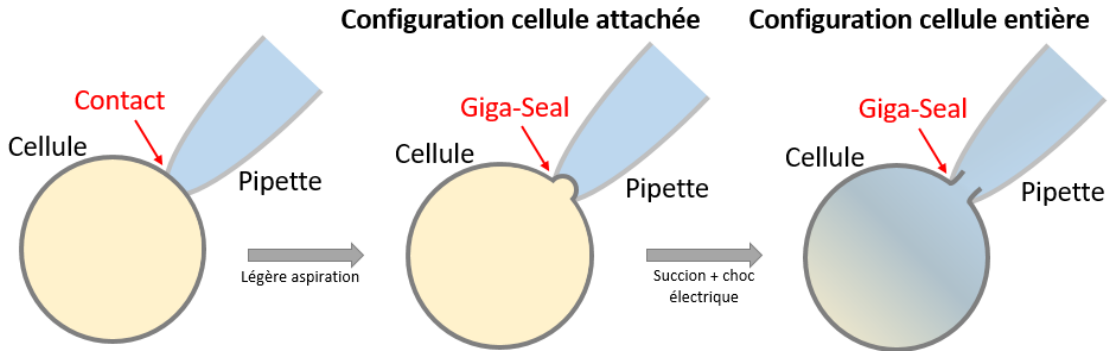


Figure 5.1 : Principe du patch-clamp et de la succession d'étapes menant à la configuration « cellule entière ». Une pipette remplie d'électrolyte mimant la composition du milieu intracellulaire est approchée de la membrane cellulaire jusqu'à établissement d'un contact. Une légère aspiration est appliquée de sorte à former un Giga-Seal entre la pipette et la membrane cellulaire. Finalement, une succion brusque associée à un choc électrique permet d'ouvrir la cellule et ainsi d'établir une continuité entre l'intérieur de la cellule et l'intérieur de la pipette. Le volume de la pipette est considéré comme infini comparé à celui de la cellule qui voit son contenu dilué dans la pipette.

[1] La terminologie francophone en électrophysiologie ne respecte pas nécessairement la terminologie adoptée en électricité ou en électronique. Il en va notamment ainsi du terme « potentiel » utilisé souvent à la place de tension. On parle par exemple de potentiel de membrane ou potentiel de repos, pour parler d'une différence de potentiel mesurée entre l'intérieur de la cellule et l'extérieur relié à la masse. On utilise également l'expression « potentiel imposé » au lieu de « tension imposée » (en anglais *voltage-clamp*), sous-entendant que c'est bien le potentiel de membrane qu'on impose.

L'organisation du patch-clamp en cellule entière est illustrée en figure 5.2, le principe consiste à établir une continuité électrique entre une électrode en argent chloruré et le cytosol d'une cellule vivante. Les échanges ioniques survenant sur toute la surface de la membrane créent des courants électriques et des variations de potentiel qui peuvent être détectés par l'électrode. Les paramètres électrophysiologiques du circuit électrique équivalent à la membrane peuvent être mesurés par patch-clamp (voir annexe 3 pour la description de la mesure).

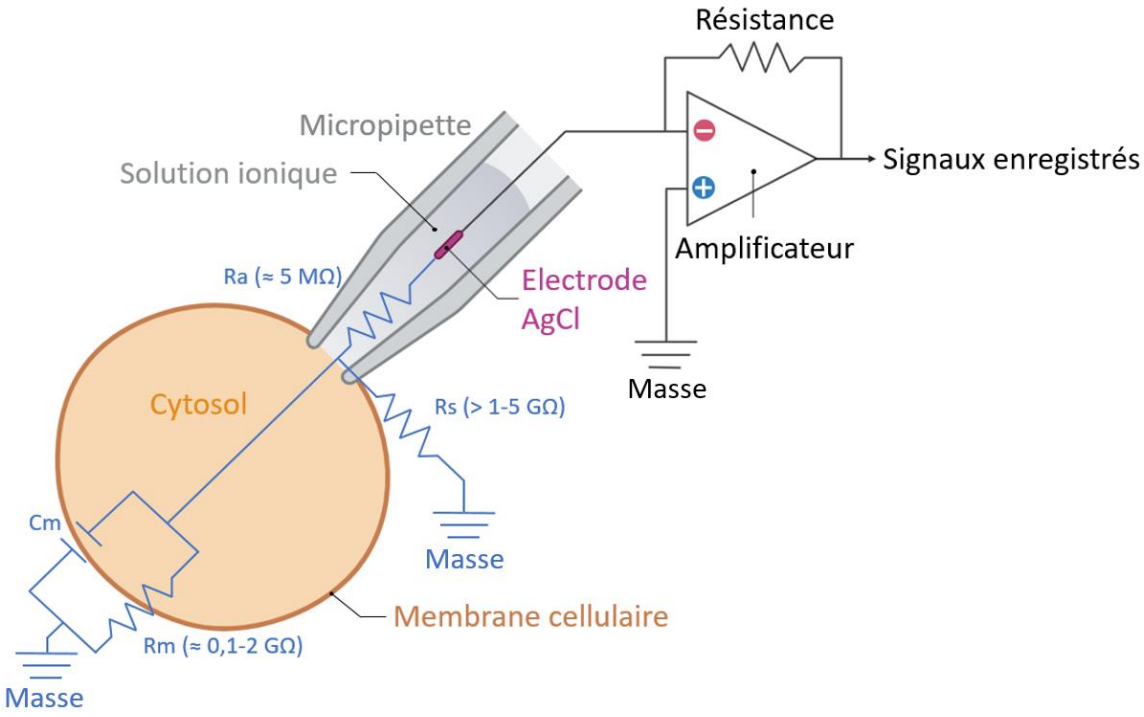


Figure 5.2 : Organisation d'une manipulation de patch-clamp en configuration « cellule entière ». En configuration « cellule entière » une continuité électrique est établie entre une électrode en argent chloruré (AgCl) reliée à un système d'acquisition (circuit en noir) et l'ensemble de la membrane cellulaire. Le circuit en bleu correspond au circuit équivalent dans la cellule. Ra = résistance d'accès. Rs = Résistance du *seal*. Rm = résistance membranaire. Cm = capacité membranaire. Figure réalisée à l'aide des logiciels BioRender.com 2023 et PowerPoint.

Les résultats obtenus par patch-clamp renseignent sur la forme des potentiels d'action, ainsi que sur leur amplitude, leur fréquence et leur durée. Cette technique (en configuration cellule entière) est invasive pour la cellule qui voit l'intégralité de son milieu intracellulaire dilué dans le milieu de la pipette de patch-clamp après ouverture de la membrane (*cf.* passage en cellule entière). Pour compléter les résultats obtenus par patch-clamp, nous avons fait le choix d'employer des techniques d'imagerie calcique moins invasives dont le principe est explicité ci-après. Ce choix se justifie également par notre volonté de pouvoir, à terme, corréler les enregistrements d'activités électriques cellulaires en dispositifs neurobiohybrides à la réalité des phénomènes biologiques concomitants se produisant dans une cellule électriquement active ; cette corrélation est en effet à la base de la démonstration d'une boucle de communication bidirectionnelle.

5.3.2 Méthodes de patch-clamp pour caractériser l'activité électrique des cellules

Dans le cadre de cette thèse, des manipulations de patch-clamp sont réalisées en configuration cellule entière pour caractériser les potentiels d'action émis par nos modèles cellulaires. Les manipulations de patch-clamp sur les cellules GH4C1 sont réalisées strictement de la même manière que pour les iCell® GlutaNeurons. Les signaux électriques sont mesurés par un amplificateur de patch-clamp RK300 (Biologic, France) et numérisés par un convertisseur AD ITC16 (Instrutech, USA) avant d'être stockés ou analysés sur ordinateur.

La solution extracellulaire est composée de solution saline équilibrée de Hank (HBSS) à pH 7.4 comprenant 142.6 mmol.L^{-1} de NaCl, 5.6 mmol.L^{-1} de KCl, 10 mmol.L^{-1} de HEPES-Na, 5 mmol.L^{-1} de glucose et 4.2 mmol.L^{-1} de $NaHCO_3$, 0.44 mmol.L^{-1} de KH_2PO_4 et 0.34 mmol.L^{-1} de Na_2HPO_4 en concentrations finales. Le HBSS extracellulaire contient également 2 mmol.L^{-1} de $CaCl_2$ et 1 mmol.L^{-1} de $MgCl_2$. Du tetraethyl ammonium chlorure (TEA-Cl, 20 mmol.L^{-1}), un bloquant non sélectif des canaux potassiques, a été ajouté dans certaines expériences pour évaluer la contribution des courants potassiques voltage-dépendants des iCell® GlutaNeurons dans les courants globaux et dans le potentiel de repos.

Pour la mesure des potentiels d'action et des courants ioniques globaux, les concentrations finales de la solution intracellulaire utilisée (de pH 7.2) sont 140 mmol.L^{-1} de potassium gluconate, 10 mmol.L^{-1} de NaCl, 10 mmol.L^{-1} de HEPES-KOH et 1 mmol.L^{-1} de $MgCl_2$. Pour certaines manipulations, 2 mM d'ATP sont ajoutés au milieu intracellulaire. La présence d'anions de mobilité différentes (notamment l'ion gluconate dans la pipette et les ions chlorures à l'extérieur) de chaque côté de la membrane plasmique entraîne l'existence d'un potentiel de jonction liquide qu'il faut calculer et qu'il faut enlever des valeurs de potentiel mesurées. Le calcul est présenté dans l'annexe 4. La valeur du potentiel de jonction liquide calculé est de 15 mV. Cette valeur a été soustraite aux valeurs de potentiel de membrane mesurées.

Les pipettes sont étirées à partir de capillaires de verre borosilicaté 1BF150F3 (World Precision Instruments, USA) à l'aide d'une étireuse à pipettes P97 (Sutter Instruments, USA) et leur pointe est polie à l'aide d'une microforge MF-900 (Narishige, Japon). Les micropipettes sont approchées des cellules par un micromanipulateur MP285 (Sutter Instruments, USA).

Pour les manipulations de patch-clamp, les lamelles servant de support aux iCell® GlutaNeurons sont transférées dans des boîtes de Petri de 3 cm de diamètre, le poste de patch-clamp n'étant pas adapté au format des plaques 24 puits. La culture n'est pas directement réalisée dans des boîtes de Petri en raison de la faible quantité de matériel biologique disponible en lien avec le fait qu'il n'est pas possible de multiplier les cellules. Le transfert est réalisé au dernier moment avec les plus grandes précautions possibles. La faible adhérence des cellules rend complexe le transfert et il est arrivé plusieurs fois que des cellules mal adhérées soient perdues au moment du transfert. Pour le patch-clamp, les cellules GH4C1 sont directement

ensemencées dans des boîtes de Petri en plastique de 3,5 cm de diamètre sans enrober préalablement la surface avec un *coating*.

5.4 Principe et méthodes de l'imagerie calcique

5.4.1 Principe de l'imagerie calcique

Le principe de l'imagerie calcique repose sur l'analyse des variations des taux de calcium présent dans le cytosol des cellules à l'aide de sondes fluorescentes.

5.4.1.1 Le calcium intracellulaire

Physiologiquement, la propagation d'un potentiel d'action sodique de l'axone jusqu'aux boutons synaptiques provoque une entrée massive de calcium dans le cytosol du bouton synaptique, ce qui provoque la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique et la libération de leur contenu (à savoir les neuromédiateurs) dans la fente synaptique (Hammond & Tritsch, 1990): c'est le principe même de la transduction d'un signal purement électrique en une information chimique qui sera décodée par les éléments post-synaptiques en vue de la propagation de l'influx nerveux à l'échelle du tissu et de l'organisme vivant. Ainsi, suivre les variations des taux de calcium libre à l'intérieur de cellules électriquement actives permet de mettre indirectement en évidence la propagation des potentiels d'action à l'échelle d'une culture de cellules. Le calcium mis en jeu à ce niveau provient de l'extérieur de la cellule et traverse la membrane plasmique par le biais de canaux transmembranaires appelés canaux calciques voltage-dépendants. L'accumulation de calcium dans le cytosol peut être aussi due à la vidange du réticulum endoplasmique qui déverse le calcium qu'il contient dans le cytosol ; ce phénomène est toutefois indépendant de l'activité électrique. En utilisant une sonde calcique intracellulaire fluorescente, il est possible de quantifier (pour les méthodes quantitatives) ou de visualiser (pour les méthodes non quantitatives) les variations des taux de calcium libre intracellulaires et de les corréler à a survenue d'un potentiel d'action.

5.4.1.2 Principe général de la fluorescence

Le principe de la fluorescence repose sur le fait qu'une molécule fluorescente (ou sonde fluorescente) comportant un groupement chimique appelé fluorophore, emmagasine de l'énergie en absorbant de la lumière à une longueur d'onde précise lors de l'excitation lumineuse, et la restitue ensuite à une longueur d'onde plus élevée. Le phénomène de fluorescence est schématisé en figure 5.3. Lors de l'excitation par un photon incident, les électrons d'énergie S0 du fluorophore passent à des niveaux d'énergie supérieurs (S1, S2, ...). Ils retournent ensuite à des niveaux d'énergie plus faibles (S1) de manière non radiative (sans

émission de lumière, conversion interne sur le diagramme) et il y a à ce stade une perte d'énergie par des mécanismes de relaxation vibrationnelle. L'électron revient ensuite au niveau initial S0 en émettant un photon. Ce photon émis a une énergie plus faible que le photon d'excitation et l'émission de lumière s'effectue donc à une longueur d'onde plus élevée que la longueur d'onde d'excitation.

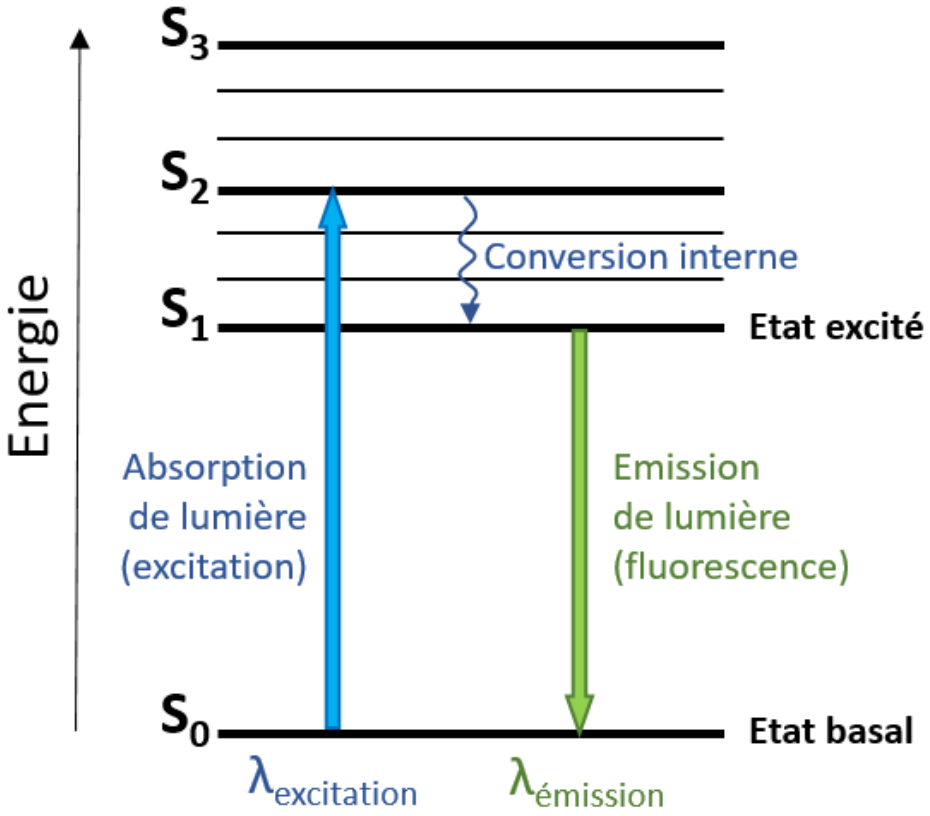


Figure 5.3 : Diagramme de Jablonski présentant schématiquement le mécanisme de fluorescence. Lorsqu'un fluorophore est exposé à une lumière correspondant à sa longueur d'onde λ d'excitation, ses électrons passent à des niveaux d'énergie supérieurs (S1, S2, …). La conversion interne correspond au retour des électrons à des niveaux d'énergie plus faibles (S1). Lorsqu'un électron retourne à son niveau d'énergie basal, il émet un photon avec une énergie plus faible que le photon excitateur. La lumière de fluorescence est donc toujours émise à une longueur d'onde λ plus élevée que la longueur d'onde d'excitation.

5.4.1.3 Le principe des sondes d'imagerie calcique, Fura2 et Cal520

Le principe de l'imagerie calcique repose sur la modification des propriétés spectrales des sondes fluorescentes (sondes calciques dans ce cas) lorsqu'elles se fixent à un ion calcium via ses 4 groupements carboxyliques. Les sondes calciques utilisées dans cette étude, aussi bien le Fura2 que le Cal520, fonctionnent selon ce principe. Les sondes calciques (du fait de la présence de ces groupements COO^-) sont hydrophiles et ne peuvent pas diffuser à travers les membranes plasmiques (qui constituent de par leur structure en bicouche phospholipide une barrière d'hydrophobicité). Pour faire pénétrer ces sondes calciques dans les cellules, des formes estérifiées (groupements carboxyliques remplacés par des groupements AcetoxyMethyl

ester (AM)) sont utilisées. Cette sonde rendue apolaire liposoluble peut diffuser au travers des membranes cellulaires (voir figure 5.4) lui permettant ainsi de pénétrer à l'intérieur de la cellule. La sonde calcique principalement utilisée pour nos manipulations est le Fura2-AM, un ester du Fura2 (Invitrogen, F1221). Une fois à l'intérieur de la cellule, le groupement AM est clivé par des enzymes de type estérases présentes dans la cellule, le Fura2-AM est ainsi transformé en Fura2. Ceci empêche ainsi le Fura2 (molécule hydrosoluble et chargée) de ressortir de la cellule (Oakes et al., 1988). La présence du groupement AM empêche également le Fura2 de se lier au calcium, ce qui évite que le Fura2-AM restant en dehors de la cellule ne biaise les résultats.

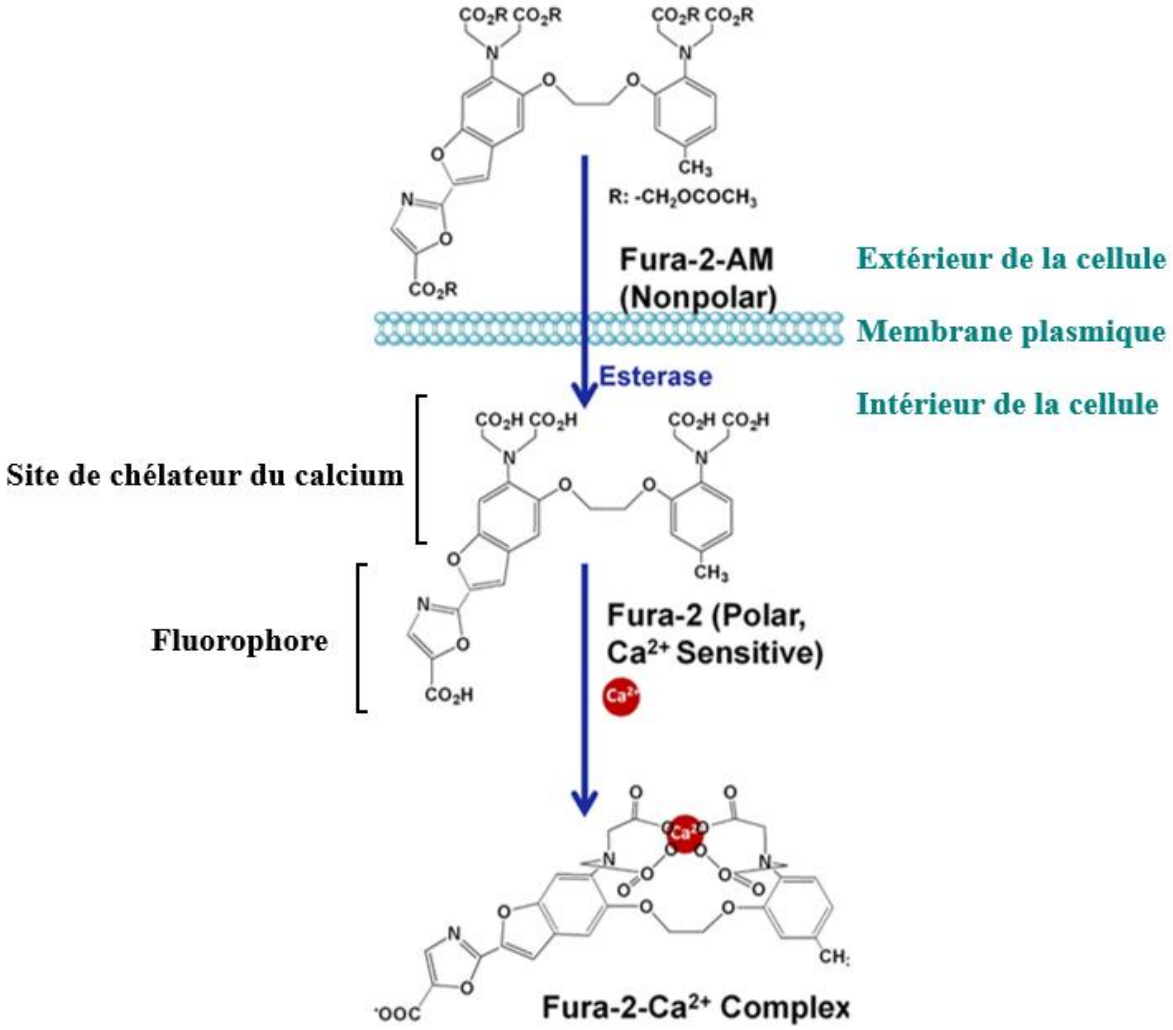


Figure 5.4 : Principe d'utilisation du Fura2-AM pour faire pénétrer le Fura2 dans les cellules. La présence du groupement AcetoxyMethyl ester (AM) permet au Fura2-AM de traverser la membrane plasmique. A l'intérieur de la cellule, les estérases présentes dans le cytoplasme clivent le groupement AM. Sans ce dernier, le Fura2 est alors piégé à l'intérieur car il ne peut plus traverser la membrane plasmique. Figure adaptée de (Wang et al, 2015).

Le Fura2 entré dans la cellule peut se lier aux ions calcium intracellulaires, un ion Ca^{2+} étant piégé entre 4 groupements carboxyliques comme illustré sur la figure 5.5 ci-dessous, ce qui va entrainer une modification du spectre d'excitation du Fura2 (Grienberger and Konnerth, 2012).

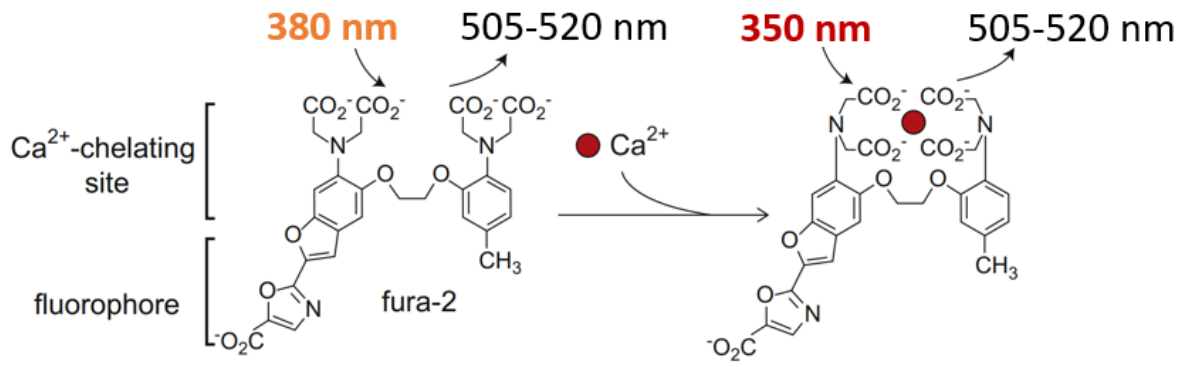


Figure 5.5 : Formule du Fura2 et site de fixation du calcium (Ca^{2+}). Sans calcium fixé, la longueur d'onde d'excitation du fluorophore est de 380 nm. Après fixation du calcium, cette longueur d'onde passe à 350 nm. Figure adaptée de (Grienberger & Konnerth, 2012).

Dans le cas du Fura2, la fixation d'un ion calcium comme le montre la figure suivante entraîne une modification du spectre d'excitation lumineuse. Cela se matérialise à l'aide du spectre de fluorescence du Fura2 qui est disponible en figure 5.6 où l'on peut voir le spectre d'émission et d'excitation. La liaison du calcium sur le Fura2 entraîne un déplacement du spectre d'excitation situé initialement autour de 490 nm vers des longueurs d'onde plus basses autour de 340 nm (voir le décalage sur la figure X entre les courbes à trait pointillés).

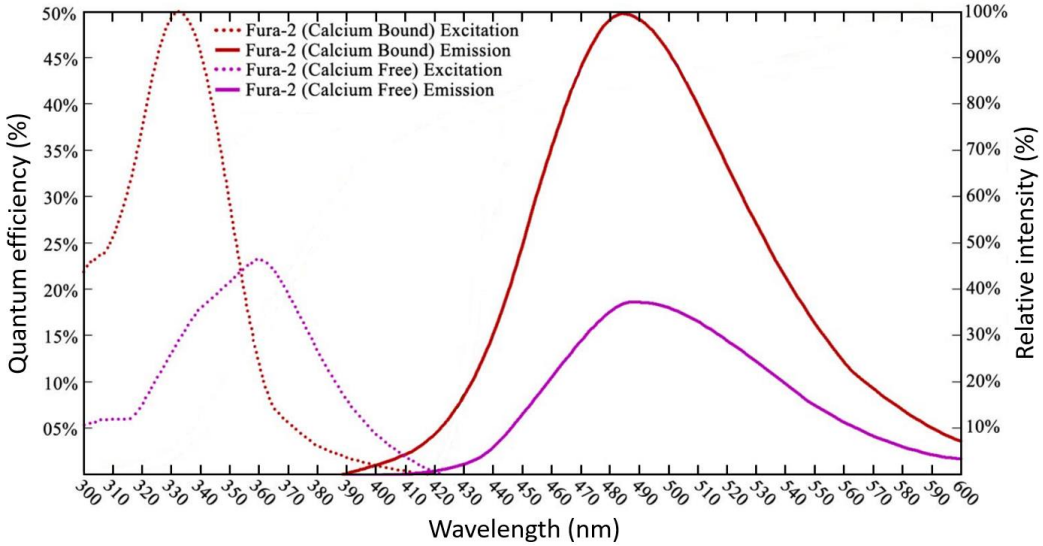


Figure 5.6 : Spectres d'excitation et d'émission des formes liées et non liées au calcium du Fura2. Courbes en traits pointillés : spectres d'excitation. Courbes en traits pleins : spectres d'émission. En marron : courbes obtenues en présence de calcium (Fura2 saturé en calcium). En violet : courbes obtenues en absence de calcium (Fura2 libre de calcium). Figure issue et adaptée de (Mudraboyina et al., 2014).

Le spectre d'émission ne subit pas de décalage au niveau des longueurs d'onde et présente un pic toujours situé à 510 nm, en présence ou en absence de calcium. L'impact de la liaison du calcium sur le Fura2 se mesure niveau de l'intensité de la photoluminescence. Le pic

d'intensité lumineuse est plus élevé en présence de calcium qu'en son absence (voir sur la figure 5.6 ci-dessus l'absence de décalage entre les courbes à trait plein mais un pic plus élevé à 510 nm pour la courbe rouge par rapport à la courbe violette).

Si l'on s'intéresse à l'aspect ratiométrique, on observe à partir de ces graphes que sans calcium, le Fura2 présente un pic d'excitation de la lumière à 380 nm. Avec calcium, ce pic se situe à 340 nm. Dans les deux situations, le fluorophore émet une lumière à 510 nm environ. Ainsi, établir le ratio entre la quantité de lumière émise lors d'une excitation lumineuse à 340 nm (F340) par rapport à la quantité de lumière émise lors d'une excitation lumineuse à 380 nm (F380) permet de normaliser les enregistrements et d'avoir un signal ratio = F340/F380 proportionnel à la concentration en Calcium intracellulaire et indépendant de la quantité de fluorophore. En ce sens, la sonde Fura2 est une sonde ratiométrique. Cela permet de réduire l'impact des variations de concentrations de sonde intracellulaires entre les cellules et de limiter l'impact du photoblanchiment. Il s'agit d'un phénomène physique corrélé au temps d'exposition traduisant une baisse progressive de l'intensité lumineuse émise pas les sondes soumises à la lumière (Barriga-Rivera et al., 2017).

Le fonctionnement s'explique de la façon suivante à partir de la figure 5.7. Sans modification de la concentration du calcium intracellulaire, le ratio de fluorescence relative reste stable (15 s). Une entrée de calcium dans le cytosol provoque des variations antiparallèles de fluorescence aux deux longueurs d'onde d'excitation (340 nm en vert et 380 nm en orange). On observe une augmentation du signal émis lors d'une excitation à 340 nm et une diminution du signal lors d'une excitation à 380 nm.

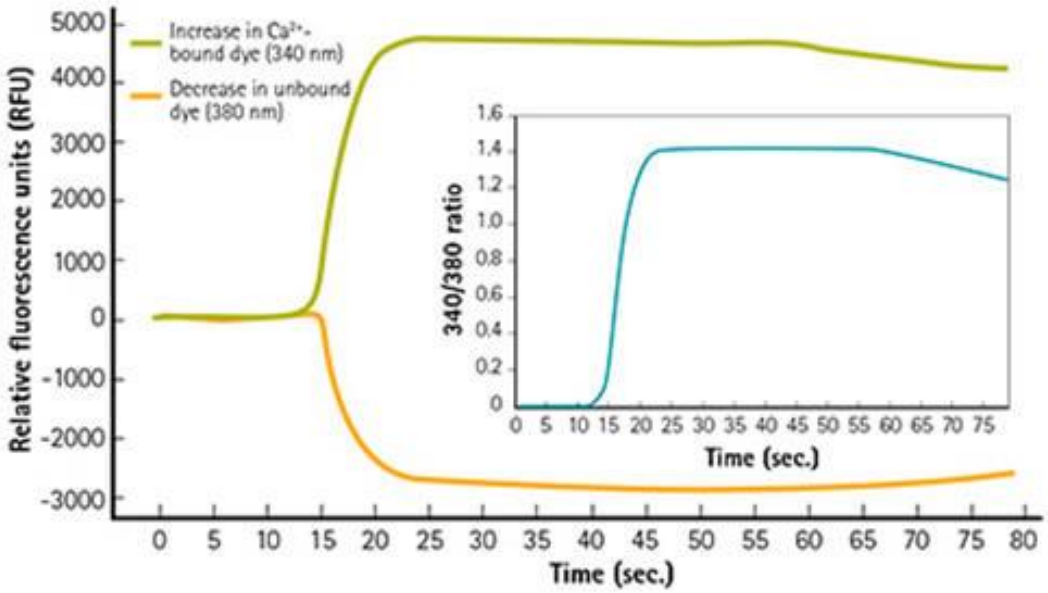


Figure 5.7 : Variations antiparallèles de l'intensité de fluorescence relative des formes liée et non liée de la sonde Fura2. A 15 secondes, une entrée de calcium dans cytosol diminue la quantité de sonde non liée (= augmentation de l'intensité de fluorescence relative) et augmente la concentration de sonde liée (= baisse de l'intensité de fluorescence relative).

Enfin, la figure 5.8 reprend de manière schématique les différentes étapes de la procédure d'imagerie calcique que nous avons utilisées lors de nos expérimentations. En complément, l'annexe 5 présente une démonstration mathématique de la corrélation entre la quantité de calcium intracellulaire et le ratio de fluorescence.

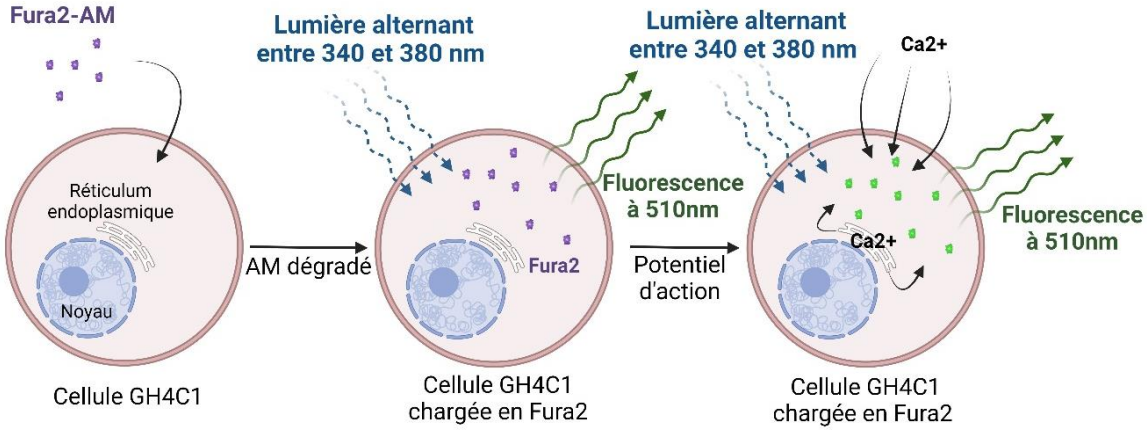


Figure 5.8 : Principe de la charge de Fura2-AM et de l'imagerie calcique avec sonde ratiométrique. Le Fura2-AM liposoluble diffuse à l'intérieur de la cellule grâce au groupement AM qui est ensuite dégradé par les estérases intracellulaires, piégeant ainsi le Fura2 rendu hydrosoluble à l'intérieur de la cellule. Sans calcium, le fluorophore du Fura2 présente un pic d'excitation de la lumière à 380 nm et émet de la fluorescence à 510 nm. Un déclenchement d'un potentiel d'action est corrélé avec une entrée massive de calcium dans le cytosol. Le calcium se lie au Fura2 déjà présent, modifiant ainsi le spectre d'excitation du Fura2. Figure réalisée à l'aide du logiciel BioRender.com 2023.

La seconde sonde calcique utilisée est le Cal520, utilisée avec succès sur des neurones *in vivo* et *in vitro* (Tada et al., 2014). Son fonctionnement est plus simple que celui du Fura2, seul son spectre d'émission étant modifié par la fixation du calcium, la fixation du calcium provoquant uniquement une augmentation considérable de l'émission de fluorescence. Sa sensibilité est telle qu'elle permet de visualiser des variations transitoires et rapides de la concentration en calcium libre cytosolique associées à des potentiels d'action neuronaux (Tada et al., 2014). Comme pour le Fura2, une version estérifiée est utilisée (Cal520-AM) pour permettre le passage de la membrane plasmique et l'accumulation de la sonde dans le cytosol. Sa fluorescence est excitée à 490 nm et est mesurée à 520 nm. Une augmentation de la concentration en calcium augmente ainsi la fluorescence mesurée mais, la sonde étant non ratiométrique, les mesures sont plus susceptibles aux artefacts et une augmentation de la fluorescence peut être due à un déplacement de la cellule, à une fuite de la sonde fluorescente ou à du photoblanchiment par exemple.

5.4.2 Méthode d'imagerie calcique

Pour nos manipulations, le Fura2-AM est dilué à 5 µmol.L^{-1} dans le milieu de culture des cellules à charger. La charge est réalisée à 37°C/5% CO_2 dans un incubateur pendant 45 minutes. Un rinçage avec du HBSS à pH 7.3 composé de 0.140 mol.L^{-1} de NaCl, 5 mmol.L^{-1} de KCl, 0.3 mmol.L^{-1} de Na_2HPO_4, 0.4 mmol.L^{-1} de KH_2PO_4, 5 mmol.L^{-1} de glucose et 10 mmol.L^{-1} d'HEPES et contenant 2 mmol.L^{-1} de $CaCl_2$ et 1 mmol.L^{-1} de $MgCl_2$ chauffé à 37°C est réalisé. L'enregistrement est réalisé dans le même tampon HBSS. La fluorescence du Fura2 est excitée alternativement à 340 nm et 387 nm (durée intégration des images de 20 msec, fréquence d'acquisition 1 Hz - une image obtenue à 340 et une image à 387 nm par seconde) grâce à un faisceau lumineux généré par un illuminateur lambda DG4 (Sutter Instruments, lampe Xenon 175 W). Les filtres utilisés sont : excitation 1 : 340 nm (bande passante 20 nm), excitation 2 : 387 nm (bande passante 11 nm), émission : 510 nm (bande passante 34 nm), miroir dichroïque 409 nm. Les images sont recueillies par une camera Qimaging Rolera EM-C2 et analysées par le logiciel Metafluor® (molecular devices). Une centaine de cellules sont enregistrées en parallèle. Le bruit de fond est également enregistré en parallèle.

De manière générale, nos manipulations consistaient en un enregistrement de 5 minutes de l'activité spontanée des cellules, suivi d'une application à la pipette de molécules modulatrices de l'activité électrique des cellules. L'impact de la 4-Aminopyridine (4-AP) diluée dans du HBSS à une concentration finale entre 1 et 10 mmol.L^{-1} a été évalué. L'impact de la thyréolibérine (TRH) connue pour moduler la forme et la fréquence des potentiels d'action des cellules GH4C1 (Ozawa & Kimura, 1979) a également été évalué. Du KCl à une concentration finale de 55 mol.L^{-1} a été appliqué pour dépolariser définitivement les cellules, provoquant ainsi une entrée de calcium voltage-dépendante, cette dépolarisation bloquant ensuite le déclenchement de nouveaux potentiels d'action. Ces composés chimiques sont aussi utilisés dans le cadre des manipulations sur le banc de caractérisation électronique. Les enjeux liés à l'utilisation de ces modulations chimiques sont détaillés dans le paragraphe suivant.

5.4.3 Recherche de molécules modulatrices des potentiels d'action

L'objectif des éléments présentés dans ce paragraphe est d'identifier des molécules permettant de modifier les potentiels d'action pendant les enregistrements dans les dispositifs neurobiohybrides. En effet, nous souhaitons pouvoir moduler chimiquement leur forme, leur amplitude et/ou leur fréquence au cours des enregistrements réalisés dans les dispositifs neurobiohybrides sur le banc de mesures présenté au chapitre 5. Ces agents chimiques sont sélectionnés sur la base des variations non équivoques qu'ils induiront dans les traces enregistrées. Cette stratégie a pour but de nous permettre de corréler les enregistrements électriques en dispositifs neurobiohybrides à la réalité des phénomènes biologiques sous-jacents, à savoir l'émission de potentiels d'action avérés et que nous pourrons moduler. En suivant cet objectif de corrélation et d'identification, nous avons étudié par patch-clamp et

imagerie calcique les effets induits sur l'activité électrique des cellules par différents agents inhibiteurs ou stimulateurs identifiés comme tels dans la littérature. La connaissance des réponses des cellules à ces différents stimuli est une source d'information précieuse pour l'analyse des données expérimentales obtenues à partir des manipulations en dispositif neurobiohybride. Le tableau 5.1 regroupe les différentes molécules testées ainsi que leurs concentrations et le type de cellule électriquement active associée. Il est à noter que nous anticipons également dès à présent cette étude pour les iCell® GlutaNeurons, les manipulations en neurobiohybride sur ce type cellulaire restant à conduire à l'instant où ce propos est rédigé.

Tableau 5.1 : Molécules candidates pour la modulation des caractéristiques électriques des cellules GH4C1 et des iCell® GlutaNeurons

Type de cellules	Molécule	Concentrations testées	Technique employée
GH4C1	TRH (Sigma-Aldrich ; P1319 ; Source BCCH2796)	1 nmol.L^{-1}, 100 nmol.L^{-1}, 1 µmol.L^{-1}	Patch-clamp
GH4C1	4-AP (Alomone Labs ; A-115 ; lot n°A115SM0425)	1 mmol.L^{-1}, 5 mmol.L^{-1}, 10 mmol.L^{-1}	Patch-clamp et imagerie calcique
iCell® GlutaNeurons	TTX (Alomone Labs ; T-550)	1 nmol.L^{-1}, 50 nmol.L^{-1}, 100 nmol.L^{-1}, 1 µmol.L^{-1}	Patch-clamp
iCell® GlutaNeurons	TEA (Sigma ; T2265)	10 mmol.L^{-1}	Patch-clamp
iCell® GlutaNeurons	Paxilline (Sigma ; P2928)	10 µmol.L^{-1}	Patch-clamp

TRH = *Thyrotropin Releasing Hormone* ; 4-AP = 4-aminopyridine ; TTX = tétrodotoxine ; TEA = tetraéthyl ammonium chloride

En ce qui concerne les effets, la 4-aminopyridine (4-AP) est connue pour bloquer les courants potassiques sortant des cellules GH4C1 (Dubinsky & Oxford, 1984a). La *Thyrotropin Releasing Hormone* ou thyréolibérine (TRH) est quant à elle connue pour stimuler la sécrétion d'hormones dans les modèles cellulaires produisant de la prolactine dont les cellules GH4C1 font partie (Kanasaki et al., 2015). Son mécanisme d'action est schématisé en annexe 6. L'effet de la TRH se distingue en deux étapes successives : une hyperpolarisation de la membrane inhibant le déclenchement de potentiels d'action puis une dépolarisation associée à une

augmentation de la fréquence de potentiels d'action émis par les cellules GH4C1 (Akita et al., 2007). La tétrodotoxine (TTX) est une neurotoxine (toxine du poisson Fugu) bloquant très spécifiquement les canaux sodiques voltage dépendants des neurones. Elle a donc pour effet d'inhiber la génération et la propagation des potentiels d'action dans les cellules qui possèdent des canaux sensibles à l'action de cette molécule (Tan et al., 2014). Pour chacune de ces molécules, l'objectif est de caractériser leurs effets sur les potentiels d'action émis par les cellules électriquement actives (*i.e.* durée et délai de déclenchement de l'effet) afin de pouvoir en tenir compte pour la réalisation et l'analyse d'enregistrements par voie électronique sur le banc conçu au sein du laboratoire. L'effet sur le potentiel de repos des iCell® GlutaNeurons du tetraéthyl ammonium chloride (TEA), un inhibiteur de canaux potassiques (K. L. Choi et al., 1991) associé ou non à de la paxilline, un inhibiteur plus spécifique des canaux potassiques voltage et calcium-dépendants (H.-F. Li et al., 2000) est évalué. Cette caractérisation contribue à l'identification des ajustements matériels qui seraient nécessaires pour compléter l'équipement du banc d'enregistrement électronique.

Les molécules sont diluées dans du milieu extracellulaire de patch-clamp ou dans le milieu de rinçage de l'imagerie calcique, selon la technique employée. Pour le patch-clamp, les molécules sont appliquées directement sur la cellule patchée à l'aide d'une autre micropipette remplie de solution contenant la molécule diluée aux concentrations indiquées dans le tableau 5.1 et dans les figures correspondantes. La micropipette contenant la solution de produit à administrer est positionnée à proximité de la cellule patchée et un très faible flux de son contenu est appliqué sur la cellule. Pour l'imagerie calcique, les molécules sont appliquées directement dans le puits de culture pendant l'enregistrement. Il est important de préciser qu'aucun système de perfusion des milieux extracellulaires n'a été mis en place à ce stade. Toute molécule appliquée aux cellules restait donc dans le puits jusqu'à la fin de la manipulation.

5.5 Caractérisation et modulation des signaux des cellules neurosécrétrices murines GH4C1

5.5.1 Mesures électrophysiologiques des cellules GH4C1

Les paramètres électrophysiologiques du circuit électrique équivalent à la membrane ont été mesurés par patch-clamp (voir figure 5.9). La résistance d'accès (ou résistance série) représente la résistance de l'extrémité de la pipette d'enregistrement une fois passé en configuration cellule entière. Sa valeur est toujours plus grande que la résistance de pipette (en moyenne de 6 MOhm) car des fragments de membrane plasmique viennent obturer partiellement la pipette et augmenter sa valeur. Elle est mesurée en permanence pendant l'enregistrement et permet de vérifier la fiabilité des mesures (si le patch de membrane se reforme spontanément pendant l'enregistrement, sa valeur va augmenter à des valeurs proches du GOhm). Elle doit rester largement inférieure à la résistance membranaire pour que les

variations de potentiel et les courants membranaires soient mesurés avec exactitude. Elle est ici de l'ordre de 25 MOhm alors que la résistance membranaire est de l'ordre de 2 GOhm soit 100 fois plus grande, ce qui est suffisant pour garantir la fiabilité des mesures. La capacité membranaire est proportionnelle à la surface membranaire, elle est ici 11 pF. Ceci est conforme à la littérature et donne une surface membranaire de 1100 µm^2 (la capacité spécifique de la membrane plasmique étant de 1 µF/cm2), soit un diamètre cellulaire de 9 µm pour ces cellules GH4C1.

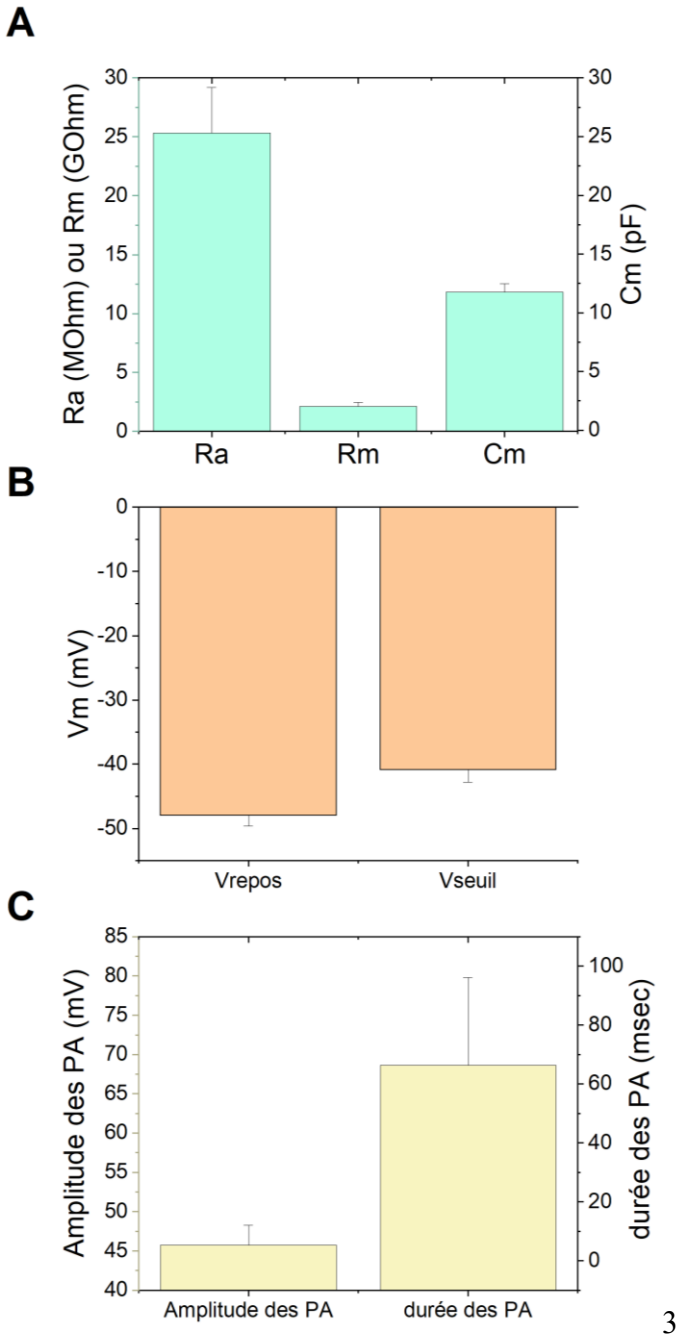


Figure 5.9 : Caractéristiques de cellules neurosécrétrices murines GH4C1. Données acquises en patch-clamp configuration cellule entière. (A) Résistance d'accès (Ra), résistance membranaire (Rm) et capacitance membranaire (Cm), (B) Potentiel de repos et potentiel seuil moyen et (C) Amplitude et durée des potentiels d'action. Le potentiel est corrigé du potentiel de jonction liquide.

