THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biochimie, biologie cellulaire et moléculaire, physiologie et nutrition

École doctorale Information, Structures et Systèmes » (I2S, ED 166)

Unité de recherche UMR 5221 – Laboratoire Charles Coulomb (L2C)
Unité de recherche UMR 9214 - Physiologie et médecine expérimentale du cœur et des muscles (PhyMedExp)

MODELISATION *IN VITRO* DU MUSCLE SUR MEMBRANE SILICONE MICROSTRUCTUREE PAR PHOTOLITHOGRAPHIE UV

Présentée par Théo REGAGNON
Le 07 Novembre 2023

Sous la direction de Pascal ETIENNE et Stefan MATECKI

Devant le jury composé de

Thomas TRIMAILLE, PU, Ingénierie des Matériaux Polymères (IMP)	Président
Vincent MOULY, DR, Sorbonne Universités	Rapporteur
Chloé THIEULEUX, DR, Université Lyon 1	Rapporteuse
Mireille COSSEE, MCU-PH, CHU de Montpellier	Examinatrice
Pascal ETIENNE, PU, Université de Montpellier	Co-directeur
Stefan MATECKI, PU-PH, CHU de Montpellier	Co-directeur

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Remerciements

C’est la fin de ce très plaisant voyage scientifique de trois ans à Montpellier et j'aimerais exprimer ma reconnaissance envers toutes les personnes qui ont joué un rôle quel qu’il soit dans la réalisation de cette thèse.

Je souhaite tout d’abord remercier mes deux directeurs de thèse Pr. Pascal Etienne et Pr. Stefan Matecki, pour avoir mis en place cet ambitieux projet et de m’avoir fait confiance pour le faire avancer le plus loin possible. Merci aussi pour leur encadrement, leurs précieux conseils et leur soutient tout au long du projet. Je tiens aussi à remercier Dr Vincent Mouly et Dr Chloé Thieuleux qui m’ont fait l’honneur d’être rapporteurs de ma thèse. Je remercie également Pr Thomas Trimaille et Dr Mireille Cossée pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je souhaite aussi dire merci à l’équipe « Matériaux Hybrides & Nanostructurés » du laboratoire Charles Coulomb pour leur accueil. Sylvie pour son expertise scientifique et ce « bonjour » quotidien toujours avec un grand sourire, Laurent pour ses nombreuses anecdotes en salle de pause, toutes aussi farfelues les unes que les autres et Sami pour toute son expérience et ses conseils autour de la capricieuse synthèse sol-gel.

Je voudrais remercier toute l’équipe « Myopathies Acquises chez le Patient en Déficiences d’Organe » de PhyMedExp, qui ont pris par la main avec plein de gentillesse un chimiste qui, avant ça, n’avait jamais manipulé de cellules de sa vie. Merci tout particulièrement à Nathalie Saint qui a pris le temps de me former en culture cellulaire et de partager tous ses précieux conseils que j’applique encore au quotidien et un grand merci à Gilles Carnac pour sa bonne humeur sans faille, ses connaissances très pointue dans le domaine et bien évidement ses nombreuses recommandations culinaires à Montpellier. Merci aussi à Gerald Hugon pour sa disponibilité et sa générosité. Merci enfin à Fabrice Raynaud pour tout l’accompagnement lors de la dernière année, au moment où il était très facile de partir dans tous les sens… sans oublier son incroyable sonnerie de téléphone !

Je souhaiterais aussi remercier le plateau peptides de l’IBMM et en particulier Gilles Subra et Cécile Echalier qui ont toujours été là pour suggérer de nouvelles hypothèses et apporter un point de vue rafraichissant au projet. Merci aussi à Julie, Laurine et Margaux, qui m’ont généreusement synthétisé des peptides tout au long de la thèse.