Le potentiel de repos des cellules GH4C1 (n=28) est de -48 ± 1.7 mV dans nos conditions de culture. Comme montré dans la littérature, ces cellules sont excitables et 85% des cellules présentaient une activité électrique dans nos enregistrements (c'est-à-dire la présence de potentiels d'action ou PA) et 74% une activité électrique spontanée au potentiel de repos. Ces potentiels d'action déclenchés à partir d'une valeur seuil de -40.8 ± 2 mV présentent des formes différentes : des PA sous forme d'un pic simple, d'un *burst* (bouffée de PA) ou un PA en plateau (voir figure 5.10). L'amplitude (pic à pic) des potentiels d'action est de 46 ± 2.5 mV. La durée (mesurée à 50% de l'amplitude) des potentiels d'action est variable (entre 30 et 200 msec avec une moyenne de 69 ± 11 msec

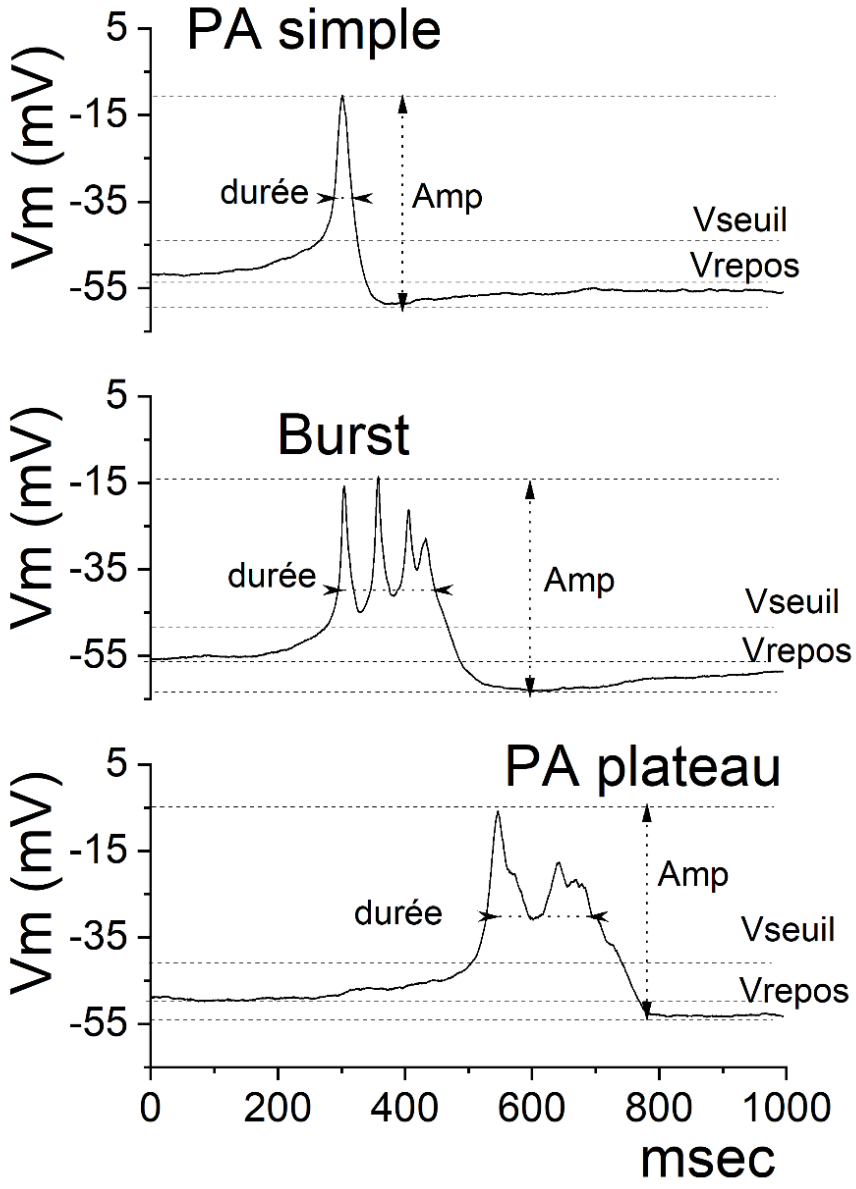


Figure 5.10 : Exemples de potentiels d'action dans les cellules GH4C1. Données acquises en patch-clamp configuration cellule entière. Les potentiels d'action présentent 3 modalités différentes, des PA simple d'une durée de 20 à 50 msec, des bouffées ou bursts, et des PA en plateau d'une durée de 150 à 200 msec. Le potentiel de repos (Vrepos), le seuil d'excitabilité (Vseuil), l'amplitude des PA (amp) et la durée sont mesurés comme indiqué.

Sur les cellules spontanément actives, la fréquence des potentiels d'action était de 0.93 ± 0.2 Hz. Un enregistrement de potentiels d'action GH4C1 est placé en figure 5.11 pour illustrer.

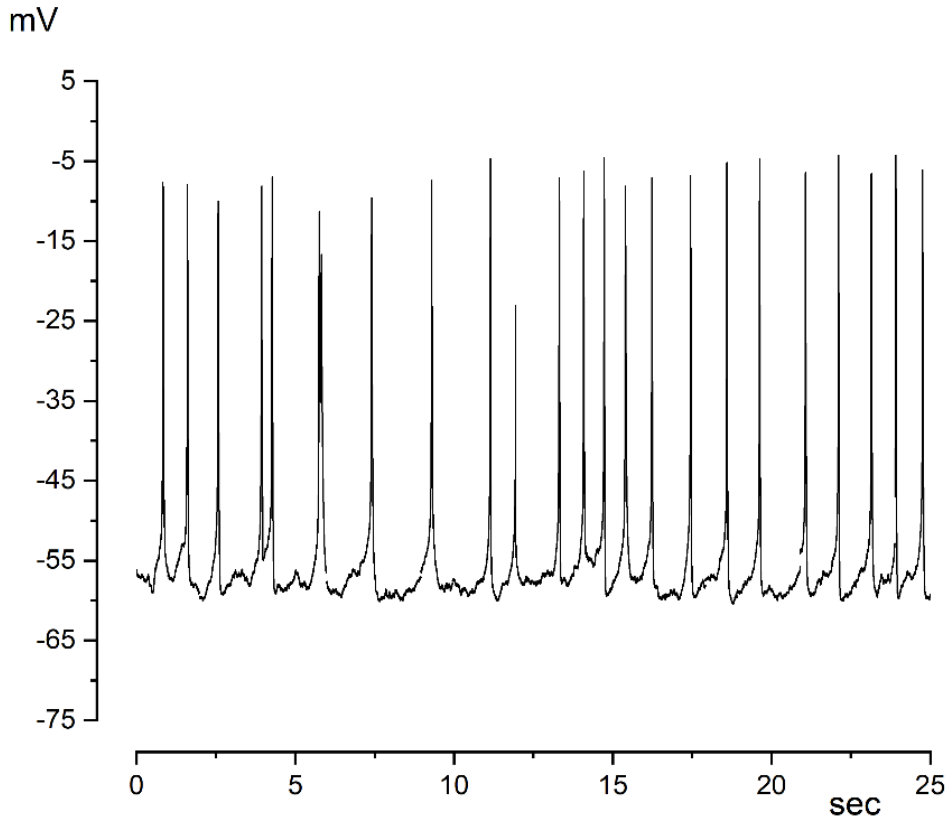


Figure 5.11 : Exemple d'enregistrement de potentiels d'action sur une cellule GH4C1 sur une longue durée. Enregistrement en patch-clamp configuration cellule entière, courant imposé.

Les PA peuvent être également déclenchés sur des cellules spontanément actives au potentiel de repos en injectant un courant dépolarisant après hyperpolarisation préalable. Sur la figure 5.12 ci-dessous, la membrane de la cellule GH4C1 a été hyperpolarisée artificiellement à -90 mV puis les potentiels d'action ont été stimulés par application d'une impulsion de 10 pA.

Ces courbes nous informent sur le fait que ces cellules peuvent générer des potentiels d'action ou des trains potentiels d'action (encore appelés « *bursts* »).

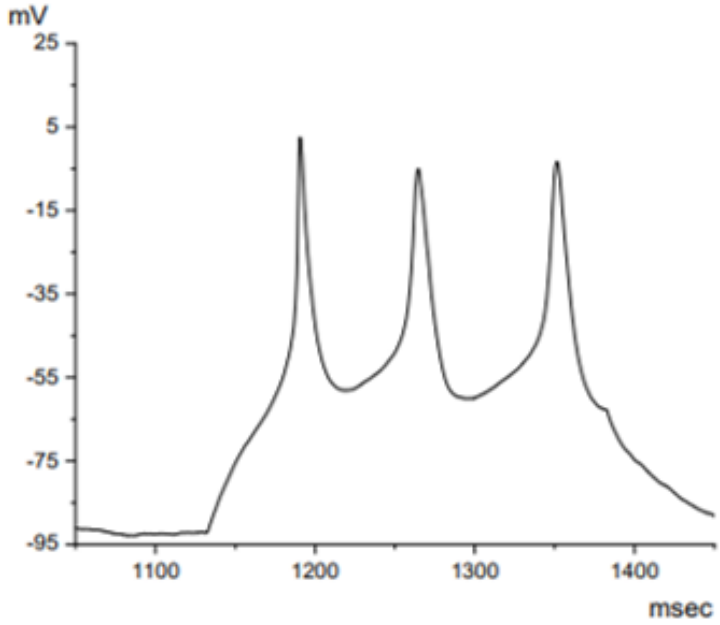


Figure 5.12 : Exemples de potentiels d'action stimulés sur une cellule GH4C1 enregistrés en patch-clamp configuration cellule entière, courant imposé. Potentiels d'action stimulés par un courant de 10 pA en patch-clamp après hyperpolarisation préalable à -90 mV.

Nous avons également effectué des mesures en potentiel imposé afin de mesurer les courants ioniques membranaires. Pour cela, un créneau de potentiel partant de -80 mV et allant jusqu'à une valeur connue (que l'on fait varier entre -120 et +120 mV) est appliqué pendant 50 msec. Avant la stimulation (en rouge sur la figure A) les courants membranaires (en noir) sont nuls, et lors de la variation de potentiel (à partir de -40 mV), les courants se développent : nous observons d'abord un courant entrant négatif suivi rapidement d'un courant sortant positif. Différentes valeurs de potentiels membranaires ont été appliquées successivement et les courbes obtenues sont superposées (voir figure 5.13 A). La figure 5.13 B représente une courbe courant-potentiel représentant la valeur maximale de ces courants (en noir, le courant entrant mesuré au pic et en rouge le courant sortant mesuré au plateau). Ces mesures en potentiel imposé nous ont permis d'observer que ces cellules GH4C1, comme décrit dans la littérature, expriment des canaux voltage-dépendants à l'origine de cette excitabilité cellulaire, *i.e.* l'aptitude à générer des potentiels d'action.

Nous n'avons pas procédé à une analyse pharmacologique de ces courants mais il a été montré largement dans la littérature que les courants entrant dans les cellules GH4C1 (courants entrants négatifs Iin sur la figure ci-dessous) sont générés majoritairement par des courants calciques (Dubinsky & Oxford, 1984a) et les courants sortant (courants positifs retardés Iout) par des canaux potassiques voltage-dépendants (Armstrong & Matteson, 1986; Dubinsky & Oxford, 1985).

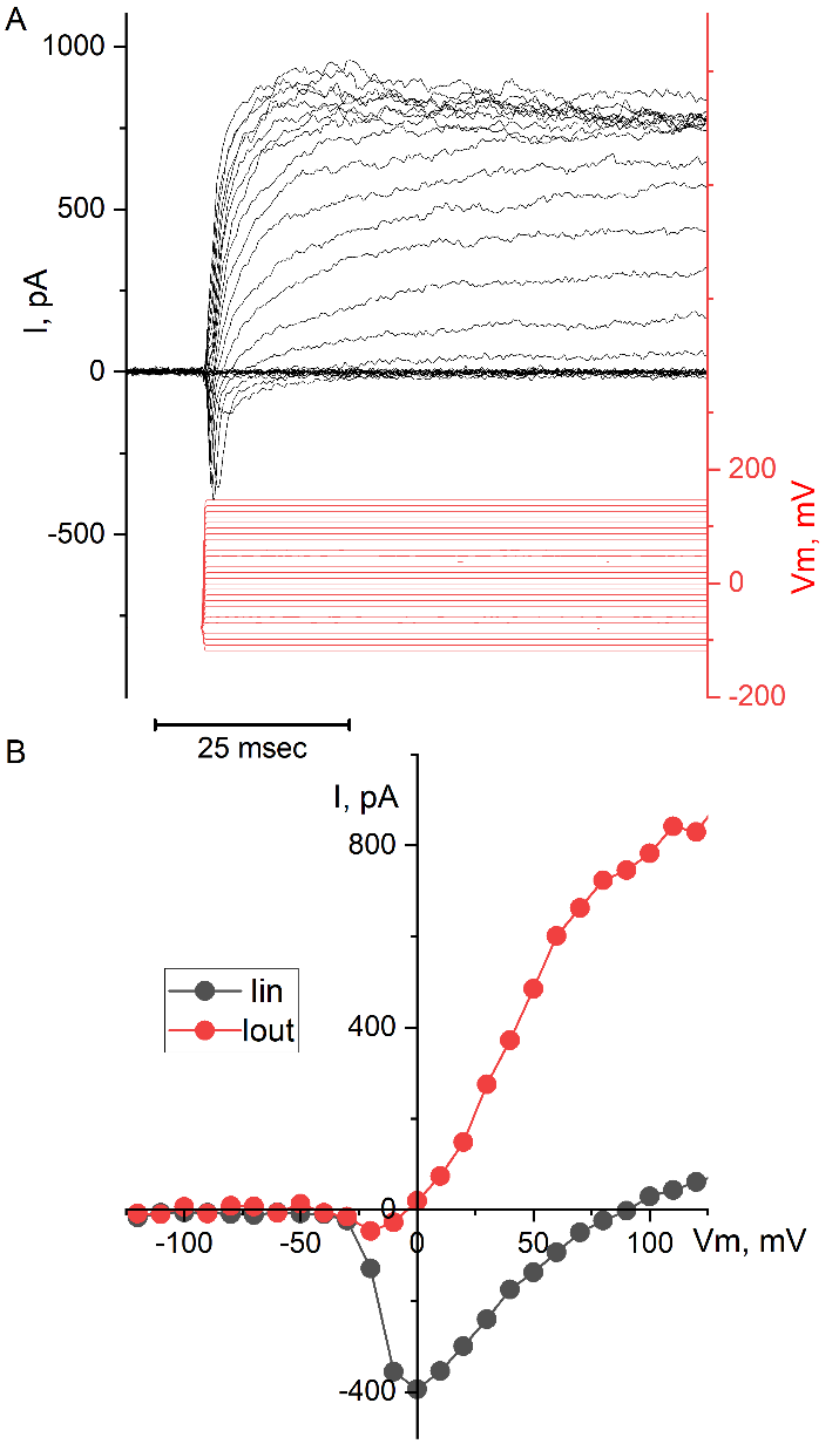


Figure 5.13 : Présence de courants voltage-dépendants mesurée par potentiel imposé. (A) En rouge : protocole de stimulation en potentiel imposé. En noir : mesure du courant membranaire. Par convention, les courants positifs sont sortants (sortie de charges positives de la cellule si ce sont des cations qui génèrent ce courant) et les courants négatifs sont entrants (entrée de charges positives dans la cellule). Ici, aucun inhibiteur n'a été utilisé et on voit donc des courants composites : une phase de courant entrant transitoire (Iin) suivie d'un courant sortant (Iout) qui se maintient ensuite en plateau pendant toute la stimulation. (B) Représentation des courants entrants (en noir, mesurés au pic négatif, 5 msec après le début de la stimulation) et des courants sortants (en rouge, mesurés 20 msec après le début de la stimulation).

5.5.2 Effet de la 4-aminopyridine sur les cellules GH4C1 évalué en patch-clamp

5.5.2.1 Effet de la 4-AP sur la forme et la durée des potentiels d'action

La figure 5.14 a pour objectif d'illustrer l'impact de la 4-AP sur une cellule GH4C1 en comparant les potentiels d'action émis en fonction du temps avant l'application de 4-AP (condition contrôle) et après l'application de 4-AP.

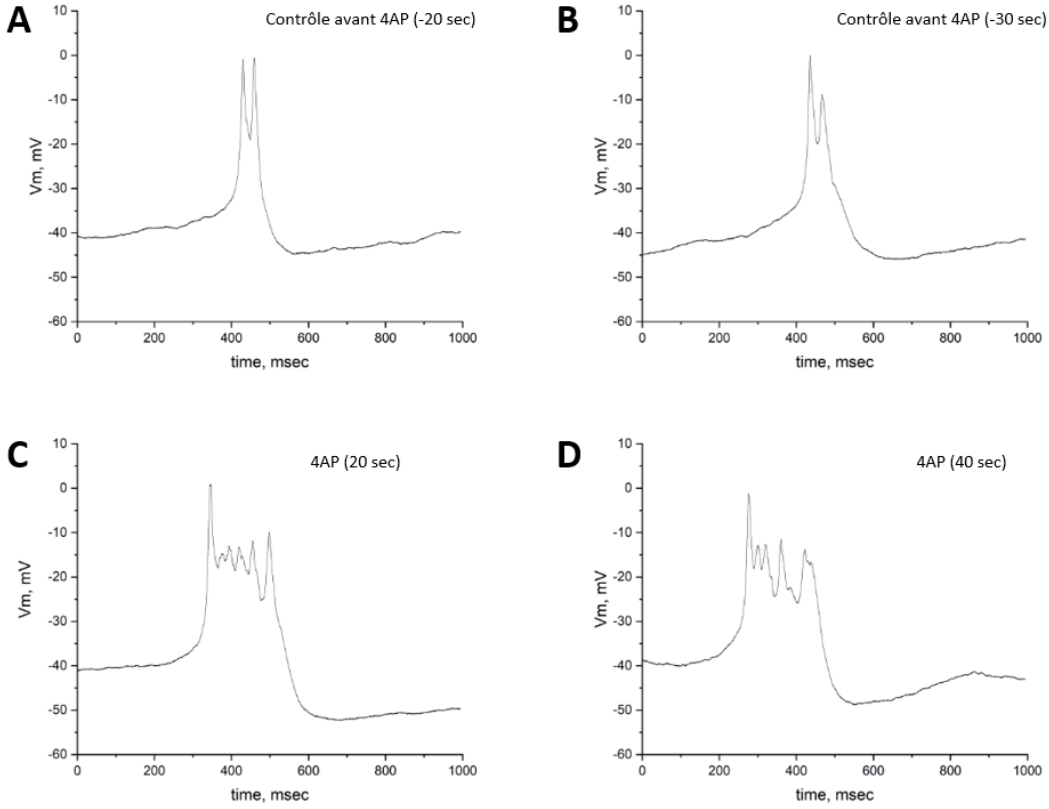


Figure 5.14 : Potentiels d'action spontanés émis par des GH4C1 sans (A et B) et avec (C et D) 4-aminopyridine. Les courbes représentent l'évolution du potentiel de membrane au cours du temps. La 4-aminopyridine (4-AP) a été appliquée pendant 40 secondes à une concentration de 5 mmol.L^{-1}.

Pour cette cellule, avant l'ajout de la solution de 4-AP, le potentiel de repos était de -45 mV. Les bursts comportaient deux potentiels d'action successifs d'environ 40 mV d'amplitude s'étalant sur une durée totale d'environ 100 ms (largeur du pic définie à mi-hauteur sur l'ensemble du burst). Ainsi après ajout de 4-AP, on observe que la durée du burst augmente pour passer de 100 à environ 200 ms, cela sans impacter l'amplitude du premier potentiel d'action. Il est à noter également que les potentiels d'action subséquents sont plus nombreux mais d'amplitudes plus faibles. Enfin, la 4-AP n'a pas d'impact notable sur le potentiel de repos.

La figure 5.15 permet d'avoir un aperçu plus global de l'impact de la 4-AP sur la durée des potentiels d'action émis par les GH4C1. Sur l'ensemble des 10 cellules testées, la 4-AP a augmenté la durée des bursts (40% en moyenne) en les faisant passer d'une durée moyenne de 97 ms à 133 ms (valeurs prises à mi-hauteur de l'amplitude). La médiane des durées des potentiels d'action enregistrés sur les cellules GH4C1 est de 84,53 ms avant l'ajout de 4-AP et de 120,85 ms après l'ajout de 4-AP. Un test de Wilcoxon réalisé à l'aide du logiciel Origin 2022

a révélé une différence significative entre ces durées de potentiels d'action avant et après 4-AP, ($n=10$, $Z=-2,75$, $p<0.05$). Les informations relatives à ce test statistique sont détaillées en annexe 7.

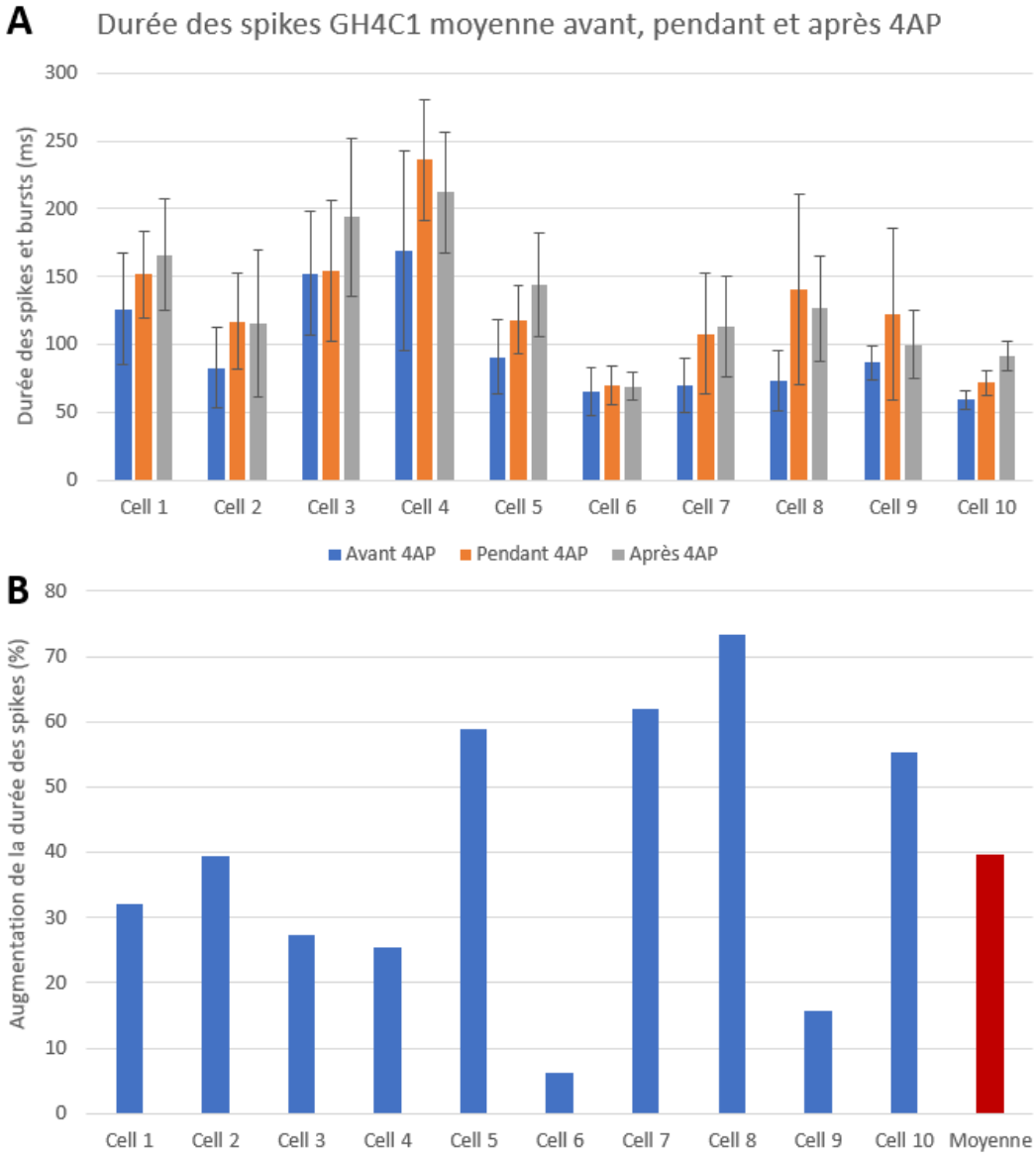


Figure 5.15 : Augmentation de la durée des bursts émis par dix cellules GH4C1. (A) Durée moyenne brute des bursts et potentiels d'action mesurés à mi-hauteur avant, pendant et après ajout de 4-aminopyridine (4AP) à 5 mmol.L^{-1}. (B) Augmentation de la durée des potentiels d'action entre avant et après l'ajout de 4AP. Manipulation réalisée en patch-clamp.

5.5.2.2 Effet de la 4-AP sur la fréquence des potentiels d'action

Sur la figure 5.16 sont présentés les potentiels d'action émis par une cellule GH4C1 sur une période totale de 165 secondes. La 4-AP est ajoutée au cours de l'enregistrement. La 4-AP a été appliquée pendant 40 secondes. Cette représentation permet de rendre compte de l'impact de la 4-AP sur la fréquence des potentiels d'action qui diminue après l'ajout de la molécule.

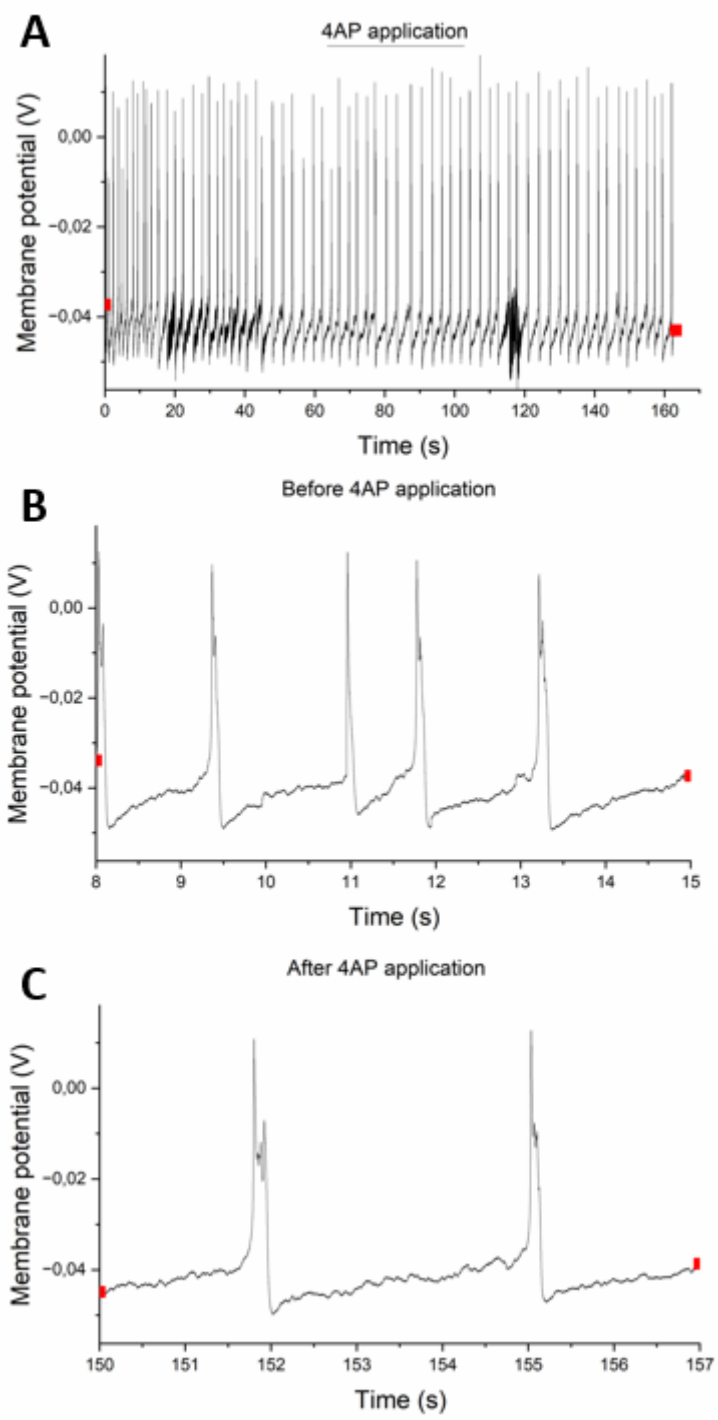


Figure 5.16 : Représentation des potentiels d'action et bursts émis par les cellules GH4C1 sur (A) l'ensemble de l'enregistrement de 165 secondes, (B) 7 secondes avant l'application de 4-aminopyridine (4AP) et (C) 7 secondes après l'application de 4AP. Mesure réalisée par patch-clamp en configuration cellule entière. La 4AP a été appliquée pendant 40 secondes à une concentration de 5 mmol.L^{-1}.

La figure 5.17 regroupe les informations concernant la fréquence d'émission de bursts et potentiels d'action de 10 cellules GH4C1 avant, pendant, et après l'application de 4-AP. Il est à noter que l'application de 4-AP réduit la fréquence d'émission des potentiels d'action observés pour 9 cellules sur les 10 testées en les faisant passer de 0.71 Hz à 0.38 Hz en moyenne.

Cela correspond à une réduction en moyenne de 43% en incluant les 10 cellules. La médiane des fréquences de potentiels d'action et de bursts enregistrés en patch-clamp (voltage imposé) sur les cellules GH4C1 est de 0,55 avant l'ajout de 4-AP et de 0,32 après l'ajout de 4-AP. Le test non paramétrique de Wilcoxon réalisé à l'aide du logiciel Origin 2022 a révélé une différence significative de fréquence de potentiels d'action et de bursts avant et après ajout de 4-AP, ($n=10$, $Z=2,54$, $p<0.05$). Les informations relatives à ce test statistique sont disponibles en annexe 7. Nous notons que la fréquence des potentiels d'action et bursts varie entre les cellules.

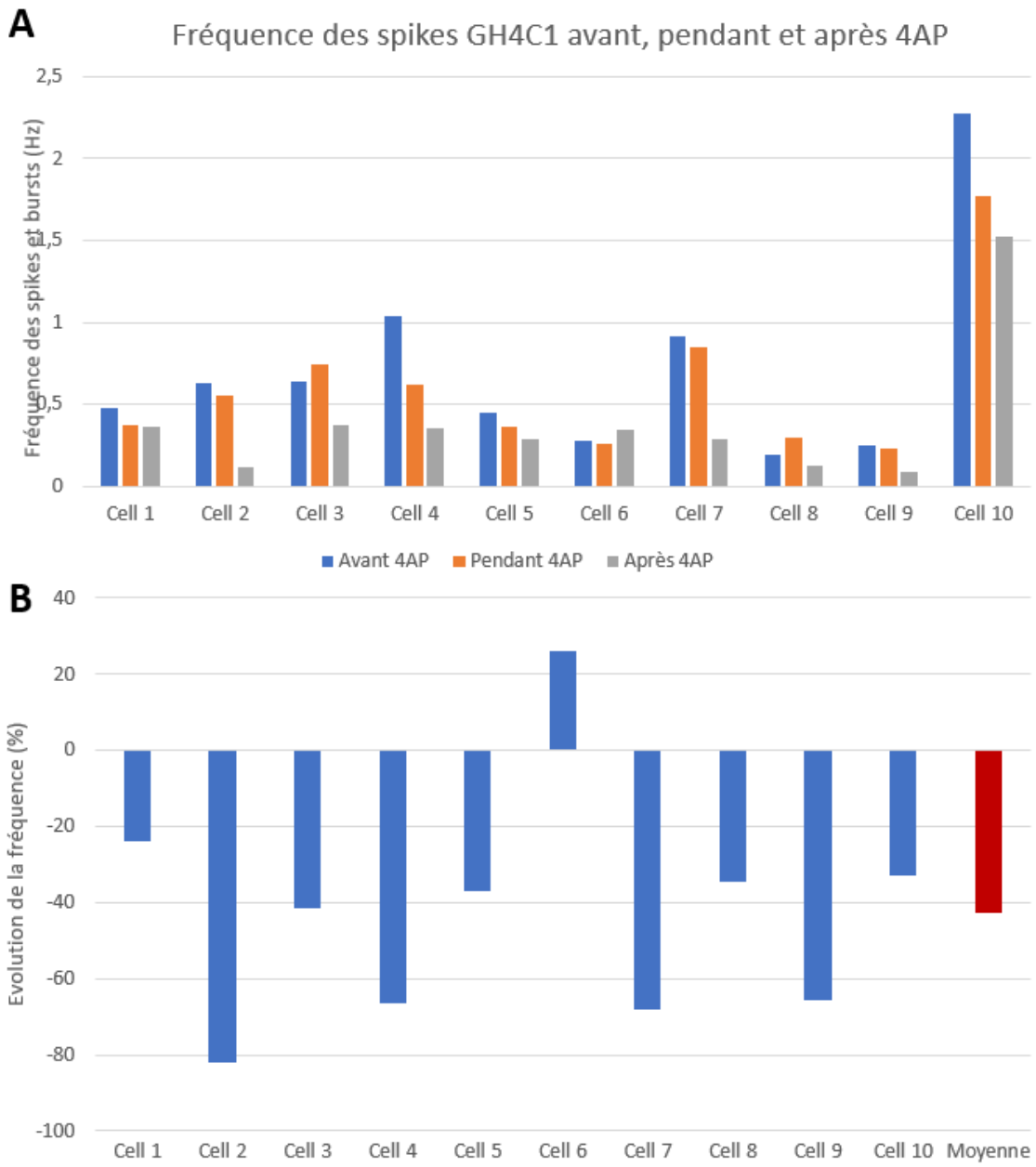


Figure 5.17 : Modification de la fréquence des bursts et potentiels d'action émis par dix cellules GH4C1. (A) Durée moyenne brute des bursts et potentiels d'action mesurés à mi-hauteur avant, pendant et après ajout de 4-aminopyridine (4AP) à 5 mmol.L^{-1}. (B) Augmentation de la durée des potentiels d'action entre avant et après l'ajout de (4AP). Manipulation réalisée en patch-clamp en configuration cellule entière.

5.5.3 Effet de la 4-AP sur la concentration intracellulaire de calcium évalué par imagerie calcique

L'effet de la 4-AP sur la concentration intracellulaire de calcium a été évalué par imagerie calcique pour trois concentrations différentes de 4-AP : 1 mmol.L^{-1}, 5 mmol.L^{-1} et 10 mmol.L^{-1}. Ces concentrations ont été choisies en adéquation avec les concentrations employées par ailleurs dans la littérature sur des cellules pituitaires de rats de sorte qu'elles soient situées dans le même ordre de grandeur (Gregerson, 2003; Koch & Schonbrunn, 1988; Wang et al., 1994). Le caractère antiparallèle des courbes d'émission de fluorescence émise lors d'excitations à 380 et 340 nm présentées en figure 5.18 démontre que les pics observés dans le ratio sont bien dus à la survenue de variations de calcium cytosolique, que ces dernières soient enregistrées avant ou après l'ajout de 4-AP. Il a été montré que les cellules GH3 et GH4C1 présentent des augmentations transitoires de calcium intracellulaire (qu'on définit comme une augmentation unitaire d'une durée de quelques secondes de la concentration en calcium cytosolique (voir figure ci-dessous)) dus à une entrée de calcium par des canaux calciques voltage-dépendants lors des potentiels d'action (Schlegel et al., 1987). On appellera ces signaux des « transitoires calciques » dans la suite du manuscrit. Dans nos expériences, une activation des canaux calciques voltage-dépendants par une dépolarisation potassique (une augmentation de la concentration en potassium extracellulaire de 5 à 50 mmol.L^{-1}) entraîne une augmentation de la concentration cytosolique en calcium. Les résultats pour chaque concentration de 4-AP présentés en figure 5.19 ont été obtenus à partir de courbes présentant également ce critère antiparallèle.

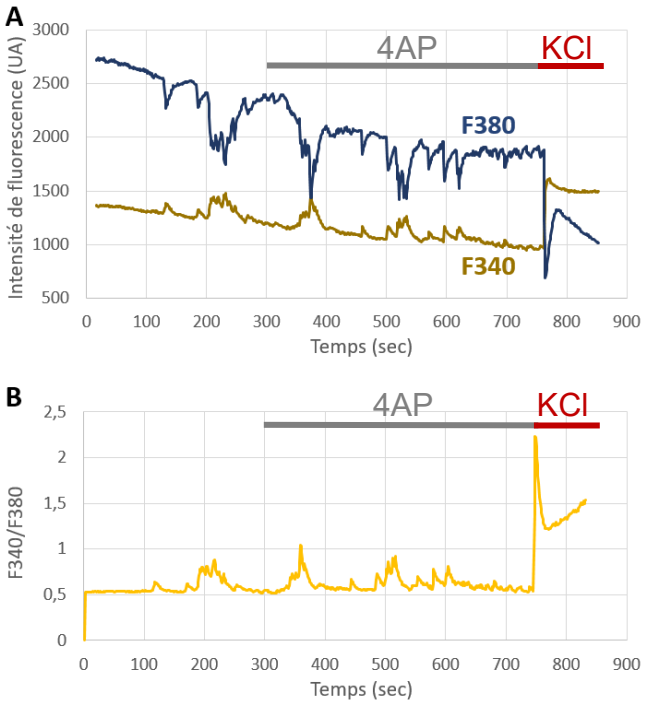


Figure 5.18 : Mise en évidence du caractère antiparallèle de la fluorescence émise à 380 et à 340 nm lors de la survenue d'une augmentation transitoire de calcium intracellulaire induite par les potentiels d'action de cellule GH4C1. Exemple collecté sur une cellule exposée à la 4-aminopyridine (4AP) 1 mmol.L^{-1} à partir de 300 secondes puis au chlorure de potassium (KCl) à partir de 750 secondes.

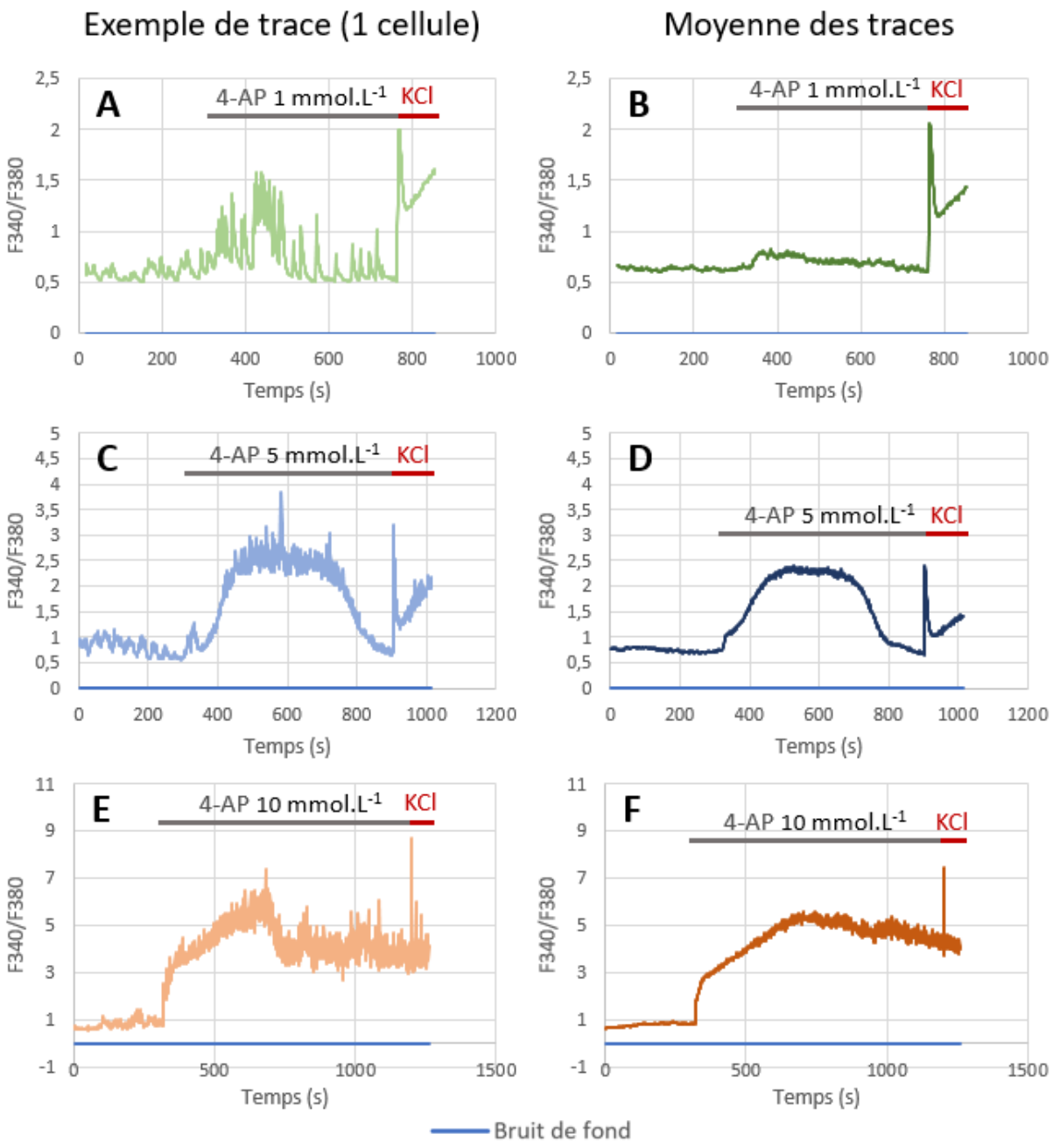


Figure 5.19 : Effet de la 4-aminopyridine sur la concentration de calcium intracellulaire. Enregistrements obtenus en imagerie calcique. La 4-AP est appliquée 300 secondes après le début de l'enregistrement à trois concentrations différentes : 1 mmol.L^{-1} (A et B), 5 mmol.L^{-1} (C et D) et 10 mmol.L^{-1} (E et F). La barre grise représente la période durant laquelle la 4-aminopyridine **(**4-AP) est présente. Un exemple de trace est donné par condition (A, C et E) et toutes les traces obtenues sont moyennées (B : 40 cellules, D : 67 cellules et F : 71 cellules). Du chlorure de potassium (KCl) est ajouté en fin de manipulation (voir barre rouge sur les graphiques) pour dépolariser définitivement les cellules à 780 secondes (A et B), 900 secondes (C et D) et 1200 secondes (E et F).

A 1 mmol.L^{-1}, la 4-AP augmente fortement l'amplitude des transitoires calciques, effet qui pourrait être dû à une plus grande entrée de calcium dans le cytosol à chaque potentiel d'action. Cet effet est très important pendant environ 200 secondes puis il semble s'atténuer, indiquant que l'effet de la 4-AP serait réversible à cette dose malgré l'absence de système de perfusion du milieu permettant de l'éliminer. Avec les données acquises par imagerie calcique,

nous ne pouvons donc pas conclure avec certitude concernant l'impact de la 4-AP sur la fréquence des transitoires calciques.

Cette technique d'imagerie n'informe pas directement sur la fréquence des potentiels d'action des cellules GH4C1. Il est en effet important de noter que s'il a été montré que les transitoires calciques sont dus à des potentiels d'action calciques dans les cellules GH4C1 (Schlegel et al 1987), les deux phénomènes ont une cinétique très différente. En effet, un potentiel d'action de GH4C1 a une durée variant entre 20 et 200 ms millisecondes. Un transitoire calcique dure pour sa part entre 5 et 10 secondes car la diminution du taux de calcium cytosolique (suite à son augmentation) est sous le contrôle de transport actifs relativement lents (pompes CaATPase notamment). Cette différence de durée est illustrée en figure 5.20. Avec une fréquence de potentiel d'action d'environ 1 Hz, il est souvent difficile d'individualiser des transitoires calciques car le taux de calcium cytosolique n'a pas le temps de redescendre suffisamment entre deux PA. Les données d'imagerie calcique ne nous permettent donc pas non plus de conclure sur la modification de la fréquence des potentiels d'action des cellules GH4C1 induite par la 4-AP.

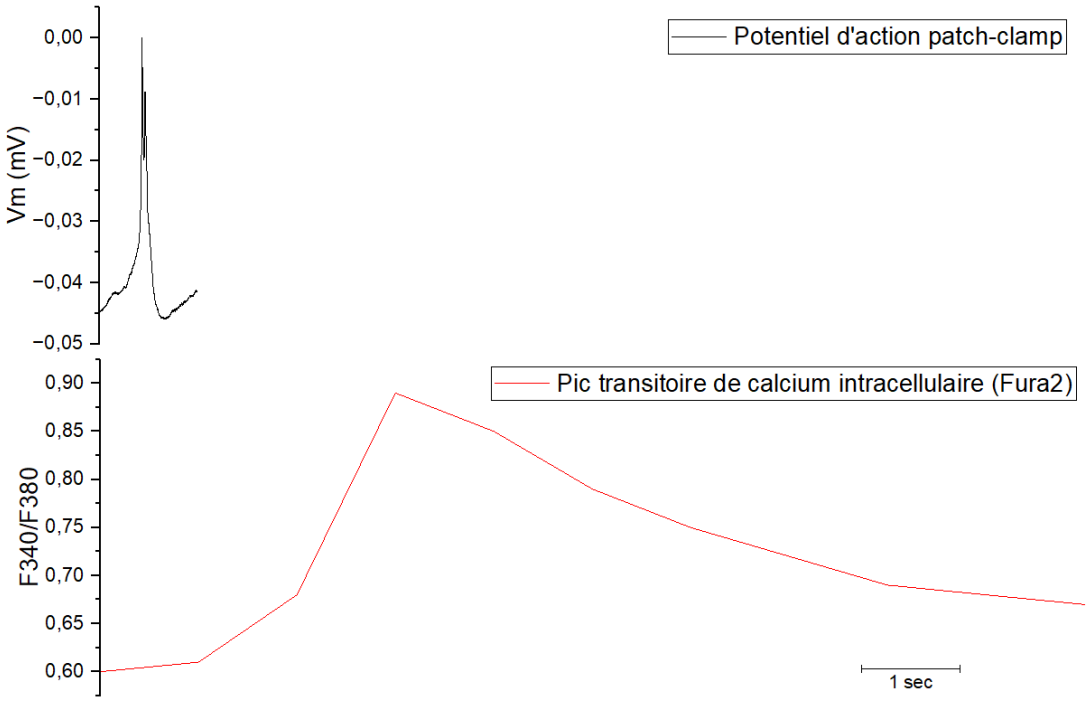


Figure 5.20 : Illustration de la différence de durée entre un potentiel d'action enregistré par patch-clamp et un pic transitoire de calcium libre intracellulaire enregistré en imagerie calcique. Enregistrements réalisés sur des cellules différentes et des cultures indépendantes en phase exponentielle de croissance.

Il est donc difficile avec cette technique de conclure sur la cause de cette augmentation de calcium cytosolique qui peut être due à une plus grande fréquence des pics transitoires de calcium libre intracellulaire ou à des amplitudes plus grandes de ces pics.

A 5 mmol.L^{-1}, la 4-AP provoque une augmentation de la concentration en calcium dans la cellule. A cette concentration, il n'est pas possible de distinguer des transitoires calciques. Ainsi, l'effet de la 4-AP s'est étendu sur environ 400 secondes avant que la concentration de calcium intracellulaire ne soit revenue à son niveau initial. Cet allongement de la durée est une donnée importante qu'il est intéressant de parvenir à monitorer lors des enregistrements sur le banc électronique.

A 10 mmol.L^{-1}, la 4-AP provoque également une augmentation de la concentration en calcium dans la cellule. L'effet est plus puissant qu'à 5 mmol.L^{-1} et semble s'atténuer lentement comme le montre la figure, même si nous n'avons pas pu finaliser l'enregistrement jusqu'au retour au niveau initial.

Dans tous les cas, l'ajout de KCl (qui provoque une dépolarisation membranaire) après ces plusieurs ajouts de 4-AP a provoqué également une augmentation de la concentration en calcium dans la cellule vraisemblablement due à une entrée voltage-dépendante de calcium dans les cellules. De plus, après KCl, les cellules n'émettent plus de transitoires calciques, ce qui montre que ces transitoires sont bien dépendants du potentiel de membrane et sont inactivés par une dépolarisation soutenue. Cette expérience nous confirme la capacité de la 4-AP à moduler les potentiels d'action des GH4C1.

5.5.4 Effet de la TRH

D'après (Dubinsky & Oxford, 1985), l'effet de la TRH se divise en deux phases comme illustré sur la figure 5.21. L'application de la TRH provoque dans un premier temps un relargage de calcium intracellulaire qui résulte en une hyperpolarisation de la membrane liée à l'activation de canaux potassiques calcium-dépendants, ce qui se traduit par une incapacité temporaire (d'environ 30 sec) de la cellule à émettre des potentiels d'action. La voie de signalisation de la TRH déclenche dans un second temps le blocage de canaux potassiques voltage-dépendants, ce qui provoque une dépolarisation de la membrane et donc une augmentation de la fréquence des potentiels d'action.

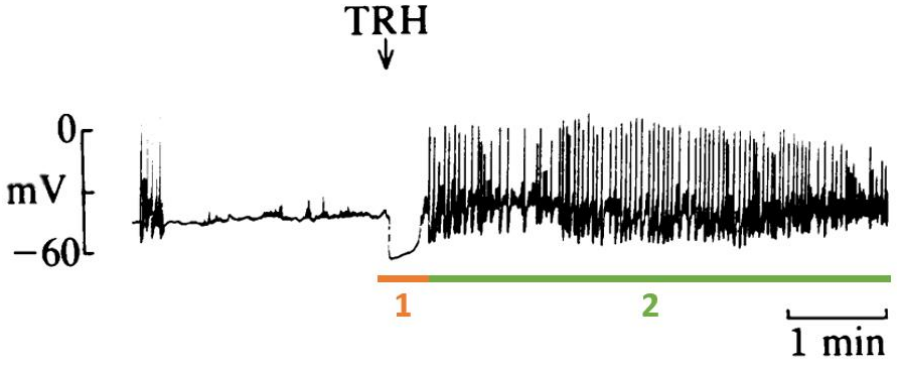


Figure 5.21 : Enregistrement patch-clamp présentant l'action en deux temps de la *Thyrotropin Releasing Hormone* à 1 µmol.L^{-1} sur des cellules GH4C1. La phase 1 en orange correspond à l'hyperpolarisation. La phase 2 en vert correspond à la période d'augmentation de la fréquence des potentiels d'action. Figure adaptée de (Dubinsky & Oxford, 1985).

La TRH apparait donc être un candidat idéal pour moduler les caractéristiques des potentiels d'action émis par les cellules GH4C1. Les résultats des tests visant à confirmer cet effet dans nos conditions expérimentales sont présentés en figure 5.22. Ces tests ont été réalisés en patch-clamp et en imagerie calcique.