J’aimerais remercier également tous les doctorants dont j’ai pu croiser le chemin. Aurélien, Harry, Jinane, Maya, Nour au L2C avec qui j’ai pu partager d’excellents repas au RA et qui m’ont tous aidé à leur manière que ce soit au niveau personnel ou professionnel. Adriana à PhyMedExp qui a longtemps

été la seule autre doctorante dans le labo et à qui je souhaite bon courage pour la fin de ses travaux. Merci aussi à Marjorie, dont la rencontre reste une sacrée anecdote et qui aura été un vrai pilier et d'un incroyable soutien tout au long de ces 3 années. Merci pour tout et on se retrouve à Lyon une fois que tu en auras fini avec la tienne ! Un grand merci par extension à tous les compères de l'IRMB (Audrey, Damien, Flavien, Jholy, Julien, Lauren, Silouane) qui ont généreusement accueilli un étranger du labo à leurs nombreux afterworks du mercredi. Et merci à Anaelle, Bruno, Margaux, Ruben, Oscar des personnes venant de tous horizons avec qui j'ai passé d'excellents moments durant ce long périple.

Enfin, je ne pourrais terminer sans remercier mon cercle proche. Axel, Gabriel, Lambert et Paul pour leur soutien à distance, les nombreux week-end pour se changer l'esprit et les innombrables souvenirs que l'on gardera tous ensemble. Un merci tout particulier aussi à Maxime qui a probablement fait naître l'idée de la thèse un sombre soir de septembre à côté du poêle dans le taudis et Marjorie une nouvelle fois merci car maintenant, plus qu'une belle rencontre, je te considère comme une réelle amie. Et incontestablement le meilleur pour la fin, merci à mes parents et à ma sœur qui m'ont toujours soutenu depuis le départ, qui ont toujours été là au moindre petit problème et même si je ne vous le dis pas souvent, je vous aime très fort.

Remerciements _____ *3*

Introduction _____ *9*

Revue bibliographique. _____ *13*

Chapitre 1 : Le muscle et son étude *in vivo*. _____ **13**

A) La physiologie et la structure du muscle strié squelettique _____ 15

B) La myogenèse _____ 18

C) La matrice extracellulaire _____ 19

D) Les modèles d'étude *in vivo* _____ 20

Chapitre 2 : La modélisation musculaire *in vitro* _____ **23**

A) Les principes de la culture in vitro _____ 24

B) La modélisation 2D du muscle _____ 31

C) La modélisation 3D du muscle _____ 39

Chapitre 3 : Les différents types de stimulation modélisables *in vitro* _____ **47**

A) Stimulation chimique _____ 47

B) Stimulation électrique _____ 49

C) La stimulation mécanique _____ 53

Chapitre 4 : Mise en place du modèle *in vitro* _____ **69**

A) Le PDMS _____ 70

B) La photolithographie additive _____ 72

C) Le procédé sol-gel _____ 74

D) Photolithographie de l'EETMOS _____ 75

E) La biofonctionnalisation du PDMS _____ 76

Partie expérimentale _____ *81*

Matériels et Méthodes _____ **81**

Résultats et Discussion _____ **85**

Chapitre 1 : Comment microstructurer un support flexible ? _____ **85**

A) Synthèse de l'EETMol par procédé sol-gel _____ 86

B) Activation plasma du PDMS et dépôt de l'EETMol _____ 87

C) Photolithographie UV de l'EETMol _____ 89

D) Observation au microscope des premiers supports microstructurés _____ 91

E) La viabilité des myoblastes primaires humains sur les supports microstructurés _____ 94

Chapitre 2 : Quel topographie favorise au mieux l'alignement ? 95

A) Impact de la microstructuration en sillon longitudinal du support sur la culture cellulaire des myoblastes primaires humains. 95

B) Impact de géométrie des microstructures sur la différenciation des myoblastes primaires humains 97

Chapitre 3 : Comment améliorer l'adhésion des myoblastes sur le support PDMS-EETMol microstructuré ? 103

A) Le greffage de peptides d'adhésion 103

B) Effet de la séquence peptidique greffés au PDMS sur la prolifération des myoblastes primaires humains en culture 104