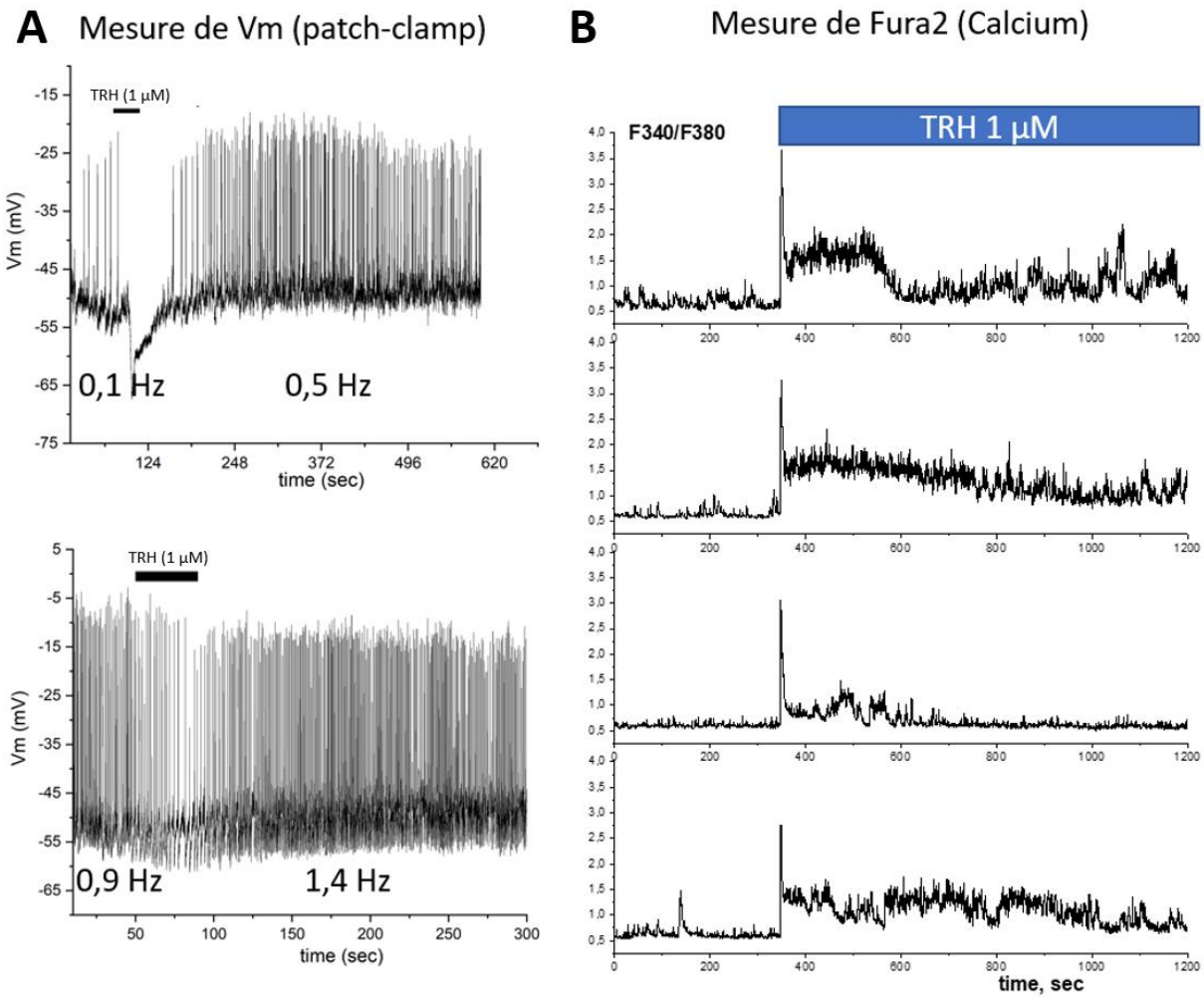


Figure 5.22 : Effet de la *Thyrotropin Releasing Hormone* sur les potentiels d'action émis par les cellules GH4C1. (A) Exemples d'enregistrements réalisés en patch-clamp sur deux cellules GH4C1 différentes. La barre noire indique la période au cours de laquelle la *Thyrotropin Releasing Hormone* (TRH) a été appliquée. Les fréquences des potentiels d'action avant et après application de la TRH sont indiqués sur les graphiques. (B) Exemples de traces enregistrées en imagerie calcique sur quatre cellules GH4C1 différentes. La TRH a été rajoutée dans le milieu à 380 secondes. Le milieu n'étant pas perfusé, elle n'est pas éliminée et reste donc jusqu'à la fin de l'enregistrement.

Les résultats obtenus en patch-clamp sont très similaires à ceux attendus et publiés dans la littérature. Deux phases sont bien distinctes : une hyperpolarisation d'approximativement 20 mV (surtout visible sur le premier enregistrement) suivie d'une augmentation de la fréquence des potentiels d'action. Cet effet est difficile à observer en patch-clamp en configuration cellule entière car la voie de signalisation intracellulaire de la TRH implique la production de seconds messagers solubles de type inositol triphosphate (IP3) dans la cellule. Ces messagers contribuent aux processus moléculaires survenant physiologiquement dans les cellules

vivantes. Or, en patch-clamp, le milieu intracellulaire est remplacé quasi-intégralement par un milieu intracellulaire artificiel et les seconds messagers produits lors de la signalisation sont en grande partie vidangés dans le volume quasiment infini de la pipette de patch-clamp au regard du volume de la cellule. Ainsi, il a été montré que les réponses physiologiques à des hormones, et notamment à la TRH, étaient perdues en patch-clamp lors du passage en cellule entière (Dufy et al., 1986). Lors de prochaines manipulations, nous envisageons d'appliquer directement la TRH après ouverture de la membrane pour limiter la diffusion de messagers solubles indispensables à la réponse physiologique dans la pipette de patch-clamp. Il est également envisageable de reproduire la manipulation en patch-perforé, une autre méthode de patch-clamp qui consiste réaliser un contact entre la pipette et la membrane cellulaire puis perforer la membrane par un agent chimique sans ouvrir la cellule.

Les enregistrements réalisés par imagerie calcique présentées sur la figure 5.22 confirment également les résultats obtenus en patch-clamp. Dès l'application de la TRH, un pic de calcium est observé, indiquant un rapide relargage d'une grande quantité de calcium dans le cytosol. Ce phénomène est cohérent par rapport au mécanisme d'action de la TRH qui provoque une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. Cet effet est suivi d'une augmentation de la fréquence des pics transitoires de calcium libre intracellulaire pour l'ensemble des cellules testées et s'accompagne d'une augmentation de l'intensité des variations calciques intracellulaires qui tend à s'atténuer au cours du temps. Chaque cellule testée a réagi à la présence de TRH, même si des variations sont observées d'une cellule à une autre.

5.5.5 Synthèse des résultats obtenus sur les cellules GH4C1

La campagne de mesures réalisée en patch-clamp et en imagerie calcique nous a permis de caractériser les signaux biologiques émis par les cellules GH4C1. Ainsi, ces cellules présentent, dans nos conditions expérimentales, un potentiel de repos de -48 mV environ. Les cellules GH4C1 peuvent émettre des potentiels d'action spontanés sous forme de potentiels d'action isolés ou de trains de potentiels d'action (bursts) d'une durée moyenne de 70 ms à mi-hauteur et de 40 mV d'amplitude. La fréquence de ces potentiels d'action spontanés est de 0.9 Hz en moyenne. Elles répondent en outre à des stimulations électriques. Ces données montrent quelques variations d'une cellule à l'autre ce qui pourrait expliquer certaines difficultés rencontrées lors des enregistrements réalisés avec notre interface neurobiohybride.

L'application de 4-AP à 5 mmol.L^{-1} en patch-clamp (configuration cellule entière) permet d'augmenter la durée des potentiels d'action et des bursts de 40% en moyenne et de réduire leur fréquence de 43% sans modifier le potentiel de repos des cellules. L'application de 4-AP à 1 mmol.L^{-1} en imagerie calcique permet d'augmenter les variations calciques dues aux déclenchements des potentiels d'action. A 5 et 10 mmol.L^{-1} en imagerie calcique, la 4-AP provoque une augmentation massive de calcium dans le cytosol et il devient compliqué de

distinguer des pics transitoires de calcium libre intracellulaire dans les traces enregistrées. A 1 et 5 mmol.L^{-1}, l'effet de la 4-AP est réversible malgré l'absence de perfusion du milieu. Cela semble également être le cas à 10 mmol.L^{-1} sur une bien plus longue période mais nous n'avons pas pu nous en assurer. Ces tests confirment la capacité de la 4-AP à moduler la forme, la fréquence et la durée des potentiels d'action. La TRH appliquée à une concentration de 1 µmol.L^{-1} en patch-clamp a un effet en deux phases sur les cellules GH4C1 : une hyperpolarisation de leur membrane se traduisant par un arrêt des potentiels d'action suivie d'une augmentation de la fréquence des potentiels d'action. Cet effet a été confirmé en imagerie calcique et il semble réversible sans perfusion du milieu. Ces molécules pourraient donc servir à confirmer le fait que les enregistrements de l'activité des GH4C1 réalisés par le biais de notre interface neurobiohybride sont bien des potentiels d'action. La perspective d'employer la 4-AP et la TRH lors des enregistrements sur le banc électronique pourrait justifier l'ajout d'un système de perfusion du milieu pour l'application et l'élimination des molécules modulatrices de l'activité électrique des cellules GH4C1.

5.6 Caractérisation et modulation des signaux des iCell® GlutaNeurons

5.6.1 Evaluation en patch-clamp de l'activité électrique des neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iCell® GlutaNeurons)

Les mesures électrophysiologiques sur les iCell® GlutaNeurons ont été effectuées entre 7 et 21 jours de culture. Les enregistrements électrophysiologiques entre 7 et 14 jours n'ont pas posé de difficulté particulière avec des *seals* supérieurs à 5-10 GOhms et un passage en cellule entière sans problème et une résistance membranaire voisine d'un à deux GOhms pour 80 % des cellules. En revanche, les enregistrements électrophysiologiques sur les cellules à 21 jours de culture ont été associés à un faible taux de réussite (pas de *seal* ou mauvais *seal* et/ou passage en cellule entière associé avec la perte du *seal* dans environ 80% des cellules). Les résultats pris en compte pour les mesures concernent uniquement les cellules ayant présenté une résistance membranaire supérieure à un GOhm.

Le potentiel de repos des iCell® GlutaNeurons est mesuré sans injection de courant quelques secondes après passage en cellule entière. Sa valeur moyenne est de -31.7±6.2 mV au jour 7 (n=15), de -39±7.4 mV au jour 14 (n=46) et de -31.6 ±9.5 mV au jour 21 (n= 16), les valeurs étant données en moyenne ± écart-type. Sachant que le seuil d'activation des iCell® GlutaNeurons est de -45 mV environ (-42.3±4.4 mV, -46.1±6.5 mV, -43.6±3.9 mV à J7, J14 et J21 respectivement), la plupart d'entre eux ne peut donc pas générer de potentiels d'action (PA) dans nos conditions expérimentales car un neurone dépolarisé voit ses canaux sodiques voltage dépendants inactivés (le seuil d'excitation étant mesuré comme indiqué sur la figure 5.23 ci-

dessous) (Ghovanloo et al., 2016). Pour la majorité des manipulations de patch-clamp, nous avons donc dû hyperpolariser (en injectant un courant) les cellules artificiellement sous le seuil d'activation de sorte qu'elles puissent émettre des potentiels d'action. Cette problématique concernant le potentiel de repos trop élevé des iCell® GlutaNeurons induisant l'impossibilité d'émettre des potentiels d'action sans hyperpolarisation artificielle est préoccupante car sur notre banc d'enregistrement électrique, nous n'avons à ce jour pas la possibilité d'hyperpolariser artificiellement les iCell® GlutaNeurons. Nous devrons donc soit parvenir à identifier des conditions expérimentales plus propices de sorte que leur potentiel de repos soit abaissé en-dessous de -55 mV (en travaillant par exemple la composition ionique de la solution extracellulaire dans laquelle sera réalisée l'enregistrement), soit prolonger la durée de culture au-delà de 21 jours afin d'atteindre un phénotype de maturité électrophysiologique acceptable, le potentiel de repos pouvant s'abaisser au fil du temps comme suggéré dans les travaux de (Prè et al., 2014) sur des neurones dérivés d'iPSCs d'origine humaine, soit inclure un poste de patch-clamp sur le banc de manipulation des dispositifs neurobiohybrides pour hyperpolariser artificiellement les cellules en cours d'enregistrement.

Les potentiels d'action enregistrés par patch-clamp dans ces neurones glutamatergiques humains au 14ème jour *in vitro* sont illustrés en figure 5.23. L'enregistrement présenté dans la figure 5.23 A correspond à celui d'un iCell® GlutaNeuron dont le potentiel de repos a été hyperpolarisé artificiellement à -75 mV. De la même manière que les cellules GH4C1, les iCell® GlutaNeurons peuvent émettre des potentiels d'action de manière spontanée et par bursts. Les potentiels d'action de ces cellules ont une durée de 2 ms (durée prise à mi-hauteur de l'amplitude) très répétable et une amplitude d'environ 75 mV. L'enregistrement présenté en figure 5.23 B présente une série de potentiels d'action (burst) obtenus à la suite d'une stimulation par une impulsion de 10 pA.

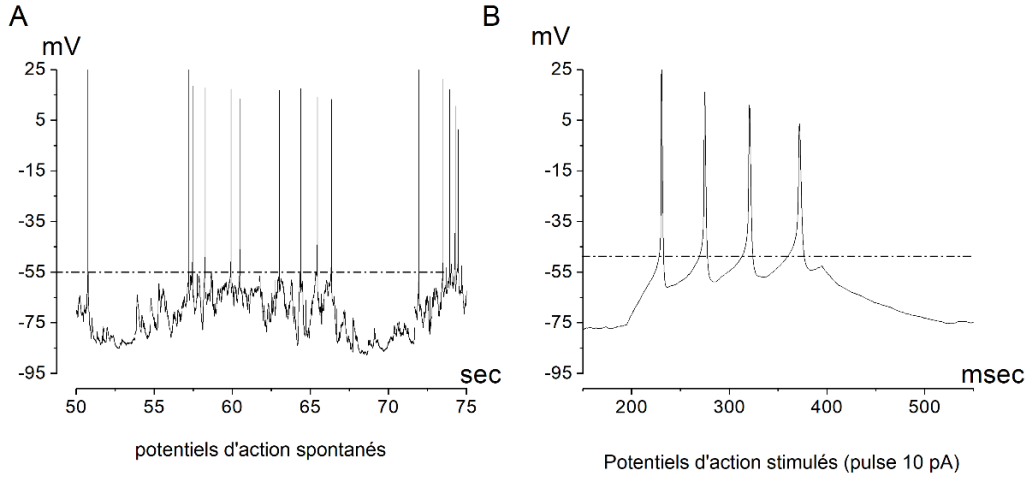


Figure 5.23 : Potentiels d'action de neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites enregistrés en patch-clamp en configuration cellule entière. (A) Potentiels d'action spontanés dans un neurone préalablement hyperpolarisé à -75 mV. (B) Potentiels d'action stimulés par un pulse de 10 pA dans un neurone préalablement hyperpolarisé à -75 mV. La ligne pointillée représente le seuil d'excitation tel qu'il a été mesuré. On peut remarquer sur le panneau de droite que lorsque la fréquence des potentiels d'action devient importante, le seuil d'excitation se déplace vers des valeurs dépolarisées, et l'amplitude des potentiels d'action diminue, phénomènes dus à l'inactivation des canaux sodiques voltage-dépendants.

La littérature disponible sur les neurones dérivés de cellules souches pluripotentes induites (humaines ou animales) indique que, bien que ce type de cellules adoptent rapidement le phénotype morphologique désiré (ce qui se traduit par l'apparition de prolongements de type neuritiques dans la culture dès la 1ère semaine et la formation de réseaux neuronaux différenciés ensuite), la maturité électrique de tels neurones n'est acquise qu'après un certain temps en culture comme le suggèrent des travaux réalisés sur d'autres neurones dérivés d'iPSCs d'origine humaine (Prè et al., 2014). Le fournisseur des iCell® GlutaNeurons recommande leur utilisation au 14ème jour de différenciation. Nous avons toutefois souhaité vérifier que, dans nos conditions de culture, ces cellules étaient bien actives électriquement à partir du 14ème jour de culture. Ainsi, nous avons réalisé une série de tests à différents temps de culture. La figure 5.24 regroupe les résultats de caractérisation de iCell® GlutaNeurons après 7 jours, 14 jours (en duplicat) et 21 jours de culture ; la résistance de la pipette de patch et la résistance d'accès sont présentées en figure 5.24 A et 5.24 B à titre informatif, les paramètres étudiés sont la résistance membranaire et la capacité membranaire.

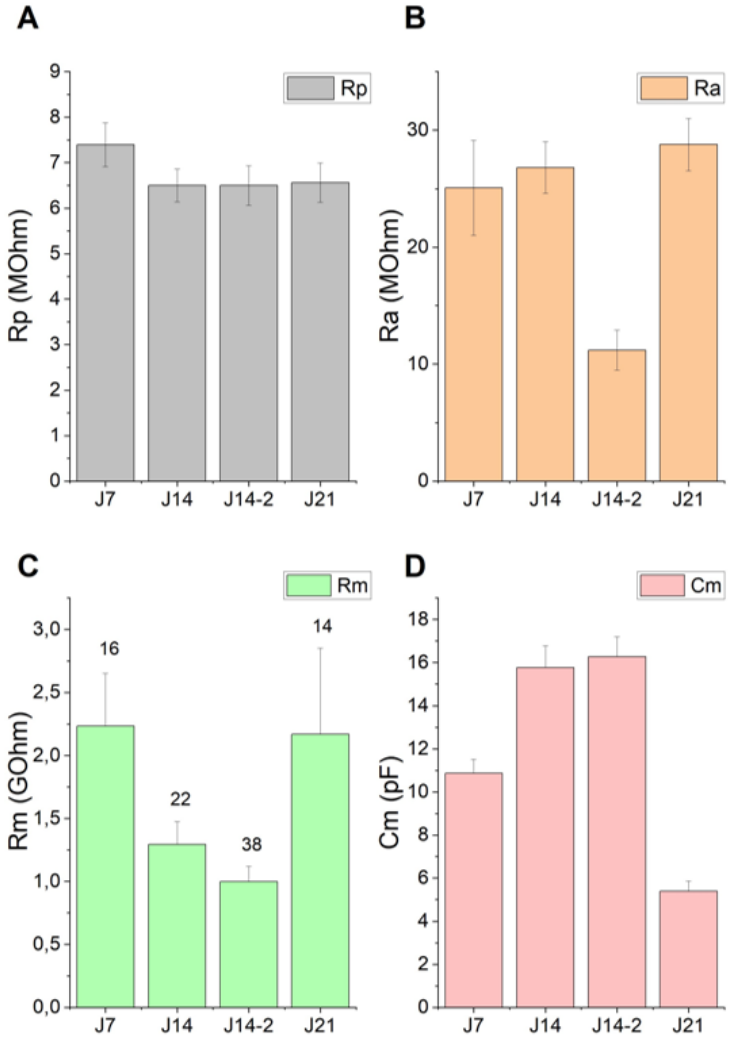


Figure 5.24 : Caractéristiques des neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites à différents stades de la culture. Données acquises en patch-clamp configuration cellule entière. (A) Résistance des pipettes de patch-clamp. (B) Résistance d'accès, (C) Résistance membranaire et (D) Capacité membranaire des iCell® GlutaNeurons. Le potentiel est corrigé du potentiel de jonction liquide.

Nous avons observé que la résistance de la membrane, présentée en figure 5.24 C, était similaire au jour 7 et au jour 21 (environ 2.5 GOhm) mais était plus faible au 14ème jour post ensemencement (environ 1.2 GOhm). La capacité membranaire présentée en figure 5.24 D reflète la surface de la membrane plasmique (dont la capacité par unité de surface est de 1 µF/cm2 ou 10 fF/µm^2 (Adrian, 1980)), et donc la taille des cellules. Une faible capacité membranaire reflète une cellule de petite taille. La capacité membranaire au 7ème jour était d'environ 11 pF soit une surface d'environ 1100 µm^2. Les cellules conservées 14 jours présentaient une capacité membranaire de 16 pF environ soit une surface d'environ 1600 µm^2, ce qui signifie que les cellules au 14ème jour seraient plus grosses qu'au 7ème jour. Au 21ème jour, la capacité membranaire chute à 5 pF, ce qui signifie que les cellules sont très petites, avec une surface d'environ 500 µm^2. Il est possible que ce phénomène soit le reflet d'un mauvais état des cellules lors de cette expérimentation (réalisée 1 seule fois à ce jour). Il est connu par exemple qu'une diminution de la taille cellulaire accompagne le processus de mort cellulaire programmée (Núñez et al., 2010). Ceci est cohérent avec le faible taux de *seal* obtenu ou la fragilité des membranes lors du passage en cellule entière au 21ème jour *in vitro*. Cette hypothèse serait cependant à confirmer car la taille des cellules observées au microscope (voir figure 5.25) ne semble pas vraiment évoluer au fil du temps.

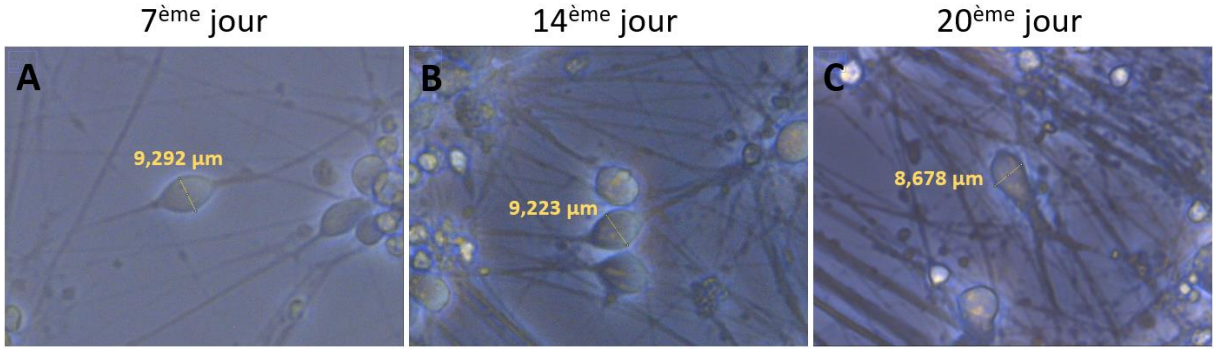


Figure 5.25 : Mesures du diamètre de neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites au (A) 7ème, (B) 14ème et (C) 20ème jour *in vitro*. Mesures réalisées à l'aide du logiciel ImageJ.

Des potentiels d'action ont pu être observés dans 12 neurones sur 16 enregistrés à J7 (aucun neurone ne présentant des PA spontanés), dans 50 neurones sur 70 enregistrés à J14 (dont un seul présentait des PA spontanés au potentiel de repos et 5 autres présentant des PA spontanés en les hyperpolarisant) et dans 14 neurones sur 16 enregistrés à J14 (aucun ne présentant d'activité spontanée). La durée des PA (à 50% de l'amplitude) était de 4.5±1.9 msec à J7, 3.7±1.1 msec à J14 et 3±1.1 msec à J21. Ils présentaient en outre une amplitude similaire (62±17 mV au jour 7, 60.7±10.3 mV au jour 14, 69.1±19 mV au jour 21).

Les caractéristiques des iCell® GlutaNeurons ainsi déterminées nous indiquent que la durée optimale de maturation en culture est actuellement de 14 jours après ensemencement. Cependant, après ces premières expériences, il apparait que des ajustements au niveau de la méthode de culture sont nécessaires pour optimiser la survie des cellules et ainsi prolonger leur survie dans nos dispositifs.

5.6.2 Vérification de l'activité électrique des iCell® GlutaNeurons par imagerie calcique

La figure 5.26 représente des augmentations transitoires de calcium intracellulaire des iCell® GlutaNeurons enregistrés par imagerie calcique. Ces transitoires calciques sont déclenchés de manière spontanée et suggèrent la présence d'une activité électrique spontanée à la base de ces fluctuations de concentration de calcium cytosolique. Sur l'ensemble des cellules enregistrées dans le champs, seulement 15% émettaient ces pics, et ce pour une seule des trois lamelles de iCell® GlutaNeurons utilisées pour ce test. Ce faible taux de succès suggère la possibilité pour ces neurones d'émettre des potentiels d'action dans nos conditions expérimentales mais également l'existence d'une problématique non résolue concernant les conditions permettant d'optimiserl'obtention d'une telle activité électrique.

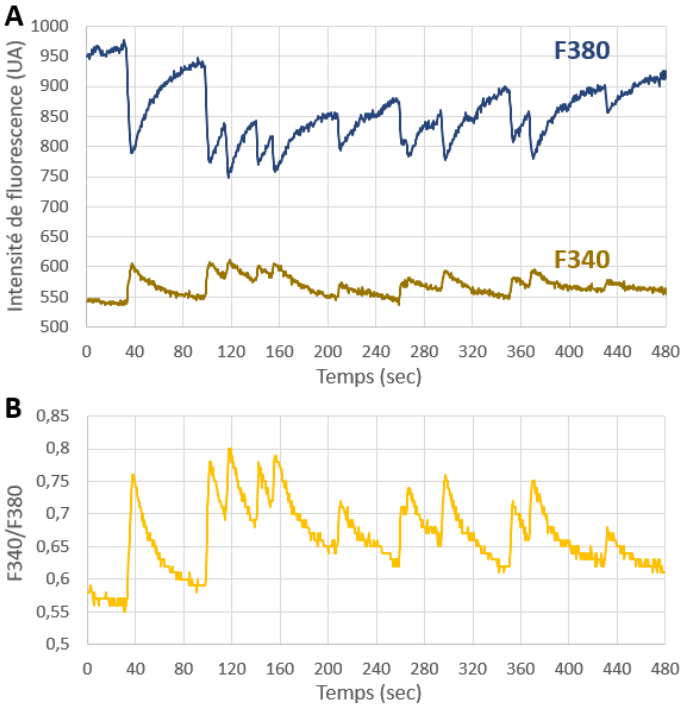


Figure 5.26 : Mise en évidence du caractère antiparallèle de la fluorescence émise à 380 et à 340 nm lors de la survenue d'une augmentation transitoire de calcium intracellulaire potentiellement induite par l'activité électrique de neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites. (A) Intensité de fluorescence à 340 et 380 nm. (B) Rapport entre l'intensité de fluorescence émise à 340 et 380 nm.

5.6.3 Caractérisation des courants des iCell® GlutaNeurons

Afin de caractériser plus en détail les signaux émis par les neurones glutamatergiques humains dérivés d'iPSC, une étude des courants ioniques à l'origine des potentiels d'action est réalisée par patch-clamp en potentiel imposé. Cette étude permet en outre de valider que ces neurones expriment bien des canaux sodiques voltage-dépendants, les protéines responsables de l'excitabilité neuronale. Les cellules sont utilisées après 14 jours de culture. Les résultats de cette analyse sont présentés en figure 5.27. Comme pour les cellules GH4C1, le protocole consiste à appliquer une variation de potentiel comme stimulus, partant de -80 mV jusqu'à

différentes valeurs connues. La figure 5.27 A présente l'évolution des courants pour différentes valeurs de stimulations électriques. Les stimulations sont réalisées de manière croissante avec des tensions allant de -105 mV à +95 mV (par incrément de 10 mV entre chaque stimulation pour un total de 19 courbes). Afin de simplifier la lecture, quatre courbes issues de ce test ont été sélectionnées pour être représentées sur le graphique A : la courbe de courant obtenue pour une stimulation à -35 mV (première observation des courants entrants), à -25 mV (courants entrants maximum), à -5 mV (première observation des courants sortants) et à 35 mV.

Les courbes présentées en figure 5.27 B sont tracées à partir des 4 courbes présentées en A et également à partir des 15 qui ne sont pas représentées, ce qui fait 19 courbes au total. La courbe « I *peak* » correspond au point le plus négatif récupéré sur le pic négatif de chaque courbe en A. Cela donne un aperçu des courants entrants responsables de la phase de dépolarisation de la membrane (= première phase du potentiel d'action). La courbe « I *steady-state* » est tracée à partir des points les plus élevés récupérés sur les plateaux de chaque courbe présentée en A. Cette courbe reflète les courants sortants responsables de la repolarisation et de l'hyperpolarisation de la membrane (= deuxième et troisième phase du potentiel d'action). Les résultats de cette analyse permettent d'avoir un aperçu du type et de la proportion de canaux voltage-dépendants responsables de chaque phase d'un potentiel d'action.

Le courant entrant (I *peak*) apparait pour une stimulation de -35 mV, la valeur de courant étant de -0.4 nA. L'intensité du pic est maximale pour une stimulation de -25 mV, la valeur de courant étant alors de -1.4 nA. L'intensité du pic décroit ensuite progressivement à mesure que la stimulation est augmentée. Le courant sortant apparait pour une stimulation de -5 mV pour une valeur de courant de 0.2 nA puis croit progressivement à chaque incrémentation du potentiel de stimulation. L'intensité de ce courant atteint sa valeur maximale pour un potentiel imposé de 35 mV. Le courant s'inverse (par extrapolation) pour un potentiel de membrane de 70 mV, ce qui suggère un potentiel d'équilibre de Nernst de 70 mV pour l'ion responsable de ce courant. Dans nos conditions, les potentiels de Nernst calculés avec les concentrations intra et extracellulaires pour une température de 20°C sont de -81 mV pour le K^+, 69 mV pour le Na^+ et 125 mV pour le Ca^{2+} (pour une concentration de calcium intracellulaire estimée à 100 nmol.L^{-1}). Ces informations nous permettent de poser l'hypothèse que les courants entrants sont majoritairement dus à une entrée d'ions Na^+, et que les courants sortants observés ici sont majoritairement dus à une sortie d'ions K^+ de la cellule. La forme des potentiels d'action serait donc majoritairement due à la présence de canaux sodiques voltage dépendants et de canaux potassiques voltage dépendants.

Ces informations démontrent que ces cellules, en dehors du potentiel de repos trop élevé sont similaires physiologiquement aux neurones humains et donc qu'elles seraient un modèle pertinent pour la démonstration de l'établissement d'une boucle de communication bidirectionnelle avec des neurones vivants si une solution était trouvée pour qu'elles soient actives électriquement sans hyperpolarisation préalable.

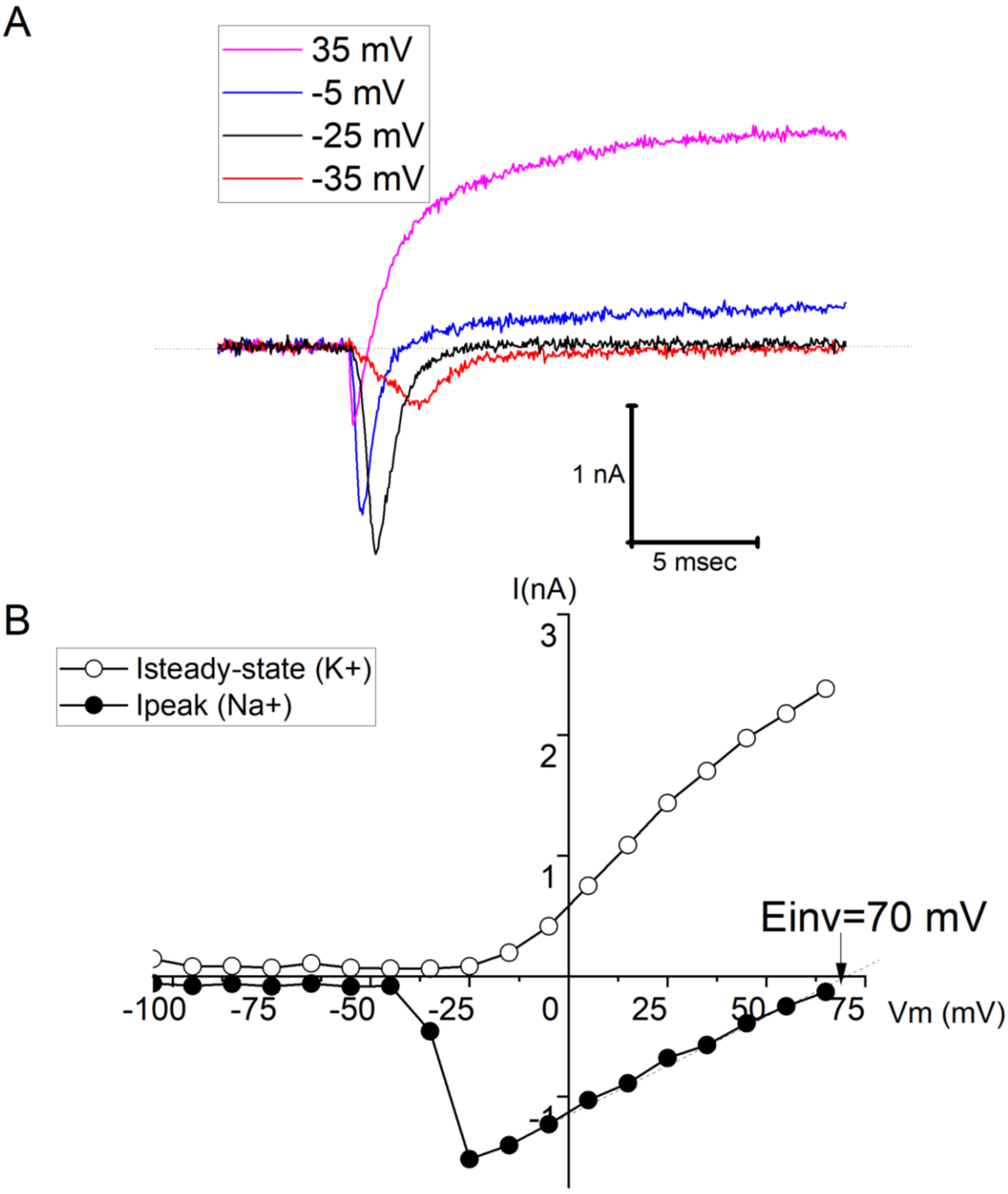


Figure 5.27 : Caractérisation des courants voltage-dépendants en voltage-clamp des neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites. Les neurones utilisés sont au 14ème jour post-ensemencement. (A) Courants entrants en fonction du temps obtenus dans un iCell® GlutaNeuron stimulé par différentes valeurs de potentiel comprises entre -35 mV à +35 mV. (B) Courbes courant-potentiel enregistrées au pic négatif (Na^+) et au sommet plateau (K^+).

Nous avons vu précédemment que la phase de dépolarisation des potentiels d'action émis par les iCell® GlutaNeurons étaient vraissemblablement due à la présence de canaux sodiques voltage-dépendants. Si cette hypothèse est avérée, il devrait alors être possible d'inhiber partiellement la phase de dépolarisation en bloquant les canaux sodiques voltage dépendants avec de la TTX, et donc par conséquent de moduler la forme des potentiels d'action de ces neurones.

Dans l'objectif de vérifier cette hypothèse, nous avons mené une campagne de mesures par patch-clamp sur des iCell® GlutaNeurons maintenus pendant 14 jours en les exposant à différentes concentrations de TTX. Les résultats de cette campagne sont présentés en figure 5.28. Les courbes présentées en 5.28 A et 5.28 B ont été réalisées de la même manière que l'analyse des courants transmembranaires des iCell® GlutaNeurons du paragraphe précédent. En A sont présentés l'ensemble des courants enregistrés pour des stimulations en tensions de -145 mV à +135 mV appliquées pendant 15 ms avec un intervalle de 35 ms. L'incrémentation de la valeur de tension entre deux stimulations est de 10 mV). Le protocole de stimulation est représenté en dernier en A. La manipulation a été répétée plusieurs fois en exposant les cellules à des concentrations croissantes de TTX (une condition contrôle sans TTX, TTX 10 $nmol.L^{-1}$, TTX 100 $nmol.L^{-1}$ et TTX 1 $\mu mol.L^{-1}$). L'impact de la TTX sur les courant sodiques est facilement identifiable sur ces courbes en observant le pic de courant négatif entre 35 et 40 ms qui perd en intensité à mesure que la concentration en TTX augmente. Ce phénomène confirme l'hypothèse que les courants entrants de dépolarisation sont bien dus à la présence de canaux sodiques voltage dépendants. Les courbes présentées en 5.28 B reprennent les valeurs au point le plus négatif du pic de courant de chaque courbe en A pour chaque condition expérimentale et les représentent en fonction du voltage appliqué pour stimuler la cellule. On observe que la valeur du courant diminue au fur et à mesure que la concentration de TTX est augmentée, jusqu'à devenir quasi-nulle pour une concentration de 1 $\mu mol.L^{-1}$ de TTX. Le fait d'avoir fait varier les concentrations de TTX nous a donc permis d'obtenir différents degrés d'inhibition qui ont été reportés en 5.28 C. Un ajustement des valeurs est réalisé à l'aide du logiciel Origin (la fonction Logistic utilisée par le logiciel est représentée directement sur le graphique). Ce type de représentation nous permet d'identifier la concentration de TTX correspondant à 50% d'inhibition des courants sodiques (= IC50 pour Inhibitory Concentration 50%) : 24.5 ± 5 $nmol.L^{-1}$. Pour compléter l'analyse, nous avons également évalué l'impact de la TTX sur les courants potassiques. Cet impact est illustré en 5.28 D (qui reprend les valeurs les plus élevées des plateaux de chaque courbe présentée en A pour chaque condition). Aucun effet notable n'est observé sur les courants potassiques, ce qui est cohérent par rapport à nos attentes.

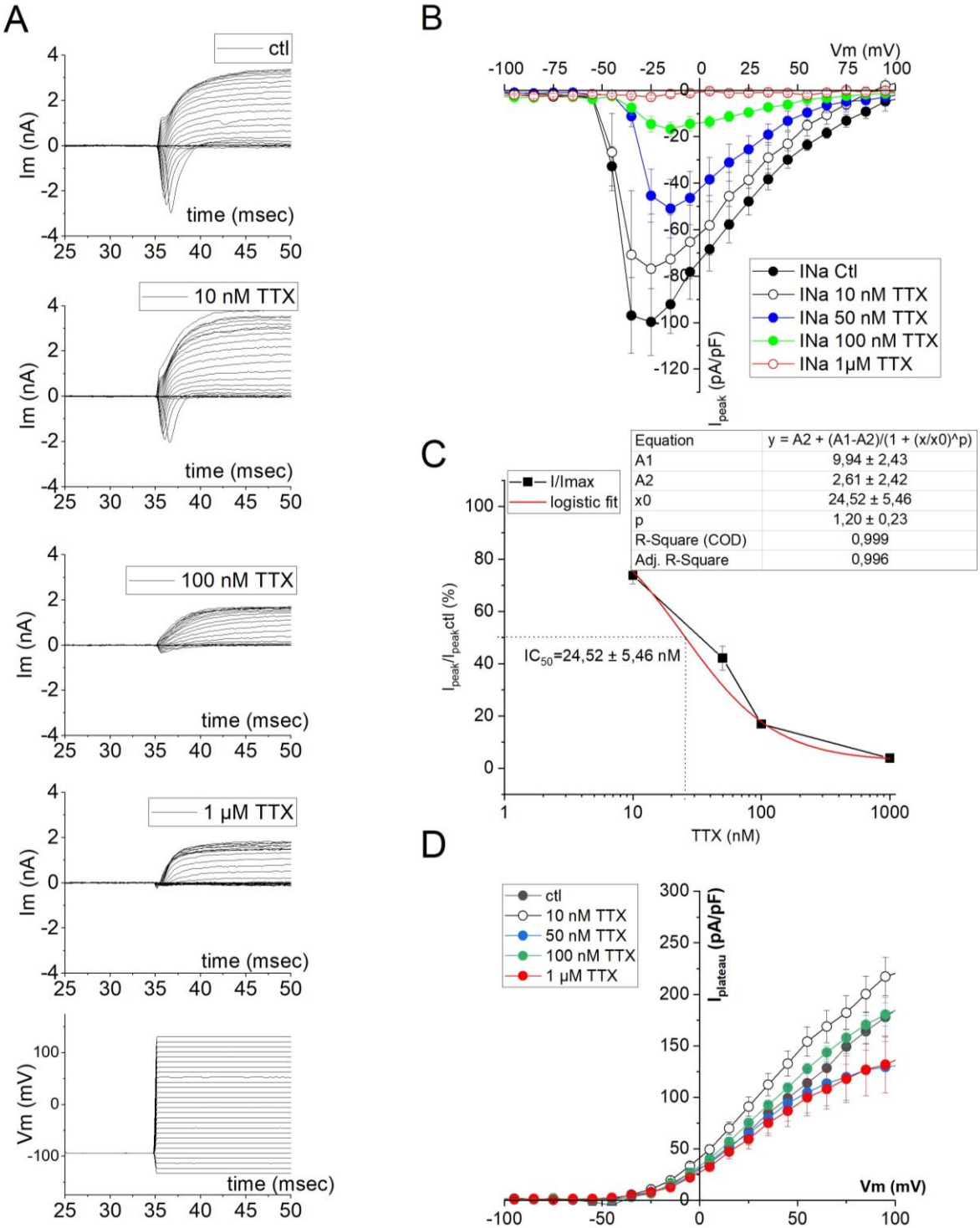


Figure 5.28 : Caractérisation des courants voltage-dépendants en présence de tétrodotoxine en voltage-clamp des neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites. Les neurones utilisés sont au 14ème jour post-ensemencement. (A) Tracés de courant brut en fonction du temps. Le graphique du bas correspond au protocole de potentiel imposé. (B) Représentation en courbe IV (courant-potentiel) des courbes présentées en A. Chaque point correspond à la valeur mesurée au sommet pic négatif. (C) Courbe effet-dose de la tétrodotoxine TTX permettant de déterminer le pourcentage d'inhibition des courants sodiques. La courbe rouge correspond à l'ajustement réalisé avec le logiciel Origin 2022 (le cadre présente la formule associée). (D) Courant tardif mesuré au plateau (= courant potassique). *Ctl* : condition contrôle (0 nM TTX).

Nous avons pu ainsi observer que la TTX (voir figure 5.29 ci-dessous) à des concentrations de 10 nmol.L^{-1} bloque partiellement le déclenchement des potentiels d'action (PA d'amplitude 39 ± 5 mV soit une réduction de 30 % de leur amplitude de référence, n=6) et bloque complètement leur déclenchement pour des concentrations supérieures à 10 nmol.L^{-1} (50 nmol.L^{-1}, 100 nmol.L^{-1}, 1 µmol.L^{-1}, n=47 total). La TTX n'a aucun effet sur le potentiel de repos contrairement aux inhibiteurs des canaux potassiques (-19 mV ± 6.9 mV en présence de TEA (tetraéthyl ammonium chloride) seul, et -9.2 ± 7.3 mV en présence de TEA 10 mmol.L^{-1} et paxilline 1 µmol.L^{-1}) qui dépolarisent les cellules.

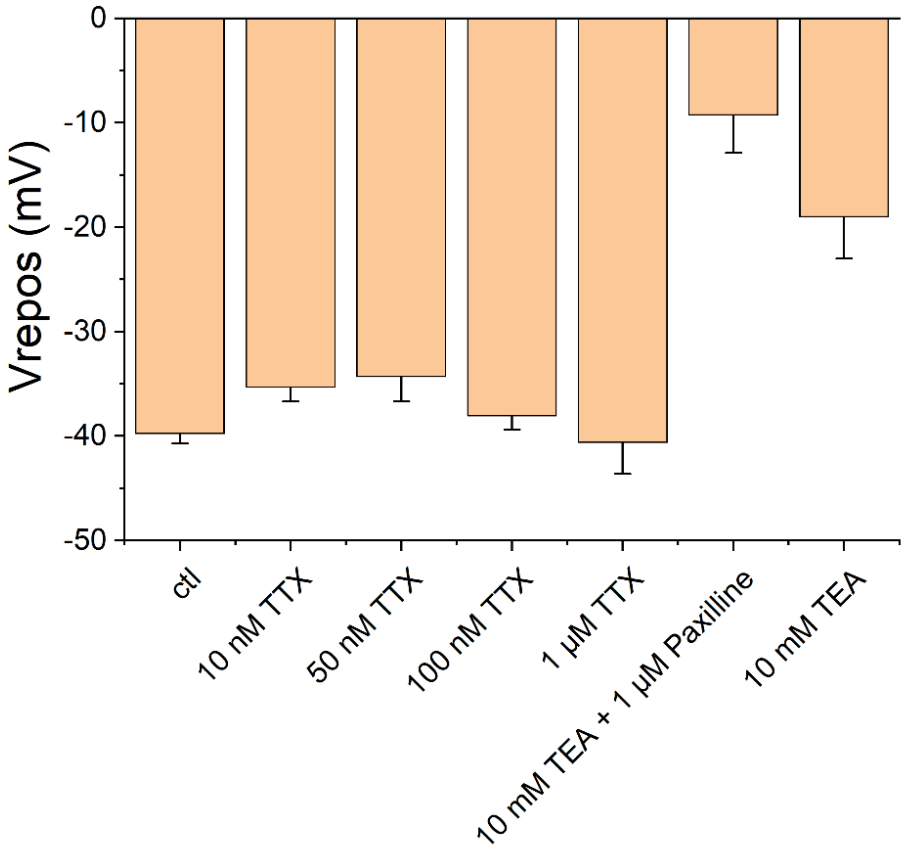


Figure 5.29 : Effet de différents inhibiteurs de canaux ioniques sur le potentiel de repos (Vrepos) des neurones glutamatergiques humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites. La tétrodotoxine (TTX), quelle que soit sa concentration, ne modifie pas le potentiel de repos, contrairement à un inhibiteur de canaux potassiques, le tétraéthylammonium (TEA), à large spectre associé ou non à la paxilline, un inhibiteur plus spécifique des canaux potassiques voltage- et calcium-dépendants à large conductance.

5.6.4 Synthèse des données acquises avec les iCell® GlutaNeurons

Les iCell® GlutaNeurons présentent un potentiel de repos trop élevé dans nos conditions expérimentales (-31.7±6.2 mV, -39±7.4 mV, -31.6 ±9.5 mV à J7, J14 et J21 respectivement) par rapport au seuil de déclenchement de potentiels d'action (-42.3±4.4 mV, -46.1±6.5 mV, -43.6±3.9 mV à J7, J14 et J21 respectivement) pour qu'ils puissent être actifs électriquement

sans hyperpolarisation artificielle. Pour pouvoir observer des potentiels d'action en patch-clamp, les iCell® GlutaNeurons ont été hyperpolarisés artificiellement à -75 mV. Les potentiels d'action émis dans ces conditions ont une amplitude d'environ 60 à 70 mV et une durée de 2 ms (prise à mi-hauteur de l'amplitude). Pour 2 iCell® GlutaNeurons, ces potentiels d'action étaient émis de manière spontanée (*i.e.* sans stimulation préalable). L'étude de l'impact de la TTX sur les courants des iCell® GlutaNeurons montrant que ces derniers sont sensibles à la TTX, il est possible de conclure que les canaux responsables des potentiels d'action des iCell® GlutaNeurons semblent être majoritairement des canaux sodiques voltage-dépendants pour la phase de dépolarisation. Des canaux potassiques voltage-dépendants observés en potentiel imposé sont vraisemblablement responsables de la repolarisation de la membrane bien que cela n'ait pas été vérifié au cours de ces travaux et du maintien du potentiel de repos comme décrit précédemment. La TTX inhibe efficacement les courants sodiques (IC50 = 24.5 ± 5 nmol.L^{-1}) et le déclenchement de potentiels d'action, et pourra donc être utilisée pour bloquer les potentiels d'action émis par les iCell® GlutaNeurons lors d'enregistrements réalisés par le biais de nos interfaces neurobiohybrides. Il existe 9 canaux sodiques voltage-dépendants chez l'espèce humaine (nommé NaV1.1 à NaV1.9) (Fux et al., 2018). Les canaux NaV1.5, NaV1.8 et Nav1.9 sont dits résistants à la TTX (bloqué avec un IC supérieur à 5 µmol.L^{-1}). Les canaux NaV1.1, NaV1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.6, Nav1.7 sont qualifiés de canaux TTX sensibles avec des IC50 pour la TTX compris entre 4 et 25 nmol.L^{-1}. Les canaux NaV1.4 et NaV1.7 humains présentent un IC50 de 25 nM pour la TTX . Ces arguments laissent supposer l'expression d'un de ces deux canaux dans les iCell® GlutaNeurons, ce qui restera à démontrer par une approche moléculaire.

Pour pouvoir établir une communication bidirectionnelle entre les iCell® GlutaNeurons et des neurones artificiels biomimétiques par le biais de l'interface neurobiohybride, il sera donc nécessaire de trouver une solution pour abaisser leur potentiel de repos. Cela pourra être réalisé par une modification de la composition ionique du milieu extracellulaire, une maturation de la culture plus longue ou par l'ajout d'un poste de patch-clamp sur le banc pour hyperpolariser les neurones artificiellement. Nous avons vu dans cette section que les caractéristiques électrophysiologiques des iCell® GlutaNeurons s'amélioraient entre le 7ème jour et le 14ème jour de culture. Les conditions de culture de ces neurones dérivés d'iPSC humaines devront toutefois être retravaillées afin de pouvoir prolonger la durée de vie des iCell® GlutaNeurons au-delà de ce délai pour l'instant insatisfaisant sur le plan électrophysiologique, et peu compatible avec nos objectifs. A ce titre, il est à noter que durant ma thèse, ces cellules ont été rachetées par Fujifilm et que ce fournisseur indique, dans ses nouveaux supports publicitaires, une utilisation possible au-delà de 1 mois de culture, cette durée étant apparemment obtenue dans de très petites chambres de culture sur des MEA commerciaux (« iCell® GlutaNeurons Application Protocol: Measuring Neuronal Activity: Maestro Multielectrode Array », accessible sur le site du fournisseur par le lien suivant : www.fujifilmcdi.com/icell-glutaneurons-01279-ggln01279). Il est important de préciser également que d'autres études menées sur des neurones dérivés

d'iPSCs indiquent la possibilité de cultiver de telles cellules sur une période de deux mois (Fux et al., 2018; Kopach et al., 2021; Rakovic et al., 2022).

5.7 Conclusion du chapitre

Ce chapitre a abordé les notions relatives à la caractérisation des modèles biologiques sélectionnés. Les données acquises sur les iCell® GlutaNeurons restent à ce jour à confirmer et des mises au point sur leurs conditions de culture prolongée sont indispensables. Les cellules endocrines hypophysaires murines GH4C1 présentent toutes les caractéristiques électrophysiologiques d'un modèle pertinent pour les étapes préliminaires de l'établissement d'une boucle de communication bidirectionnelle entre des neurones artificiels biomimétiques et des neurones vivants. En effet, ces cellules émettent des potentiels d'action spontanés qui ont été caractérisés en patch-clamp. De plus, nous avons identifié plusieurs molécules (la TRH et la 4-AP) permettant de moduler la durée et de la fréquence de leurs potentiels d'action/bursts en cours d'enregistrement. Nous avons également conduit une étude en imagerie calcique des variations des taux de calcium libre intracellulaire, ce qui nous a permis d'implémenter un dispositif d'imagerie calcique non ratiométrique sur le banc de caractérisation des dispositifs neurobiohybrides. L'ensemble de ces travaux était indispensable pour développer les outils nécessaires à la validation de la réalité biologique des phénomènes électriques enregistrés en dispositifs neurobiohybrides.

Chapitre 6 Etablissement d'une première boucle de communication bidirectionnelle

6.1 Introduction du chapitre

L'objectif poursuivi dans cette partie de mon travail a été d'établir une boucle de communication bidirectionnelle au sein de nos nouvelles interfaces neurobiohybrides entre des cellules électriquement actives et les neurones artificiels. Ainsi, après avoir vérifié par des approches d'électrophysiologie (en patch-clamp) et d'imagerie calcique l'excitabilité des modèles biologiques utilisés dans les dispositifs neurobiohybrides, nous avons concentré nos études sur les cellules GH4C1. En effet, nous avons vu (*cf.* Chapitre 5, § 5.5.5) que ces cellules endocrines hypophysaires murines disposent des caractéristiques recherchées pour apporter la première preuve de concept de la mise en place d'une boucle bidirectionnelle complète entre des cellules électriquement actives et des neurones artificiels : ces cellules sont électriquement actives, de manière spontanée ou induite, leur activité électrique peut être modulée par la TRH et la 4-AP, et cette activité électrique est objectivable par imagerie calcique.

L'objectif principal poursuivi dans ce chapitre est illustré en figure 6.1. Ce dernier consiste à mettre en évidence le lien de cause à effet entre les différents éléments du neurobiohybride. Il est indispensable de pouvoir affirmer avec certitude que l'émission d'un potentiel d'action par un neurone vivant est bien consécutive à une excitation initiée par un potentiel d'action biomimétique émis par un neurone artificiel et vice-versa. Pour parvenir à mettre en évidence cette interaction, un banc de caractérisation électrique a été développé. Sa conception sera présentée dans la suite de ce chapitre.

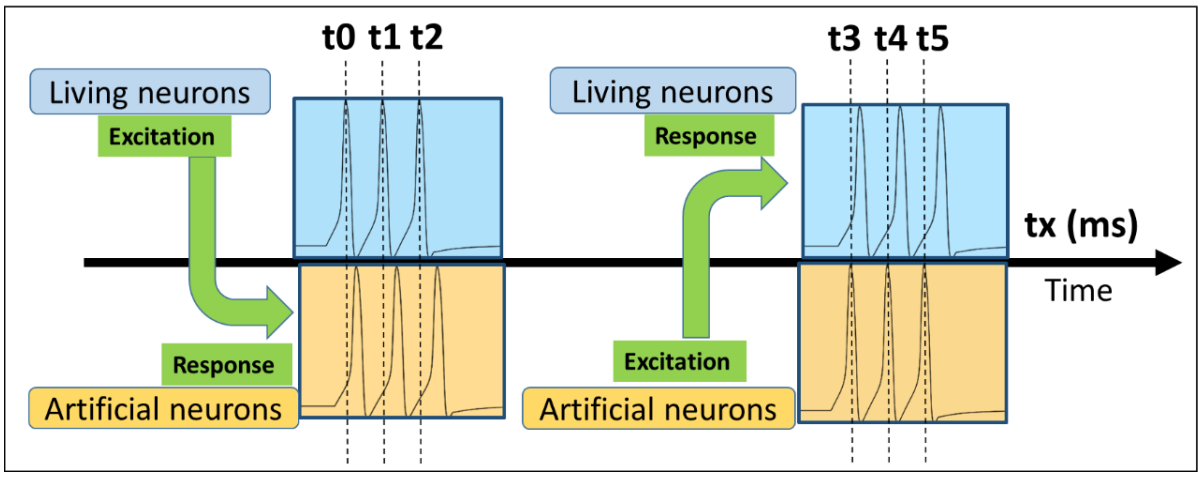


Figure 6.1 : Représentation schématique du lien de causalité unissant l'émission de potentiels d'action issus de cellules vivantes et l'émission de potentiels d'action biomimétiques par les neurones artificiels. Chaque potentiel d'action émis par un ou plusieurs neurones vivants déclenche un ou plusieurs potentiels d'action biomimétiques après un court délai et vice-versa, permettant ainsi une communication bidirectionnelle en temps-réel.

La première partie de la mise en place d'une communication bidirectionnelle entre des cellules électriquement actives et des neurones artificiels nécessite de parvenir à stimuler électriquement les cellules vivantes. Cette première étape a déjà été initiée et validée dans le

cadre des travaux de doctorat de M. Dimitri Henniquau où des cellules de Phéochromocytome de rat (PC12) différenciées en cellules neuronales ont été stimulées à l'aide d'un signal potentiel d'action biomimétique amplifié à 1.5 V (*cf*. Chapitre 3, §3.2). Etant donné que le modèle cellulaire sélectionné pour les travaux présentés dans ce manuscrit diffère des travaux antérieurs de M. Henniquau, il convient de confirmer dans un premier temps la possibilité de stimuler électriquement les cellules endocrines hypophysaires GH4C1 à l'aide d'un signal électrique biomimétique. Les résultats de ces travaux nécessaires à la mise en place d'une boucle de communication complète sont présentés dans la suite de ce chapitre.

Dans un second temps, nous présentons les résultats relatifs à la deuxième partie de la boucle, à savoir l'enregistrement à l'aide de notre banc de l'activité électrique des cellules GH4C1 avec une vérification en imagerie calcique de l'activité des cellules. Les manipulations ayant permis l'obtention de ces enregistrements ont été débutées en juin 2022 et sont toujours en cours à ce jour. Les traces obtenues ont été comparées à un enregistrement du bruit intrinsèque de la chaine d'enregistrement afin de confirmer que les signaux enregistrés sont bien associés à une activité électrique liée à la présence des cellules GH4C1 dans l'interface. Les signaux détectés ont été comparés à des potentiels d'action enregistrés par patch-clamp.

Et enfin nous présentons les résultats de simulation issus de notre modèle qui utilisent en partie un enregistrement de l'activité cellulaire pour le neurone biologique excitateur. Pour poursuivre le développement de notre interface neurobiohybride, nous menons en parallèle des travaux de modélisation de l'ensemble de la boucle de communication bidirectionnelle comprenant le neurone artificiel et un modèle des cellules GH4C1 établit sur la base des paramètres déterminés par les travaux de caractérisation détaillés en chapitre 5. Cette modélisation prend également en compte les paramètres de l'interface électrode-cellule.

6.2 Stimulation électrique de l'activité des cellules GH4C1

Afin de vérifier la possibilité de stimuler les cellules GH4C1, ces dernières ont été ensemencées dans un dispositif appelé IMACA conçu initialement pendant les travaux de doctorat de M. Dimitri Henniquau. Ces dispositifs du type IMACA ne peuvent pas être utilisés pour l'enregistrement, ils sont uniquement utilisés pour la démonstration de la stimulation des cellules par un signal biomimétique. Pour cela, les mêmes procédures d'ensemencement que pour les dispositifs RxTx présentées précédemment (*cf*. Chapitre 4, §4.5.1) ont été adoptées. Le dispositif IMACA, dont le schéma est présenté en figure 6.2, consiste en trois faisceaux de dix lignes d'or traversant un puits de culture circulaire de 3,5 cm de diamètre. Ces faisceaux sont directement déposés sur une surface de verre selon les techniques de fabrication similaires à celles présentées en chapitre 3 pour les interfaces neurobiohybrides du type RxTx. Ces expériences de stimulation à l'aide du dispositif de type IMACA ont été réalisées au début de ma thèse, de ce fait cette interface neurobiohybride n'a pas bénéficié de l'ensemble des

améliorations présentées dans le chapitre 3, essentiellement destinées à optimiser les conditions d'enregistrement de l'activité électrique des cellules. Dans le cadre de la configuration des électrodes pour les dispositifs de type IMACA, les signaux électriques appliqués stimulent sans distinction l'ensemble des cellules placées sur et dans l'environnement proche des lignes. Il est à noter que les dispositifs RxTx sont prévus à terme pour réaliser à la fois la stimulation des cellules neuronales et l'enregistrement de leurs réponses électriques.

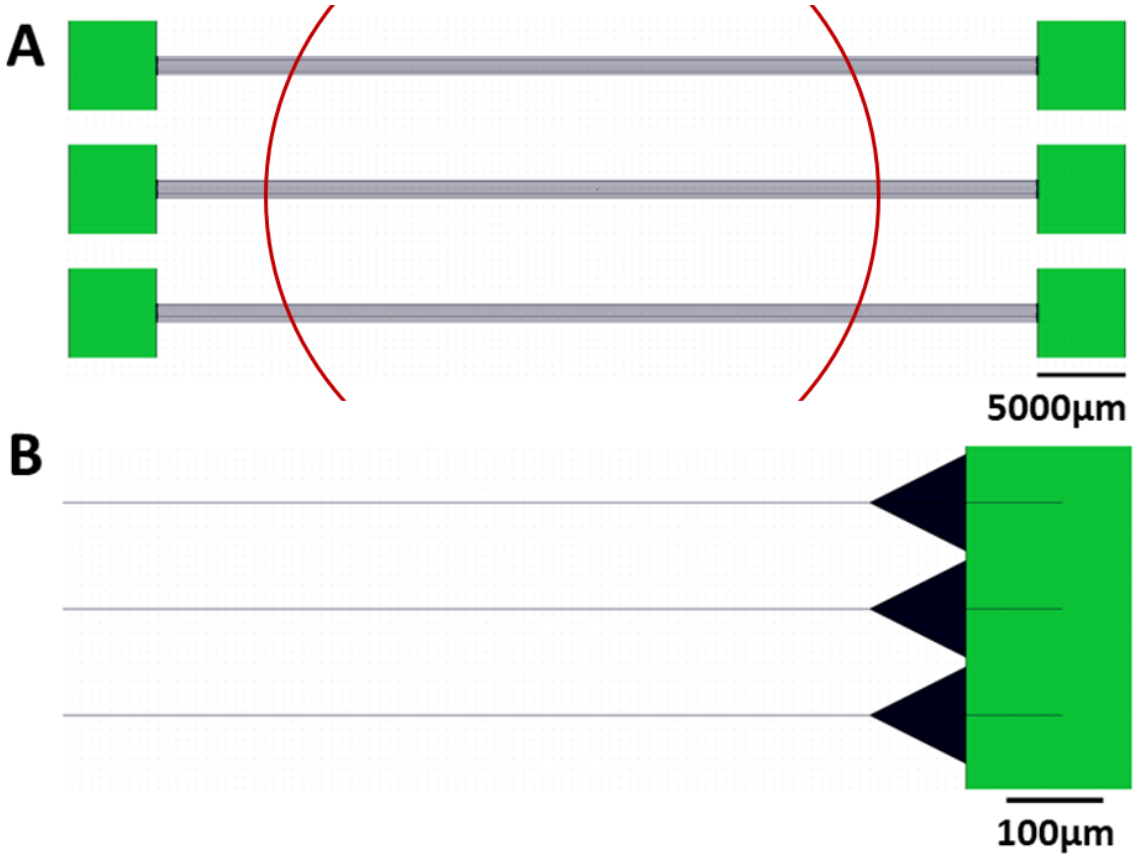


Figure 6.2 : Schéma du réseau d'électrodes traversantes pour la stimulation. (A) Schéma complet du dispositif. Chaque électrode est composée de 10 lignes de 10 µm de large, connectées entre elles par les pads d'accès situés à leurs extrémités. Les limites du puits de culture sont indiquées à l'aide des arcs de cercle rouges (B) Détail de la jonction des lignes aux pads d'accès.

Comme nous le verrons par la suite, une série d'impulsions électriques de 5 ms en forme de créneau de différentes amplitudes (1.5 V ; 2 V et 2.5 V) a été appliquée aux cellules à une fréquence de 1 Hz. L'amplitude 2.5 V est également testée à une fréquence de 10 Hz. Ce signal a été appliqué à l'aide d'un générateur basse fréquence connecté au dispositif IMACA par une pointe posée sur un pad d'accès. La masse est réalisée à l'aide d'une autre pointe plongée dans l'électrolyte. La conséquence de ces impulsions sur l'activité électrique des cellules GH4C1 est imagée à l'aide d'une sonde calcique non ratiométrique : le Cal520-AM (Abcam ; ab171868). Le principe de cette sonde est très similaire à celui de la sonde Fura2-AM et a été détaillé dans le chapitre précédent (*cf.* Chapitre 5, §5.4.1.3). Cette sonde, sélectionnée pour son rapport

signal/bruit amélioré par rapport aux sondes classiques (telles que le Fura2) permet, tout comme ces dernières, de mettre en évidence des variations de concentration de calcium intracellulaires corrélées à la survenue de potentiels d'action. Le Cal520 contient un groupement AM le rendant liposoluble. Ce groupement est éliminé à l'intérieur des cellules de la même manière que pour le Fura2-AM présenté en chapitre 5. La charge est réalisée selon les recommandations du fournisseur par une incubation de 2h00 à 37°C puis de 30 minutes à température ambiante à l'aide Cal520-AM dilué à 10 µmol.L^{-1} dans du milieu de culture. Le milieu de charge contenant la sonde est ensuite éliminé par deux rinçages successifs avec une solution saline équilibrée de Hank avec 20 mmol.L^{-1} de tampon HEPES (HHBS ; AAT Bioquest ; 20011-AAT). Tous les enregistrements présentés dans ce chapitre sont réalisés dans 1 mL de cette solution de HHBS. Le fluorophore du Cal520 est excité à l'aide d'un laser à 490 nm (Cobolt), la lumière du laser est acheminée jusqu'au puits de culture contenant les cellules chargées par une fibre optique. L'illumination est réalisée avec un angle d'incidence de 45° par le haut du puits. Un filtre passe-bande de 500 à 550 nm (Edmund Optics Worldwide) permet de filtrer la lumière enregistrée par la caméra (Optoprim ; PrimeBSI) et donc de bloquer la lumière du laser pouvant être réfléchie vers le capteur. Ainsi, seule l'émission de fluorescence du Cal520 à 520 nm atteint l'objectif de la caméra. La manipulation est réalisée dans l'obscurité au sein d'une *dark box*. La configuration de la manipulation est illustrée en figure 6.3.

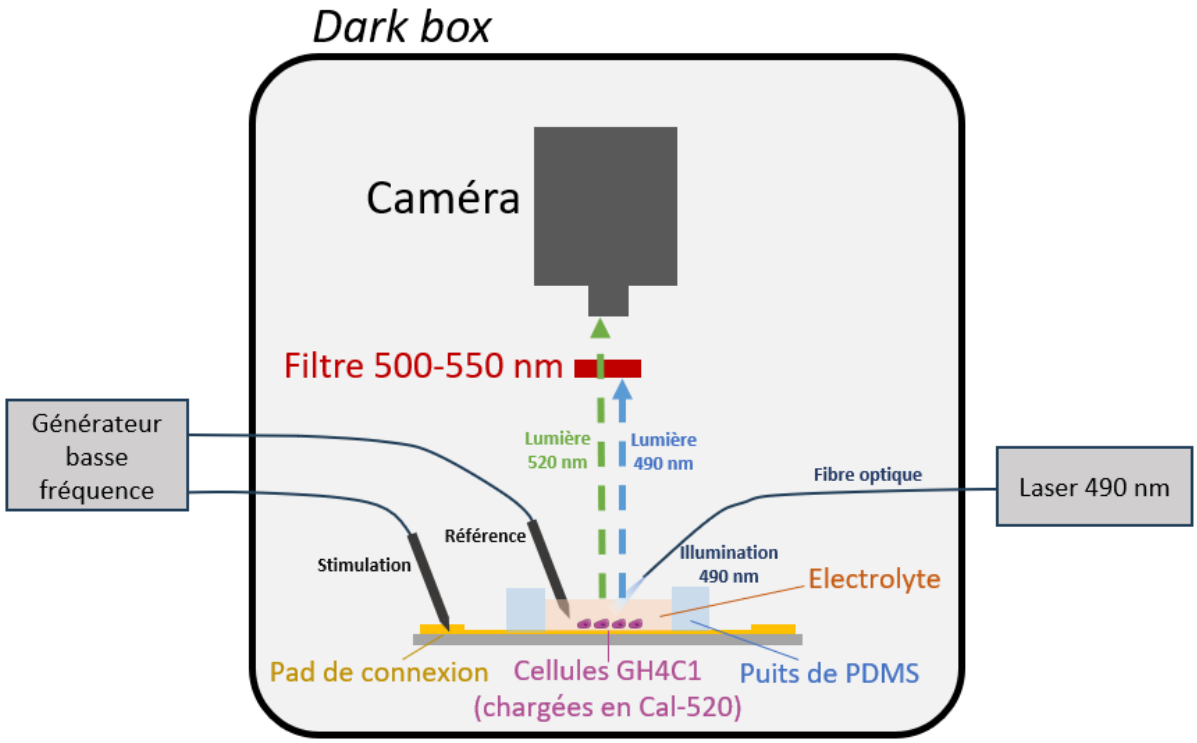


Figure 6.3 : Représentation schématique de la configuration de la manipulation de stimulation des cellules GH4C1 placées dans un dispositif IMACA. La conception comprend l'ensemble du matériel nécessaire à l'imagerie des flux calciques transitoires témoignant de la survenue d'un potentiel d'action (filtre, laser et caméra).

Le résultat de cette manipulation est donné en figure 6.4 où deux courbes sont présentées. La première représente une cellule GH4C1 dont la réponse est représentative de l'ensemble des cellules imagées. La seconde courbe présente une moyenne de l'ensemble des courbes obtenues pour 48 cellules stimulées en parallèle. Le protocole de stimulation est représenté sur le dernier graphique. Le signal utilisé est en forme de créneau. Une impulsion de 1.5 V appliquée à 1 Hz pendant 50 secondes ne provoque pas d'entrée calcique dans le cytosol des cellules GH4C1. Appliquer cette même tension à la même fréquence sur une plus longue période déclenche des transitoires calciques (et donc certainement une activité électrique) qui se poursuivent après l'arrêt du protocole de stimulation. L'application d'impulsions de 2 V à une fréquence d'1 Hz provoque une entrée calcique plus importante que celle initiée à 1 V. A 2.5 V, l'entrée calcique est encore plus importante, et les cellules peinent à extruder le calcium accumulé dans le cytosol. Les impulsions de 2.5 V appliquées à une fréquence de 10 Hz provoquent une entrée calcique non réversible sur la durée de l'enregistrement. L'application de ce protocole de stimulation démontre que les cellules GH4C1 peuvent répondre à une impulsion électrique, et que cette dernière doit être modérée pour ne pas nuire à la physiologie des cellules.

Il est important de noter qu'il s'agit d'une toute première manipulation sur le versant de la stimulation de cellules du type GH4C1. L'objectif est de montrer la faisabilité de la mise en place de la boucle de communication avec ces cellules vivantes comme modèle. Les conditions optimales de stimulations électriques ne sont pas encore déterminées à cet instant. Ce travail nécessite des études complémentaires en suivant plusieurs axes. Le premier axe consiste à utiliser un dispositif RxTx pour appliquer une stimulation biomimétique et réaliser l'enregistrement extracellulaire d'une même cellule. Le second axe réside dans l'utilisation d'un modèle prédictif développé en interne pour définir les meilleures conditions de stimulation. Pour cela, il conviendra de confronter les résultats de simulation avec les résultats expérimentaux afin de définir quels sont les paramètres prépondérants entre la durée, la fréquence et l'amplitude des signaux électriques.

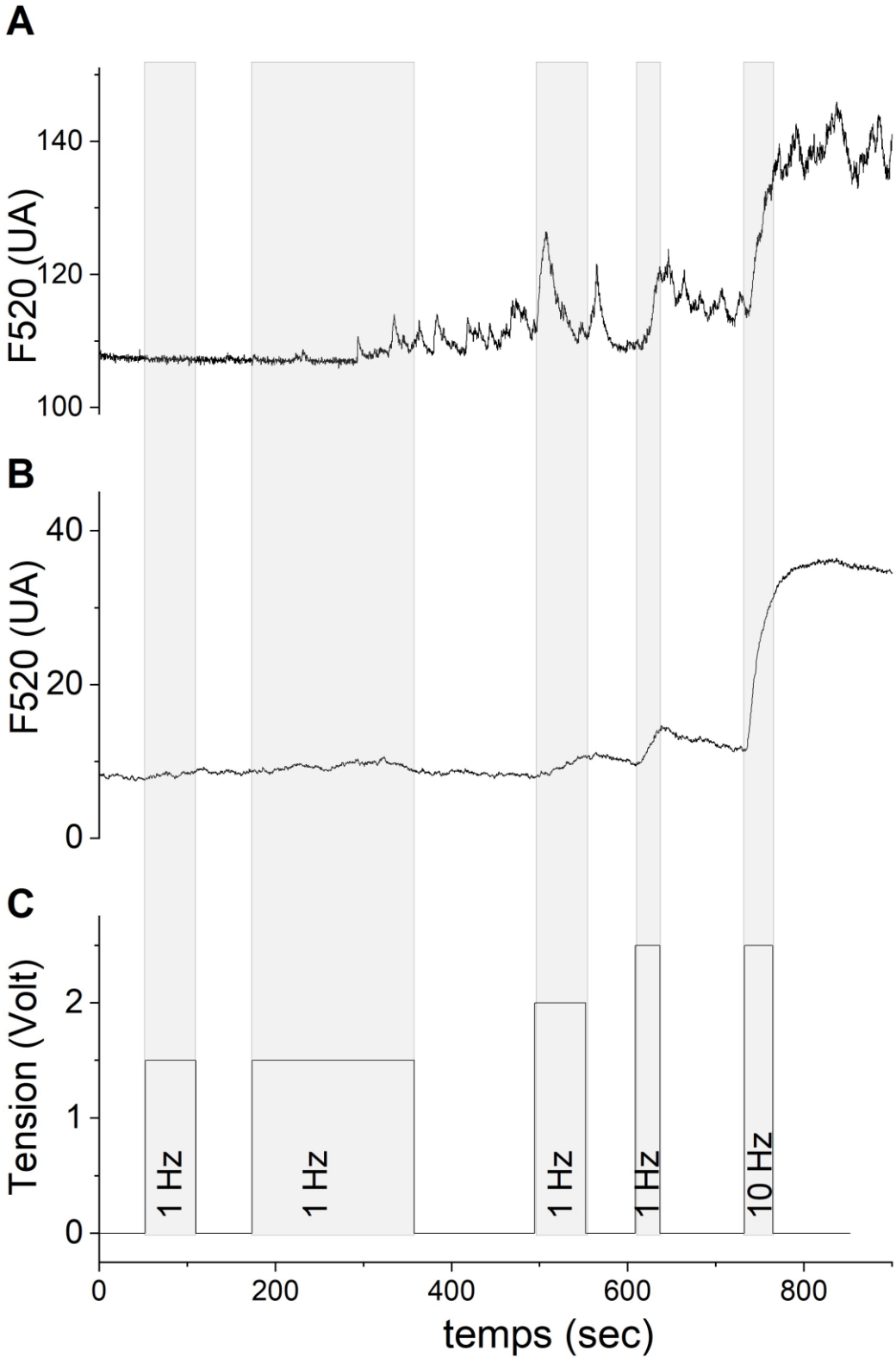


Figure 6.4 : Impact de la stimulation électrique sur la concentration en calcium intracellulaire de cellules GH4C1. (A) Evolution du calcium intracellulaire pour une cellule représentative de l'ensemble de la population testée visualisée à l'aide de Cal520. (B) Moyenne de l'évolution du calcium intracellulaire de 48 cellules visualisée à l'aide de Cal520. (C) Amplitude et fréquence des impulsions de 5 ms appliquées pour stimuler les cellules GH4C1 pendant l'enregistrement.

6.3 Enregistrement de l'activité électrique des cellules GH4C1

La mise en place de la seconde partie de la boucle de communication bidirectionnelle consiste à parvenir à enregistrer par voie électronique la signature électrique des potentiels d'action émis par les cellules GH4C1. Il est important de mentionner que les résultats présentés dans cette partie correspondent à un cliché instantané des différentes expériences d'un travail initié en juin 2022 et toujours en cours. Ainsi, depuis 2022, il y a eu 15 campagnes de mesure en « enregistrement ». Seuls quelques résultats représentatifs de la variété des signatures électriques obtenues sont présentés. Nous avons choisi 3 enregistrements réalisés à des périodes différentes qui montrent une activité électrique des cellules GH4C1 détectée par le biais du système neurobiohybride développé pendant ces travaux de thèse.

Il est important de rappeler que ce sont des enregistrements extracellulaires. En effet, les signaux acquis sur l'électrode passent au travers de différentes couches (membrane, électrolyte, coating, …) comme cela a été présenté précédemment (*cf*. Chapitre 4, §4.2.3, figure 4.8). Par conséquent, la forme des signaux électriques enregistrés et représentés en fonction du temps ne peuvent pas être directement identifiés comme étant des potentiels d'action ce qui complexifie les différentes interprétations. En effet, en fonction de la distance séparant la cellule du plot et du taux de recouvrement de ce dernier par la cellule, la valeur de la résistance de jointure R_{seal} (correspondant à une fuite des signaux vers l'électrolyte, à ne pas confondre avec le R_{seal} d'une pipette de patch (*cf*. Chapitre 5, §5.3.1)) et de la capacité de la membrane attachée C_m varie. Comme cela sera explicité par la suite, ces paramètres influencent le modèle électrique qui évolue entre deux états de détection : la détection directe de la tension intracellulaire ou bien la détection de la dérivée de cette tension.

Dans ce contexte de travail en cours, il est à noter que les paramètres expérimentaux associés aux résultats placés dans ce chapitre sont parfois différents entre les manipulations et qu'ils évoluent encore tant au niveau du matériel de la chaîne d'acquisition qu'au niveau des réglages des paramètres d'acquisition (Bande passante (BP), gain, …). Par conséquent, il convient d'apprécier les résultats dans le cadre d'une même campagne de mesure et d'être vigilant quant à la comparaison des résultats entre eux.

Afin de faire l'état d'avancement des travaux d'enregistrement menés pendant ces travaux de thèse, la suite du chapitre est construite de la façon suivante : une première section présente une caractérisation du bruit intrinsèque relatif à la chaîne de mesure ainsi que la méthode mise en place pour la détection des signaux ; une deuxième partie consiste à présenter l'activité physiologique des cellules par imagerie de fluorescence afin de démontrer qu'il y a bien une activité électrique au sein de cellules GH4C1 mises en culture dans les interfaces neurobiohybrides et placées dans l'enceinte du banc d'enregistrement ; une troisième partie présente des exemples d'enregistrements extracellulaires sélectionnés parmi l'ensemble des traces collectées durant les différentes campagnes; et enfin une quatrième partie présente la

mise en place d'une première forme de boucle de communication bidirectionnelle au travers de travaux de simulation.

6.3.1 Caractéristique du banc : méthode de détection et bruit intrinsèque

Des travaux ont été menés au sein de l'équipe pour permettre la mise en place du banc d'enregistrement capable de détecter les signaux extracellulaires de très faible amplitude des cellules GH4C1 et pour la quantification du bruit. Dans les critères importants, il est à noter que le bruit est multifactoriel. Il est composé du bruit de la chaîne de mesure et, par exemple, de l'amplificateur qui apporte un bruit intrinsèque. Il est aussi lié à l'environnement électromagnétique, par exemple à des ondes qui circulent dans l'atmosphère et dans le bâtiment, venant perturber le signal enregistré. Il est aussi directement impacté par le secteur (220 V) qui apporte des perturbations notamment à la fréquence 50 Hz, et aux harmoniques supérieures.

Un effort particulier a ainsi été apporté pour détecter la tension de très faible amplitude aux bornes de l'électrode recouverte du *coating* et au contact de la cellule. Le signal qui est capté au niveau de l'électrode est de très faible amplitude. S'il est noyé dans le bruit, il ne sera pas possible d'identifier la signature électrique des cellules. Pour cela, une étude a été menée pour choisir l'étage d'amplification du signal. Pour pouvoir réaliser une détection en tension, il est primordial de choisir un dispositif amplificateur avec une impédance d'entrée la plus élevée possible.

6.3.2 Description de la chaîne de mesure et principe de détection

Une description générale de la chaîne de mesure est présentée sur la figure 6.5 pour la partie « enregistrement ». Cette dernière est composée d'un premier amplificateur suiveur (gain = 1) qui présente une très grande impédance d'entrée. Il s'agit d'un critère important pour la détection de la tension au niveau de l'électrode, le principe (détaillé ensuite) s'appuie sur le fait qu'il n'y a pas de courant qui circule jusqu'au premier étage de la chaîne. Il y a ensuite un second amplificateur qui a pour rôle de porter le signal dans une plage optimale pour le détecteur qui permet la visualisation et le traitement des enregistrements. Le gain de cet amplificateur et la bande de fréquence (filtre) sont des paramètres qui sont régulièrement ajustés aux cours des expérimentations. Le filtre est un circuit linéaire qui permet de sélectionner la plage de fréquences de travail appropriée au signal à observer et de rejeter tout signal en dehors de cette plage. Le gain de l'amplificateur peut varier entre G = 10 à 50.000 et la bande passante du filtre de l'amplificateur va de 0.03 Hz à 1 MHz. Le tout est complété par un système de détection acquisition des signaux de chez *National Instruments* associé à un module graphique pour la visualisation et le traitement a postériori du signal.

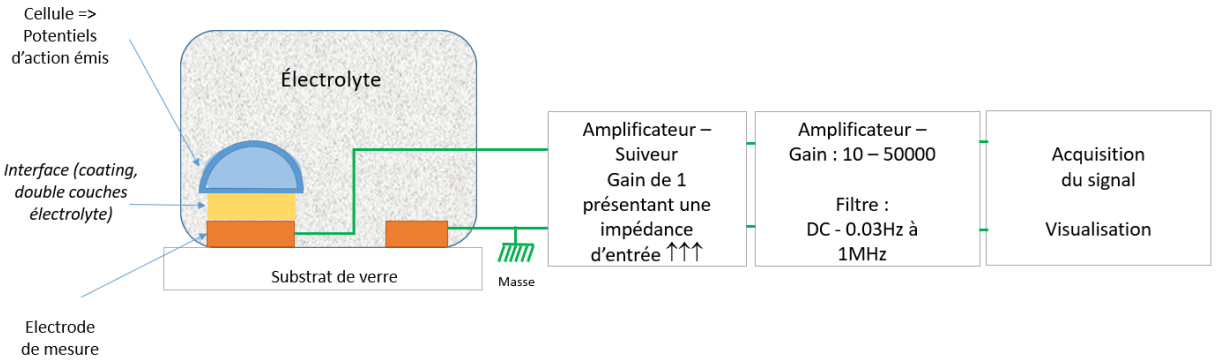


Figure 6.5 : Représentation schématique de la chaîne de mesures et des fonctions électroniques pour la partie enregistrement.

La figure 6.6 permet d'expliciter de manière schématique la méthode de détection. Le premier étage amplificateur possédant une très grande impédance d'entrée (cas d'un circuit ouvert), il n'y a pas de courant qui circule jusqu'à lui (*I=0*), la tension détectée $V_{détectée}\ (t)$ correspond alors à la tension $V_i(t)$ située entre le *coating* sur l'électrode et la membrane attachée. En effet, le courant qui traverse la capacité C_i est tel que $i = C \times \frac{dv}{dt}$ et donc la tension aux bornes de la capacité est telle que $v = \frac{1}{C} \int i\ dt$. Par conséquent, si i=0 alors v=0, ce qui veut dire qu'il n'y a pas de chute de potentiel aux bornes de la capacité C_i et donc que les potentiels V_i et $V_{détectée}$ sont égaux à une constante d'intégration près.

Le potentiel intracellulaire $V_{intra}(t)$ varie en fonction du temps au rythme de la génération des potentiels d'action. Avant ces événements de génération, on peut considérer le système au repos et donc $V_i=0$. En raison de la variation du potentiel intracellulaire $V_{intra}(t)$, le potentiel V_i va donc varier au cours du temps et dans la mesure où $V_i = V_{détectée}$, c'est cette variation qui sera détectée et mesurée par la chaîne d'enregistrement.

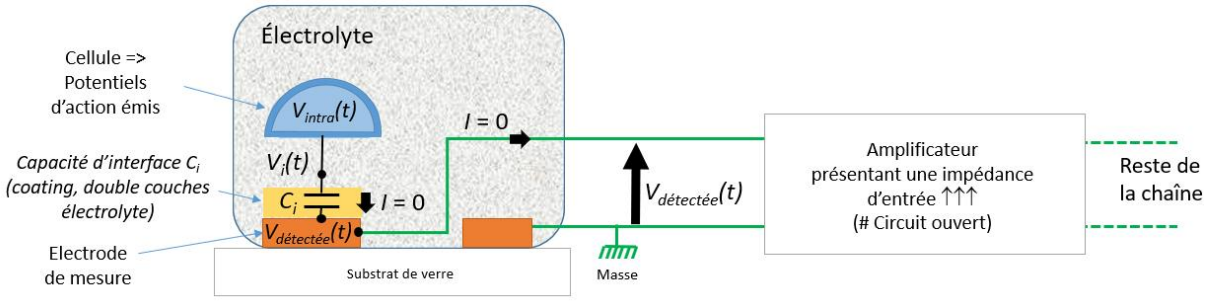


Figure 6.6 : Principe de la méthode de détection mise en œuvre pour l'enregistrement des signaux extracellulaires.

Pour poursuivre le raisonnement, il convient de s'appuyer sur les travaux antérieurs de M. Dimitri Henniquau dans le cadre de sa thèse (Henniquau, 2021). Ce dernier a implémenté sous le logiciel LTSPICE, un modèle de membrane neuronale représentant le neurone vivant, interfacé avec une électrode métallique. Ce modèle intègre les éléments parasites liés à l'interface. De plus, la membrane neuronale est considérée comme un modèle paramétrique tenant compte du positionnement et de la configuration en 3D du neurone vivant. Il y a ainsi deux composantes pour modéliser la surface de la membrane 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 LTSPICE. La partie en regard de l'électrode est appelée « membrane attachée » et celle qui se retrouve dans l'électrolyte est appelée « membrane libre » comme le montre la figure 6.7 ci-après. Il est à noter que *la membrane neuronale d'un neurone vivant 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 sont donc reliées.*

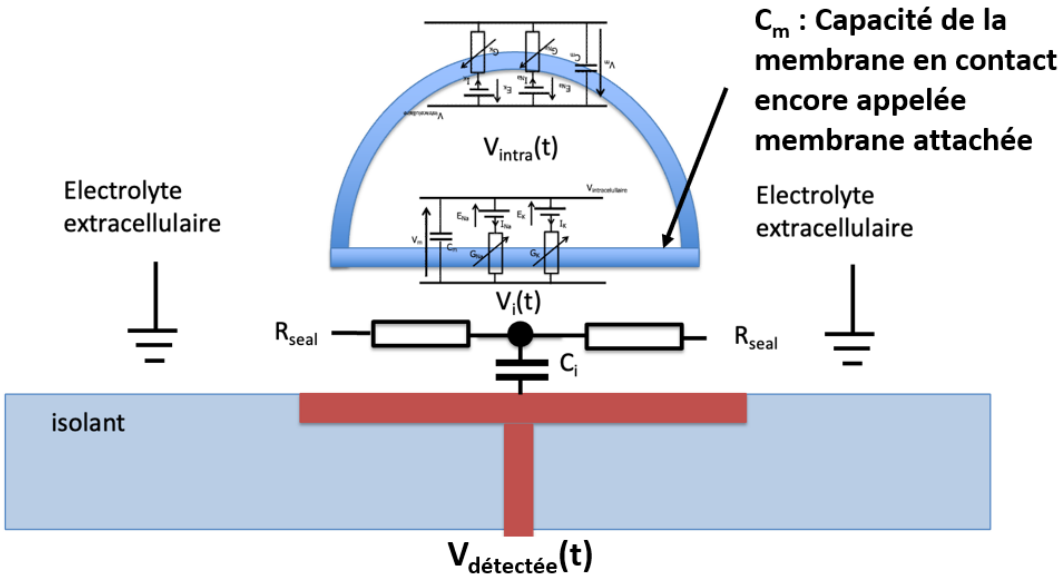


Figure 6.7 : Schéma électrique équivalent de l'interface électrode-cellule. La surface rouge correspond à l'électrode. La membrane cellulaire est représentée en bleu. R_{seal} : Résistance de jointure. $V_{intra}(t)$: potentiel intracellulaire. $V_i(t)$: tension à l'interface. C_i : Capacité d'interface.

A partir de ce modèle, il est possible de faire un focus sur deux paramètres clefs de la détection, à savoir la résistance de jointure R_{seal} et la capacité de la membrane C_m du neurone attachée au plot. La définition de R_{seal} s'apprécie au travers des indications suivantes : « *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 entraine 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. » En ce qui concerne la capacité de membrane C_m qui intervient dans la suite de la démonstration, celle-ci est associée à la partie de la membrane du neurone qui est spécifiquement liée à la surface en regard du plot. Il s'agit ici de la membrane attachée.

Ces deux grandeurs R_{seal} et C_m sont très importantes car elles conditionnent fortement la détection du signal comme cela sera explicité ci-après. Si la cellule est éloignée du plot et/ou si elle ne le recouvre pas correctement, alors ces deux grandeurs auront des valeurs faibles, et leur produit qui intervient dans la suite de la démonstration le sera également. Pour bénéficier de valeurs élevées pour ces deux entités, il faut impérativement une très bonne adhésion de la cellule et également un fort taux d'« écrasement » de cette dernière pour bénéficier d'un taux de recouvrement élevé sur l'électrode permettant d'enregistrer le signal.

A partir de ces éléments, il convient maintenant de s'intéresser à l'interface située entre l'intérieur de la cellule défini par $V_{intra}(t)$ et l'extérieur de la cellule au voisinage direct de la capacité C_i défini par $V_i(t)$. Puisqu'il n'y a pas de courant qui circule jusqu'au premier amplificateur de la chaîne d'enregistrement, il est possible de définir une équation de continuité du courant uniquement entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule reliée par la résistance R_{seal} à l'électrolyte comme le montre la figure 6.8. Cette équation de continuité du courant donnée ci-après est la résultante du courant qui circule au travers de la membrane attachée et du courant qui circule dans R_{seal}. Elle tient compte de la partie de la membrane attachée de la cellule au travers de sa capacité C_m, de la différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule $V_{intra}(t)$-$V_i(t)$ et du courant de fuite dans l'électrolyte corrélé directement à la résistance de fuite R_{seal}.

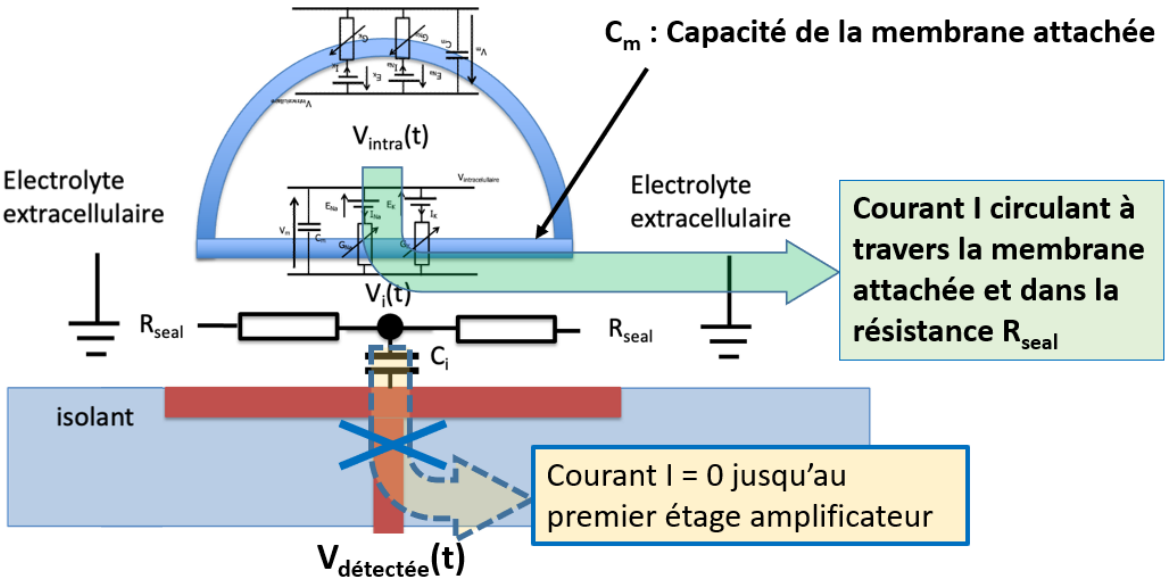


Figure 6.8 : Mise en évidence du courant dirigé vers l'électrolyte par la résistance de jointure R*seal* et de son impact sur les signaux détectés au niveau de l'électrode. La surface rouge correspond à l'électrode. La membrane cellulaire est représentée en bleu. R_{seal} : Résistance de jointure. $V_{intra}(t)$: potentiel intracellulaire. $V_i(t)$: tension à l'interface. C_i : Capacité d'interface.

Le courant qui circule au travers de la membrane est défini par le terme de gauche. Il est égal au courant qui passe dans la résistance R_{seal} défini par le terme de droite. Avec C_m qui est la capacité de la partie attachée de la cellule, les variations de V_i sont régies par l'équation différentielle simple suivante :

$$\underbrace{C_m \frac{d(V_{intra} - V_i)}{dt}}_{\text{I(t) au travers de la membrane}} = \underbrace{\frac{V_i}{R_{seal}}}_{\text{I(t) dans l'électrolyte}}$$

Cette dernière peut alors s'écrire de la façon suivante :

$$R_{seal} C_m \frac{dV_{intra}}{dt} = R_{seal} C_m \frac{dV_i}{dt} + V_i$$

Il est possible d'analyser cette équation et d'en tirer des tendances en tenant compte des variations du potentiel d'action V_{intra} qui est caractérisé par son amplitude maximale et sa durée t_{PA}. Comme V_i, ainsi que les dérivées de V_{intra} et de V_i par rapport au temps, varient à l'échelle de cette durée t_{PA}, deux cas limites peuvent être envisagés : soit le produit $R_{seal} \times C_m$ (homogène à un temps) est petit par rapport à t_{PA} et dans ce cas le terme $Rseal \times Cm \times \frac{dVi}{dt}$ est négligeable par rapport à V_i, soit le produit $Rseal \times Cm$ est grand devant t_{PA} et dans ce cas, c'est le terme V_i qui est négligeable devant $Rseal \times Cm \times \frac{dVi}{dt}$.

- La constante de temps $R_{seal} C_m$ est petite par rapport à t_{PA}. Le premier terme du membre de droite est négligeable, et on obtient alors :

  $$R_{seal} C_m \frac{dV_{intra}}{dt} \approx V_i$$

  => Dans ce cas, le potentiel détecté $V_{detectée}$=V_i correspond à la dérivée temporelle de V_{intra} affecté du coefficient de multiplication $R_{seal} C_m$

- La constante de temps $R_{seal} C_m$ est grande par rapport à t_{PA}. Le deuxième terme du membre de droite est négligeable et on obtient alors :

  $$R_{seal} C_m \frac{dV_{intra}}{dt} = R_{seal} C_m \frac{dV_i}{dt}$$

  => Dans ce cas, le potentiel détecté $V_{detectée}$ = V_i correspond à V_{intra} (à une constante près, la valeur de V_{intra} au repos). Ce cas est évidemment souhaitable, mais il nécessite notamment que la valeur de R_{seal} soit très élevée ce qui implique une très bonne adhérence entre la cellule et le plot.

En conclusion, **la tension $V_i(t)$ et donc la tension $V_{détectée}(t)$ correspondant aux enregistrements présentés dans la suite de ce chapitre varie entre ces deux solutions au cours d'une acquisition. Il est à noter que le fait de ne pas connaître exactement la valeur de R_{seal} et de la capacité de membrane attachée C_m complexifient un peu plus les analyses des enregistrements.** Enfin, il est également très important d'ajouter que pour détecter ces signaux extracellulaires, il faut veiller à ce que l'ensemble de l'électrolyte soit bien à la masse (potentiel 0V). Cela est réalisé dans notre cas grâce au design des électrodes spécifiques qui sont au contact de l'électrolyte assurant l'équi-potentialité de l'électrolyte en dehors des cellules.

6.3.3 Caractérisation de la chaîne d'enregistrement : artéfacts et mesure de bruit

Au-delà de la méthode de détection, il faut tenir compte également des artéfacts de mesures qui pourraient se produire pendant les enregistrements et du rapport signal/bruit associé à la chaîne de mesure. En effet, il est important que la tension détectée ne soit pas impactée par des signaux extérieurs à la manipulation et noyée dans le bruit dont les composantes sont définies plus haut. Par conséquent, deux études sont régulièrement conduites : la première est la mesure sur un dispositif neurobiohybride, pour un temps suffisamment long, de la tension détectée sur les électrodes sans activité cellulaire ; la seconde correspond à la détermination de la densité spectrale de la tension de bruit, permettant de calculer le rapport signal sur bruit et de vérifier la qualité de la détection.

6.3.3.1 Mesure de la tension dans un dispositif sur un temps long

Pour réaliser cette étude, plusieurs enregistrements sont réalisés sur un temps long sans activité électrique d'origine biologique. Une de ces acquisitions, réalisée sur une durée de 10 minutes, est présentée figure 6.9. Cette mesure, réalisée très régulièrement permet de vérifier qu'il n'y a pas de bruit extérieur ajouté à la manipulation et enlève de fait la possibilité d'artefacts de mesure. L'inspection du tracé de 0.2 s de durée suggère peu d'interférences de type 50 Hz. Le gain utilisé ici est de 5000 et la plage de fréquence est de 0.03-1 KHz. Il est également intéressant de noter la dynamique du signal et la durée d'étalement des pics de tension. Ainsi, le pic apparu autour des 449 secondes est agrandi, afin de montrer qu'il ne peut pas être confondu avec un signal du type potentiel d'action, levant toute ambiguïté pour la suite des exploitations.

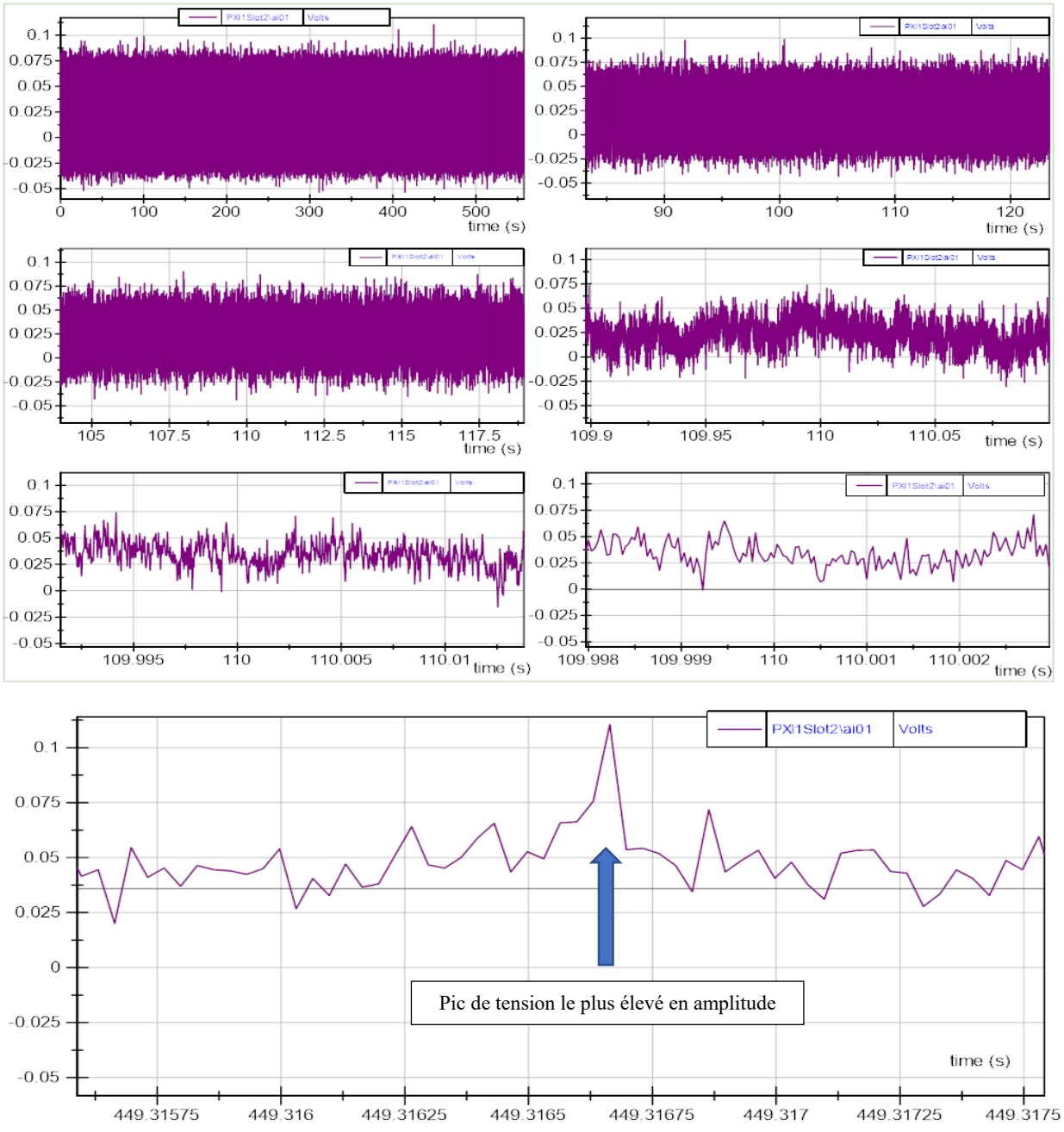


Figure 6.9 : Enregistrement du signal dans un dispositif neurobiohybride sans activité biologique pendant une période de dix minutes afin de mettre en évidence l'absence d'artéfact significatif. La durée totale de cette portion de l'enregistrement est de 1.7 millisecondes (durée calculée entre le premier et le dernier incrément numéroté de l'axe des abscisses : de 449.31575 secondes à 449.31750 secondes).

6.3.3.2 Mesure de bruit

A l'instant où ce propos est rédigé, de nouveaux aménagements du banc ont été réalisés pour diminuer la tension de bruit et améliorer la détection du signal extracellulaire. La caractérisation en bruit à l'aide d'un mesureur de bruit de la chaîne d'enregistrement est réalisée très régulièrement. Les dernières mesures donnent une nouvelle information sur la valeur minimale de la tension pic-pic (pp) détectable (non noyée dans le bruit) au niveau de l'électrode

recouverte de *coating* et en contact avec l'électrolyte. Ainsi, la tension pic-pic de bruit ramenée au niveau de l'électrode de détection (avant amplification) est donc $V_{bruit}pp$=8,76 µVpp. Le détail des calculs justifiant ce résultat est placé en annexe 8. A partir de cette tension pic-pic de bruit, il est possible de déterminer le rapport signal/bruit pour les enregistrements extracellulaires présentés dans la suite de ce chapitre. Cela permettra de définir la qualité de la détection des potentiels d'action que nous souhaitons améliorer de façon constante.