C) Effet combiné de la biofonctionnalisation par greffage de peptide et du revêtement de Matrigel® sur la prolifération des myoblastes primaires humains en culture 106

D) Effet synergique entre les séquences RGD et YIGSR et influence de la concentration en peptides. 108

E) Impact de la sylilation du peptide sur la biofonctionnalisation du PDMS 111

F) Effet de l'épaisseur de la couche de peptides sur la prolifération et la différenciation des myoblastes primaires humains en culture 120

Chapitre 4 : Mise en place d'un protocole d'étirement mécanique permettant de stimuler in vitro la différenciation des myotubes en culture sur support microstructuré en sillon longitudinal. 123

A) Effet de l'amplitude d'étirement sur la différenciation des myotubes humains en culture 124

B) Effet de la fréquence et de la durée de l'étirement sur la différenciation des myotubes humains en culture. 128

C) Effet du moment où démarre l'étirement sur la différenciation des myotubes humains mise en culture. 129

Conclusion et perspectives 137

Références 143

Annexes 171

Annexe 1 : Synthèse et caractérisation des peptides 171

Annexe 2 : Méthode d'anlayse XPS 173

Annexe 3 : Résultats complémentaires 174

Introduction

Le corps humain est composé de plus de 600 muscles différents ce qui en fait l'organe le plus important en poids à hauteur de 40% de la masse totale. Il participe à la plupart de nos fonctions végétative essentielles, au maintien de l'homéostasie (transport de l'oxygène grâce à l'appareil cardio-respiratoire, digestion des aliment) et permet de s'adapter et d'interagir avec le milieu environnant (thermorégulation, déplacement). Des travaux remontant à l'Antiquité et notamment à l'époque d'Aristote portent sur le muscle et constituent le point de départ de la myologie. Les premiers écrits complets ("Historia animalium") (1) datent du XVIe siècle et sont considérés comme la première base de la zoologie moderne. Mais ce n'est qu'au XVIIe siècle et plus précisément en 1669 que l'anatomiste et géologue danois Niels Stensen présente Elementorum Myologiae Specimen (2), un ouvrage dans lequel le muscle est défini et présenté selon quarante-quatre définitions et cinq hypothèses avec notamment un intérêt particulier sur la contraction musculaire. Ces travaux ont été complétés quelques années plus tard par le médecin et physiologiste anglais Robert Boyle. Cependant les premières découvertes significatives sur la physiologie du muscle datent du XIXe siècle sous l'impulsion du physiologiste français Claude Bernard qui a notamment mis en évidence le rôle du glycogène dans les muscles et a établi le principe de l'homéostasie (3) qu'il définit comme la tendance de l'organisme à réguler les constantes physiologiques (température, débit sanguin, tension artérielle) de telle sorte à ce qu'elles ne s'écartent pas trop de la normale. La recherche sur le muscle est alors devenue extensive en se basant principalement sur l'utilisation de nombreux modèles animaux (la souris, le cochon, le lapin, le chien, le hamster, le mouton et le rat) (4). Cette approche in vivo grâce aux modèles animaux, a permis d'explorer les mécanismes physiologiques et pathologiques qui gouvernent le fonctionnement des tissus musculaires au sein d'un organisme vivant. Elle a permis d'observer et de décrire comment les muscles se contractent, se développent, se régénèrent et s'adaptent aux divers stimuli inhérents au variation de leur environnement. Elle joue un rôle essentiel dans de multiples domaines, notamment la médecine sportive, la rééducation après des lésions musculaires, et la recherche sur les maladies musculaires.