6.4 Vérification de l'activité physiologique des cellules par imagerie de fluorescence

Toujours dans le but de limiter les possibles artéfacts de mesures et d'assurer la validité des enregistrements, nous nous assurons que les cellules GH4C1 émettent des potentiels d'action. Pour cela, un protocole de charge de sonde calcique (Cal520) a été mis en œuvre de manière routinière lors de chaque campagne d'enregistrement des signaux extracellulaires par le biais de l'interface neurobiohybride. Ainsi, avant de démarrer les enregistrements électriques et à différents moments de l'expérience, des enregistrements des concentrations de calcium libre intracellulaire sont réalisés afin de vérifier la fonctionnalité des cellules GH4C1. A ce stade de l'étude, il n'a pas été possible de réaliser cet enregistrement des variations calciques en même temps que l'enregistrement par voie électronique (ce qui aurait permis une corrélation directe entre un phénomène biologique et les signaux enregistrés par voie électronique) en raison des perturbations électriques apportées par le fonctionnement de la caméra et du laser. Ces enregistrements de variations de la concentration calcique intracellulaire ont donc été réalisés plusieurs fois au cours de chaque manipulation. Pour illustration, la figure 6.10 présente des photographies de cellules GH4C1 dans une interface neurobiohybride RxTx placée au sein du banc d'enregistrement. La première image est prise en champ clair et la seconde est extraite d'un enregistrement Cal520.

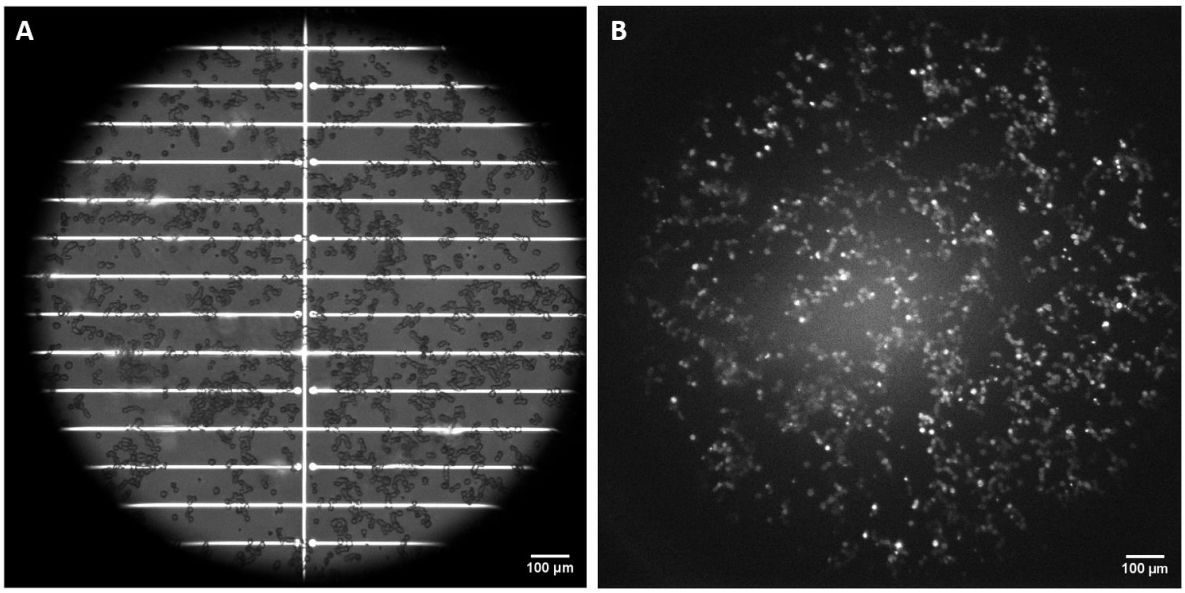


Figure 6.10 : Photographies des cellules GH4C1 dans l'interface RxTx. (A) Photographie en champ clair. Le réseau d'électrodes correspond aux structures blanches. Les cellules sont les points circulaires gris foncé répartis sur l'ensemble de la surface. La photographie a été prise sur un champ au centre du puits. (B) Photographie des cellules en cours d'enregistrement de variations calciques à l'aide du Cal520. Le champ imagé est le même que celui présenté en figure A. Les cellules correspondent aux points gris et blancs. Le réseau d'électrodes n'est pas visible.

Il est important de préciser qu'à ce jour, les conditions expérimentales du banc d'enregistrement ne sont pas encore pleinement optimisées. En effet, l'enceinte de la *dark box* où sont placées les interfaces neurobiohybrides contenant les cellules à enregistrer pourrait être équipée d'appareils qui favoriseraient le maintien sur un temps plus long des conditions physiologiques de sorte à permettre le maintien de la température à 37°C et la stabilisation de l'hygrométrie et des taux de CO_2 et d'O_2. En raison de cela, les temps d'acquisition des signaux extracellulaires sont effectués sur des durées limitées raisonnables (inférieur à 2h après la sortie de l'incubateur). Par ailleurs, il est à noter que nous prévoyons d'implémenter ces améliorations sur le banc pour les prochaines campagnes.

La figure 6.11 présente un exemple d'enregistrement des variations de la concentration intracellulaire de calcium imagées avec la sonde calcique Cal520. Le premier enregistrement correspond aux variations enregistrées sur une cellule GH4C1 (sélectionnée à titre d'exemple). Cette trace est représentative de l'ensemble des cellules de l'ensemble des manipulations réalisées. Une activité pulsatile est visible, ce qui est cohérent avec les enregistrements réalisés en patch-clamp et en imagerie calcique avec la sonde Fura2 présentés dans le chapitre précédent. L'ajout de KCl à 100 mmol.L^{-1} a pour effet de dépolariser les membranes, les cellules ne peuvent ensuite plus émettre de potentiels d'action et leur concentration en calcium intracellulaire ne varie plus. Ce phénomène est illustré sur le graphique B où chaque tracé représente les variations calciques intracellulaires d'une cellule unique : aucune d'entre elles ne présente d'importantes variations suggérant l'arrêt des potentiels d'action. Ce graphique a été réalisé sur les mêmes cellules que celles ayant permis d'établir le premier graphique. L'ajout de

KCl ayant inhibé la présence des pics de variation calcique, il est donc possible de conclure que ces derniers étaient bien corrélés à l'émission de potentiels d'action.

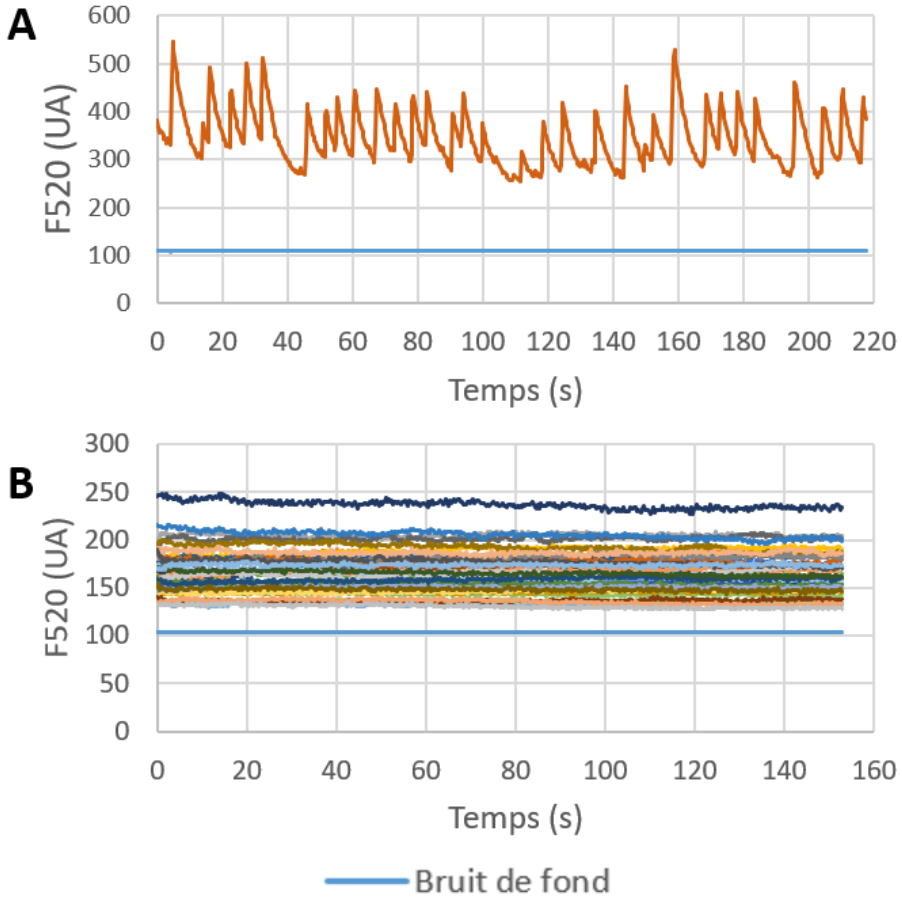


Figure 6.11 : Impact du chlorure de potassium à 100 mmol.L^{-1} sur les oscillations calciques intracellulaires de cellules GH4C1 cultivées dans une interface neurobiohybride placée dans les conditions d'enregistrement électrique. Les variations de concentration calciques sont imagées à l'aide de Cal520. (A) Oscillations de calcium pour une cellule GH4C1 représentative de l'ensemble des cellules du puits. (B) Illustration de l'absence d'oscillation après ajout de chlorure de potassium à 100 mmol.L^{-1} sur l'ensemble des cellules du champ imagé. Les deux tracés ont été obtenus lors de la même manipulation.

La figure 6.12 présente également un exemple d'enregistrement des variations intracellulaires de calcium imagées avec la sonde calcique Cal520 provenant d'une autre manipulation que les traces présentées sur la figure précédente. Le graphique A présente un exemple de trace obtenue pour une cellule GH4C1 placée dans les conditions d'enregistrement représentatives de l'ensemble de la culture. Le graphique B présente l'impact de l'acide éthylèneglycol- bis(β-aminoéthyl)-N,N,N′,N′-tétraacétique (EGTA) sur les variations calciques intracellulaires de cellules GH4C1. L'EGTA a été appliqué à une concentration de 2 mmol.L^{-1}. Cette molécule a la propriété de chélater (≈ piéger) les ions calcium du milieu extracellulaire, les rendant indisponibles pour les cellules. Sa concentration étant supérieure à la concentration de calcium présent dans le milieu extracellulaire, tous ces ions devraient théoriquement être

chélatés (chaque molécule d'EGTA pouvant capturer 1 ion Ca^{2+}). Ainsi, aucune variation calcique ne peut être observée après ajout, ce qui confirme que les oscillations repérées sur le graphique A étaient bien associées à une détection de calcium par le Cal520 (et n'étaient donc pas du bruit ou des artefacts). De plus, comme cela a été démontré dans la littérature et vérifié dans le chapitre précédent, la phase de dépolarisation des GH4C1 est majoritairement due à une entrée de calcium dans l'espace intracellulaire (Dubinsky & Oxford, 1984b). L'EGTA a donc vraisemblablement éliminé toute activité électrique des GH4C1. Il est donc, tout comme pour la figure précédente, possible de conclure que les signaux identifiés en figure A sont bien associés à des potentiels d'action émis par les cellules GH4C1.

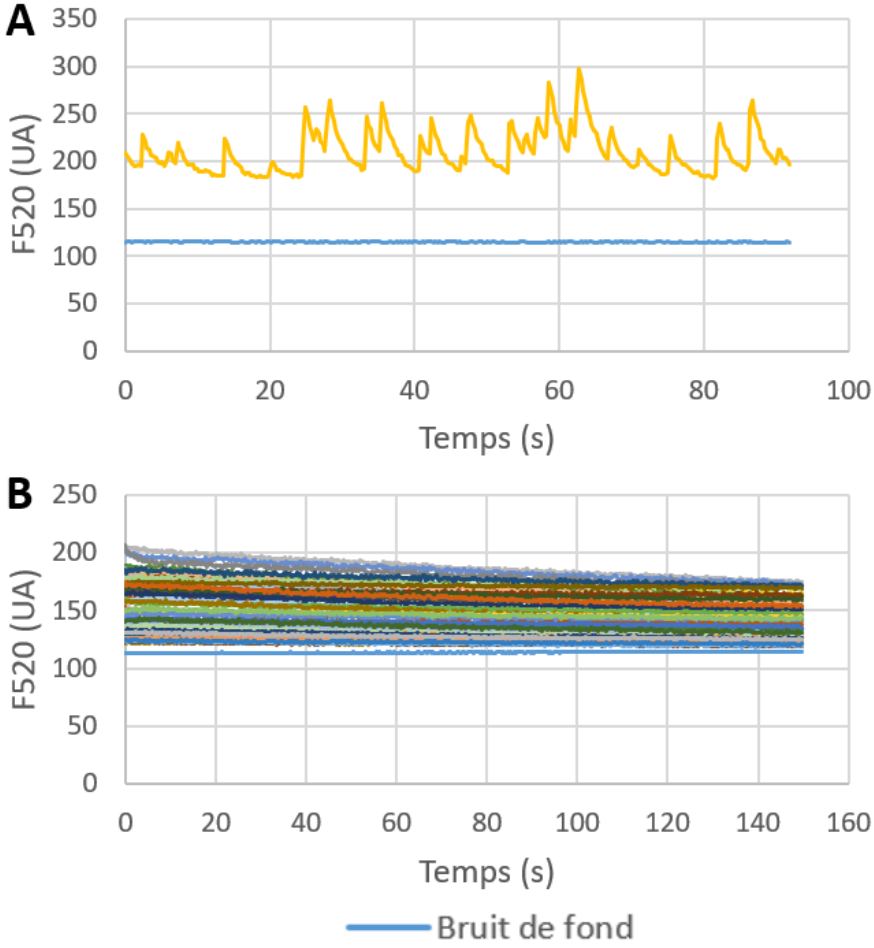


Figure 6.12 : Impact de l'EGTA à 2 mmol.L^{-1} sur les oscillations calciques intracellulaires de cellules GH4C1 cultivées dans une interface neurobiohybride placée dans les conditions d'enregistrement électrique. Les variations de concentration calciques sont imagées à l'aide de Cal520. (A) Oscillations pour une cellule GH4C1 représentative de l'ensemble des cellules du puits. (B) Illustration de l'absence d'oscillation après ajout d'acide éthylèneglycol- bis(β-aminoéthyl)-N,N,N′,N′-tétraacétique (EGTA) à 2 mmol.L^{-1} sur l'ensemble des cellules du champ imagé. Les deux tracés ont été obtenus lors de la même manipulation.

Ces vérifications ont été régulièrement réalisées au cours de la campagne de manipulations d'enregistrement. A ce jour, toutes les cellules placées dans les conditions d'enregistrement du banc et dont l'activité a été vérifiée à l'aide de Cal520 présentaient des oscillations calciques.

6.5 Enregistrements extracellulaires caractéristiques

Cette section du chapitre a vocation à présenter les enregistrements caractéristiques sélectionnés pour illustrer les signaux obtenus lors des campagnes d'enregistrement menées à l'aide d'un banc électronique. L'ensemble des manipulations a été réalisé avec des cellules GH4C1 cultivées dans des dispositifs de type RxTx dont la conception et les méthodes de fabrication ont été présentées dans un chapitre précédent (*cf*. Chapitre 4, §4.3). L'ensemble des traces présentées dans cette section a été enregistré au maximum 2h00 après la sortie des cellules de l'incubateur. En l'absence d'indication contraire, les électrodes enregistrées comportaient toujours à leur surface une cellule préalablement identifiée comme étant active par un enregistrement des oscillations calciques (Cal520). Cette section est découpée en 4 parties. Dans un premier temps, les courbes sélectionnées et les conditions d'enregistrement spécifiques pour chacune d'elle sont présentées. Dans un deuxième temps, les signaux obtenus sont comparés aux enregistrements obtenus en patch-clamp. Dans un troisième temps, l'amplitude des signaux observés est objectivée par rapport au niveau de bruit. Enfin, dans un quatrième temps, des résultats de simulation de la boucle de communication bidirectionnelle sont présentés. Ces travaux de simulation utilisent des données provenant d'enregistrements de signaux extracellulaires afin de modéliser le premier neurone excitateur.

6.5.1 Présentation des courbes

Trois campagnes d'enregistrement ont été sélectionnées pour être présentées dans ce manuscrit. La première correspond à des cellules GH4C1 non chargées en Cal520 ; la deuxième correspond à des cellules GH4C1 chargées en Cal520 et la troisième correspond à des cellules GH4C1 chargées en Cal520 dont l'activité a été modulée à l'aide de 4-AP. Les courbes présentées illustrent l'ensemble des signatures électriques sortant du bruit repérées dans chacun des enregistrements.

6.5.1.1 Campagne d'enregistrements A : enregistrement en conditions basales (= sans application de molécules modulatrices de l'activité des cellules GH4C1)

Cette campagne réalisée avec des cellules GH4C1 non chargées en Cal520 a été menée le 5 juillet 2022. Les paramètres d'acquisition en lien avec les réglages des éléments de la chaîne sont : BP (0,3 Hz - 100 Hz) - Gain 10000 - Couplage AC.

Sur la figure 6.13, le signal électrique en Volt acquis sur la voie « ai1 » est représenté en fonction du temps. Nous pouvons ainsi mettre en évidence une réelle activité électrique entre 10s et 25s. Cette zone d'intérêt est ensuite agrandie dans les différents cadrans afin de montrer au mieux l'allure du signal enregistré. Les figures 6.14 et 6.15 à l'aide d'agrandissements pour

des plages de temps centrées autour de 11s et de 20s permettent de mettre en évidence la forme des pics de tension et leur étalement temporel.

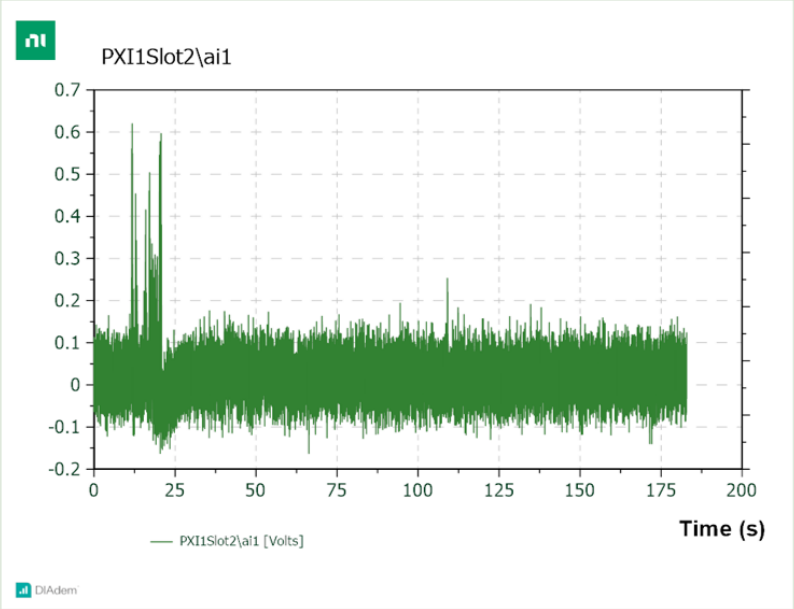


Figure 6.13 : Enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure A pendant 2 minutes 55 secondes - BP (0,3 Hz - 100 Hz) - Gain 10000. Mise en évidence de la détection de l'activité électrique entre 10 secondes et 25 secondes.

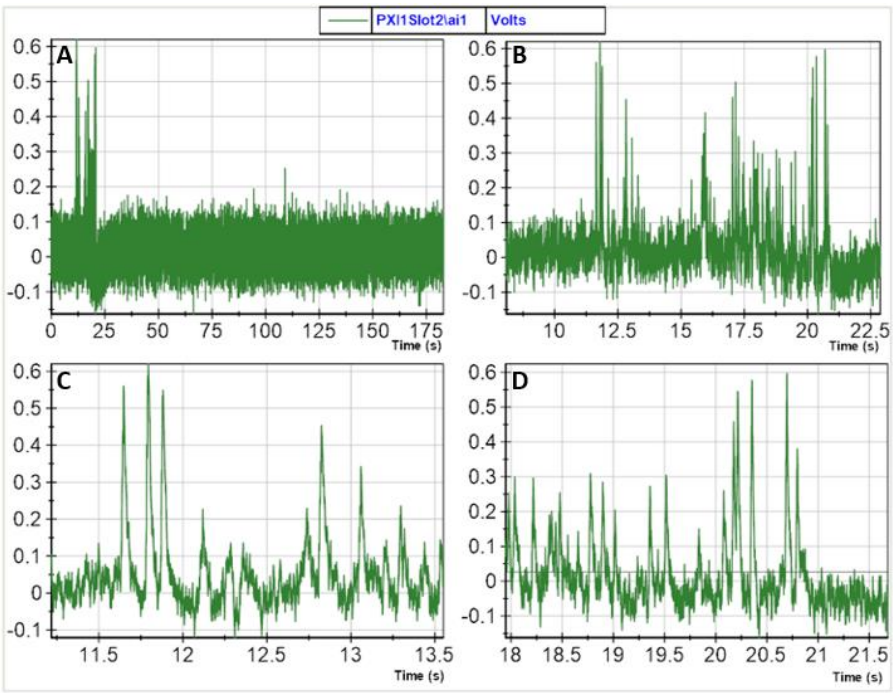


Figure 6.14 : Analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure A. - BP (0,3 Hz - 100 Hz) - Gain 10000. (A) Enregistrement complet de 2 minutes 55 secondes. Mise en évidence de la forme des pics de tension et de leur étalement à l'aide d'agrandissements pour une plage de temps de (B) 15 secondes centrées autour de 15 secondes, (C) pour une plage de temps de 2.5 secondes centrée autour de 12.5 secondes et (D) pour une plage de temps de 3.5 secondes centrée autour de 19.75 secondes.

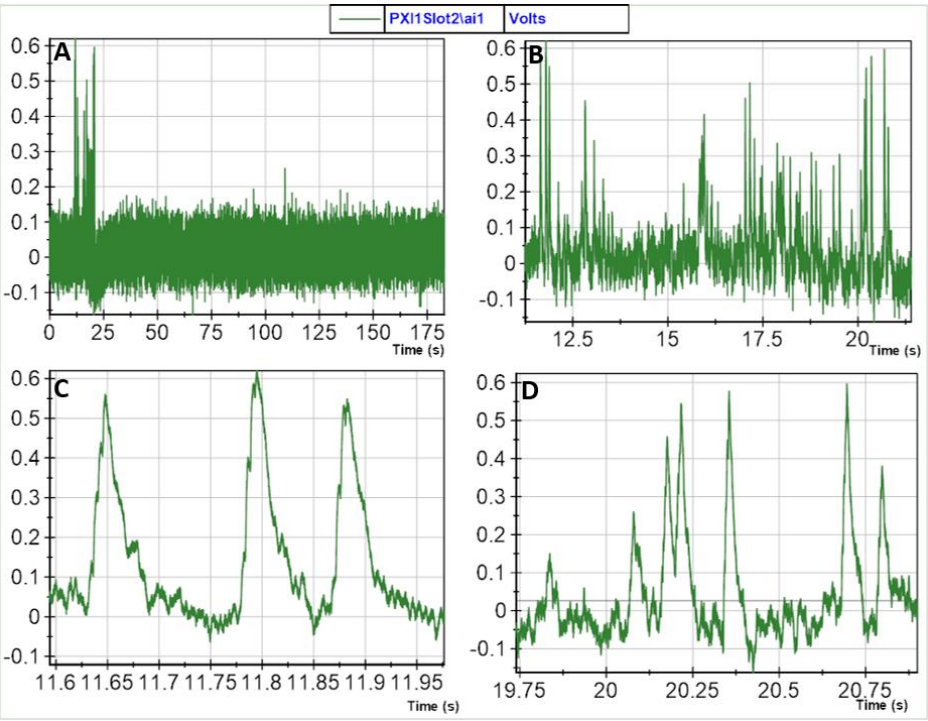


Figure 6.15 : Agrandissements complémentaires pour l'analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure A. - BP (0,3 Hz - 100 Hz) - Gain 10000. (A) Enregistrement complet d'une durée de 2 minutes et 55 secondes. Mise en évidence de la forme des pics de tension et de leur étalement à l'aide d'agrandissements pour une (B) plage de temps de 10 secondes centrées autour de 16 secondes, (C) pour une plage de temps de 0.4 seconde centrée autour de 11.8 secondes et (D) pour une plage de temps de 1 seconde centrée autour de 20.25 secondes.

6.5.1.2 Campagne d'enregistrements B : enregistrement en conditions basales avec charge Cal520

Cette campagne réalisée avec des cellules GH4C1 chargées en Cal520 a été menée le 9 juin 2023. Les paramètres d'acquisition en lien avec les réglages des éléments de la chaîne sont : BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000 - Couplage AC.

Sur la figure 6.16, le signal électrique en Volt acquis sur la voie « ai0 » est représenté en fonction du temps. Une activité électrique est visible sur l'ensemble de la trace. Cette trace a été comparée à une trace enregistrée sur une autre électrode pour laquelle aucune activité électrique n'a été enregistrée (voir figure 6.17), ce qui suggère que les signaux observés résultent bien d'une activité électrique associée à la présence d'une cellule GH4C1 suffisamment proche de l'électrode pour être détectée. Différentes zones d'intérêt sont ensuite définies et agrandies dans les différents cadrans présentés en figure 6.18, 6.19, 6.20 et 6.21 afin de montrer au mieux l'allure du signal enregistré ainsi que la forme des pics de tension et leur étalement temporel.

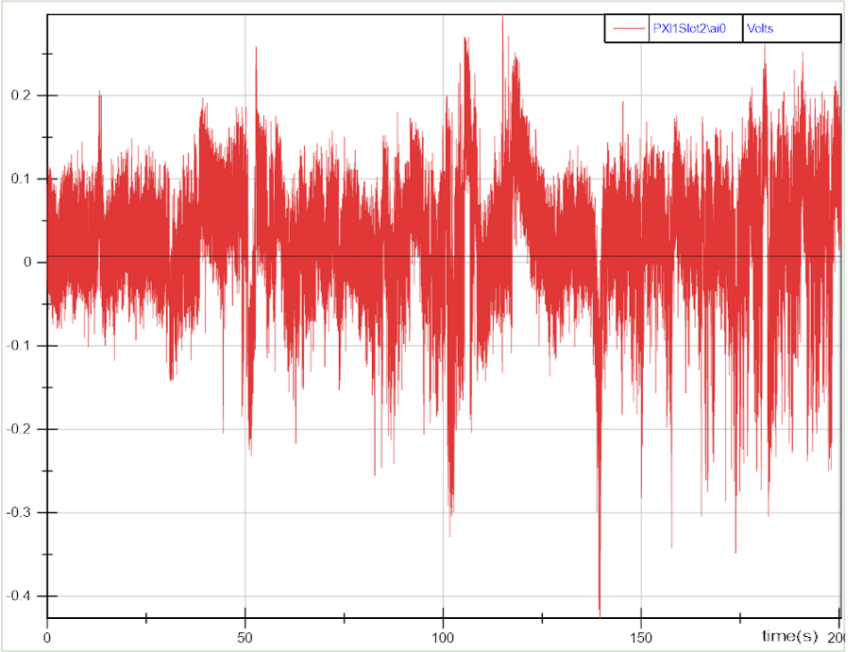


Figure 6.16 : Enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure B pendant (3 minutes 20 secondes). - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000.

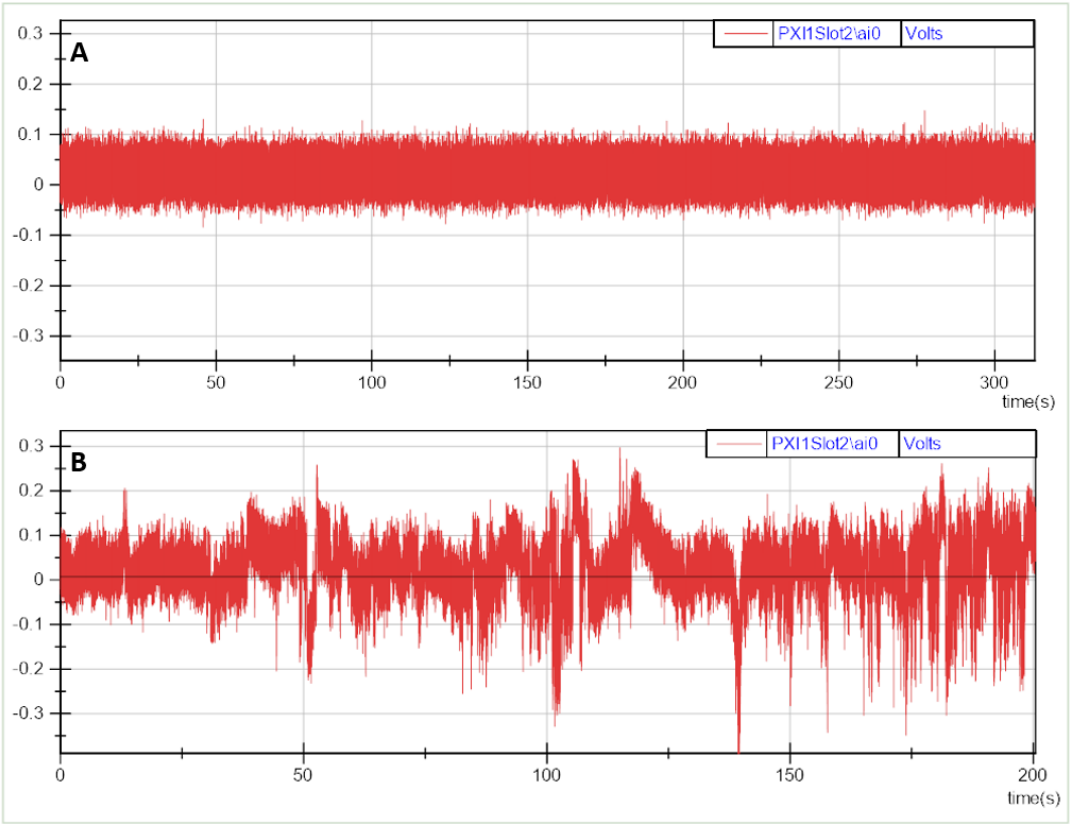


Figure 6.17 : Comparaison des enregistrements de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) obtenus à partir de deux électrodes différentes recouvertes de cellules – Validation et observation au microscope optique sur le banc d'enregistrement. - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000. (A) Enregistrement ne montrant aucun niveau de tension extracellulaire dépassant la plage de tension comprise entre -0,05V et +0,1V avec un gain de 5000. (B) Enregistrement montrant un niveau de tension extracellulaire comprise entre -0,45V et +0,3V avec un gain de 5000.

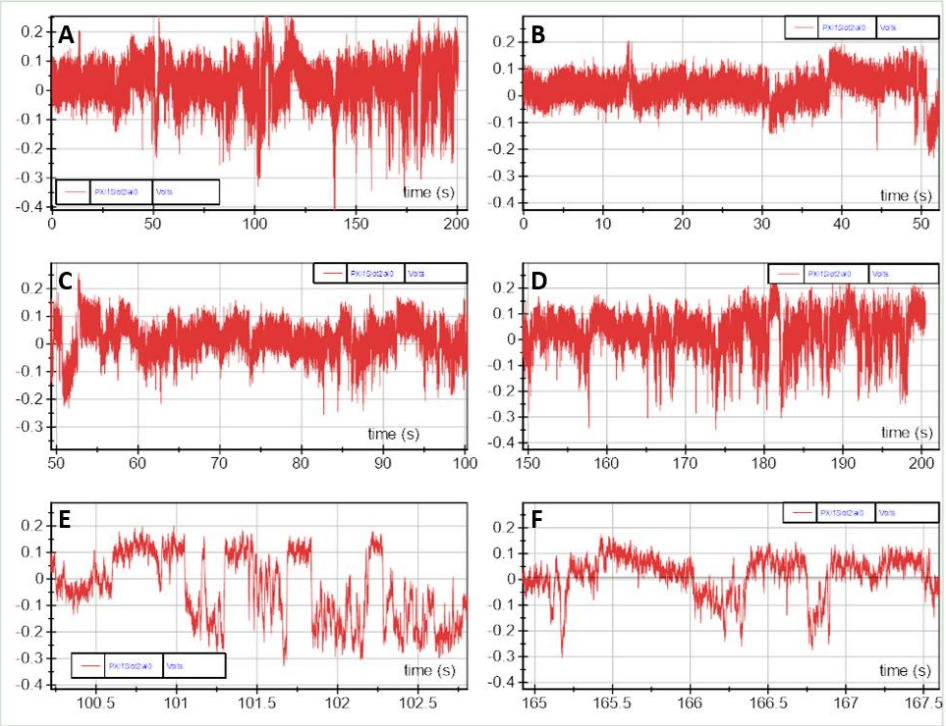


Figure 6.18 : Analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure B. - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000. (A) Enregistrement complet de 3 minutes 35 secondes. Des agrandissements sont réalisés sur des plages de temps de 50 secondes centrées autour de (B) 25 secondes, (C) 75 secondes et (D) 175 secondes. Mise en évidence de la forme des pics de tension et de leur étalement à l'aide d'agrandissements plus précis pour des plages de temps de 2.5 secondes centrées sur (E) 101.50 secondes et (F) 165.25 secondes.

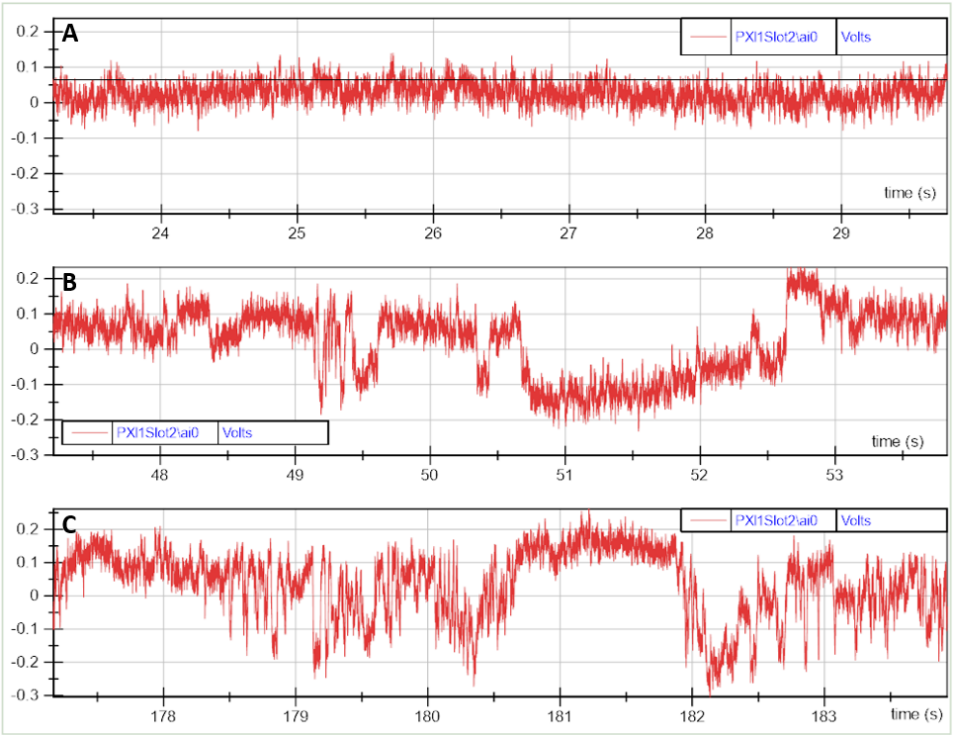


Figure 6.19 : Série 1 d'agrandissements complémentaires pour l'analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure B. - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000. Agrandissements réalisés sur des plages de temps de 7 secondes centrées autour de (A) 26.5 secondes, (B) 50.5 secondes et (C) 180.5 secondes.

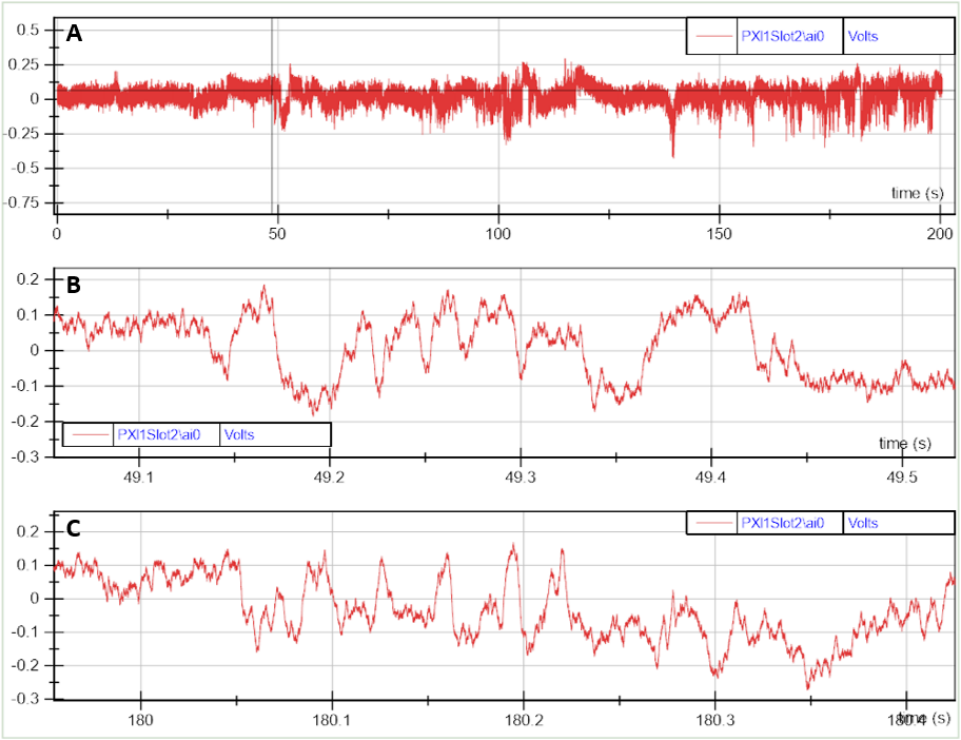


Figure 6.20 : Série 2 d'agrandissements complémentaires pour l'analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif de la campagne de mesure B. - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000. (A) Enregistrement complet de 3 minutes 20 secondes. Agrandissements réalisés sur des plages de temps de 0.5 secondes centrées autour de (B) 49.3 secondes et (C) 180.2 secondes.

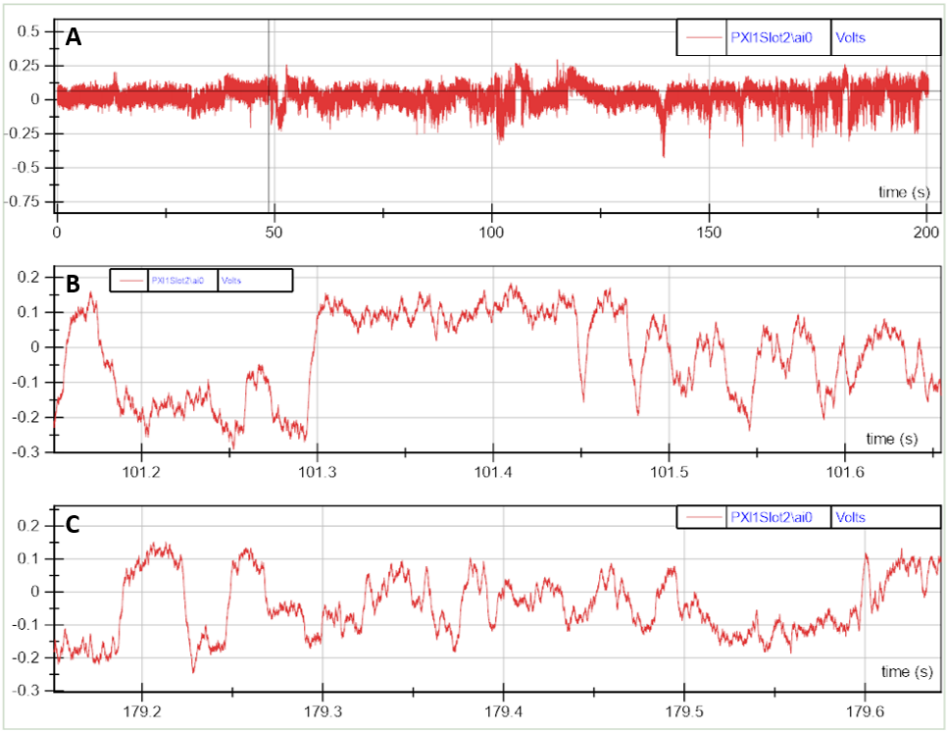


Figure 6.21 : Série 3 d'agrandissements complémentaires pour l'analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure B. - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000. (A) Enregistrement complet de 3 minutes 20 secondes. Agrandissements réalisés sur des plages de temps de 0.5 secondes centrées autour de (B) 101.4 secondes et (C) 179.4 secondes.

6.5.1.3 Campagne d'enregistrements C : enregistrement en conditions basales avec charge Cal520 et 4-AP présente dans l'électrolyte

Cette campagne réalisée avec des cellules GH4C1 chargées en Cal520 a été menée le 16 novembre 2022. Les paramètres d'acquisition en lien avec les réglages des éléments de la chaîne sont : BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000 - Couplage AC. De la 4-AP à 5 mmol.L^{-1} a été ajoutée à l'électrolyte 10 minutes avant le début de l'enregistrement des traces présentées. Au vu de ce délai de 10 minutes écoulé et en se référant aux résultats d'imagerie calcique présentés dans le chapitre précédent (*cf.* Chapitre 5, §5.5.3), il est possible que la 4-AP ne fasse plus effet au moment de l'enregistrement. Cette dernière est cependant toujours bien présente dans le milieu extracellulaire, le banc d'enregistrement n'étant pas encore équipé d'un système de perfusion du milieu qui aurait permis de l'éliminer. Des signaux électriques ont été observés dans ces conditions.

Sur la figure 6.22, le signal électrique en Volt acquis sur la voie « ai0 » est représenté en fonction du temps. Une activité électrique est visible entre 150 et 310 secondes. Différentes zones d'intérêt sont ensuite définies et agrandies dans les différents cadrans présentés en figure 6.23, 6.24, 6.25 et 6.26 afin de montrer au mieux l'allure du signal enregistré ainsi que la forme des pics de tension et leur étalement temporel.

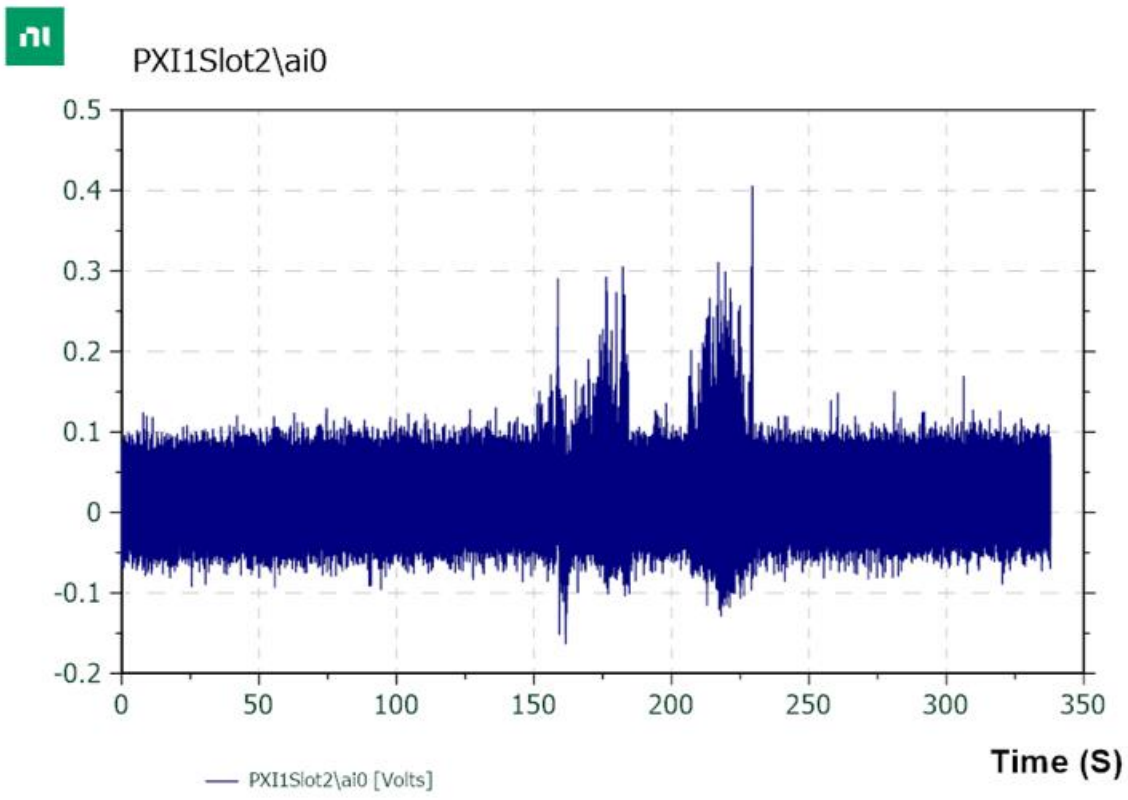


Figure 6.22 : Enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif de la campagne de mesure C pendant (5 minutes 40 secondes). - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000. Mise en évidence d'une réelle activité électrique entre 150 secondes et 310 secondes.

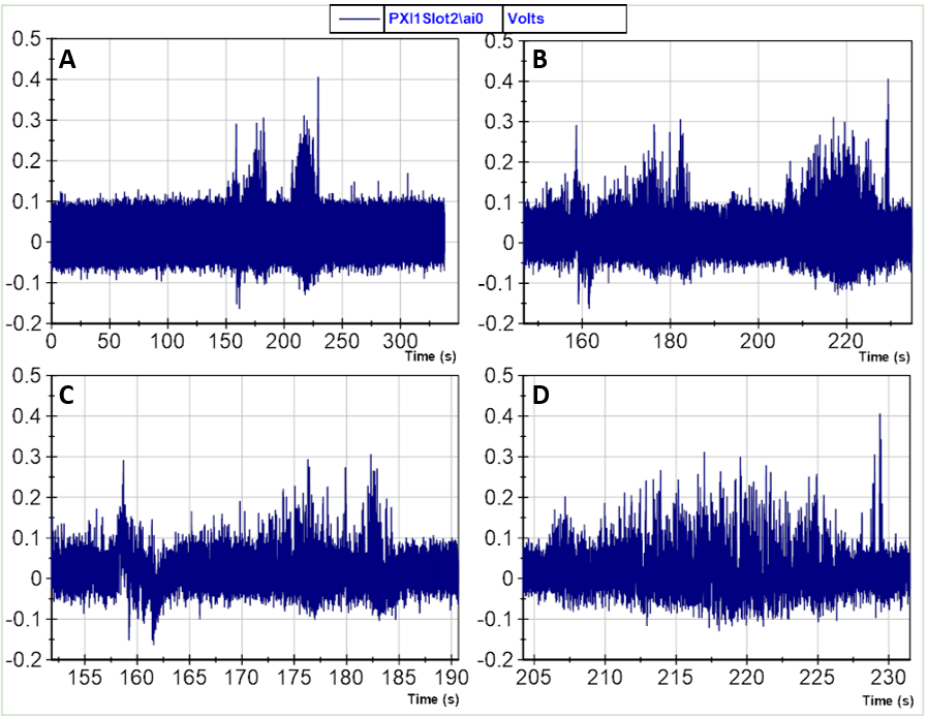


Figure 6.23 : Analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure C pendant 340 secondes. - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000. Un agrandissement est réalisé sur une plage de temps de 60 secondes centrée autour de 190 secondes. D'autres agrandissements plus précis sont réalisés sur des plages de 35 secondes environ et centrés autour de 172.5 secondes et 217.5 secondes pour mieux visualiser les plages présentant une intense activité électrique.

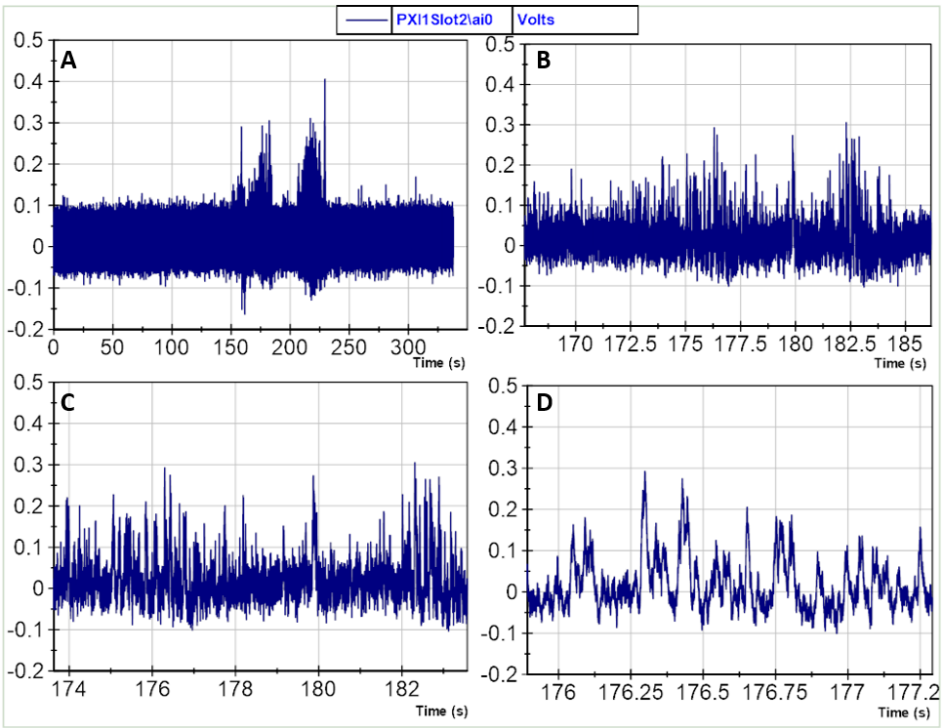


Figure 6.24 : Série 1 d'agrandissements complémentaires pour l'analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure C. - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000. (A) Enregistrement complet de 4 minutes. Agrandissements progressifs centrés sur 176.5 secondes réalisés sur des plages de temps de (B) 20 secondes, (C) 10 secondes et (D) 1.5 seconde.

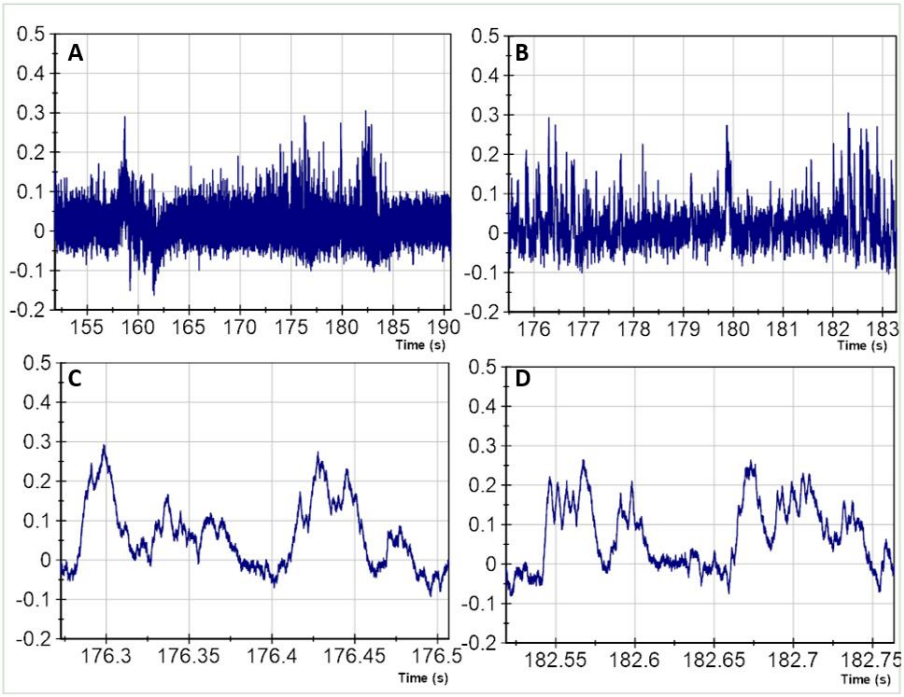


Figure 6.25 : Série 2 d'agrandissements complémentaires pour l'analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure C. - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000. (A) Région d'intérêt au sien de laquelle sont réalisés les agrandissements suivants s'étalant de 155 secondes à 190 secondes de l'enregistrement complet. (B) Agrandissement réalisé sur une plage de temps de 10 secondes centrée sur 179.5 secondes. Deux agrandissements sont réalisés sur des plages de temps de 0.25 seconde, centrés sur (C) 176.4 secondes et (D) 182.65 secondes.

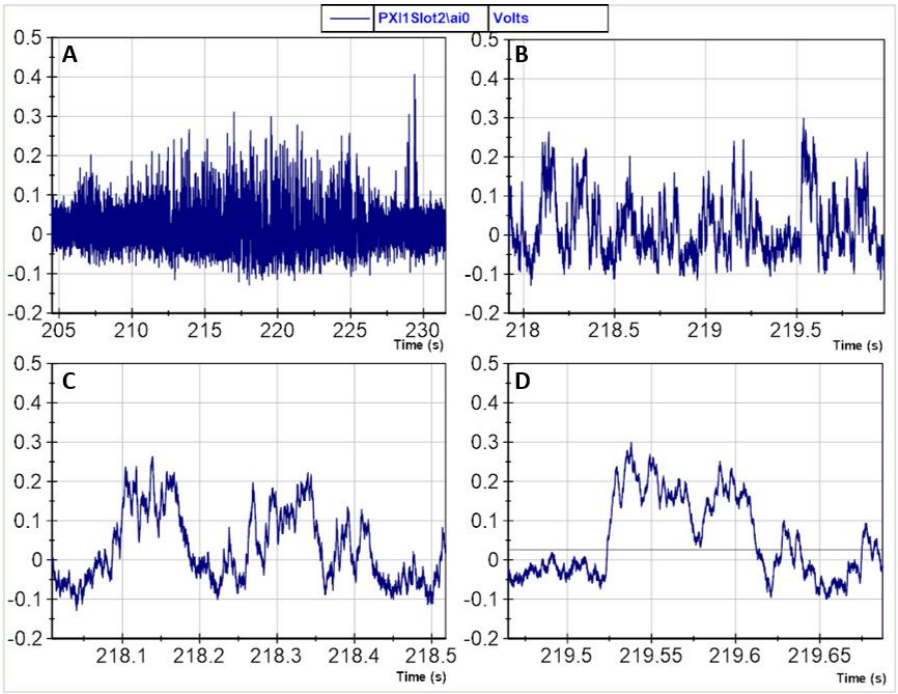


Figure 6.26 : Série 3 d'agrandissements complémentaires pour l'analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode du dispositif RxTx de la campagne de mesure C. - BP (0,3 Hz – 1 kHz) - Gain 5000. (A) Région d'intérêt au sien de laquelle sont réalisés les agrandissements suivants s'étalant de 205 à 230 secondes de l'enregistrement complet. (B) Agrandissement réalisé sur une plage de temps de 2 secondes centrée sur 219 secondes. (C) Agrandissement réalisé sur une plage de temps de 0.5 seconde centrée sur 218.25 secondes. (D) Agrandissement réalisé sur une plage de temps de 0.2 seconde centrée sur 219.75 secondes.

6.5.2 Comparaison des temps d'étalement des pics d'activité électrique avec des potentiels d'action enregistrés en patch-clamp

L'analyse de l'enregistrement de la tension extracellulaire détectée (Volt) en fonction du temps (s) sur une électrode peut être confrontée aux potentiels d'action enregistrés en patch-clamp pour ces cellules. Pour cela, il convient toutefois de rappeler que les pics de tension enregistrés sur le banc électronique ne sont pas directement des potentiels d'action comme évoqué au début de ce chapitre (*cf.* Chapitre 6, §6.3.2). Au demeurant, la base de temps et donc la durée d'étalement d'un évènement de type potentiels d'action ou pics de tension extracellulaire peuvent être des éléments de comparaison intéressants.

Un signal tiré d'un enregistrement en patch-clamp est présenté en figure 6.27 à titre d'exemple et pour comparaison. Ce signal est représentatif des potentiels d'action unitaires émis par les cellules GH4C1 d'une durée à mi-hauteur de l'amplitude de 30 ms environ. Il est important de rappeler que toutes les cellules ne présentaient pas le même schéma d'émission. Ainsi, certaines pouvaient émettre des potentiels d'action par *burst* d'une durée pouvant aller jusqu'à 200 ms (cf. Chapitre 5, §5.5.1).

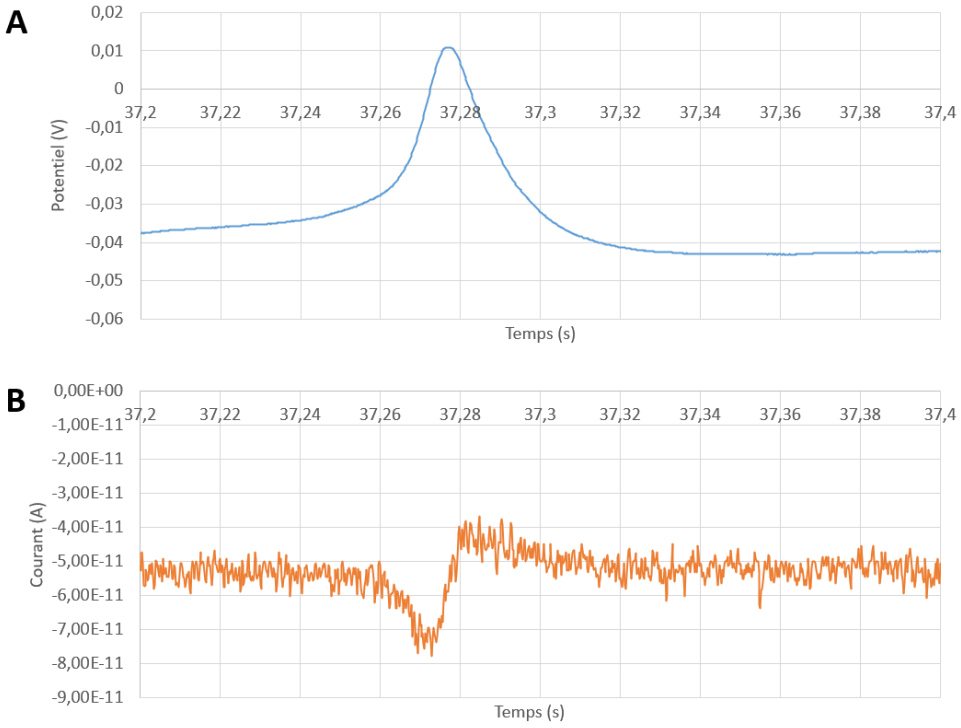


Figure 6.27 : Potentiel d'action de cellule GH4C1 enregistré par patch-clamp. (A) Potentiel d'action représentatif récupéré à titre d'exemple. (B) Enregistrement du courant associé à la survenue de ce même potentiel d'action. Le courant représenté est décalé de 50 pA vers le bas en raison de la présence d'un convertisseur analogique vers digital dans la chaine d'enregistrement du poste de patch.

La figure 6.28 reprend un exemple de tension extracellulaire (Volts) en fonction du temps (s) mesurée au travers de l'interface neurobiohybride. Il apparait que la durée pendant laquelle un pic de tension extracellulaire se produit (environ 30 ms à mi-hauteur de l'amplitude) est comparable à celui d'un potentiel d'action issu de cellules GH4C1 enregistrées en patch-clamp (environ 30 ms à mi-hauteur de l'amplitude).

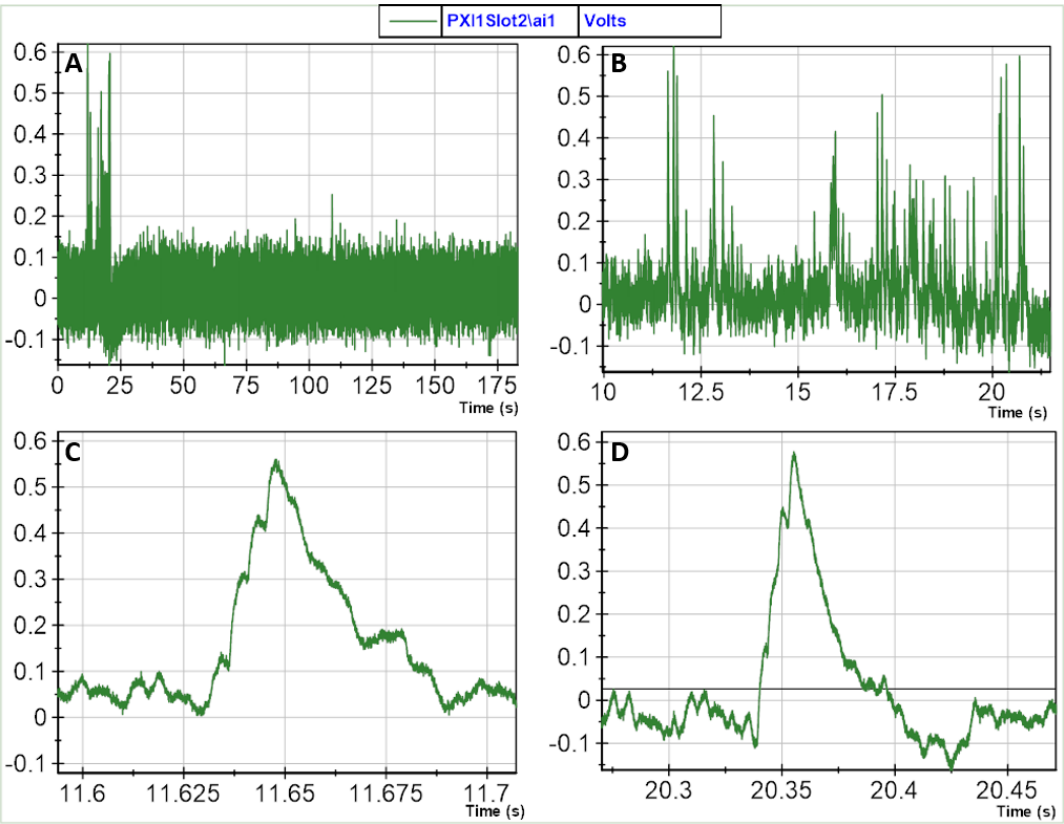


Figure 6.28 : Agrandissement sur des pics d'activité électrique tirés de la campagne d'enregistrement A de durée comparable à celle d'un potentiel d'action de cellule GH4C1 enregistré par patch-clamp. (A) Enregistrement complet de 175 secondes. (B) Agrandissement sur la région contenant les pics d'activité. (C et D) Pics mis sur une échelle de temps comparable à celle d'un potentiel d'action enregistré par patch-clamp.

A ce stade, il est clair que cette simple comparaison doit être approfondie et qu'elle ne permet pas d'affirmer de façon certaine que les signaux enregistrés par le biais de l'interface neurobiohybride sont bien corrélés à une activité électrique des cellules. Il a cependant été démontré que le bruit basal (sans activité électrique d'origine biologique) associé à la chaine d'enregistrement du banc ne contient pas de telles signatures électriques (*cf.* Chapitre 6, §6.3.5). La superposition d'un signal enregistré par le biais de l'interface neurobiohybride (pouvant refléter une activité électrique des cellules GH4C1) avec un autre signal enregistré également au travers de l'interface sans activité cellulaire (signal reflétant le bruit basal) sera présentée plus loin dans ce chapitre (*cf.* Chapitre 6, §6.5.4).

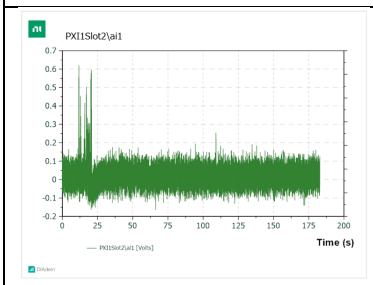
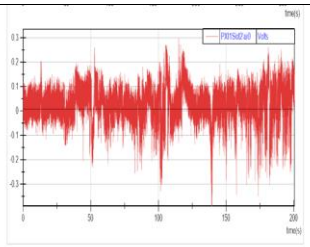
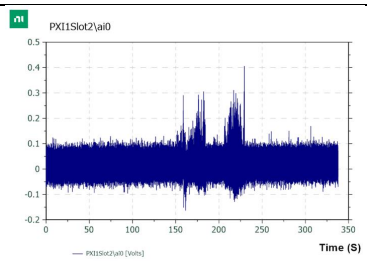
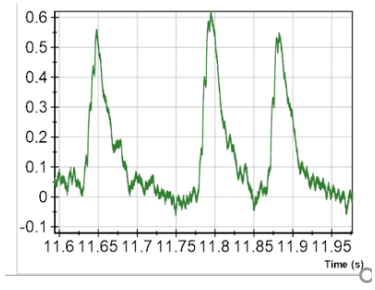
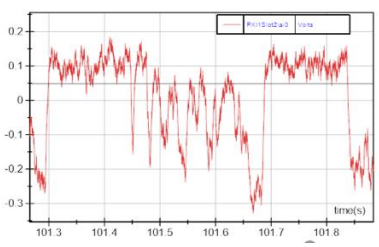
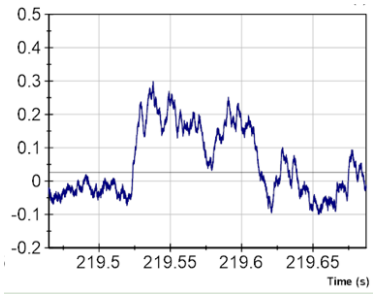
La démonstration complète d'une telle corrélation sera apportée par la réalisation d'un enregistrement concomitant d'un phénomène biologique réel reflétant l'activité électrique (par imagerie calcique par exemple) et par l'interface neurobiohybride. A ce jour, l'équipement du banc d'enregistrement ne permet pas de réaliser une telle manipulation, le bruit généré par la caméra et le laser (essentiels pour l'imagerie des flux calciques) venant parasiter les enregistrements réalisés par voie électronique. Des actions sont en cours pour isoler électriquement ce matériel. Une autre solution développée actuellement consiste à ajouter un équipement de patch-clamp sur le banc. Enfin, un système de perfusion doit également être

installé sur le banc pour tester les agents chimiques type 4-AP ou TRH qui pourraient être appliqués pendant la détection d'une tension extracellulaire sur une électrode.

6.5.3 Analyse de l'amplitude du signal détecté et calcul du rapport signal sur bruit

Afin d'estimer la qualité de la détection de la chaine d'enregistrement, des calculs permettant d'évaluer le rapport signal/bruit pour les différents enregistrements de la tension extracellulaire sont présentés. Nous proposons dans ce tableau n° 6.1 une analyse des enregistrements en déterminant en premier lieu les amplitudes V_{AR} des signaux extracellulaires mesurés les plus représentatives. Dans un second temps, nous utilisons la valeur de la tension pic-pic de bruit ramenée au niveau de l'électrode de détection (avant amplification) $V_{bruit}pp$=8,76 µVpp afin de calculer le rapport signal/bruit. Pour cela, il convient de calculer le rapport en tension $V_{AR}/V_{bruit}pp$ en linéaire et en dB grâce à l'expression 20log10 ($V_{AR}/V_{bruit}pp$) puisqu'il s'agit d'un rapport de tension. Cette analyse peut être faite sur les 3 enregistrements suivants.

Tableau 6.1 : analyse de l'amplitude du signal détecté et calcul du rapport signal sur bruit pour les enregistrements des campagnes A, B et C.

Campagne A	Campagne B	Campagne C
		
		
L'amplitude pic-pic la plus importante dans ce cas est de 0,7 V soit 700 mVpp puisque l'amplitude s'étend de -0,1 V à +0,6 V. Cette dernière est acquise après une	Nous pouvons mener le même raisonnement en notant que l'amplitude pic-pic en tension pour le signal détecté varie assez fortement. Dans ce contexte,	L'amplitude pic-pic la plus importante et la plus représentative est 0,35 V soit 350 mVpp. Cet enregistrement est réalisé après une amplification de

amplification de gain 10.000 et dans une bande passante proche de 100 Hz. Avant amplification, nous disposons donc d'une amplitude de 70 µVpp *(700mV/10.000)*.	des valeurs caractéristiques choisies de façon raisonnable évoluent entre 250 mVpp à 400 mVpp. Cet enregistrement est réalisé après une amplification de gain 5.000 et dans une bande passante de 1 kHz. Avant amplification, nous disposons donc d'une amplitude de 50 µV à 80 µV *(250mV et 400mV/5.000)*.	gain 5.000 et dans une bande passante proche de 1 kHz. Avant amplification, nous disposons donc d'une amplitude de 70 µV *(350mV/5.000)*.
Calcul du rapport signal sur bruit V_{AR}/V_{bruit}pp en linéaire et en dB		
70µVpp/8,76µVpp = 8 $20\log_{10}$ = 18 dB	50µVpp/8,76µVpp = 5,7 $20\log_{10}$ = 15,12 dB 80µVpp/8,76µVpp = 16 $20\log_{10}$ = 24 dB	70µVpp/8,76µVpp = 8 $20\log_{10}$ = 18 dB
Par conséquent, le rapport signal/bruit est estimé à 8 en linéaire (70µVpicpic/8,76µV) correspondant à 18 dB, restant dans une limite acceptable pour la détection.	En suivant le même raisonnement que précédemment, le rapport signal/bruit dans une bande de 1 kHz varie entre 15,12 dB (limite basse pour la détection) et 24 dB (cas le plus favorable pour la détection).	Le rapport signal/bruit est estimé à 8 en linéaire (70µVpicpic/8,76µV) correspondant à 18 dB, ce qui montre que nous sommes également dans une limite acceptable pour la détection de signal.

6.5.4 Comparaison entre l'enregistrement de la campagne B et l'enregistrement de la tension sur un temps long sans activité électrique d'origine biologique

La superposition des signaux obtenus durant la campagne d'enregistrement B et celle correspondant à la tension dans un dispositif neurobiohybride sans activité électrique d'origine biologique sur un temps long (trace de 10 min présentée précédemment (*cf.* Chapitre 6, §6.3.4)) est présentée figure 6.29. Les deux courbes sont obtenues avec des réglages similaires : BP 1 kHz et gain de 5000. Différents agrandissements sont présentés sur la figure pour donner accès au lecteur à différentes échelles d'analyse. Cette comparaison permet de mettre en évidence l'enregistrement d'une réelle activité électrique cellulaire à l'aide de l'interface neurobiohybride et de les différencier d'éventuels artéfacts de mesure.

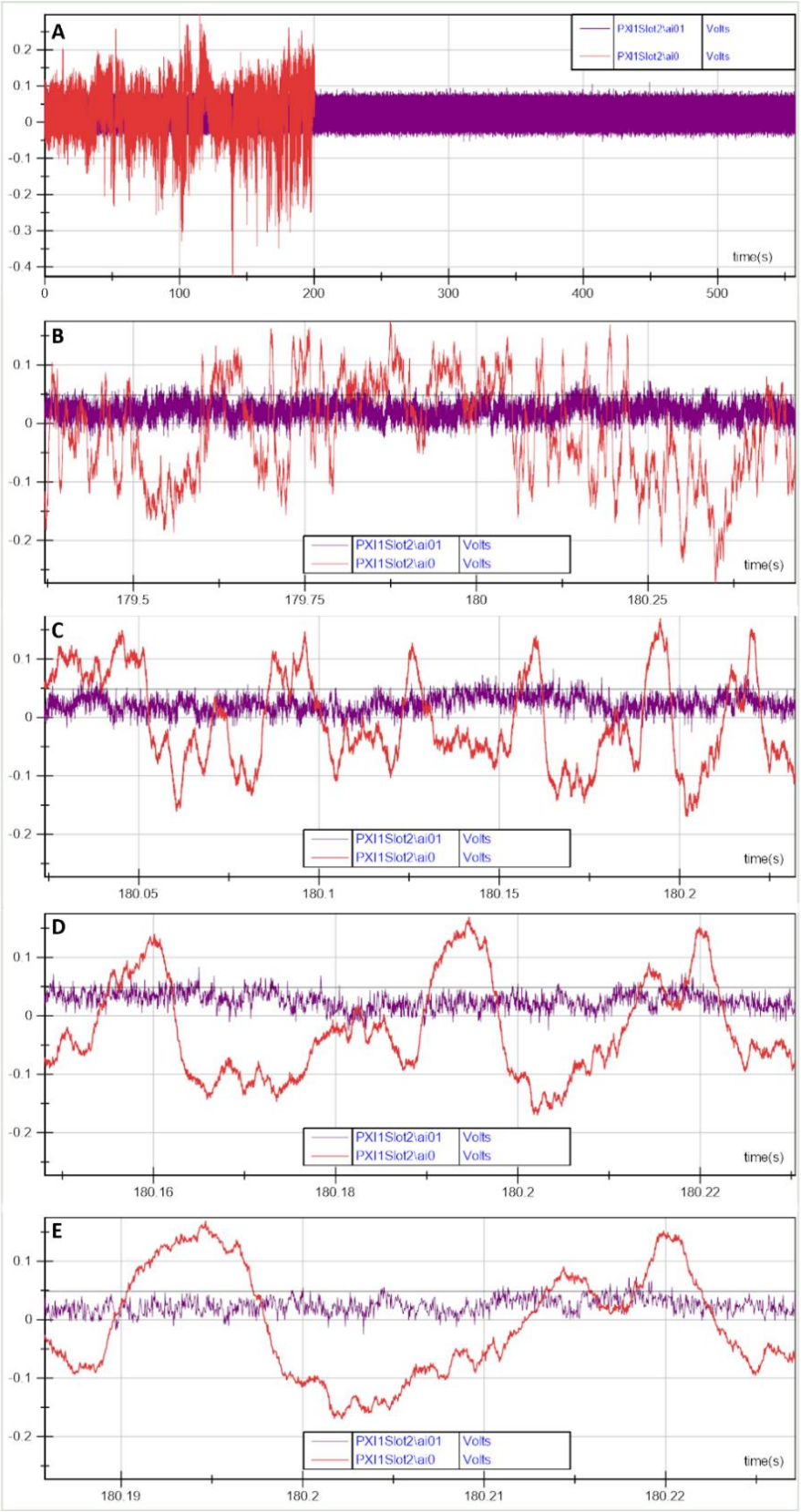


Figure 6.29 : Superposition du signal extrait de la campagne d'enregistrement B (courbes en rouge) et du signal enregistré dans un dispositif neurobiohybride sans activité biologique pendant une période de 10 minutes (courbes en violet). (A) Superposition de l'intégralité de l'enregistrement de l'activité électrique de cellules GH4C1 et de l'intégralité de l'enregistrement sans activité biologique sur 10 minutes. Des agrandissements de plus en plus précis centrés aux environs de 180 secondes sont réalisés : agrandissement sur une plage d'une durée de (B) 1 seconde, (C) 0.2 seconde, (D) 0.1 seconde et (E) 0.05 seconde.

6.6 Simulation de la boucle de communication bidirectionnelle

Pour nous aider dans ce travail d'analyse des enregistrements et pour poursuivre le développement de notre interface neurobiohybride, nous menons en parallèle des travaux de modélisation de l'ensemble de la boucle de communication bidirectionnelle à l'aide du logiciel LT-SPICE (*Simulation Program with Integrated Circuit Emphasis*). Il s'agit d'un *logiciel* libre de simulation de circuits électroniques analogiques. La simulation d'un circuit à l'aide de ce logiciel est la méthode standard pour concevoir, prédire le bon fonctionnement ainsi que les performances d'un circuit.

Le neurone artificiel est modélisé par son schéma électrique présenté dans la publication de (Sourikopoulos et al., 2017) avec 6 transistors du type MOSFET et deux capacités. Une impulsion de courant permet d'exciter le modèle du neurone artificiel, qui répond en émettant des potentiels d'action biomimétiques. A l'occasion de travaux antérieurs, ce modèle de neurone artificiel a été décliné en modèle de membrane permettant de définir le modèle du neurone vivant. Ce concept a été introduit dans ce chapitre 5 lors de la définition de la résistance de jointure R_{seal} et de la capacité de membrane attachée C_m. Ainsi, le neurone vivant est modélisé par une membrane, dont une partie est attachée à l'électrode et dont l'autre partie est au contact de l'électrolyte. Ces deux parties de membrane sont reliées par le cytosol qui est représenté par une résistance R_{int}.

Ce modèle vise à offrir un outil simple et complet pour interpréter les expériences de stimulation et d'enregistrement et prédire les tendances futures. Par exemple, il pourrait être utilisé pour étudier plusieurs paramètres impliqués dans l'excitabilité des neurones vivants stimulés par des signaux électriques de forme, de fréquence et d'amplitude variables. Ce modèle permet également de prédire le bon fonctionnement de la boucle complète en mettant en évidence une communication analogique bidirectionnelle en temps réel.

Pour aller plus loin, nous avons utilisé des données provenant des derniers enregistrements pour modéliser le premier neurone excitateur afin de simuler la boucle de communication définie sur la figure 6.30. Nous avons sélectionné de façon aléatoire des morceaux d'enregistrements qui ont été mis bout à bout afin d'être intégré dans la simulation analogique. La boucle qui a été simulée est comme suit :

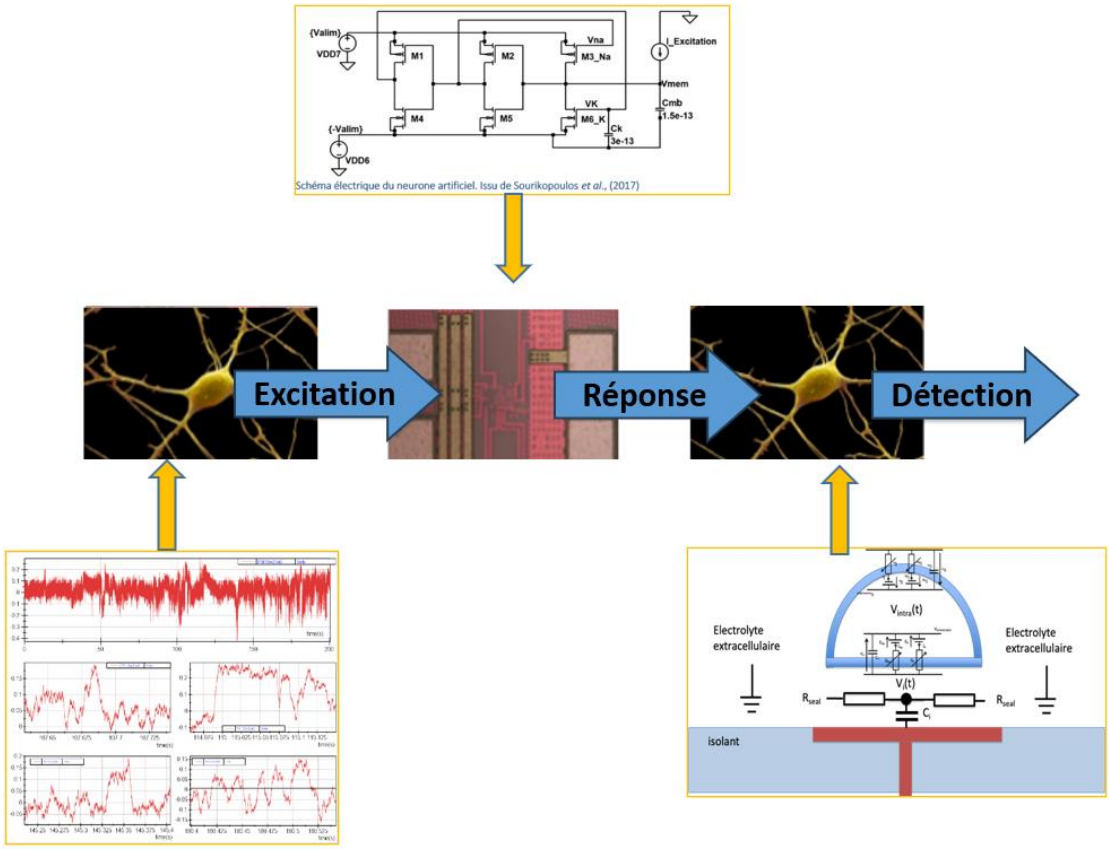


Figure 6.30 : Représentation schématique de la boucle de communication bidirectionnelle simulée avec le logiciel LTSPICE. Pour les parties encadrées en jaune, se référer aux légendes des figures 3.1 (schéma électrique équivalent du neurone artificiel), 6.7 (schéma électrique équivalent de l'interface électrode-cellule), 6.17, 6.20 et 6.21 pour les tracés.

Les résultats de simulation représentent respectivement :

1- la tension extracellulaire (mV) enregistrée servant d'excitation pour le neurone artificiel,
2- la tension de membrane (mV) du neurone artificiel excité par la tension extracellulaire enregistrée,
3- la tension de membrane (mV) pour le neurone vivant modélisé et excité par le neurone artificiel

en fonction du temps (ms) et sont donnés sur la figure 6.31 pour la totalité de l'enregistrement. Le premier graphe (A) représente les caractéristiques électriques mesurées du neurone excitateur placées au début de la boucle. Le deuxième graphe (B) montre la réponse du neurone artificiel à la première excitation et le troisième (C) montre la réponse d'une cellule GH4C1 modélisée à l'aide de l'approche membrane libre et membrane attachée à l'excitation du neurone artificiel. Les résultats sur la figure 6.32 sont quant à eux donnés pour un agrandissement temporel autour de 45 ms. Au travers de ces graphes et de ces résultats de simulation intégrant des résultats d'enregistrements, il est possible de conclure à la mise en place d'une boucle de communication bidirectionnelle entre des neurones artificiels et vivants ouvrant les perspectives de nouvelles générations de neuroprothèses.

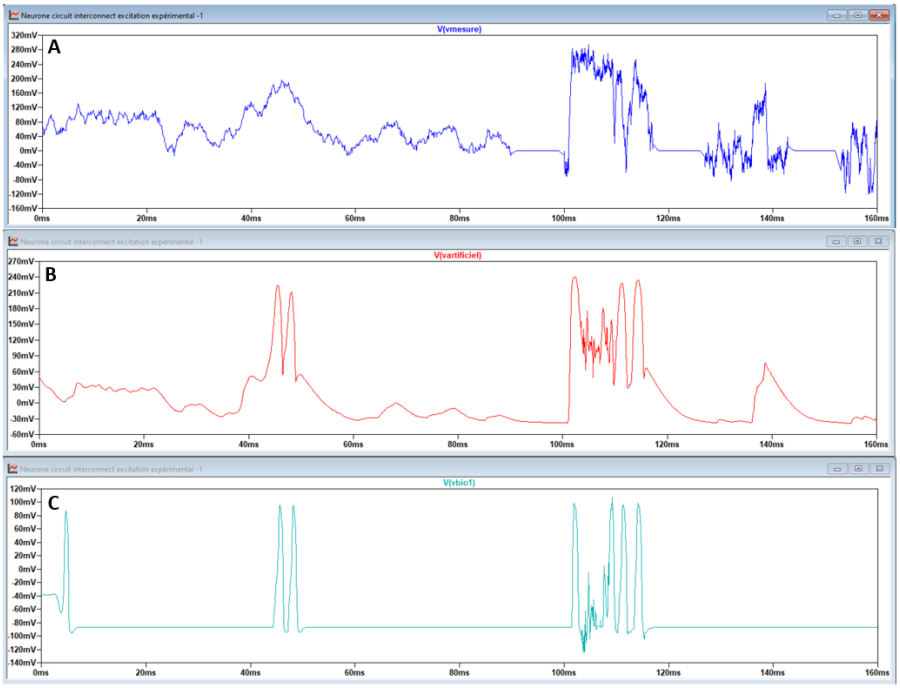


Figure 6.31 : Différents signaux intervenants dans la boucle de communication bidirectionnelle simulée. (A) Assemblage de plusieurs signaux électriques extracellulaires issus des cellules GH4C1 mis bout à bout enregistrés par le biais de l'interface neurobiohybride et utilisés pour stimuler une version simulée du neurone artificiel. (B) Signaux émis par le neurone artificiel sous forme de potentiel d'action en réponse aux signaux extracellulaires excitateurs des cellules GH4C1. (C) Réponse sous forme de potentiels d'action d'une cellule GH4C1 modélisée et stimulée par le neurone artificiel.

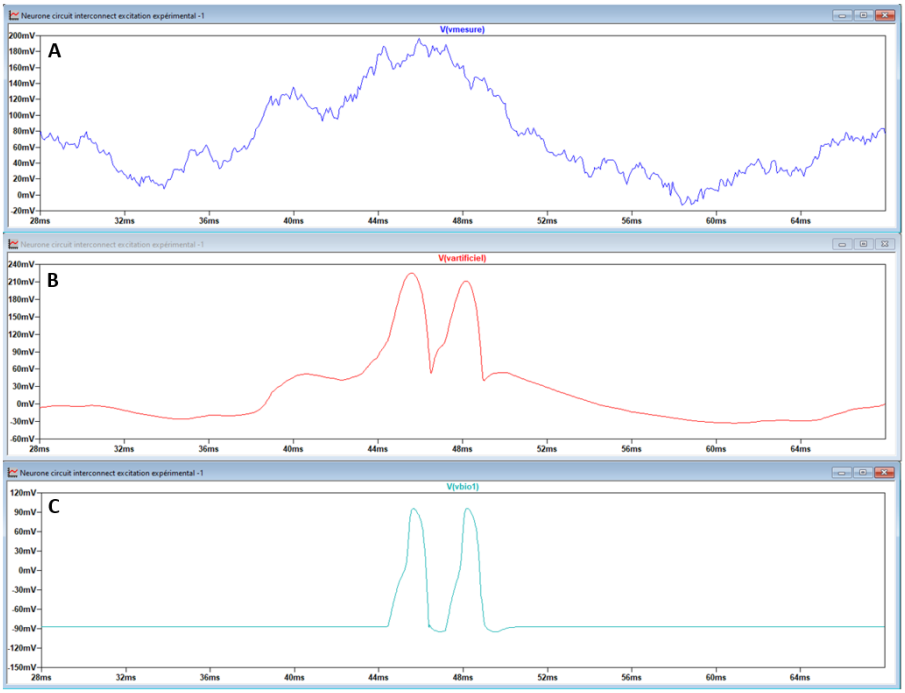


Figure 6.32 : Agrandissement autour de 45ms des différents signaux intervenants dans la boucle de communication bidirectionnelle simulée. (A) Agrandissement à 45 millisecondes des signaux électriques extracellulaires issus des cellules GH4C1 enregistrés par le biais de l'interface neurobiohybride et utilisés pour stimuler une version simulée du neurone artificiel. (B) Agrandissement à 45 millisecondes des signaux émis par le neurone artificiel sous forme de potentiel d'action en réponse aux signaux extracellulaires excitateurs des cellules GH4C1. (C) Agrandissement à 45 millisecondes de la réponse sous forme de potentiels d'action d'une cellule GH4C1 modélisée et stimulée par le neurone artificiel.

6.7 Conclusion du chapitre

Ce chapitre concerne la mise en place d'une première boucle de communication bidirectionnelle entres des neurones artificiels biomimétiques et des cellules endocrines hypophysaires GH4C1 cultivées au sein des nouvelles interfaces neurobiohybrides spécifiquement développées pour cet objectif. Les manipulations de stimulation réalisées avec des interfaces IMACA héritées de travaux antérieurs ont permis de confirmer que les cellules GH4C1 répondent à des impulsions électriques de 5 ms à partir d'une amplitude de 2 V (à une fréquence de 1 Hz). Ces résultats viennent confirmer la possibilité de stimuler ces cellules à l'aide de signaux émis par les neurones artificiels. Ces travaux nécessitent une optimisation des conditions de stimulation afin de déterminer les meilleurs paramètres (tension, durée, fréquence de stimulation). Il conviendra ensuite de concevoir le neurone artificiel pour lui conférer ces paramètres de stimulation.

La suite des travaux présentés dans ce chapitre concerne le développement d'un banc d'enregistrement électronique ayant vocation, dans le futur, à permettre la mise en place d'une boucle de communication bidirectionnelle entre les neurones artificiels physiques et des cellules électriquement actives. D'importants travaux ont été réalisés pour la conception d'une chaine d'enregistrement suffisamment sensible pour détecter des signaux extracellulaires de très faible amplitude. Les caractéristiques du banc ont été présentées ainsi que le principe utilisé pour la détection de la tension extracellulaire. Le bruit de la chaine d'enregistrement a été évalué à l'aide d'un dispositif neurobiohybride ne comportant pas d'activité électrique d'origine biologique. La caractérisation en bruit à l'aide d'un mesureur de bruit de la chaîne d'enregistrement a également été réalisée, indiquant que la tension pic-pic de bruit ramenée au niveau de l'électrode de détection (avant amplification) est de 8,76 µVpp.

Afin de limiter les possibles artéfacts de mesures et d'assurer la validité des enregistrements, nous nous assurons que les cellules GH4C1 émettent des potentiels d'action. Pour cela, un protocole de charge de sonde calcique non ratiométrique (Cal520) a été mis en œuvre de manière routinière lors de chaque campagne d'enregistrement des signaux extracellulaires par le biais de l'interface neurobiohybride. Il est à noter que les conditions d'enregistrement du banc ne sont pas encore parfaitement optimisées pour permettre le maintien de conditions physiologiques dans l'enceinte d'enregistrement (température, taux de CO_2/O_2, hygrométrie, …). De nombreux aménagements du banc sont prévus afin de les améliorer. Les enregistrements des variations intracellulaires de calcium imagées avec la sonde calcique Cal520 obtenus dans ces conditions démontrent cependant bien la possibilité pour ces cellules d'émettre des signaux du type potentiel d'action. Cette vérification de l'activité pulsatile a été répétée de manière routinière à chaque tentative d'enregistrement par voie électrique.

De nombreuses campagnes d'enregistrement utilisant les cellules GH4C1 ont permis d'optimiser le banc et les paramètres d'enregistrement, notamment le gain et la bande passante du filtre. Au cours de ces expériences, des signaux électriques extracellulaires témoignant d'une

activité électrique ont été enregistrés, présentés et analysés pour les 3 campagnes A, B et C. Une première confrontation de ces enregistrements avec ceux réalisés par patch-clamp montre une concordance au niveau de la durée des pics de tension détectés (40-50ms). Une analyse des enregistrements du point de vue du rapport signal/bruit a également permis d'évaluer la qualité de la détection. Il convient à ce stade de l'étude d'établir une corrélation plus formelle entre les évènements. Cela pourrait être réalisé en évaluant de façon concomitante des variations calciques intracellulaire par Cal520. Cependant le matériel nécessaire (caméra et laser) génère des perturbations électriques qui viennent parasiter les enregistrements réalisés par voie électronique. Des réflexions sont en cours pour supprimer ces perturbations. Une autre solution envisagée consisterait à assembler un poste de patch-clamp directement dans l'enceinte d'enregistrement pour enregistrer les cellules à la fois par patch-clamp et par le biais de l'électrode. Il est important de garder en mémoire que l'ensemble des traces enregistrées avec des cellules GH4C1 identifiées comme étant actives génère des traces différentes du bruit intrinsèque de la chaine d'enregistrement. Enfin, il est possible que le couplage entre les cellules et l'électrode ne soit pas parfait, et soit variable d'une cellule à l'autre, ce qui peut résulter en différents types de traces suivant la position de la cellule et sa distance par rapport à l'électrode.

Des signaux caractéristiques correspondant à une activité électrique probable des cellules GH4C1 ont été intégrés dans un modèle de simulation LTSPICE afin d'évaluer la réponse d'un neurone artificiel simulé à ces signaux. Les signaux enregistrés par le biais de l'interface neurobiohybride sur le banc d'enregistrement permettent bien de déclencher l'émission de potentiels d'action biomimétiques par les neurones artificiels. La réponse générée par ces neurones artificiels permet également de stimuler une version modélisée des cellules GH4C1. Cette simulation utilisant des enregistrements extracellulaires, le modèle paramétrique du neurone artificiel et d'une cellule neuronale vivante démontre la faisabilité de la mise en place d'une boucle de communication bidirectionnelle entre les cellules GH4C1 et les neurones artificiels. Il est actuellement envisagé de connecter directement un neurone artificiel à l'électrode d'enregistrement de sorte que des signaux issus de cellules GH4C1 en cours d'enregistrement soient directement appliqués au neurone artificiel. Cet objectif requiert plusieurs ajustements matériels qui sont en cours d'implémentation.

Chapitre 7 Conclusion générale du manuscrit

Le travail de doctorat présenté dans ce manuscrit avait pour objectif de répondre à la problématique suivante : établir une boucle de communication bidirectionnelle entre des neurones vivants et des neurones artificiels analogiques. Ce travail s'est inscrit dans la thématique générale de l'équipe de recherche que j'ai rejointe en 2020 à l'IEMN dont l'objectif à long terme est de concevoir des systèmes neurobiohybrides implantables à visée thérapeutique. L'ensemble des résultats présentés dans ce manuscrit nous a permis de répondre aux objectifs annoncés pour mon projet de doctorat concernant 1 – l'amélioration de l'interfaçage entre les neurones artificiels analogiques et les neurones vivants mis en place dans les travaux précédents ; 2 – la poursuite de la caractérisation de cette communication entre neurones artificiels et neurones biologiques par l'utilisation des techniques d'imagerie calcique et d'électrophysiologie et 3 – la démonstration de la capacité des neurones biologiques à activer les neurones artificiels analogiques afin d'établir une boucle de communication bidirectionnelle au sein des nouvelles interfaces neurobiohybrides.

Ainsi, une interface neurobiohybride a été développée et optimisée pour permettre l'enregistrement de l'activité électrique de groupes de cellules électriquement actives. Sur la base d'une caractérisation par patch-clamp de l'activité électrique de cellules endocrines hypophysaires murines GH4C1, les signatures électriques ont été enregistrées par le biais de cette interface neurobiohybride et ont été associées à l'émission de potentiels d'action de ces cellules. Ces observations ont été répétées plusieurs fois et sont confortées par les enregistrements en l'absence d'activité électrique biologique montrant une nette différence entre les signatures électriques. Cela s'appuie également sur une étude du bruit impactant la chaîne d'enregistrement montrant un rapport signal sur bruit acceptable pour la détection de signaux biologiques. Un travail complémentaire est néanmoins nécessaire pour conclure avec certitude quant à la nature des signatures enregistrées et quant au le lien de causalité entre l'action d'un neurone biologique sur un neurone artificiel analogique et vice-versa. Des pistes sont présentées dans la suite de ce chapitre de conclusion.

Des signatures électriques extracellulaires de cellules GH4C1 mesurées sur le banc électronique ont été implémentées dans le modèle électrique développé sous le logiciel de simulation LTSPICE. Ces signatures électriques extracellulaires ont été utilisées pour simuler le premier neurone vivant excitateur dans la boucle de communication définie par l'enchainement « Cellule GH4C1 *in vitro* – Neurone artificiel biomimétique modélisé par son schéma équivalent – Cellule GH4C1 modélisée par un modèle à deux compartiments (liés/attachés) de membrane ». Les résultats obtenus soulignent, en l'état actuel de nos connaissances, la capacité des neurones artificiels à réagir à l'activité électrique des cellules GH4C1 excitatrices puisqu'ils génèrent des signaux biomimétiques en réponse aux stimulations de ces dernières placées au début de la boucle. Pour compléter la simulation de la boucle de communication bidirectionnelle, un modèle à deux compartiments (liés/attachés) de membrane prenant en compte les paramètres électriques d'excitabilité des cellules GH4C1 a également été implémenté à la suite du neurone artificiel analogique. Cela a permis de montrer que les cellules

GH4C1 peuvent bien être stimulées par un potentiel d'action biomimétique émis par un neurone artificiel analogique ; ce résultat indique que les différents éléments de la boucle de communication peuvent être mis en réseau et traduit la faisabilité de la boucle fermée selon les principes posés en début de manuscrit. Il faut ajouter à cela que la dernière partie de la boucle a également été confortée dans le cadre d'une expérimentation sur le banc électronique montrant que les cellules GH4C1 vivantes peuvent être stimulées par application d'un signal électrique. L'ensemble de ces observations est très encourageant et nous pousse par conséquent à poursuivre nos travaux afin de finaliser la mise en place expérimentale de la boucle de communication bidirectionnelle entre des cellules GH4C1 et des neurones artificiels.

A court terme, plusieurs améliorations sont envisagées pour l'évolution de ce projet. Dans un premier temps, pour finaliser ces travaux, nous souhaitons améliorer la reproductibilité des enregistrements réalisés par le biais de l'interface, et assurer un contact électrode/cellule avec la meilleure qualité possible pour favoriser une forte valeur de la résistance de jointure R_{seal}. Déployer les techniques de fonctionnalisation de la surface des électrodes que nous avons commencé à étudier pourrait contribuer à répondre à cette problématique. Par ailleurs, l'impact du bruit sur la chaine d'enregistrement pourrait être encore réduit par une sélection de composants mieux adaptés à notre technique de détection, ce qui contribuerait à améliorer la qualité du rapport signal/bruit et donc des traces enregistrées. Dans un second temps, il nous apparait essentiel d'établir un lien de causalité direct entre la survenue d'un potentiel d'action et une signature enregistrée par le biais de l'interface à l'aide d'une technique fiable et classiquement utilisée pour la détection de l'activité électrique de cellules. Nous avons vu que, en l'état actuel de développement du banc, cela n'était pas possible par imagerie calcique, l'équipement nécessaire générant trop de bruit et nuisant sévèrement à la qualité des enregistrements par voie électronique. Nous allons chercher à résoudre cette difficulté sur le plan électrique en isolant les éléments bruyants. Une autre solution envisagée consistera à installer un poste de patch-clamp directement dans le banc pour pouvoir enregistrer simultanément l'activité de cellules par le biais d'une pipette de patch et par les électrodes de l'interface. L'emploi d'un poste de patch-clamp présente plusieurs avantages : cette technique n'emploie aucun appareil pouvant générer du bruit (pas de caméra, ni de laser) et cette technique permettrait de stimuler directement la cellule par application d'un *pulse* par le biais de l'électrode de patch.

L'ajout d'un système de perfusion de l'électrolyte contribuerait également à démontrer que les signatures électriques enregistrées par le biais de l'interface sont bien corrélées à une activité électrique avérée dans les cellules cultivées au sein de l'interface neurobiohybride. Nous pourrions ainsi appliquer dans l'électrolyte, pendant l'enregistrement d'une activité extracellulaire, les différentes molécules modulatrices de l'activité électrique des cellules GH4C1 et évaluer directement leurs impacts. Nous pourrions, grâce à ces molécules, identifier directement dans les traces enregistrées des variations de fréquence et de durée des réponses électriques ainsi modulées, ce qui contribuerait à confirmer que les signatures enregistrées

correspondent bien à une activité biologique avérée. Ce système de perfusion permettrait également de renouveler l'électrolyte en enlevant ces molécules ajoutées pendant les expérimentations, limitant par ailleurs leurs actions dans le temps. Un tel système de perfusion contribuerait en outre au maintien de conditions plus physiologiques au sein de l'interface, notamment en termes de pH, et en éliminant les métabolites produits par l'activité cellulaire.

Une autre évolution envisagée pour améliorer la qualité des enregistrements extracellulaires réalisés par le biais de l'interface avec des cellules GH4C1 consiste à employer les techniques de photostructuration développées au cours de mes travaux de doctorat pour n'ensemencer des cellules que sur les plots des électrodes. Cette amélioration contribuerait à réduire le bruit d'origine biologique (dû à la présence d'un grand nombre de cellules actives dans le milieu de culture) lors de l'enregistrement et donc pourrait simplifier l'analyse des traces enregistrées. Ces techniques de photostructuration trouveraient également leur utilité à plus long terme pour la réalisation de réseaux de neurones orientés.

A moyen terme, nous travaillerons à confirmer les résultats obtenus en simulation et les briques de bases expérimentales en incluant physiquement une puce comportant des neurones artificiels analogiques au contact direct des neurones vivants, afin d'établir en temps réel la boucle de communication complète. Cela correspondrait à une première version d'un système neurobiohybride complet incluant le neurone artificiel.

Le design de l'interface pourra également évoluer. Il existe des marges de manœuvres pour optimiser la qualité des signaux enregistrés et permettre une meilleure stimulation de l'activité des cellules. Il est possible par exemple de moduler la taille des électrodes et/ou des lignes de masse pour assurer une meilleure équipotentialité de l'électrolyte. Il est aussi possible d'adapter l'interface aux contraintes de cultures qui permettront de rapprocher notre étude de contextes physiologiques plus réalistes. Il est ainsi envisagé d'employer successivement des cocultures de lignées établies, des cultures organotypiques et éventuellement des organoïdes cérébraux, et ce dans l'objectif final d'aboutir à une démonstration *in vivo* chez l'animal.