Les modèles animaux partagent de nombreuses caractéristiques anatomiques et physiologiques avec les humains, ce qui en fait des sujets d'étude précieux :

- Les souris et les rats sont parmi les modèles animaux les plus utilisés en recherche biomédicale en raison de leur taille modeste, de leur cycle de reproduction court et de leur similitude physiologique avec les humains. Ils sont souvent utilisés pour étudier divers aspects du muscle, tels que la régulation de sa masse ou sa fonction métabolique aussi bien en situation normale

que dans les pathologies neuro-musculaires acquises ou congénitales. Grâce aux nombreuses avancées en biotechnologie autour du génome, et notamment l'émergence de l'outil CRISP-Cas9, les rats et souris peuvent facilement être modifiés génétiquement pour évaluer le rôle et la modulation de l'expression d'un gène d'intérêt dans les différentes fonctions du muscle. Cela a permis par exemple de mieux aborder les différents mécanismes fondamentaux de la myogenèse (5,6).

- Les primates, tels que les singes macaques, sont les plus proches des humains sur le plan génétique et physiologique. Ils peuvent être utilisés pour des études plus avancées sur le muscle, notamment dans le cadre d'essais de thérapies en près clinique, avant le passage chez l'homme (7).
- Le poisson zèbre est un modèle de recherche beaucoup plus récent en biologie musculaire. En effet, sa transparence sa capacité à se régénérer rapidement font de cet animal un modèle particulièrement efficace pour étudier la régénération musculaire (8). Une transparence que l'on retrouve aussi dans des modèle de Caenorhabditis elegans, un ver d'un millimètre environ et non parasitaire (9).
- Les porcs partagent aussi de nombreuses similitudes anatomiques et physiologiques avec les humains, ce qui en fait un modèle précieux pour les recherches précliniques. Ils sont utilisés pour tester des traitements potentiels et des implants musculaires, ainsi que pour étudier l'efficacité d'une thérapie cellulaires ou génique à visée musculaire (10).

Bien que les modèles animaux du muscle soient extrêmement utiles pour la recherche biomédicale, ils présentent également des inconvénients et des limites qu'il est important de prendre en compte :

- L'utilisation de modèles animaux est coûteuse en termes de financement, de personnel et de ressources. L'élevage, le logement et les soins aux animaux, ainsi que la gestion des installations expérimentales, nécessitent des ressources importantes.
- L'utilisation d'animaux dans la recherche soulève des préoccupations éthiques en matière de bien-être animal. Les chercheurs doivent respecter les normes éthiques strictes leur permettant de minimiser toute souffrance animale.
- Les cycles de vie des animaux de laboratoire peuvent être beaucoup plus courts que ceux des humains. Cela peut rendre difficile l'étude de maladies qui se développent lentement au fil du temps, notamment pour les maladies chroniques à tropisme musculaire.

Malgré ces inconvénients, les modèles animaux restent un outil précieux et omniprésent en recherche dans le domaine de la myologie, en particulier pour les études préliminaires, l'identification de mécanismes biologiques clés et le développement initial de thérapies potentielles. Cependant, il est important de les compléter par d'autres approches, telles que la recherche in vitro en utilisant par des

cellules humaines pour obtenir une compréhension complète et applicable des maladies musculaires et de leur traitement. Les modèles à partir de cellules humains ont l'avantage de garder le contexte génétique des patients, ce qui constitue un aspect important pour la physiopathologie.

La modélisation *in vitro* utilise des cellules progénitrices afin de reconstituer sur la paillasse, un tissus reproduisant si possible la pathologie du donneurs de cellules, afin d'étudier les processus biologiques impliqués. Les applications de la modélisation in vitro sont vastes, allant de la recherche fondamentale en biologie cellulaire et moléculaire à l'identification de cibles thérapeutiques permettant de tester des biomolécules d'intérêt, en passant par la toxicologie et la recherche sur les thérapies géniques. Si à ce jour il n'existe aucun modèle in vitro suffisamment différencié pour reproduire la complexité du muscle in vivo, les dernières avancées, notamment avec l'émergence des organoïdes, s'en rapprochent de plus en plus. Cependant, la plupart des modèles actuels n'ont pas cet objectif en tête mais plutôt de se concentrer sur certains paramètres pour reproduire au mieux la physiologie du muscle. Parmi ces paramètres on retrouve la culture en 3D pour mimer les interactions environnantes aux fibres musculaires ; l'alignement des fibres musculaires qui est une caractéristique géométrique retrouvée naturellement dans le muscle ; la coculture avec d'autres types cellulaires que l'on retrouve dans l'environnement du muscle tel que les cellules endothéliales et les cellules nerveuses ; l'application de différents stress (chimique, électrique, mécanique) que l'on retrouve en permanence dans le muscle in vivo.

La problématique autour de ce projet de thèse est de mettre en place un modèle de culture de myoblastes primaires humains, c'est-à-dire directement issus de biopsies de patients, avec l'objectif principal de mimer in vitro les contraintes mécaniques d'étirement appliquées sur les fibres musculaires au cours de leur différenciation in vivo. Ainsi, pour représenter au mieux ces contraintes mécaniques, il est important d'obtenir au cours de la différenciation des myotubes, alignés afin que l'étirement uni-axial soit comparable à celui appliqué au muscle lors d'une contraction musculaire. Pour cela, des supports flexibles en PDMS (Polydimethylsiloxane), un silicone largement utilisé dans le domaine biomédical) ont été microstructurés, c'est-à-dire que des lignes ont été formées par-dessus le silicone pour créer une topographie en 3D. Cette microstructuration a été effectuée par photolithographie d'un polymère hybride organique-inorganique déposée à la surface du silicone ce qui permet de produire des supports avec une précision de l'ordre du micromètre et avec une grande répétabilité. Des myoblastes primaires humains ont été alors ensemencés sur ces supports biocompatibles pour se déposer naturellement, par effet de pesanteur, sur toute la surface du silicone et donc certains entre les microstructures. Avec l'objectif d'étirer ces supports pour appliquer un stress mécanique aux myotubes (l'intermédiaire entre le myoblaste et la fibre musculaire) sans risque de décollement, le silicone a été biofonctionnalisé en utilisant une séquence peptidique connue pour

favoriser l'adhésion cellulaire. Ainsi, lorsque les myotubes sont bien adhérents au support, ceux-ci sont aussi stimulés quand le support microstructuré est étiré. Enfin, un protocole d'étirement a été optimisé de telle sorte à obtenir une réponse favorable à l'étirement mécanique des myotubes alignés sur le support microstructuré.

Le manuscrit de thèse se divise donc en deux parties :

- Dans un premier temps, une revue bibliographique a été effectuée afin de mieux comprendre les enjeux autour du projet. Le chapitre 1 fait une présentation du muscle dans son ensemble, afin de mieux comprendre, pour les non-biologistes cellulaires, l'importance des caractéristiques du support que l'on cherche produire dans notre modèle de culture cellulaire. Ensuite, le chapitre 2 est un état de l'art est effectué pour illustrer les différentes techniques développées pour produire des modèles in vitro en 3D et en 2D. Dans la foulée, le chapitre 3 fait un focus sur les différents stimuli que l'on peut appliquer dans les modèles in vitro afin d'améliorer la différenciation. Pour terminer cette partie, le chapitre 4 se concentre sur la mise en place de notre modèle et notamment sur la fabrication des supports microstructurés.
- Dans un second temps, la partie Résultats et Discussion regroupent les principaux résultats obtenus durant les 3 années de thèse. Pour commencer, le chapitre 1 se focalise sur la fabrication des supports microstructurés. Ensuite, le chapitre 2 présente les étapes d'optimisation de la topographie du support pour une réponse optimales des myoblastes primaires humains dans le but d'obtenir des myotubes alignés. Ensuite, le chapitre 3 se concentre sur la biofonctionnalisation du silicone afin d'assurer une adhésion des myoblastes et une bonne adhérence des myotubes sur les supports microstructurés. Enfin, le chapitre 4 est centré sur la mise en place d'un protocole d'étirement permettant d'améliorer la croissance des myotubes.

Enfin, la conclusion expose les caractéristiques essentielles au modèle in vitro développé durant le projet de thèse. Elle met en avant les propriétés topographiques idéales du support, la méthode de biofonctionnalisation la plus performante pour les myotubes humains et le protocole d'étirement présentant les meilleurs résultats en termes de réponse des myotubes. Cette conclusion est complémentée de plusieurs perspectives mettant en avant les principales directions de recherche à optimiser pour valoriser encore plus le modèle.