A plus long terme, un travail sur les neurones artificiels et leurs interconnections à l'aide de synapses artificielles sera nécessaire pour leur permettre de fonctionner en réseau. Des travaux devront être menés pour choisir la meilleure implémentation de ces éléments. Théoriquement, ce réseau devrait être capable d'auto-apprentissage au sens de l'intelligence artificielle et pourrait donc s'adapter en temps réel aux variations de l'activité du tissu neuronal interfacé. Ce réseau de neurones/synapses analogiques présente un grand intérêt pour les différentes maladies et handicaps présentés au cours de ce document. Leur intérêt pourrait potentiellement s'élargir à d'autres types de maladies et pourrait peut-être contribuer à pallier certains symptômes de maladies cardiaques (Hadaya et al., 2023) ou du diabète de type I en stimulant le nerf vague (Guyot et al., 2019) ou encore contribuer à lutter contre l'apnée du sommeil par stimulation du nerf phrénique (Baumert et al., 2023). Pour permettre leur

utilisation dans un contexte clinique, quelle que soit l'application visée des circuits neurones artificiels, l'alimentation énergétique de ces derniers *in vivo* devra également être optimisée.

En dehors de leurs applications thérapeutiques, les systèmes neurobiohybrides donnent lieu à des découvertes en recherche fondamentale auxquelles les neurones artificiels pourraient contribuer. Des travaux réalisés *in vitro* ont par exemple permis de connecter différents types de cultures de neurones vivants (cultures primaires de neurones corticaux murins, et neurones humains dérivés d'iPSC), à un ordinateur pour leur permettre d'apprendre à jouer au jeu « Pong ». Cette découverte, largement relayée dans les médias et ayant fasciné le monde entier, a démontré la capacité d'apprentissage de neurones en culture et ouvert la porte à de nombreuses opportunités (Kagan et al., 2022). Ces travaux soulignent par ailleurs toute la pertinence des études *in vitro* dans le domaine, et la contribution indéniable à ce type de recherches de modèles parfois qualifiés à tort de 'simples'. Nous notons en particulier tout l'intérêt des cultures dérivées d'iPSC humaines dans ce contexte.

Sur le plan médiatique, l'autorisation récente attribuée à Neuralink par la *Food and Drug Administration*[2] pour mener des essais cliniques sur des patients (non encore recrutés à notre connaissance) atteints de paralysies, à l'instar des travaux des équipes suisses, démontre que la compétition internationale est intense dans le domaine des neurobiohybrides. De nombreux acteurs testent différentes approches en parallèle de la nôtre ; nous en avons déjà présenté l'intérêt et exposé les limites. Les travaux de (Lorach et al., 2023) sont par exemple particulièrement avancés et ont déjà permis à un patient de retrouver l'usage de ses jambes. Un autre exemple est celui des travaux de (Metzger et al., 2023) et (Willett et al., 2023) où des patients incapables de parole ont pu communiquer par le biais d'une interface neurobiohybride à une vitesse supérieure à 60 mots par minute. Tous ces travaux concomitants indiquent le besoin de nouvelles interfaces pour réparer des fonctions neuronales endommagées par des traumatismes ou des processus dégénératifs, mais à notre connaissance, aucun n'adresse intégralement les limites associées aux unités de traitement de signal. Nos travaux contribuent donc à ouvrir une perspective nouvelle particulièrement encourageante pour le développement de neuroprothèses bien plus économes sur le plan énergétique et moins contraignantes pour le patient.

Le rapide développement des systèmes neurobiohybrides à boucle de communication fermée soulève, malgré ses succès, plusieurs questions éthiques que certains auteurs anticipent dès aujourd'hui. Par exemple, l'impact d'une telle boucle de communication sur la prise de décision de patients n'a à ce jour pas été évalué, ce qui pourrait présenter un risque pour l'autonomie de ces derniers malgré les bénéfices sur le plan thérapeutique (Gilbert et al., 2018). Il a par ailleurs été démontré qu'il était possible de pirater des dispositifs médicaux tels que des *pacemaker* ce qui soulève d'importantes questions de sécurité tant pour la santé des patients que pour les données personnelles qui pourraient être subtilisées (Puat & Rahman, 2020).

[2] La *Food and Drug Administration* est l'autorité compétente aux Etats-Unis en matière d'autorisation d'essais cliniques et de mise sur le marché de nouveaux médicaments ou dispositifs à visée thérapeutique.

Certains auteurs précisent également que le manque de données empiriques concernant l'impact de tels systèmes sur les patients ne permet pas de satisfaire leurs implications éthiques d'autant que ces aspects sont encore peu pris en compte dans les études publiées (Aggarwal & Chugh, 2020). Toutes ces questions d'actualité ne pourront être résolues en même temps, mais elles justifient que les efforts d'équipes différentes convergent pour les résoudre.

Annexes

Annexe 1 : Méthodes de culture des cellules GH4C1

Les cellules GH4C1 sont cultivées en suivant strictement les recommandations du fournisseur (ATCC, CCL-82.2, lot n° 59689338). La culture est maintenue à hygrométrie et température constantes (37°C) dans une atmosphère contenant 5% de CO_2. Les cellules sont cultivées dans du milieu contenant 82.5% de milieu de Ham F10 sans L-Glutamine et du $NaHCO_3$ (Eurobio Scientific, CM1H1000-01, lot n° 171607), 15% de sérum de cheval inactivé par la chaleur (Gibco 26050-088, lot n° 2299554) et 2.5% de sérum de veau fœtal non inactivé (ATCC30-2020, lot n° 80211500, bouteille n° 2057) stérilisé par filtration sur filtre de 0.22µm en PES (Dutscher, 141303 BPE2215, lot n°210812-053). Pour le maintien de la lignée, la culture est divisée au 1/20 une fois par semaine à l'aide d'un mélange Trypsine/EDTA 0.25% sans calcium et sans magnésium (HyClone, SH30042.02, lot n° J200016, bouteille n° 1033) et maintenue dans des flasques T25 en plastique avec bouchon ventilé (Sarstedt, 83.3910.002). La proportion de cellules vivantes est vérifiée à chaque division de la culture par marquage au bleu trypan 0.4% (Invitrogen T10282, lot n° 1914469) d'un échantillon de cellules prélevées après élimination de la trypsine. L'observation de la culture et les différents comptages réalisés à chaque passage suggèrent un temps de doublement approximatif de ~48h. Dans nos conditions de laboratoire, la culture présente environ 50% de cellules adhérentes et 50% de cellules en suspension.

Annexe 2 : Méthode de marquage fluorescent de matériel intracellulaire de cellules GH4C1

Le marquage est réalisé selon les procédures indiquées par le fournisseur de la phalloïdine Alexa fluor 488 (Invitrogen ; A12379 ; lot n° 2129460) utilisée pour marquer la tubuline. Le protocole est réalisé sur des cellules ensemencées sur des lamelles en verre à puits amovible (Labtek® ; Nalge Nunc International ; lot n° 031014-4-0) préalablement enduites de PLO selon les mêmes procédures que pour l'ensemencement des dispositifs. Les puits sont rincés avec du PBS pH 7.2 (Gibco : 20012-019, lot n° 2242230) chauffé à 37°C pour éliminer les cellules flottantes puis les cellules adhérentes sont fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 3.7% (Sigma-Aldrich ; 252549 ; lot n° MKCH0868). Les sites de liaison aspécifiques sont bloqués à l'aide d'une incubation de 30 minutes à température pièce dans un tampon PBS pH 7.2 contenant 0.5% de Triton X100 (Sigma ; 93443 ; lot n° BCBZ2232) et 1% de BSA (Thermoscientific, 37525, lot n° SI2527711). Le marquage de la tubuline est ensuite réalisé à l'aide d'une solution de phalloïdine diluée au 1/2000ème dans la solution de blocage. Des contrôles sans phalloïdine sont inclus. Après marquage, les puits sont rincés au PBS pH 7.2 puis la chambre amovible est détachée. Le montage de la lame est réalisé avec un milieu contenant du DAPI (Vectashield® ; Vector Laboratories ; H-1200 ; lot n° ZG1202) pour marquer le matériel génétique. Des lamelles en verre sont placées sur les cellules et les bordures sont scellées avec du vernis à ongles.

Annexe 3 : Principe de mesure des paramètres électrophysiologiques.

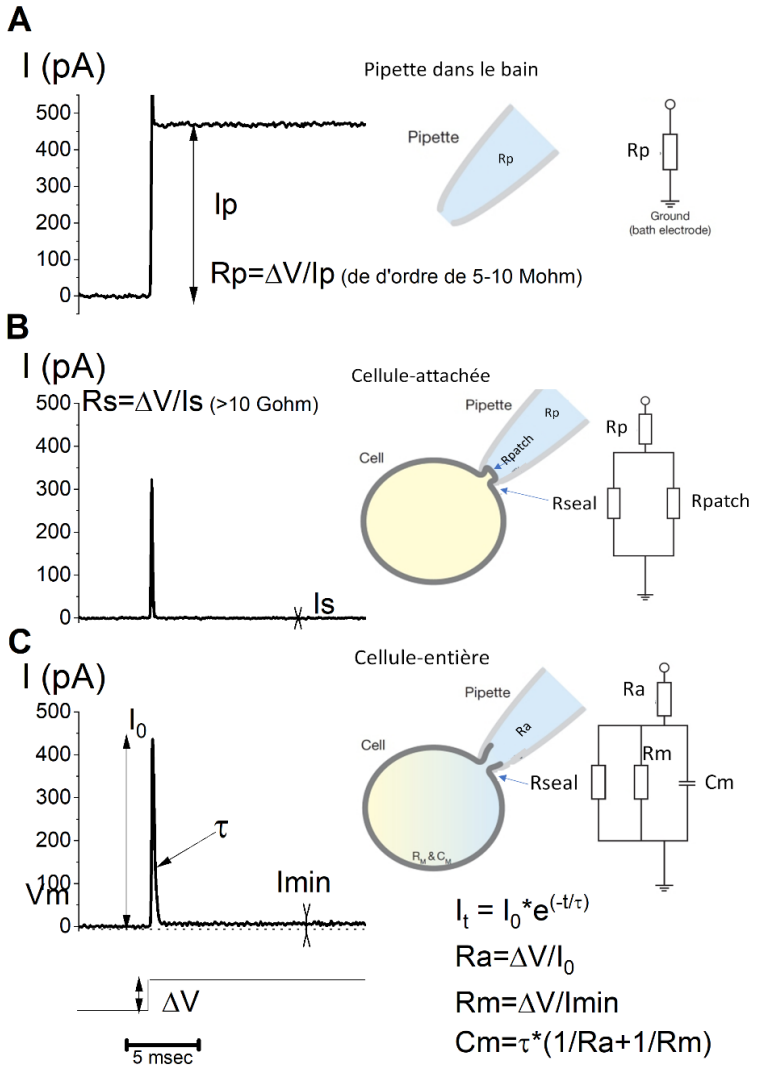


Figure A.1 : Principe de mesure des paramètres électrophysiologiques. Les valeurs de résistance de pipette, résistance d'accès (résistance série), résistance de seal, résistance membranaire et capacité membranaire sont mesurées en potentiel imposé grâce à une variation de potentiel de membrane imposée à la cellule, généralement d'amplitude 5 à 10 mV (représentée en bas). Lorsque la pipette est dans le bain (A), la composante principale est la résistance de pipette Rp, classiquement comprise entre 2 et 10 MOhm. Lorsque la pipette est posée sur une cellule et qu'une dépression est appliquée à l'extrémité de la pipette, la membrane se colle au verre, on a un circuit RC constitué de la capacité du patch de membrane (non représenté ici en B) en parallèle avec les résistances du seal et du patch de membrane et en série avec la résistance de la pipette. Lors de la variation de potentiel, le courant capacitif généré décroit vers une valeur minimum Is. L'estimation de ce courant Is permet d'évaluer la résistance du seal (à la limite près qu'on ne fait pas la distinction entre la contribution de la résistance du seal et de la résistance du patch de membrane). On considère généralement qu'une résistance de seal de 10 GOhm est une bonne valeur de seal pour effectuer des mesures correctes et reflète une bonne adhésion des cellules au verre de la micropipette. Les courants capacitifs sont ensuite annulés de manière analogique par des circuits de compensation. Lors du passage en cellule entière (C), la variation de potentiel induit des courants capacitifs correspondant au circuit électrique équivalent de la cellule. La résistance d'accès correspond à la résistance série et découle du fait que la résistance de la pipette se trouve augmentée par des fragments de membrane qui viennent obturer partiellement la pointe de la pipette, Ra est donc supérieur à Rp. La résistance d'accès est calculée en mesurant le courant maximum I0. Rm est calculé grâce à la mesure du courant minimum à l'état stable. Cm est calculé grâce à la mesure de la constante de temps τ obtenue après fitting de la décroissance exponentielle du courant capacitif (mesure et analyse effectuées par le logiciel PulseFit).

Annexe 4 : Tableau de calcul du potentiel de jonction liquide de patch-clamp

Le potentiel de jonction liquide a été calculé à partir de l'équation de Nernst-Planck stationnaire (Marino et al., 2014) en utilisant le logiciel LJPcalc (https://swharden.com/LJPcalc).

Tableau A.1 : concentrations de chaque ion contenu dans les solutions intracellulaires et extracellulaires utilisées en patch-clamp

Ion	Valence	Mobility m/s/N	Conductivity S·cm²/mol	A mM	B mM	Edit
K	1	4,755e11	73,5	150	6,04	
Na	1	3,242e11	50,11	10	157,2	
Cl	-1	4,936e11	76,31	12	154,2	
Gluconate	-1	1,569e11	24,255	140	0	
Mg	2	1,716e11	53,06	1	1	
Ca	2	1,924e11	59,5	0	2	
HEPES	-1	1,426e11	22,05	10	10	
HCO3	-1	2,879e11	44,5	0	4,3	

°C 20 Details Examples Ion Set

Tableau A.2 : Résultats du calcul du potentiel de jonction liquide mesuré

	Target			Latest			Best	
Ion	A	B	Φ	B	Error	Φ	B	Error
Cl (-1)	12	154,2	143,1377	154,2003	<1%	143,1377	154,2003	<1%
Gluconate (-1)	140	0	-87,7154	-0	<1%	-87,7154	-0	<1%
Mg (+2)	1	1	0,6141	1,0001	<1%	0,6141	1,0001	<1%
Ca (+2)	0	2	1,9698	2,0006	<1%	1,9698	2,0006	<1%
HEPES (-1)	10	10	-2,5703	10,0002	<1%	-2,5703	10,0002	<1%
HCO3 (-1)	0	4,3	2,7123	4,3	<1%	2,7123	4,3	<1%
K (+1)	150	6,04	-143,96	6,04	<1%	-143,96	6,04	<1%
Na (+1)	10	157,2	194,3566	156,459	<1%	194,3566	156,459	<1%

Latest LJP = 15,165266027915157 mV
Best LJP = 15,165266027915157 mV
Solutions Tested: 23
Calculation Time: 0,51 sec

Potentiel de jonction = +15,165 mV

Annexe 5 : Principe de mesure de calcium avec une sonde ratiométrique

A partir du ratio de fluorescence mesurée à 340 et 380 nm, il est possible de déterminer la concentration en calcium intracellulaire. Cette annexe a pour vocation à présenter la démonstration mathématique associée. Cette démonstration est également disponible dans (Mammano & Bortolozzi, 2010).

Équilibre réactionnel entre Ca^{2+} et Fura2 :

$Ca^{2+} + Fura2 \leftrightarrow Fura2\text{-}Ca^{2+}$

$$Kd = \frac{[Fura2] * [Ca]}{[Fura2Ca]}$$

En mesurant la fluorescence à 2 λ excitation ($\lambda 1 = 340$ nm et $\lambda 2 = 380$nm)

Les mesures de fluorescence sont appelées :
F340 (intensité lumineuse émise à 510 nm après une excitation à 340 nm)
F380 (intensité lumineuse émise à 510 nm après une excitation à 380 nm)

$$F340 = x1 \times [Fura2] + y1 \times [Fura2Ca]$$
$$F380 = x2 \times [Fura2] + y2 \times [Fura2Ca]$$

Comme

$$[Fura2Ca] = \frac{[Fura2] * [Ca]}{Kd}$$

On a

$$F340 = x1 \times [Fura2] + y1 \times \frac{[Fura2] * [Ca]}{Kd} = [Fura2] \times (x1 + y1 \times \frac{[Ca]}{Kd})$$

$$F380 = x2 \times [Fura2] + y2 \times \frac{[Fura2] * [Ca]}{Kd} = [Fura2] \times (x2 + y2 \times \frac{[Ca]}{Kd})$$

Posons :

$$R = \frac{F340}{F380}$$

Quand $[Ca^{2+}]$ tend vers 0 :

$$F340 = x1 \times [Fura2]$$
$$F380 = x2 \times [Fura2]$$

Dans cette situation :

$$R = \frac{F340}{F380} = \frac{x1}{x2} = Rmin$$

Quand [Ca] tend vers des valeurs élevées saturant tout le Fura (sous forme complexée), la forme Fura2 devient négligeable, on a alors :

$$F340 = y1 \times [Fura2] \times \frac{[Ca]}{Kd}$$
$$F380 = y2 \times [Fura2] \times \frac{[Ca]}{Kd}$$

Dans cette situation :

$$R = \frac{F340}{F380} = \frac{y1}{y2} = Rmax$$

On a :

$$R = \frac{[Fura]2] \times (x1 + y1 \times {[Ca]}/{Kd})}{[Fura]2] \times (x2 + y2 \times {[Ca]}/{Kd})} = \frac{x1 + y1 \times {[Ca]}/{Kd}}{x2 + y2 \times {[Ca]}/{Kd}}$$

En remaniant, on a :

$$[Ca] = Kd \times \frac{(R \times x2 - x1)}{(y1 - R \times y2)}$$

En divisant par x2 et y2, et en posant

$$\beta = \frac{x2}{y2}$$

On obtient l'équation de (Grynkiewicz et al., 1985) :

$$[Ca] = Kd \times \beta \times \frac{(R - Rmin)}{Rmax - R}$$

Avec :
Kd = 220 nmol.L^{-1}(donnée de la littérature)
Rmin = Ratio R minimum quand [Ca] tend vers 0
Rmax = Ratio R maximum quand [Ca] tend vers des concentrations saturant le Fura2

Rmin, Rmax et ß sont des constantes dans des conditions de mesure standardisées et peuvent être déterminées expérimentalement. Dans des conditions idéales, la concentration en calcium intracellulaire mesurée avec cette technique est ici indépendante de la quantité totale de Fura2, des phénomènes de bleaching...

La courbe reliant le ratio R avec la concentration en Ca^{2+} (avec par exemple Rmax = 10, Rmin = 0,5 et b=3) est tracée avec l'équation ci-dessous déduite de l'équation de Grynkiewz. Cette courbe est illustrée en figure A.2. On voit que le Fura2 mesure les variations de calcium correctement entre 50 $nmol.L^{-1}$ et 2000 $nmol.L^{-1}$, dans la gamme de concentrations physiologiques cytosoliques de calcium libre.

$$R = \frac{([Ca] \times Rmax + Rmin \times {Kd}/{\beta}}{[Ca] + {Kd}/{\beta}}$$

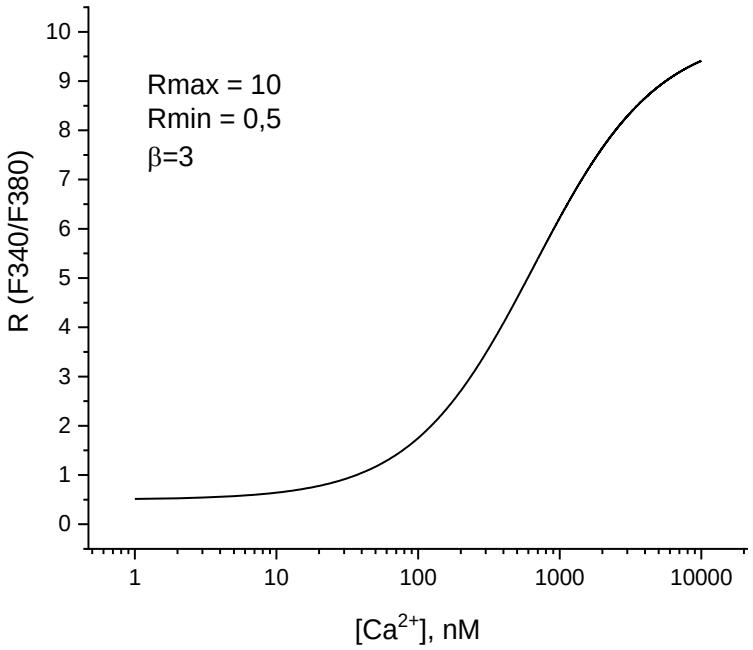


Figure A.2 : Ratio de fluorescence émise entre 340 et 380 nm en fonction de la concentration en calcium. Figure réalisée à l'aide du logiciel Origin 2021.

Annexe 6 : Mécanisme d'action de la TRH

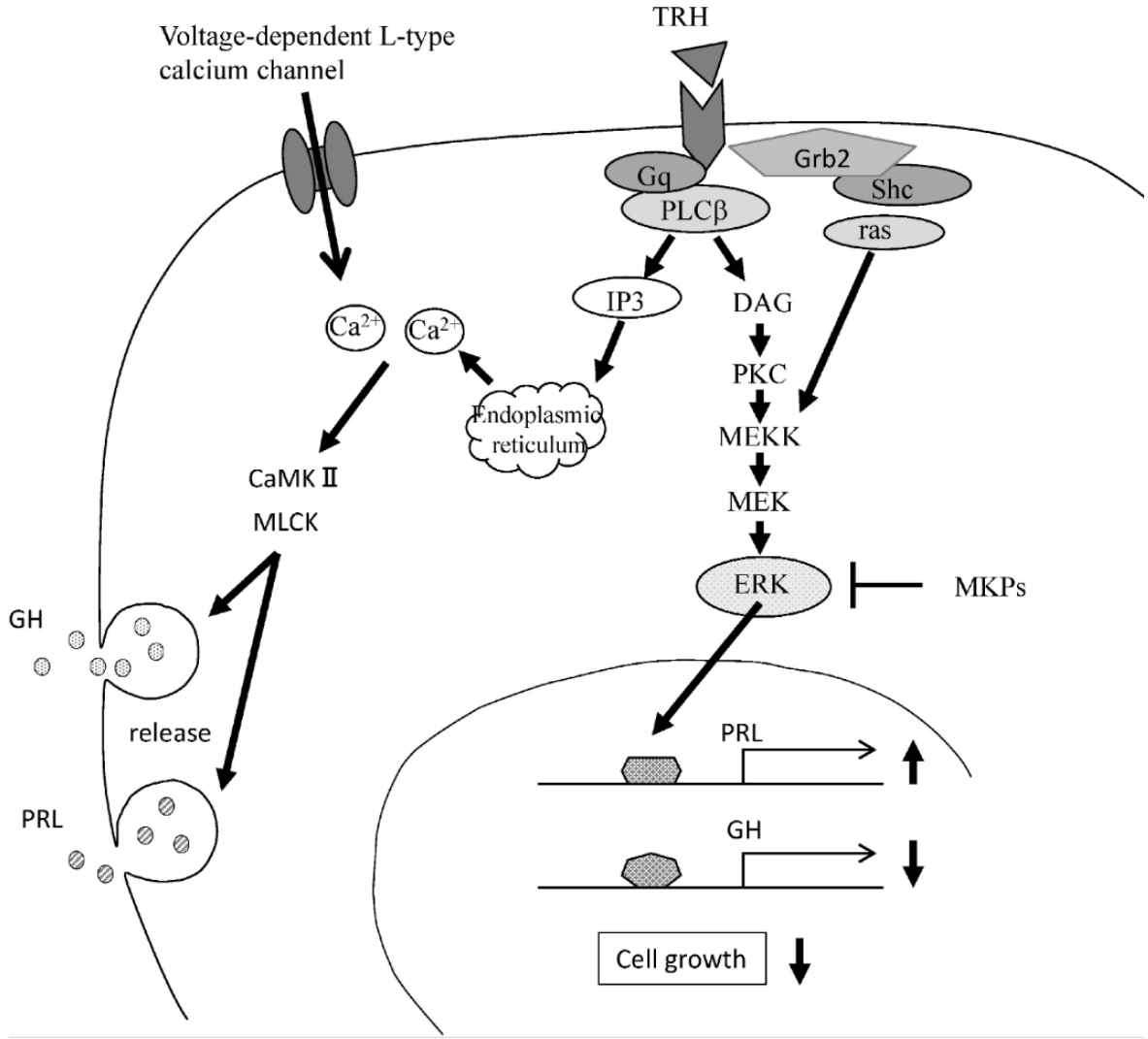


Figure A.3 : Mécanisme d'action de la *Thyrotropin Releasing Hormone*. La *Thyrotropin Releasing Hormone* (TRH) se fixe sur un récepteur membranaire et active deux voies métaboliques distinctes. La voie Diacylglycérol (DAG) permettra de stimuler la production d'hormone de croissance et de prolactine. La voie inositol triphosphate (IP3) provoque une augmentation de la concentration de calcium intracytosolique qui permet le relargage de l'hormone de croissance (GH) et de la prolactine (PRL). Figure issue de (Kanasaki et al., 2015).

Annexe 7 : Analyse statistique de l'évolution des paramètres des signaux électriques émis par des cellules GH4C1 exposées à la 4-AP

Les analyses statistiques présentées dans ce chapitre 4 ont été réalisées directement dans le logiciel Origin (version 2022). Au regard de la taille des échantillons comparés (n=10), nous avons utilisé le test non paramétrique de Wilcoxon, utilisé pour des échantillons dépendants dont les distributions ne suivent pas une loi normale (Haynes, 2013). Le seuil de significativité a été fixé à $p<0.05$.

A) <u>Evolution de la durée des *bursts* et potentiels d'action de cellules GH4C1 exposées à la 4-AP : tableau bilan du test statistique</u> :

Wilcoxon Signed Ranks Test (04/10/2023 16:14:41)

Notes

X-Function	Wilcoxon Signed Ranks Test
User Name	Nathan
Time	04/10/2023 16:14:41
Data Filter	No

Input Data

	Data	Range
1st Data Range	[Book1]Sheet1!A	[1*:10*]
2nd Data Range	[Book1]Sheet1!B	[1*:10*]

Descriptive Statistics

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max
A	10	59,0625	68,75	84,52797	132,44078	169,23077
B	10	69,11765	97,94444	120,8502	173,15341	212,31343

Ranks

		N	Mean Rank	Sum Rank
B-A	Positive Ranks	10	5,5	55
	Negative Ranks	0	0	0

Test Statistics

	W	Z	Exact Prob>|W|	Asymp. Prob>|W|
	0	-2,75209	0,00195	0,00592

Null Hypothesis: Median1 = Median2
Alternative Hypothesis: Median1 <> Median2
At the 0.05 level, the two distributions are significantly different.

Figure A.4 : Résultat du test non paramétrique Wilcoxon réalisé par le biais du logiciel Origin 2022 sur l'ensemble des données de durée des bursts et potentiels d'action de GH4C1 exposées à la 4-aminopyridine.

B) <u>Evolution de la fréquence des *bursts* et potentiels d'action de cellules GH4C1 exposées à la 4-AP : tableau bilan du test statistique</u> :

Wilcoxon Signed Ranks Test (04/10/2023 16:24:32)

Notes

X-Function	Wilcoxon Signed Ranks Test
User Name	Nathan
Time	04/10/2023 16:24:32
Data Filter	No

Input Data

	Data	Range
1st Data Range	[Book1]Sheet1!A	[1*:10*]
2nd Data Range	[Book1]Sheet1!B	[1*:10*]

Descriptive Statistics

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max
A	10	0,1875	0,26875	0,55385	0,94659	2,27273
B	10	0,08621	0,12023	0,31898	0,36499	1,52308

Ranks

		N	Mean Rank	Sum Rank
B-A	Positive Ranks	1	2	2
	Negative Ranks	9	5,88889	53

Test Statistics

W	Z	Exact Prob>|W|	Asymp. Prob>|W|
53	2,54824	0,00586	0,01083

Null Hypothesis: Median1 = Median2

Alternative Hypothesis: Median1 <> Median2

At the 0.05 level, the two distributions are significantly different.

Figure A.5 : Résultat du test non paramétrique Wilcoxon réalisé par le biais du logiciel Origin 2022 sur l'ensemble des données de fréquence des bursts et potentiels d'action de GH4C1 exposées à la 4-aminopyridine.

Annexe 8 : mesure de bruit du banc d'enregistrement

Campagne de mesures de bruit permettant de définir la tension de bruit au niveau de l'électrode à partir de la courbe représentant la densité spectrale de tension (µV/√Hz) en fonction de la fréquence (Hz). L'analyse des données et la détermination des grandeurs caractéristiques s'appuient sur la nature du bruit blanc gaussien.

- La tension efficace de bruit (après amplification) par un gain de 5000, pointes posées est de : **Vbs=7,3 mVeff** sur la bande passante de 1 KHz,
- La tension efficace de bruit ramenée au niveau de l'électrode (avant amplification) utilisée pour la détection Vbe est égale à **Vbe**= 7,3^{e}-3/5000 **=1,46 µVeff,**
- La tension pic-pic de bruit ramenée au niveau de l'électrode (avant amplification) utilisée pour la détection est **Vpp**=1,46 µVeff*6= **8,76 µVpp**.

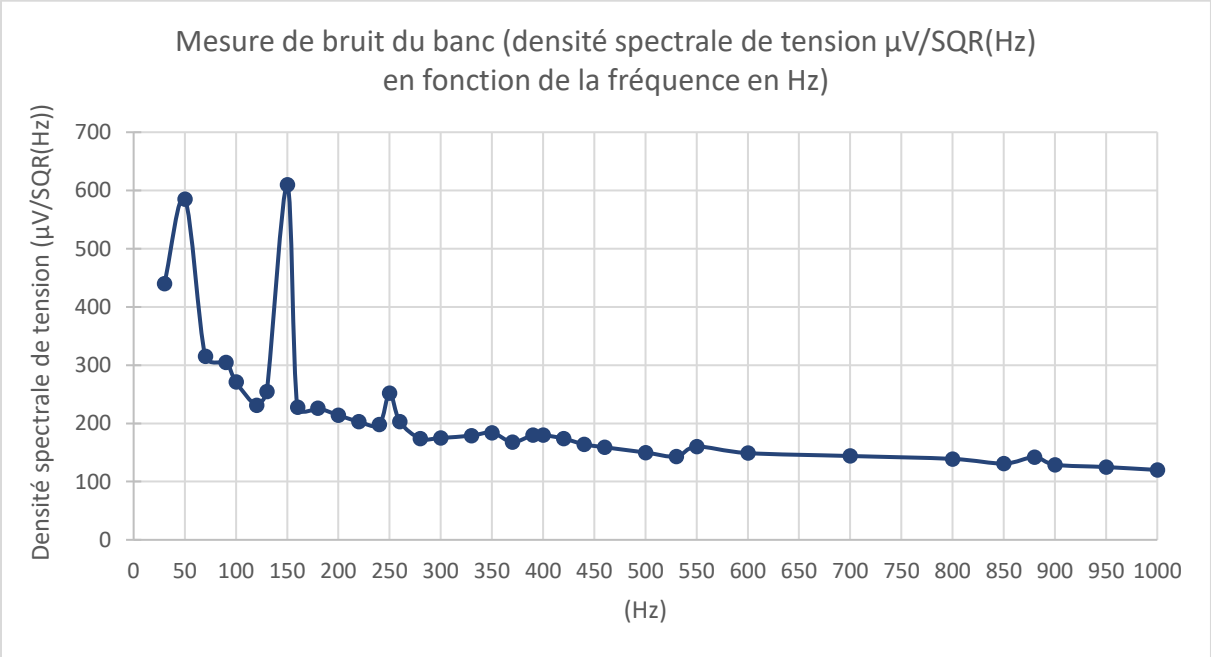


Figure A.6 : Mesure de bruit du banc : densité spectrale de tension (µV/SQR(Hz) en fonction de la fréquence en Hz.

Références

Ades, H. W., & Engström, H. (1974). Anatomy of the Inner Ear. In Keidel, W.D., Neff, W.D. (Eds.), *Auditory System: Anatomy Physiology (Ear)* (pp. 125–158). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-65829-7_5

Adewole, D. O., Serruya, M. D., Harris, J. P., Burrell, J. C., Petrov, D., Chen, H. I., Wolf, J. A., & Cullen, D. K. (2016). The Evolution of Neuroprosthetic Interfaces. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, *44*(1–2). https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.2016017198

Adrian, R. H. (1980). The Capacity of Cell Membranes: Gating Current Measurements. In A. Borsellino, P. Omodeo, R. Strom, A. Vecli, & E. Wanke (Eds.), *Developments in Biophysical Research* (pp. 49–55). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-1077-8_6

Aggarwal, S., & Chugh, N. (2020). Ethical Implications of Closed Loop Brain Device: 10-Year Review. *Minds and Machines*, *30*(1), 145–170. https://doi.org/10.1007/s11023-020-09518-7

Agorelius, J., Tsanakalis, F., Friberg, A., Thorbergsson, P. T., Pettersson, L., & Schouenborg, J. (2015). An array of highly flexible electrodes with a tailored configuration locked by gelatin during implantation—Initial evaluation in cortex cerebri of awake rats. *Frontiers in Neuroscience*, *9*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2015.00331

Akita, Y., Kawasaki, H., Imajoh-Ohmi, S., Fukuda, H., Ohno, S., Hirano, H., Ono, Y., & Yonekawa, H. (2007). Protein kinase C ε phosphorylates keratin 8 at Ser8 and Ser23 in GH4C1 cells stimulated by thyrotropin-releasing hormone. *The FEBS Journal*, *274*(13), 3270–3285. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05853.x

Angeli, C. A., Boakye, M., Morton, R. A., Vogt, J., Benton, K., Chen, Y., Ferreira, C. K., & Harkema, S. J. (2018). Recovery of Over-Ground Walking after Chronic Motor Complete Spinal Cord Injury. *The New England Journal of Medicine*, *379*(13), 1244–1250. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1803588

Arfin, S. K., & Sarpeshkar, R. (2012). An Energy-Efficient, Adiabatic Electrode Stimulator With Inductive Energy Recycling and Feedback Current Regulation. *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems*, *6*(1), 1–14. https://doi.org/10.1109/TBCAS.2011.2166072

Armstrong, C. M., & Matteson, D. R. (1986). The role of calcium ions in the closing of K channels. *The Journal of General Physiology*, *87*(5), 817–832. https://doi.org/10.1085/jgp.87.5.817

Badia, J., Boretius, T., Andreu, D., Azevedo-Coste, C., Stieglitz, T., & Navarro, X. (2011). Comparative analysis of transverse intrafascicular multichannel, longitudinal intrafascicular and multipolar cuff electrodes for the selective stimulation of nerve fascicles. *Journal of Neural Engineering*, *8*(3), 036023. https://doi.org/10.1088/1741-2560/8/3/036023

Barnett, H. H., Heimbuck, A. M., Pursell, I., Hegab, R. A., Sawyer, B. J., Newman, J. J., & Caldorera-Moore, M. E. (2019). Poly (ethylene glycol) hydrogel scaffolds with multiscale porosity for culture of human adipose-derived stem cells. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *30*(11), 895–918. https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1612725

Barnett, M. W., & Larkman, P. M. (2007). The action potential. *Practical Neurology*, *7*(3), 192–197.

Barone, D. G., Carnicer-Lombarte, A., Tourlomousis, P., Hamilton, R. S., Prater, M., Rutz, A. L., Dimov, I. B., Malliaras, G. G., Lacour, S. P., Robertson, A. A. B., Franze, K.,

Fawcett, J. W., & Bryant, C. E. (2022). Prevention of the foreign body response to implantable medical devices by inflammasome inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(12), e2115857119. https://doi.org/10.1073/pnas.2115857119

Barriga-Rivera, A., Bareket, L., Goding, J., Aregueta-Robles, U. A., & Suaning, G. J. (2017). Visual Prosthesis: Interfacing Stimulating Electrodes with Retinal Neurons to Restore Vision. *Frontiers in Neuroscience*, *11*, 620. https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00620

Bashirullah, R., Harris, J. G., Sanchez, J. C., Nishida, T., & Principe, J. C. (2007). Florida Wireless Implantable Recording Electrodes (FWIRE) for Brain Machine Interfaces. *2007 IEEE International Symposium on Circuits and Systems (ISCAS)*, 2084–2087. https://doi.org/10.1109/ISCAS.2007.378509

Baumert, M., Immanuel, S., McKane, S., & Linz, D. (2023). Transvenous phrenic nerve stimulation for the treatment of central sleep apnea reduces episodic hypoxemic burden. *International Journal of Cardiology*, *378*, 89–95. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2023.02.041

Bean, B. P. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nature Reviews. Neuroscience*, *8*(6), 451–465. https://doi.org/10.1038/nrn2148

Belkacem, A. N., Jamil, N., Khalid, S., & Alnajjar, F. (2023). On closed-loop brain stimulation systems for improving the quality of life of patients with neurological disorders. *Frontiers in Human Neuroscience*, *17*, 1085173. https://doi.org/10.3389/fnhum.2023.1085173

Benabid, A. L. (2003). Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurobiology*, *13*(6), 696–706. https://doi.org/10.1016/j.conb.2003.11.001

Benabid, A. L., Pollak, P., Louveau, A., Henry, S., & de Rougemont, J. (1987). Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Applied Neurophysiology*, *50*(1–6), 344–346. https://doi.org/10.1159/000100803

Bestel, R., van Rienen, U., Thielemann, C., & Appali, R. (2020). *Measuring Neuronal Signals with Microelectrode Arrays: A Finite Element Analysis* (p. 2020.06.07.139014). bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2020.06.07.139014

Bloem, B. R., Okun, M. S., & Klein, C. (2021). Parkinson's disease. *The Lancet*, *397*(10291), 2284–2303. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00218-X

Boi, F., Moraitis, T., De Feo, V., Diotalevi, F., Bartolozzi, C., Indiveri, G., & Vato, A. (2016). A Bidirectional Brain-Machine Interface Featuring a Neuromorphic Hardware Decoder. *Frontiers in Neuroscience*, *10*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2016.00563

Boretius, T., Badia, J., Pascual-Font, A., Schuettler, M., Navarro, X., Yoshida, K., & Stieglitz, T. (2010). A transverse intrafascicular multichannel electrode (TIME) to interface with the peripheral nerve. *Biosensors and Bioelectronics*, *26*(1), 62–69. https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.05.010

Bouton, C. E., Shaikhouni, A., Annetta, N. V., Bockbrader, M. A., Friedenberg, D. A., Nielson, D. M., Sharma, G., Sederberg, P. B., Glenn, B. C., Mysiw, W. J., Morgan, A. G., Deogaonkar, M., & Rezai, A. R. (2016). Restoring cortical control of functional movement in a human with quadriplegia. *Nature*, *533*(7602), 247–250. https://doi.org/10.1038/nature17435

Brady, K. D., Wagner, K. A., Tashjian, A. H., & Golan, D. E. (1994). Relationships between amplitudes and kinetics of rapid cytosolic free calcium fluctuations in GH4C1 rat pituitary cells: Roles for diffusion and calcium-induced calcium release. *Biophysical Journal*, *66*(5), 1697–1705.

Brain Computer Interface Global Market Report 2022: Ukraine-Russia War Impact. (2022, December). ReportLinker. https://www.reportlinker.com/p06374656/Brain-Computer-Interface-Global-Market-Report-Ukraine-Russia-War-Impact.html

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

Broccard, F. D., Joshi, S., Wang, J., & Cauwenberghs, G. (2017). Neuromorphic neural interfaces: From neurophysiological inspiration to biohybrid coupling with nervous systems. *Journal of Neural Engineering*, *14*(4), 041002. https://doi.org/10.1088/1741-2552/aa67a9

Brocker, D. T., & Grill, W. M. (2013). Chapter 1—Principles of electrical stimulation of neural tissue. In A. M. Lozano & M. Hallett (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 116, pp. 3–18). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53497-2.00001-2

Bronte-Stewart, H., Beudel, M., Ostrem, J. L., Fasano, A., Almeida, L., Hassell, T., Moro, E., Gostkowski, M., Mitchell, K. T., Hainque, E., Sarangmat, N., Stanslaski, S., Tonder, L., Summers, R., Raike, R. S., & Herrington, T. M. (2023). Adaptive DBS Algorithm for Personalized Therapy in Parkinson's Disease: ADAPT-PD clinical trial methodology and early data (P1-11.002). *Neurology*, *100*(17 Supplement 2). https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000203099

Brunet, M. (2016). *Conditionnement et fonctionnalisation de la surface du nitrure de silicium* [Phdthesis, Université Paris Saclay (COmUE)]. https://pastel.hal.science/tel-01508952

Bruno, G., Colistra, N., Melle, G., Cerea, A., Hubarevich, A., Deleye, L., De Angelis, F., & Dipalo, M. (2020). Microfluidic Multielectrode Arrays for Spatially Localized Drug Delivery and Electrical Recordings of Primary Neuronal Cultures. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 626. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00626

Buccelli, S., Bornat, Y., Colombi, I., Ambroise, M., Martines, L., Pasquale, V., Bisio, M., Tessadori, J., Nowak, P., Grassia, F., Averna, 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

Burke, J. F., Kunwar, N., Yaroshinsky, M. S., Louie, K. H., Shirvalkar, P., Su, P., Henry, M., Pasvankas, G., Poree, L., Jacques, L., & Wang, D. D. (2021). Epidural Spinal Electrogram Provides Direct Spinal Recordings in Awake Human Participants. *Frontiers in Human Neuroscience*, *15*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnhum.2021.721076

Cagnan, H., Denison, T., McIntyre, C., & Brown, P. (2019). Emerging technologies for improved deep brain stimulation. *Nature Biotechnology*, *37*(9), Article 9. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0244-6

Caldwell, R., Street, M. G., Sharma, R., Takmakov, P., Baker, B., & Rieth, L. (2020). Characterization of Parylene-C degradation mechanisms: In vitro reactive accelerated aging model compared to multiyear in vivo implantation. *Biomaterials*, *232*, 119731. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119731

Cardoso, B. D., Castanheira, E. M. S., Lanceros-Méndez, S., & Cardoso, V. F. (2023). Recent Advances on Cell Culture Platforms for In Vitro Drug Screening and Cell Therapies: From Conventional to Microfluidic Strategies. *Advanced Healthcare Materials*, *12*(18), 2202936. https://doi.org/10.1002/adhm.202202936

Cassar, I. R., Yu, C., Sambangi, J., Lee, C. D., Whalen, J. J., Petrossians, A., & Grill, W. M. (2019). Electrodeposited platinum-iridium coating improves in vivo recording performance of chronically implanted microelectrode arrays. *Biomaterials*, *205*, 120–132. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.03.017

Ceyssens, F., Deprez, M., Turner, N., Kil, D., Kuyck, K. van, Welkenhuysen, M., Nuttin, B., Badylak, S., & Puers, R. (2017). Extracellular matrix proteins as temporary coating for thin-film neural implants. *Journal of Neural Engineering*, *14*(1), 014001. https://doi.org/10.1088/1741-2552/14/1/014001

Chan, P. H., Yurko, M., & Fishman, R. A. (1982). Phospholipid Degradation and Cellular Edema Induced by Free Radicals in Brain Cortical Slices. *Journal of Neurochemistry*, *38*(2), 525–531. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1982.tb08659.x

Chang, E. F., & Anumanchipalli, G. K. (2020). Toward a Speech Neuroprosthesis. *JAMA*, *323*(5), 413–414. https://doi.org/10.1001/jama.2019.19813

Chen, S., & Allen, M. G. (2012). Extracellular matrix-based materials for neural interfacing. *MRS Bulletin*, *37*(6), 606–613. https://doi.org/10.1557/mrs.2012.120

Chenais, N. A. L., Airaghi Leccardi, M. J. I., & Ghezzi, D. (2021). Photovoltaic retinal prosthesis restores high-resolution responses to single-pixel stimulation in blind retinas. *Communications Materials*, *2*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s43246-021-00133-2

Chia, L. S., Thompson, J. E., & Moscarello, M. A. (1983). Disorder in human myelin induced by superoxide radical: An in vitro investigation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *117*(1), 141–146. https://doi.org/10.1016/0006-291x(83)91552-8

Chiang, C.-H., Won, S. M., Orsborn, A. L., Yu, K. J., Trumpis, M., Bent, B., Wang, C., Xue, Y., Min, S., Woods, V., Yu, C., Kim, B. H., Kim, S. B., Huq, R., Li, J., Seo, K. J., Vitale, F., Richardson, A., Fang, H., Huang, Y., Shepard, K., Pesaran, B., Rogers, J.A. & Viventi, J. (2020). Development of a neural interface for high-definition, long-term recording in rodents and nonhuman primates. *Science Translational Medicine*, *12*(538), eaay4682. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay4682

Chiappalone, M., Cota, V. R., Carè, M., Di Florio, M., Beaubois, R., Buccelli, S., Barban, F., Brofiga, M., Averna, A., Bonacini, F., Guggenmos, D. J., Bornat, Y., Massobrio, P., Bonifazi, P., & Levi, T. (2022). Neuromorphic-Based Neuroprostheses for Brain Rewiring: State-of-the-Art and Perspectives in Neuroengineering. *Brain Sciences*, *12*(11), 1578. https://doi.org/10.3390/brainsci12111578

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

Choi, K. L., Aldrich, R. W., & Yellen, G. (1991). Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K+ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(12), 5092–5095. https://doi.org/10.1073/pnas.88.12.5092

Chung, T., Wang, J. Q., Wang, J., Cao, B., Li, Y., & Pang, S. W. (2015). Electrode modifications to lower electrode impedance and improve neural signal recording sensitivity. *Journal of Neural Engineering*, *12*(5), 056018. https://doi.org/10.1088/1741-2560/12/5/056018

Cinel, C., Valeriani, D., & Poli, R. (2019). Neurotechnologies for Human Cognitive Augmentation: Current State of the Art and Future Prospects. *Frontiers in Human Neuroscience*, *13*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnhum.2019.00013

Coin, A., & Dubljević, V. (2023). An Introduction to Policy, Identity, and Neurotechnology: The Neuroethics of Brain–Computer Interfaces. In V. Dubljević & A. Coin (Eds.), *Policy, Identity, and Neurotechnology: The Neuroethics of Brain-Computer Interfaces*

(pp. 1–7). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-26801-4_1

Creasey, G. H., Kilgore, K. L., Brown-Triolo, D. L., Dahlberg, J. E., Peckham, P. H., & Keith, M. W. (2000). Reduction of costs of disability using neuroprostheses. *Assistive Technology: The Official Journal of RESNA*, *12*(1), 67–75. https://doi.org/10.1080/10400435.2000.10132010

Cullen, D. K., & Pfister, B. (2011). State of the art and future challenges in neural engineering: Neural interfaces: foreword / editors' commentary (volume 1). *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, *39*(1), 1–3. https://doi.org/10.1615/critrevbiomedeng.v39.i1.10

Cuttaz, E., Goding, J., Vallejo-Giraldo, C., Aregueta-Robles, U., Lovell, N., Ghezzi, D., & Green, R. A. (2019). Conductive elastomer composites for fully polymeric, flexible bioelectronics. *Biomaterials Science*, *7*(4), 1372–1385. https://doi.org/10.1039/C8BM01235K

de la Oliva, N., del Valle, J., Delgado-Martínez, I., Mueller, M., Stieglitz, T., & Navarro, X. (2019). Long-Term Functionality of Transversal Intraneural Electrodes is Improved by Dexamethasone Treatment. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, *27*(3), 457–464. https://doi.org/10.1109/TNSRE.2019.2897256

Delgado, J. M. R. (1969). *Physical Control of the Mind: Toward a Psychocivilized Society*. Harper & Row.

Denby, B., Schultz, T., Honda, K., Hueber, T., Gilbert, J. M., & Brumberg, J. S. (2010). Silent speech interfaces. *Speech Communication*, *52*(4), 270–287. https://doi.org/10.1016/j.specom.2009.08.002

Denison, T., Consoer, K., Santa, W., Avestruz, A.-T., Cooley, J., & Kelly, A. (2007). A 2 \mu\hboxW 100 nV/rtHz Chopper-Stabilized Instrumentation Amplifier for Chronic Measurement of Neural Field Potentials. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, *42*(12), 2934–2945. https://doi.org/10.1109/JSSC.2007.908664

Desai, S. J., Bharne, A. P., Upadhya, M. A., Somalwar, A. R., Subhedar, N. K., & Kokare, D. M. (2014). A simple and economical method of electrode fabrication for brain self-stimulation in rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *69*(2), 141–149. https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.12.006

Dethier, J., Nuyujukian, P., Ryu, S. I., Shenoy, K. V., & Boahen, K. (2013). Design and validation of a real-time spiking-neural-network decoder for brain-machine interfaces. *Journal of Neural Engineering*, *10*(3), 036008. https://doi.org/10.1088/1741-2560/10/3/036008

Dorrian, R. M., Berryman, C. F., Lauto, A., & Leonard, A. V. (2023). Electrical stimulation for the treatment of spinal cord injuries: A review of the cellular and molecular mechanisms that drive functional improvements. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *17*, 1095259. https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1095259

Dubinsky, J. M., & Oxford, G. S. (1984a). Ionic currents in two strains of rat anterior pituitary tumor cells. *The Journal of General Physiology*, *83*(3), 309–339. https://doi.org/10.1085/jgp.83.3.309

Dubinsky, J. M., & Oxford, G. S. (1984b). Ionic currents in two strains of rat anterior pituitary tumor cells. *Journal of General Physiology*, *83*(3), 309–339. https://doi.org/10.1085/jgp.83.3.309

Dubinsky, J. M., & Oxford, G. S. (1985). Dual modulation of K channels by thyrotropin-releasing hormone in clonal pituitary cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *82*(12), 4282–4286. https://doi.org/10.1073/pnas.82.12.4282

Dufy, B., MacDermott, A., & Barker, J. L. (1986). Rundown of GH3 cell K+ conductance response to TRH following patch recording can be obviated with GH3 cell extract.