Revue bibliographique.

L'ingénierie tissulaire spécialisée pour le muscle reçoit un regain d'attention depuis plusieurs décennies notamment grâce aux différentes avancées technologique telles que l'impression 3D, la microfluidique et les nanotechnologies. Les modèles sont de plus en plus avancés et tentent de reproduire *in vitro* toutes les interactions existantes *in vivo*. A ce jour, la complexité du muscle dans son ensemble fait qu'il n'existe toujours pas de modèle *in vitro* de muscle dans son entièreté. La plupart des projets de recherche se focalisent sur des problématiques particulières : l'alignement des fibres musculaires et la production de matrice extracellulaire pour mimer au mieux la physiologie naturelle du muscle (11) ; la jonction neuromusculaire qui est la zone de communication entre le nerf et le muscle à l'origine de la contraction suite à une impulsion de l'influx nerveux (12) ; le continuum muscle-tendon-os pour prendre en compte la tension passive exercée en continu sur le muscle (13) ; la fabrication de modèle en 3D pour obtenir des système en multicouche et ainsi reproduire les interactions cellules-cellules (14) ; la coculture avec d'autres types cellulaires (cellules endothéliales, macrophages, fibroblastes) (15) ; la culture sous flux dynamique sur puce microfluidique pour simuler le renouvellement naturel du milieu environnant et connecter différents organes entre eux (16). Chaque modèle est optimisé afin de répondre à différents objectifs : l'implantation (ou greffage) de tissus musculaires suite à une lésion ou une opération, la compréhension fondamentale de pathologies musculaires et les mécanismes moléculaires impliqués, le « screening » de biomolécules, la médecine personnalisée afin d'adapter le traitement à chacun en fonction de son efficacité testé *in vitro*. D'autres objectifs en dehors du monde de la médecine sont aussi en vue tel que l'optimisation de l'entrainement chez le sportif dans le but d'adapter le programme d'entrainement en fonction des capacités de résistance au stress mécanique et de régénération des fibres musculaires de chaque athlète. Ainsi, le développement de modèles de culture de fibre musculaire obtenue à partir de cellules du patient, reproduisant sa pathologie musculaire observée est un objectif porté par un grand nombre d'équipes de recherche tant les retombées thérapeutiques sont prometteuses.

Chapitre 1 : Le muscle et son étude *in vivo*.

Du faite du charactère transdisciplinaire de cette thèse, impliquant des disciplines en interface (physique des matériaux, chimie et biologie cellulaire), nous avons fait le choix de présenter une première partie théorique relativement généraliste facilement accessible aux non spécialistes.