Biochemical and Biophysical Research Communications, *137*(1), 388–396. https://doi.org/10.1016/0006-291X(86)91222-2

Etemadi, L., Mohammed, M., Thorbergsson, P. T., Ekstrand, J., Friberg, A., Granmo, M., Pettersson, L. M. E., & Schouenborg, J. (2016). Embedded Ultrathin Cluster Electrodes for Long-Term Recordings in Deep Brain Centers. *PLOS ONE*, *11*(5), e0155109. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155109

Fattahi, P., Yang, G., Kim, G., & Abidian, M. R. (2014). A review of organic and inorganic biomaterials for neural interfaces. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, *26*(12), 1846–1885. https://doi.org/10.1002/adma.201304496

Ferguson, J. E., Boldt, C., Puhl, J. G., Stigen, T. W., Jackson, J. C., Crisp, K. M., Mesce, K. A., Netoff, T. I., & Redish, A. D. (2012). Nanowires precisely grown on the ends of microwire electrodes permit the recording of intracellular action potentials within deeper neural structures. *Nanomedicine*, *7*(6), 847–853. https://doi.org/10.2217/nnm.11.157

Fernández, E., & Normann, R. A. (2017). CORTIVIS Approach for an Intracortical Visual Prostheses. In V. P. Gabel (Ed.), *Artificial Vision: A Clinical Guide* (pp. 191–201). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41876-6_15

Fifer, M. S., McMullen, D. P., Osborn, L. E., Thomas, T. M., Christie, B., Nickl, R. W., Candrea, D. N., Pohlmeyer, E. A., Thompson, M. C., Anaya, M. A., Schellekens, W., Ramsey, N. F., Bensmaia, S. J., Anderson, W. S., Wester, B. A., Crone, N. E., Celnik, P. A., Cantarero, G. L., & Tenore, F. V. (2022). Intracortical Somatosensory Stimulation to Elicit Fingertip Sensations in an Individual With Spinal Cord Injury. *Neurology*, *98*(7), e679–e687. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000013173

Fink, M. (2001). Convulsive therapy: A review of the first 55 years. *Journal of Affective Disorders*, *63*(1), 1–15. https://doi.org/10.1016/S0165-0327(00)00367-0

FitzGerald, J. J. (2016). Suppression of scarring in peripheral nerve implants by drug elution. *Journal of Neural Engineering*, *13*(2), 026006. https://doi.org/10.1088/1741-2560/13/2/026006

Foutz, T. J., & Wong, M. (2022). Brain stimulation treatments in epilepsy: Basic mechanisms and clinical advances. *Biomedical Journal*, *45*(1), 27–37. https://doi.org/10.1016/j.bj.2021.08.010

Frederick, R. A., Shih, E., Towle, V. L., Joshi-Imre, A., Troyk, P. R., & Cogan, S. F. (2022). Chronic stability of activated iridium oxide film voltage transients from wireless floating microelectrode arrays. *Frontiers in Neuroscience*, *16*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2022.876032

Frey, J., Cagle, J., Johnson, K. A., Wong, J. K., Hilliard, J. D., Butson, C. R., Okun, M. S., & de Hemptinne, C. (2022). Past, Present, and Future of Deep Brain Stimulation: Hardware, Software, Imaging, Physiology and Novel Approaches. *Frontiers in Neurology*, *13*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2022.825178

Fung, S. H., Burstein, D., & Born, R. T. (1998). In vivo microelectrode track reconstruction using magnetic resonance imaging. *Journal of Neuroscience Methods*, *80*(2), 215–224. https://doi.org/10.1016/S0165-0270(98)00003-X

Fux, J. E., Mehta, A., Moffat, J., & Spafford, J. D. (2018). Eukaryotic Voltage-Gated Sodium Channels: On Their Origins, Asymmetries, Losses, Diversification and Adaptations. *Frontiers in Physiology*, *9*, 1406. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01406

Gardner, J. (2013). A history of deep brain stimulation: Technological innovation and the role of clinical assessment tools. *Social Studies of Science*, *43*(5), 707. https://doi.org/10.1177/0306312713483678

Gaunt, R. A., Bruns, T. M., Crammond, D. J., Tomycz, N. D., Moossy, J. J., & Weber, D. J. (2011). Single- and multi-unit activity recorded from the surface of the dorsal root

ganglia with non-penetrating electrode arrays. *2011 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 6713–6716. https://doi.org/10.1109/IEMBS.2011.6091655

George, J. A., Kluger, D. T., Davis, T. S., Wendelken, S. M., Okorokova, E. V., He, Q., Duncan, C. C., Hutchinson, D. T., Thumser, Z. C., Beckler, D. T., Marasco, P. D., Bensmaia, S. J., & Clark, G. A. (2019). Biomimetic sensory feedback through peripheral nerve stimulation improves dexterous use of a bionic hand. *Science Robotics*, *4*(32), eaax2352. https://doi.org/10.1126/scirobotics.aax2352

George, R., Chiappalone, M., Giugliano, M., Levi, T., Vassanelli, S., Partzsch, J., & Mayr, C. (2020). Plasticity and Adaptation in Neuromorphic Biohybrid Systems. *iScience*, *23*(10), 101589. https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101589

Geramifard, N., Lawson, J., Cogan, S. F., & Black, B. J. (2022). A Novel 3D Helical Microelectrode Array for In Vitro Extracellular Action Potential Recording. *Micromachines*, *13*(10), 1692. https://doi.org/10.3390/mi13101692

Ghovanloo, M.-R., Aimar, K., Ghadiry-Tavi, R., Yu, A., & Ruben, P. C. (2016). Physiology and Pathophysiology of Sodium Channel Inactivation. *Current Topics in Membranes*, *78*, 479–509. https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2016.04.001

Gidon, A., Zolnik, T. A., Fidzinski, P., Bolduan, F., Papoutsi, A., Poirazi, P., Holtkamp, M., Vida, I., & Larkum, M. E. (2020). Dendritic action potentials and computation in human layer 2/3 cortical neurons. *Science (New York, N.Y.)*, *367*(6473), 83–87. https://doi.org/10.1126/science.aax6239

Gilbert, F., O'Brien, T., & Cook, M. (2018). The Effects of Closed-Loop Brain Implants on Autonomy and Deliberation: What are the Risks of Being Kept in the Loop? *Cambridge Quarterly of Healthcare Ethics: CQ: The International Journal of Healthcare Ethics Committees*, *27*(2), 316–325. https://doi.org/10.1017/S0963180117000640

Gill, M. L., Grahn, P. J., Calvert, J. S., Linde, M. B., Lavrov, I. A., Strommen, J. A., Beck, L. A., Sayenko, D. G., Van Straaten, M. G., Drubach, D. I., Veith, D. D., Thoreson, A. R., Lopez, C., Gerasimenko, Y. P., Edgerton, V. R., Lee, K. H., & Zhao, K. D. (2018). Neuromodulation of lumbosacral spinal networks enables independent stepping after complete paraplegia. *Nature Medicine*, *24*(11), 1677–1682. https://doi.org/10.1038/s41591-018-0175-7

Gordon, J., Amini, S., & White, M. K. (2013). General overview of neuronal cell culture. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1078*, 1–8. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5_1

Grahn, P. J., Lavrov, I. A., Sayenko, D. G., Van Straaten, M. G., Gill, M. L., Strommen, J. A., Calvert, J. S., Drubach, D. I., Beck, L. A., Linde, M. B., Thoreson, A. R., Lopez, C., Mendez, A. A., Gad, P. N., Gerasimenko, Y. P., Edgerton, V. R., Zhao, K. D., & Lee, K. H. (2017). Enabling Task-Specific Volitional Motor Functions via Spinal Cord Neuromodulation in a Human With Paraplegia. *Mayo Clinic Proceedings*, *92*(4), 544–554. https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.02.014

Greenwald, E., Masters, M. R., & Thakor, N. V. (2016). Bidirectional Neural Interfaces. *Medical & Biological Engineering & Computing*, *54*(1), 1–17. https://doi.org/10.1007/s11517-015-1429-x

Gregerson, K. A. (2003). Functional expression of the dopamine-activated K+ current in lactotrophs during the estrous cycle in female rats. *Endocrine*, *20*(1), 67–74. https://doi.org/10.1385/ENDO:20:1-2:67

Grider, M. H., Belcea, C. Q., Covington, B. P., Reddy, V., & Sharma, S. (2023). Neuroanatomy, Nodes of Ranvier. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537273/

Grienberger, C., & Konnerth, A. (2012). Imaging Calcium in Neurons. *Neuron*, *73*(5), 862–885. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.011

Griot, C., Vandevelde, M., Richard, A., Peterhans, E., & Stocker, R. (1990). Selective degeneration of oligodendrocytes mediated by reactive oxygen species. *Free Radical Research Communications*, *11*(4–5), 181–193. https://doi.org/10.3109/10715769009088915

Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, *260*(6), 3440–3450. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)83641-4

Guardamagna, M., Eichler, R., Pedrosa, R., Aarts, A., Meyer, A. F., & Battaglia, F. P. (2022). The Hybrid Drive: A chronic implant device combining tetrode arrays with silicon probes for layer-resolved ensemble electrophysiology in freely moving mice. *Journal of Neural Engineering*, *19*(3), 036030. https://doi.org/10.1088/1741-2552/ac6771

Gulino, M., Kim, D., Pané, S., Santos, S. D., & Pêgo, A. P. (2019). Tissue Response to Neural Implants: The Use of Model Systems Toward New Design Solutions of Implantable Microelectrodes. *Frontiers in Neuroscience*, *13*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.00689

Guyot, M., Simon, T., Ceppo, F., Panzolini, C., Guyon, A., Lavergne, J., Murris, E., Daoudlarian, D., Brusini, R., Zarif, H., Abélanet, S., Hugues-Ascery, S., Divoux, J.-L., Lewis, S. J., Sridhar, A., Glaichenhaus, N., & Blancou, P. (2019). Pancreatic nerve electrostimulation inhibits recent-onset autoimmune diabetes. *Nature Biotechnology*, *37*(12), Article 12. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0295-8

Hadaya, J., Dajani, A.-H., Cha, S., Hanna, P., Challita, R., Hoover, D. B., Ajijola, O. A., Shivkumar, K., & Ardell, J. L. (2023). Vagal Nerve Stimulation Reduces Ventricular Arrhythmias and Mitigates Adverse Neural Cardiac Remodeling Post–Myocardial Infarction. *JACC: Basic to Translational Science*, *8*(9), 1100–1118. https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2023.03.025

Hamet, P., & Tremblay, J. (2017). Artificial intelligence in medicine. *Metabolism*, *69*, S36–S40. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.01.011

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

Hammond, C., & Tritsch, D. (1990). *Neurobiologie cellulaire: Canaux ioniques et transmission synaptique - Constance Hammond; Danièle Tritsch: 9782704006236 - AbeBooks*. Doin.

Hariz, M. I., Blomstedt, P., & Zrinzo, L. (2010). Deep brain stimulation between 1947 and 1987: The untold story. *Neurosurgical Focus*, *29*(2), E1. https://doi.org/10.3171/2010.4.FOCUS10106

Harris, A. R., Newbold, C., Stathopoulos, D., Carter, P., Cowan, R., & Wallace, G. G. (2022). Comparison of the In Vitro and In Vivo Electrochemical Performance of Bionic Electrodes. *Micromachines*, *13*(1), 103. https://doi.org/10.3390/mi13010103

Harrison, R. R. (2008). The Design of Integrated Circuits to Observe Brain Activity. *Proceedings of the IEEE*, *96*(7), 1203–1216. https://doi.org/10.1109/JPROC.2008.922581

Hashemi Noshahr, F., Nabavi, M., & Sawan, M. (2020). Multi-Channel Neural Recording Implants: A Review. *Sensors*, *20*(3), 904. https://doi.org/10.3390/s20030904

Haynes, W. (2013). Wilcoxon Rank Sum Test. In W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, K.-H. Cho, & H. Yokota (Eds.), *Encyclopedia of Systems Biology* (pp. 2354–2355). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7_1185

He, W., McConnell, G. C., Schneider, T. M., & Bellamkonda, R. V. (2007). A Novel Anti-inflammatory Surface for Neural Electrodes. *Advanced Materials*, *19*(21), 3529–3533. https://doi.org/10.1002/adma.200700943

Hedayat, S. (2018). *Conception et fabrication de neurones artificiels pour le traitement bioinspiré de l'information* [These de doctorat, Université de Lille (2018-2021)]. https://www.theses.fr/2018LILUI039

Henniquau, D. (2021). *Conception d'une interface fonctionnelle permettant la communication de neurones artificiels et biologiques pour des applications dans le domaine des neurosciences* [These de doctorat, Université de Lille (2018-2021)]. https://theses.fr/en/2021LILUN032

Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: A linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in Human Neuroscience*, *3*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/neuro.09.031.2009

Herz, A. V. M., Gollisch, T., Machens, C. K., & Jaeger, D. (2006). Modeling Single-Neuron Dynamics and Computations: A Balance of Detail and Abstraction. *Science*, *314*(5796), 80–85. https://doi.org/10.1126/science.1127240

Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes* (Third Edition, Third Edition). Oxford University Press.

Horn, A., & Fox, M. D. (2020). Opportunities of connectomic neuromodulation. *NeuroImage*, *221*, 117180. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2020.117180

Hyakumura, T., Aregueta-Robles, U., Duan, W., Villalobos, J., Adams, W. K., Poole-Warren, L., & Fallon, J. B. (2021). Improving Deep Brain Stimulation Electrode Performance in vivo Through Use of Conductive Hydrogel Coatings. *Frontiers in Neuroscience*, *15*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2021.761525

Isler, H. (1992). [Romantic origins of electrophysiology. *Schweizerische Rundschau fur Medizin Praxis = Revue suisse de medecine Praxis*, *81*(49), 1485–1488.

Jiang, L., Woodington, B., Carnicer-Lombarte, A., Malliaras, G., & Barone, D. G. (2022). Spinal cord bioelectronic interfaces: Opportunities in neural recording and clinical challenges. *Journal of Neural Engineering*, *19*(2), 021003. https://doi.org/10.1088/1741-2552/ac605f

Kagan, B. J., Kitchen, A. C., Tran, N. T., Habibollahi, F., Khajehnejad, M., Parker, B. J., Bhat, A., Rollo, B., Razi, A., & Friston, K. J. (2022). In vitro neurons learn and exhibit sentience when embodied in a simulated game-world. *Neuron*, *110*(23), 3952-3969.e8. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.09.001

Kanasaki, H., Oride, A., Mijiddorj, T., & Kyo, S. (2015). Role of thyrotropin-releasing hormone in prolactin-producing cell models. *Neuropeptides*, *54*, 73–77. https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.08.001

Karttu, A., Lahtonen, K., Heikkilä, J., Väliaho, J., Narkilahti, S., Lekkala, J., & Kallio, P. (2022). Corrosion and Protection of Silicon Nitride Insulators in Microelectrode Array Applications. *IEEE Sensors Journal*, *22*(13), 12504–12514. https://doi.org/10.1109/JSEN.2022.3178640

Kashkoush, A. I., Gaunt, R. A., Fisher, L. E., Bruns, T. M., & Weber, D. J. (2019). Recording single- and multi-unit neuronal action potentials from the surface of the dorsal root ganglion. *Scientific Reports*, *9*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41598-019-38924-w

Kathe, C., Skinnider, M. A., Hutson, T. H., Regazzi, N., Gautier, M., Demesmaeker, R., Komi, S., Ceto, S., James, N. D., Cho, N., Baud, L., Galan, K., Matson, K. J. E., Rowald, A., Kim, K., Wang, R., Minassian, K., Prior, J. O., Asboth, L., Barraud, Q., Lacour, S.P., Levine, A.J., Wagner, F., Bloch, J. & Courtine, G. (2022). The neurons that restore

walking after paralysis. *Nature*, *611*(7936), 540–547. https://doi.org/10.1038/s41586-022-05385-7

Kawada, T., Zheng, C., Tanabe, S., Uemura, T., Sunagawa, K., & Sugimachi, M. (2004). A sieve electrode as a potential autonomic neural interface for bionic medicine. *The 26th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, *2*, 4318–4321. https://doi.org/10.1109/IEMBS.2004.1404202

Keogh, C. (2020). Optimizing the neuron-electrode interface for chronic bioelectronic interfacing. *Neurosurgical Focus*, *49*(1), E7. https://doi.org/10.3171/2020.4.FOCUS20178

Keren, H., Partzsch, J., Marom, S., & Mayr, C. G. (2019). A Biohybrid Setup for Coupling Biological and Neuromorphic Neural Networks. *Frontiers in Neuroscience*, *13*, 432. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00432

Kikkawa, Y. S., Nakagawa, T., Ying, L., Tabata, Y., Tsubouchi, H., Ido, A., & Ito, J. (2014). Growth factor-eluting cochlear implant electrode: Impact on residual auditory function, insertional trauma, and fibrosis. *Journal of Translational Medicine*, *12*(1), 280. https://doi.org/10.1186/s12967-014-0280-4

Kim, E., Kim, J.-Y., & Choi, H. (2017). An SU-8-based microprobe with a nanostructured surface enhances neuronal cell attachment and growth. *Micro and Nano Systems Letters*, *5*(1), 28. https://doi.org/10.1186/s40486-017-0062-x

Koch, B. D., & Schonbrunn, A. (1988). Characterization of the cyclic AMP-independent actions of somatostatin in GH cells. II. An increase in potassium conductance initiates somatostatin-induced inhibition of prolactin secretion. *Journal of Biological Chemistry*, *263*(1), 226–234. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)57382-3

Konat, G. W., & Wiggins, R. C. (1985). Effect of Reactive Oxygen Species on Myelin Membrane Proteins. *Journal of Neurochemistry*, *45*(4), 1113–1118. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1985.tb05530.x

Koo, J., MacEwan, M. R., Kang, S.-K., Won, S. M., Stephen, M., Gamble, P., Xie, Z., Yan, Y., Chen, Y.-Y., Shin, J., Birenbaum, N., Chung, S., Kim, S. B., Khalifeh, J., Harburg, D. V., Bean, K., Paskett, M., Kim, J., Zohny, Z. S., Lee, S.M., Zhang, R., Luo, K., Ji, B., Banks, A., Lee, H.M., Huang, Y., Ray, W.Z. & Rogers, J. A. (2018). Wireless bioresorbable electronic system enables sustained nonpharmacological neuroregenerative therapy. *Nature Medicine*, *24*(12), Article 12. https://doi.org/10.1038/s41591-018-0196-2

Kopach, O., Esteras, N., Wray, S., Abramov, A. Y., & Rusakov, D. A. (2021). Genetically engineered MAPT 10+16 mutation causes pathophysiological excitability of human iPSC-derived neurons related to 4R tau-induced dementia. *Cell Death & Disease*, *12*(8), 716. https://doi.org/10.1038/s41419-021-04007-w

Kular, J. K., Basu, S., & Sharma, R. I. (2014). The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering*, *5*, 2041731414557112. https://doi.org/10.1177/2041731414557112

Kuo, J. T. W., Kim, B. J., Hara, S. A., Lee, C. D., Gutierrez, C. A., Hoang, T. Q., & Meng, E. (2013). Novel flexible Parylene neural probe with 3D sheath structure for enhancing tissue integration. *Lab on a Chip*, *13*(4), 554–561. https://doi.org/10.1039/C2LC40935F

Lacour, S. P., Courtine, G., & Guck, J. (2016). Materials and technologies for soft implantable neuroprostheses. *Nature Reviews Materials*, *1*(10), Article 10. https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.63

Lee, C., Sarwar, S. S., Panda, P., Srinivasan, G., & Roy, K. (2020). Enabling Spike-Based Backpropagation for Training Deep Neural Network Architectures. *Frontiers in Neuroscience*, *14*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2020.00119

Lehninger, A. L. (1968). The neuronal membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *60*(4), 1069–1080. https://doi.org/10.1073/pnas.60.4.1069

Lenarz, T. (2018). Cochlear implant – state of the art. *GMS Current Topics in Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery*, *16*, Doc04. https://doi.org/10.3205/cto000143

Li, H.-F., Chen, S.-A., & Wu, S.-N. (2000). Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca2+-activated K+ current in vascular endothelial cells. *Cardiovascular Research*, *45*(4), 1035–1045. https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00397-1

Li, L.-J., Zhang, J., Zhang, F., Lineaweaver, W. C., Chen, T.-Y., & Chen, Z.-W. (2005). Longitudinal intrafascicular electrodes in collection and analysis of sensory signals of the peripheral nerve in a feline model. *Microsurgery*, *25*(7), 561–565. https://doi.org/10.1002/micr.20159

Limousin, P., & Foltynie, T. (2019). Long-term outcomes of deep brain stimulation in Parkinson disease. *Nature Reviews. Neurology*, *15*(4), 234–242. https://doi.org/10.1038/s41582-019-0145-9

Lorach, H., Galvez, A., Spagnolo, V., Martel, F., Karakas, S., Intering, N., Vat, M., Faivre, O., Harte, C., Komi, S., Ravier, J., Collin, T., Coquoz, L., Sakr, I., Baaklini, E., Hernandez-Charpak, S. D., Dumont, G., Buschman, R., Buse, N., Denison, T., van Nes, I., Asboth, L., Watrin, A., Struber, L., Sauter-Starace, F., Langar, L., Auboiroux, V., Carda, S., Chabardes, S., Aksenova, T., Demesmaeker, R., Charvet, G., Bloch, J. & Courtine, G. (2023). Walking naturally after spinal cord injury using a brain–spine interface. *Nature*, *618*(7963), Article 7963. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06094-5

Lorusso, N. D., Mohan, U. R., & Jacobs, J. (2022). Jose Delgado: A controversial trailblazer in neuromodulation. *Artificial Organs*, *46*(4), 531–540. https://doi.org/10.1111/aor.14200

Luan, L., Robinson, J. T., Aazhang, B., Chi, T., Yang, K., Li, X., Rathore, H., Singer, A., Yellapantula, S., Fan, Y., Yu, Z., & Xie, C. (2020). Recent Advances in Electrical Neural Interface Engineering: Minimal Invasiveness, Longevity, and Scalability. *Neuron*, *108*(2), 302–321. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.10.011

Ludwig, P. E., Reddy, V., & Varacallo, M. (2023). Neuroanatomy, Neurons. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441977/

Lundstrom, M. S., & Alam, M. A. (2022). Moore's law: The journey ahead. *Science*, *378*(6621), 722–723. https://doi.org/10.1126/science.ade2191

Maass, W. (1997). Networks of spiking neurons: The third generation of neural network models. *Neural Networks*, *10*(9), 1659–1671. https://doi.org/10.1016/S0893-6080(97)00011-7

Mahabadi, N., & Al Khalili, Y. (2023). Neuroanatomy, Retina. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545310/

Mai, J. K., & Paxinos, G. (2011). *The Human Nervous System—3rd Edition*. Academic Press. https://shop.elsevier.com/books/the-human-nervous-system/k-mai/978-0-12-374236-0

Mammano, F., & Bortolozzi, M. (2010). Ca2+ Imaging: Principles of Analysis and Enhancement. In A. Verkhratsky & O. H. Petersen (Eds.), *Calcium Measurement Methods* (Vol. 43, pp. 57–80). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-476-0_3

Mariello, M., Kim, K., Wu, K., Lacour, S. P., & Leterrier, Y. (2022). Recent Advances in Encapsulation of Flexible Bioelectronic Implants: Materials, Technologies, and Characterization Methods. *Advanced Materials*, *34*(34), 2201129. https://doi.org/10.1002/adma.202201129

Marino, M., Misuri, L., & Brogioli, D. (2014). *A new open source software for the calculation of the liquid junction potential between two solutions according to the stationary Nernst-Planck equation* (arXiv:1403.3640). arXiv. https://doi.org/10.48550/arXiv.1403.3640

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

McConnell, G. C., Rees, H. D., Levey, A. I., Gutekunst, C.-A., Gross, R. E., & Bellamkonda, R. V. (2009). Implanted neural electrodes cause chronic, local inflammation that is correlated with local neurodegeneration. *Journal of Neural Engineering*, *6*(5), 056003. https://doi.org/10.1088/1741-2560/6/5/056003

McDonnall, D., Clark, G. A., & Normann, R. A. (2004). Interleaved, multisite electrical stimulation of cat sciatic nerve produces fatigue-resistant, ripple-free motor responses. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, *12*(2), 208–215. https://doi.org/10.1109/TNSRE.2004.828425

MEA Amplifiers | www.multichannelsystems.com. (2023, September 29). https://www.multichannelsystems.com/products/mea-amplifiers

Merolla, P. A., Arthur, J. V., Alvarez-Icaza, R., Cassidy, A. S., Sawada, J., Akopyan, F., Jackson, B. L., Imam, N., Guo, C., Nakamura, Y., Brezzo, B., Vo, I., Esser, S. K., Appuswamy, R., Taba, B., Amir, A., Flickner, M. D., Risk, W. P., Manohar, R., & Modha, D. S. (2014). A million spiking-neuron integrated circuit with a scalable communication network and interface. *Science*, *345*(6197), 668–673. 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

Metzger, S. L., Littlejohn, K. T., Silva, A. B., Moses, D. A., Seaton, M. P., Wang, R., Dougherty, M. E., Liu, J. R., Wu, P., Berger, M. A., Zhuravleva, I., Tu-Chan, A., Ganguly, K., Anumanchipalli, G. K., & Chang, E. F. (2023). A high-performance neuroprosthesis for speech decoding and avatar control. *Nature*, *620*(7976), Article 7976. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06443-4

Moore, G. E. (2006). Cramming more components onto integrated circuits, Reprinted from Electronics, volume 38, number 8, April 19, 1965, pp.114 ff. *IEEE Solid-State Circuits Society Newsletter*, *11*(3), 33–35. https://doi.org/10.1109/N-SSC.2006.4785860

Mortimer, J. T., Shealy, C. N., & Wheeler, C. (1970). Experimental Nondestructive Electrical Stimulation of the Brain and Spinal Cord. *Journal of Neurosurgery*, *32*(5), 553–559. https://doi.org/10.3171/jns.1970.32.5.0553

Moses, D. A., Metzger, S. L., Liu, J. R., Anumanchipalli, G. K., Makin, J. G., Sun, P. F., Chartier, J., Dougherty, M. E., Liu, P. M., Abrams, G. M., Tu-Chan, A., Ganguly, K., & Chang, E. F. (2021). Neuroprosthesis for Decoding Speech in a Paralyzed Person with Anarthria. *New England Journal of Medicine*, *385*(3), 217–227. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2027540

Mudraboyina, A. K., Blockstein, L., Luk, C. C., Syed, N. I., & Yadid-Pecht, O. (2014). A Novel Lensless Miniature Contact Imaging System for Monitoring Calcium Changes in Live Neurons. *IEEE Photonics Journal*, *6*(1), 1–15. https://doi.org/10.1109/JPHOT.2014.2304554

Nachshon-Fendyur, A., Mazurski, N., Shappir, J., & Spira, M. (2011). Formation of Essential Ultrastructural Interface between Cultured Hippocampal Cells and Gold Mushroom-Shaped MEA- Toward IN-CELL Recordings from Vertebrate Neurons. *Frontiers in Neuroengineering*, *4*, 14. https://doi.org/10.3389/fneng.2011.00014

Nanivadekar, A. C., Ayers, C. A., Gaunt, R. A., Weber, D. J., & Fisher, L. E. (2019). Selectivity of afferent microstimulation at the DRG using epineural and penetrating electrode arrays. *Journal of Neural Engineering*, *17*(1), 016011. https://doi.org/10.1088/1741-2552/ab4a24

Naples, G. G., Mortimer, J. T., Scheiner, A., & Sweeney, J. D. (1988). A spiral nerve cuff electrode for peripheral nerve stimulation. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, *35*(11), 905–916. https://doi.org/10.1109/10.8670

Norton, W. T., Aquino, D. A., Hozumi, I., Chiu, F. C., & Brosnan, C. F. (1992). Quantitative aspects of reactive gliosis: A review. *Neurochemical Research*, *17*(9), 877–885. https://doi.org/10.1007/BF00993263

Núñez, R., Sancho-Martínez, S. M., Novoa, J. M. L., & López-Hernández, F. J. (2010). Apoptotic volume decrease as a geometric determinant for cell dismantling into apoptotic bodies. *Cell Death and Differentiation*, *17*(11), 1665–1671. https://doi.org/10.1038/cdd.2010.96

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

Ojovan, S. M., Rabieh, N., Shmoel, N., Erez, H., Maydan, E., Cohen, A., & Spira, M. E. (2015). A feasibility study of multi-site,intracellular recordings from mammalian neurons by extracellular gold mushroom-shaped microelectrodes. *Scientific Reports*, *5*(1), 14100. https://doi.org/10.1038/srep14100

Otto, K. J., Johnson, M. D., & Kipke, D. R. (2006). Voltage pulses change neural interface properties and improve unit recordings with chronically implanted microelectrodes. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, *53*(2), 333–340. https://doi.org/10.1109/TBME.2005.862530

Ozawa, S., & Kimura, N. (1979). Membrane potential changes caused by thyrotropin-releasing hormone in the clonal GH3 cell and their relationship to secretion of pituitary hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *76*(11), 6017–6020. https://doi.org/10.1073/pnas.76.11.6017

Palanker, D., Le Mer, Y., Mohand-Said, S., & Sahel, J. A. (2022). Simultaneous perception of prosthetic and natural vision in AMD patients. *Nature Communications*, *13*(1), 513. https://doi.org/10.1038/s41467-022-28125-x

Panuccio, G., Semprini, M., & Chiappalone, M. (2016). Intelligent biohybrid systems for functional brain repair. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, *3*(3–4), 162. https://doi.org/10.1016/j.nhtm.2016.10.001

Parent, A. (2004). Giovanni Aldini: From Animal Electricity to Human Brain Stimulation. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, *31*(4), 576–584. https://doi.org/10.1017/S0317167100003851

Peksa, J., & Mamchur, D. (2023). State-of-the-Art on Brain-Computer Interface Technology. *Sensors*, *23*(13), Article 13. https://doi.org/10.3390/s23136001

Peper, F. (2017). The End of Moore's Law: Opportunities for Natural Computing? *New Generation Computing*, *35*(3), 253–269. https://doi.org/10.1007/s00354-017-0020-4

Peri, R., Triggle, D. J., & Singh, S. (2001). Regulation of L-type Calcium Channels in Pituitary GH4C1 Cells by Depolarization *. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(34), 31667–31673. https://doi.org/10.1074/jbc.M102613200

Plonsey, R., & Barr, R. C. (2007). *Bioelectricity: A Quantitative Approach*. Springer Science & Business Media.

Prasad, A., & Sanchez, J. C. (2012). Quantifying long-term microelectrode array functionality using chronic in vivo impedance testing. *Journal of Neural Engineering*, *9*(2), 026028. https://doi.org/10.1088/1741-2560/9/2/026028

Prè, D., Nestor, M. W., Sproul, A. A., Jacob, S., Koppensteiner, P., Chinchalongporn, V., Zimmer, M., Yamamoto, A., Noggle, S. A., & Arancio, O. (2014). A time course analysis of the electrophysiological properties of neurons differentiated from human induced

pluripotent stem cells (iPSCs). *PloS One*, *9*(7), e103418. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103418

Prodanov, D., & Delbeke, J. (2016). Mechanical and Biological Interactions of Implants with the Brain and Their Impact on Implant Design. *Frontiers in Neuroscience*, *10*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2016.00011

Proix, T., Truccolo, W., Leguia, M. G., Tcheng, T. K., King-Stephens, D., Rao, V. R., & Baud, M. O. (2021). Forecasting seizure risk in adults with focal epilepsy: A development and validation study. *The Lancet Neurology*, *20*(2), 127–135. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30396-3

Puat, H. A. M., & Rahman, N. A. A. (2020). IoMT: A Review of Pacemaker Vulnerabilities and Security Strategy. *Journal of Physics: Conference Series*, *1712*(1), 012009. https://doi.org/10.1088/1742-6596/1712/1/012009

Pudenz, R. H., Bullara, L. A., Dru, D., & Talalla, A. (1975). Electrical stimulation of the brain. II. Effects on the blood-brain barrier. *Surgical Neurology*, *4*(2), 265–270.

Qian, S., Lin, H.-A., Pan, Q., Zhang, S., Zhang, Y., Geng, Z., Wu, Q., He, Y., & Zhu, B. (2023). Chemically revised conducting polymers with inflammation resistance for intimate bioelectronic electrocoupling. *Bioactive Materials*, *26*, 24–51. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.02.010

Raider, S. I., Flitsch, R., Aboaf, J. A., & Pliskin, W. A. (1976). Surface Oxidation of Silicon Nitride Films. *Journal of The Electrochemical Society*, *123*(4), 560. https://doi.org/10.1149/1.2132877

Rakovic, A., Voß, D., Vulinovic, F., Meier, B., Hellberg, A.-K., Nau, C., Klein, C., & Leipold, E. (2022). Electrophysiological Properties of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Midbrain Dopaminergic Neurons Correlate With Expression of Tyrosine Hydroxylase. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *16*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2022.817198

Rao, L., Liu, Y., & Zhou, H. (2022). Significantly improved cell affinity of polydimethylsiloxane enabled by a surface-modified strategy with chemical coupling. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *33*(10), 66. https://doi.org/10.1007/s10856-022-06690-3

Rapeaux, A. B., & Constandinou, T. G. (2021). Implantable brain machine interfaces: First-in-human studies, technology challenges and trends. *Current Opinion in Biotechnology*, *72*, 102–111. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.10.001

Ratner, B. D., & Bryant, S. J. (2004). Biomaterials: Where we have been and where we are going. *Annual Review of Biomedical Engineering*, *6*, 41–75. https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027

Rechkunov, S. N., Prinz, A. V., Seleznev, V. A., Golod, S. V., Soots, R. A., Ivanov, A. I., Ratushnyak, A. S., & Prinz, V. Ya. (2015). Neurointerfaces: Review and development. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, *5*(6), 552–561. https://doi.org/10.1134/S2079059715060143

Robinson, K. R. (1985). The responses of cells to electrical fields: A review. *The Journal of Cell Biology*, *101*(6), 2023–2027. https://doi.org/10.1083/jcb.101.6.2023

Rokai, J., Ulbert, I., & Márton, G. (2023). Edge computing on TPU for brain implant signal analysis. *Neural Networks*, *162*, 212–224. https://doi.org/10.1016/j.neunet.2023.02.036

Rosenquist, P. B., & McCall, W. V. (2003). Electroconvulsive Therapy (ECT). In M. J. Aminoff & R. B. Daroff (Eds.), *Encyclopedia of the Neurological Sciences* (pp. 78–79). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B0-12-226870-9/01083-2

Roy, S., Azad, A. N. M. W., Baidya, S., Alam, M. K., & Khan, F. (2022). Powering Solutions for Biomedical Sensors and Implants Inside the Human Body: A Comprehensive Review on Energy Harvesting Units, Energy Storage, and Wireless Power Transfer

Techniques. *IEEE Transactions on Power Electronics*, *37*(10), 12237–12263. https://doi.org/10.1109/TPEL.2022.3164890

Sagdic, K., Fernández-Lavado, E., Mariello, M., Akouissi, O., & Lacour, S. P. (2023). Hydrogels and conductive hydrogels for implantable bioelectronics. *MRS Bulletin*, *48*(5), 495–505. https://doi.org/10.1557/s43577-023-00536-1

Salahuddin, U., & Gao, P.-X. (2021). Signal Generation, Acquisition, and Processing in Brain Machine Interfaces: A Unified Review. *Frontiers in Neuroscience*, *15*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2021.728178

Sattigeri, R. M. (2020). Action Potential: A Vortex Phenomena; Driving Membrane Oscillations. *Frontiers in Computational Neuroscience*, *14*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncom.2020.00021

Scarpelli, A., Demofonti, A., Terracina, F., Ciancio, A. L., & Zollo, L. (2020). Evoking Apparent Moving Sensation in the Hand via Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation. *Frontiers in Neuroscience*, *14*, 534. https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00534

Schlegel, W., Winiger, B. P., Mollard, P., Vacher, P., Wuarin, F., Zahnd, G. R., Wollheim, C. B., & Dufy, B. (1987). Oscillations of cytosolic Ca2+ in pituitary cells due to action potentials. *Nature*, *329*(6141), 719–721. https://doi.org/10.1038/329719a0

Schmitt, G., Faßbender, F., Lüth, H., Schöning, M. J., Schultze, J.-W., & Buß, G. (2000). Passivation and corrosion of microelectrode arrays. *Materials and Corrosion*, *51*(1), 20–25. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4176(200001)51:1<20::AID-MACO20>3.0.CO;2-Q

Schulze-Bonhage, A., Hirsch, M., Knake, S., Kaufmann, E., Kegele, J., Rademacher, M., Vonck, K., Coenen, V. A., Glaser, M., Jenkner, C., Winter, Y., Groppa, S., & EASEE Study Group. (2023). Focal Cortex Stimulation With a Novel Implantable Device and Antiseizure Outcomes in 2 Prospective Multicenter Single-Arm Trials. *JAMA Neurology*, *80*(6), 588–596. https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2023.0066

Sengupta, N., Ramos, J. I. E., Tu, E., Marks, S., Scott, N., Weclawski, J., Gollahalli, A. R., Doborjeh, M. G., Doborjeh, Z. G., Kumarasinghe, K., Breen, V., & Abbott, A. (2018). From von Neumann Architecture and Atanasoffs ABC to Neuro-Morphic Computation and Kasabov's NeuCube: Principles and Implementations. In V. Sgurev, V. Piuri, & V. Jotsov (Eds.), *Learning Systems: From Theory to Practice* (pp. 1–28). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75181-8_1

Serruya, M. D. (2017). Connecting the Brain to Itself through an Emulation. *Frontiers in Neuroscience*, *11*, 373. https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00373

Shalf, J. (2020). The future of computing beyond Moore's Law. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *378*(2166), 20190061. https://doi.org/10.1098/rsta.2019.0061

Shen, K., & Maharbiz, M. M. (2021). Ceramic packaging in neural implants. *Journal of Neural Engineering*, *18*(2), 025002. https://doi.org/10.1088/1741-2552/abd683

Shepherd, R. K., Carter, P. M., Dalrymple, A. N., Enke, Y. L., Wise, A. K., Nguyen, T., Firth, J., Thompson, A., & Fallon, J. B. (2021). Platinum dissolution and tissue response following long-term electrical stimulation at high charge densities. *Journal of Neural Engineering*, *18*(3). https://doi.org/10.1088/1741-2552/abe5ba

Shlomy, I., Divald, S., Tadmor, K., Leichtmann-Bardoogo, Y., Arami, A., & Maoz, B. M. (2021). Restoring Tactile Sensation Using a Triboelectric Nanogenerator. *ACS Nano*, *15*(7), 11087–11098. https://doi.org/10.1021/acsnano.0c10141

Shur, M., Akouissi, O., Rizzo, O., Colin, D. J., Kolinski, J. M., & Lacour, S. P. (2023). Revealing the complexity of ultra-soft hydrogel re-swelling inside the brain. *Biomaterials*, *294*, 122024. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2023.122024

Simpson, J., & Ghovanloo, M. (2007). An Experimental Study of Voltage, Current, and Charge Controlled Stimulation Front-End Circuitry. In *Proceedings—IEEE International Symposium on Circuits and Systems* (p. 328). https://doi.org/10.1109/ISCAS.2007.378401

Song, E., Li, J., & Rogers, J. A. (2019). Barrier materials for flexible bioelectronic implants with chronic stability—Current approaches and future directions. *APL Materials*, *7*(5), 050902. https://doi.org/10.1063/1.5094415

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

Stadelmann, C., Timmler, S., Barrantes-Freer, A., & Simons, M. (2019). Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiological Reviews*, *99*(3), 1381–1431. https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2018

Subasi, A. (2022). Artificial Intelligence in Brain Computer Interface. *2022 International Congress on Human-Computer Interaction, Optimization and Robotic Applications (HORA)*, 1–7. https://doi.org/10.1109/HORA55278.2022.9800002

Sugiyama, K., Nozaki, T., Asakawa, T., Koizumi, S., Saitoh, O., & Namba, H. (2015). The Present Indication and Future of Deep Brain Stimulation. *Neurologia Medico-Chirurgica*, *55*(5), 416–421. https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2014-0394

Sun, F. T., & Morrell, M. J. (2014). The RNS System: Responsive cortical stimulation for the treatment of refractory partial epilepsy. *Expert Review of Medical Devices*, *11*(6), 563–572. https://doi.org/10.1586/17434440.2014.947274

Szarowski, D. H., Andersen, M. D., Retterer, S., Spence, A. J., Isaacson, M., Craighead, H. G., Turner, J. N., & Shain, W. (2003). Brain responses to micro-machined silicon devices. *Brain Research*, *983*(1–2), 23–35. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)03023-3

Tada, M., Takeuchi, A., Hashizume, M., Kitamura, K., & Kano, M. (2014). A highly sensitive fluorescent indicator dye for calcium imaging of neural activity in vitro and in vivo. *The European Journal of Neuroscience*, *39*(11), 1720–1728. https://doi.org/10.1111/ejn.12476

Tan, Z.-Y., Piekarz, A. D., Priest, B. T., Knopp, K. L., Krajewski, J. L., McDermott, J. S., Nisenbaum, E. S., & Cummins, T. R. (2014). Tetrodotoxin-Resistant Sodium Channels in Sensory Neurons Generate Slow Resurgent Currents That Are Enhanced by Inflammatory Mediators. *Journal of Neuroscience*, *34*(21), 7190–7197. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5011-13.2014

Teixeira, H., Dias, C., Aguiar, P., & Ventura, J. (2021). Gold-Mushroom Microelectrode Arrays and the Quest for Intracellular-Like Recordings: Perspectives and Outlooks. *Advanced Materials Technologies*, *6*(2), 2000770. https://doi.org/10.1002/admt.202000770

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

Tolosa, E., Garrido, A., Scholz, S. W., & Poewe, W. (2021). Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology*, *20*(5), 385–397. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00030-2

Tresco, P. A., & Winslow, B. D. (2011). The Challenge of Integrating Devices into the Central Nervous System. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, *39*(1). https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.v39.i1.30

Tringides, C. M., Boulingre, M., & Mooney, D. J. (2023). Metal-based porous hydrogels for highly conductive biomaterial scaffolds. *Oxford Open Materials Science*, *3*(1), itad002. https://doi.org/10.1093/oxfmat/itad002

Tringides, C. M., Vachicouras, N., de Lázaro, I., Wang, H., Trouillet, A., Seo, B. R., Elosegui-Artola, A., Fallegger, F., Shin, Y., Casiraghi, C., Kostarelos, K., Lacour, S. P., & Mooney, D. J. (2021). Viscoelastic surface electrode arrays to interface with viscoelastic tissues. *Nature Nanotechnology*, *16*(9), Article 9. https://doi.org/10.1038/s41565-021-00926-z

Tsagkaris, C., Papadakis, M., Trompoukis, C., Matiashova, L., & Matis, G. (2023). What do eels teach about open access, medical education and professional ethics? The inception of Peripheral Nerve Stimulation in ancient Rome. *Brain Stimulation: Basic, Translational, and Clinical Research in Neuromodulation*, *0*(0). https://doi.org/10.1016/j.brs.2023.06.009

Usenko, A., & Senawiratne, J. (2010). Silicon Nitride Surface Conversion into Oxide to Enable Hydrophilic Bonding. *ECS Transactions*, *33*(4), 475. https://doi.org/10.1149/1.3483538

Valeriani, D., Santoro, F., & Ienca, M. (2022). The present and future of neural interfaces. *Frontiers in Neurorobotics*, *16*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbot.2022.953968

Vallejo-Giraldo, C., Kelly, A., & Biggs, M. J. P. (2014). Biofunctionalisation of electrically conducting polymers. *Drug Discovery Today*, *19*(1), 88–94. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.07.022

van Erp, J., Lotte, F., & Tangermann, M. (2012). Brain-Computer Interfaces: Beyond Medical Applications. *Computer*, *45*(4), 26–34. https://doi.org/10.1109/MC.2012.107

Vassanelli, S., & Mahmud, M. (2016a). Trends and Challenges in Neuroengineering: Toward "Intelligent" Neuroprostheses through Brain-"Brain Inspired Systems" Communication. *Frontiers in Neuroscience*, *10*, 438. https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00438

Vassanelli, S., & Mahmud, M. (2016b). 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

Velisar, A., Syrkin-Nikolau, J., Blumenfeld, Z., Trager, M. H., Afzal, M. F., Prabhakar, V., & Bronte-Stewart, H. (2019). Dual threshold neural closed loop deep brain stimulation in Parkinson disease patients. *Brain Stimulation*, *12*(4), 868–876. https://doi.org/10.1016/j.brs.2019.02.020

Verma, A., Verma, M., & Singh, A. (2020). Animal tissue culture principles and applications. *Animal Biotechnology*, 269–293. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4

Viswam, V., Obien, M. E., Frey, U., Franke, F., & Hierlemann, A. (2018a). Effects of Electrode Size on Extracellular Recordings of Neural Activity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*. https://doi.org/10.3389/conf.fncel.2018.38.00098

Viswam, V., Obien, M. E. J., Franke, F., Frey, U., & Hierlemann, A. (2019). Optimal Electrode Size for Multi-Scale Extracellular-Potential Recording From Neuronal Assemblies. *Frontiers in Neuroscience*, *13*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.00385

Viswam, V., Obien, M., Frey, U., Franke, F., & Hierlemann, A. (2018b). Acquisition of Bioelectrical Signals with Small Electrodes. *IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference : Healthcare Technology : [Proceedings]. IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference*, *2017*, 1–4. https://doi.org/10.1109/BIOCAS.2017.8325216

Vitale, F., Shen, W., Driscoll, N., Burrell, J. C., Richardson, A. G., Adewole, O., Murphy, B., Ananthakrishnan, A., Oh, H., Wang, T., Lucas, T. H., Cullen, D. K., Allen, M. G., & Litt, B. (2018). Biomimetic extracellular matrix coatings improve the chronic biocompatibility of microfabricated subdural microelectrode arrays. *PLOS ONE*, *13*(11), e0206137. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206137

Vu, P. P., Vaskov, A. K., Irwin, Z. T., Henning, P. T., Lueders, D. R., Laidlaw, A. T., Davis, A. J., Nu, C. S., Gates, D. H., Gillespie, R. B., Kemp, S. W. P., Kung, T. A., Chestek, C. A., & Cederna, P. S. (2020). A regenerative peripheral nerve interface allows real-time control of an artificial hand in upper limb amputees. *Science Translational Medicine*, *12*(533), eaay2857. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay2857

Vyawahare, H., & Shinde, P. (2022). Age-Related Macular Degeneration: Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Cureus*, *14*(9), e29583. https://doi.org/10.7759/cureus.29583

Wagner, K. A., Yacono, P. W., Golan, D. E., & Tashjian, A. H. (1993). Mechanism of spontaneous intracellular calcium fluctuations in single GH4C1 rat pituitary cells. *Biochemical Journal*, *292*(Pt 1), 175–182.

Wang, X., Inukai, T., Greer, M. A., & Greer, S. E. (1994). Rat Prl and TSH secretion are regulated differently by K(+)-channel blockers. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *266*(1), E39–E43. https://doi.org/10.1152/ajpendo.1994.266.1.E39

Whitmer, D., de Solages, C., Hill, B., Yu, H., Henderson, J., & Bronte-Stewart, H. (2012). High frequency deep brain stimulation attenuates subthalamic and cortical rhythms in Parkinson's disease. *Frontiers in Human Neuroscience*, *6*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnhum.2012.00155

Willett, F. R., Kunz, E. M., Fan, C., Avansino, D. T., Wilson, G. H., Choi, E. Y., Kamdar, F., Hochberg, L. R., Druckmann, S., Shenoy, K. V., & Henderson, J. M. (2023). *A high-performance speech neuroprosthesis* (p. 2023.01.21.524489). bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2023.01.21.524489

Yang, C., & Suo, Z. (2018). Hydrogel ionotronics. *Nature Reviews Materials*, *3*(6), Article 6. https://doi.org/10.1038/s41578-018-0018-7

Yang, W., Gong, Y., & Li, W. (2021). A Review: Electrode and Packaging Materials for Neurophysiology Recording Implants. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.622923

Yeon, P., Mirbozorgi, S. A., Ash, B., Eckhardt, H., & Ghovanloo, M. (2016). Fabrication and Microassembly of a mm-Sized Floating Probe for a Distributed Wireless Neural Interface. *Micromachines*, *7*(9), Article 9. https://doi.org/10.3390/mi7090154

Yip, M., Jin, R., Nakajima, H. H., Stankovic, K. M., & Chandrakasan, A. P. (2015). A Fully-Implantable Cochlear Implant SoC with Piezoelectric Middle-Ear Sensor and Arbitrary Waveform Neural Stimulation. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, *50*(1), 214–229. https://doi.org/10.1109/JSSC.2014.2355822

Zhang, X., Ma, Z., Zheng, H., Li, T., Chen, K., Wang, X., Liu, C., Xu, L., Wu, X., Lin, D., & Lin, H. (2020). The combination of brain-computer interfaces and artificial intelligence: Applications and challenges. *Annals of Translational Medicine*, *8*(11), 712. https://doi.org/10.21037/atm.2019.11.109

Zhang, Y., Zhang, J., Le, S., Niu, L., Tao, J., Liang, J., Zhang, L., & Kang, X. (2022). Parylene C as an Insulating Polymer for Implantable Neural Interfaces: Acute Electrochemical Impedance Behaviors in Saline and Pig Brain In Vitro. *Polymers*, *14*(15), Article 15. https://doi.org/10.3390/polym14153033

Zhang, Z., Savolainen, O. W., & Constandinou, T. G. (2022). Algorithm and hardware considerations for real-time neural signal on-implant processing. *Journal of Neural Engineering*, *19*(1), 016029. https://doi.org/10.1088/1741-2552/ac5268

Zhao, Y., You, S. S., Zhang, A., Lee, J.-H., Huang, J., & Lieber, C. M. (2019). Scalable ultrasmall three-dimensional nanowire transistor probes for intracellular recording. *Nature Nanotechnology*, *14*(8), Article 8. https://doi.org/10.1038/s41565-019-0478-y

Zheng, X. S., Tan, C., Castagnola, E., & Cui, X. T. (2021). Electrode Materials for Chronic Electrical Microstimulation. *Advanced Healthcare Materials*, *10*(12), e2100119. https://doi.org/10.1002/adhm.202100119

Zhou, T., Yuk, H., Hu, F., Wu, J., Tian, F., Roh, H., Shen, Z., Gu, G., Xu, J., Lu, B., & Zhao, X. (2023). 3D printable high-performance conducting polymer hydrogel for all-hydrogel bioelectronic interfaces. *Nature Materials*, *22*(7), Article 7. https://doi.org/10.1038/s41563-023-01569-2