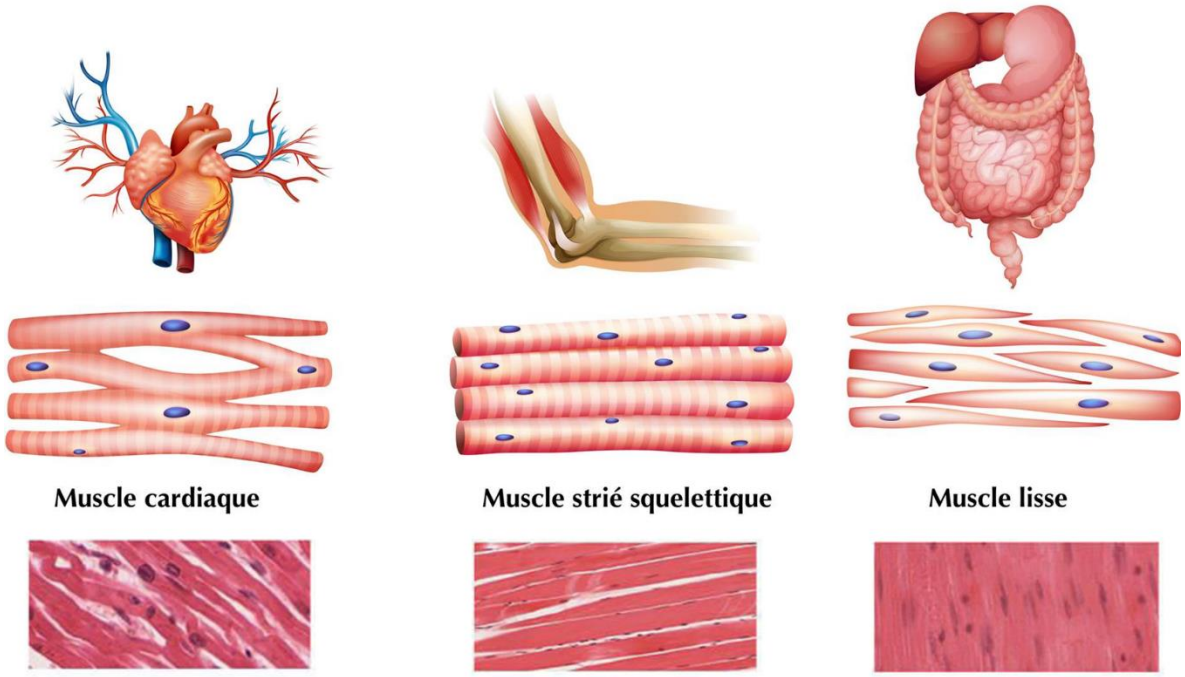

Figure 1 : Schéma et observation au microscope des différents types de muscle : Le muscle cardiaque, le muscle strié squelettique, le muscle lisse.
Adapté de stileex.xyz

Le muscle est divisé en trois grandes catégories : le muscle lisse, le muscle strié squelettique et le muscle cardiaque (Figure 1). Les muscles lisses sont présents dans les parois des organes internes comme l'estomac, l'intestin et les vaisseaux sanguins et sont composés de cellules mononucléées. Le muscle cardiaque, ou myocarde, est lui constitué de cellules mononucléées ou binucléées qui se différencient de celles du muscle lisse par la présence de striations à l'échelle microscopique. Ces deux types de muscles ont une activité contractile sous la dépendance du système nerveux végétatif. Enfin, le muscle strié squelettique regroupe le reste des muscles du corps humain. Il est attaché aux os par des tendons et est composé de fibres multinucléées, longues et cylindriques. Celles-ci possèdent des stries qui représentent l'organisation régulière des protéines contractile. Le muscle strié squelettique est contrôlé par le système nerveux volontaire.

Le muscle strié squelettique est caractérisé par 4 propriétés fonctionnelles :

- L'excitabilité qui est la capacité à reconnaitre un stimulus et à pouvoir y répondre,
- La contractilité qui consiste à pouvoir générer de la force en se contractant suite à un stimulus,
- L'élasticité et l'extensibilité qui représentent la capacité des fibres musculaires à revenir à leur état initial après avoir subi un étirement ou une contraction,
- La plasticité qui caractérise sa faculté à modifier sa forme et sa composition selon le travail et l'effort qu'il effectue.

A) La physiologie et la structure du muscle strié squelettique

Le muscle squelettique est un organe complexe composé de nombreux types cellulaires formant différents types de tissu. On retrouve des fibres musculaires, du tissu conjonctif, des vaisseaux sanguins et des nerfs (Figure 2). Le muscle est composé de plusieurs faisceaux qui sont maintenus dans l'épimysium et inséré sur l'os par l'intermédiaire du tendon. Autour de chaque faisceau se trouve le périmysium dans lequel on retrouve les veines, les artères et les nerfs. A l'intérieur de chaque faisceau, plusieurs fibres musculaires sont maintenues alignées entre elles par l'endomysium, un tissu conjonctif majoritairement constitué de collagène qui participe au microenvironnement de chaque fibre musculaire, qui, en interagissant avec elle, module sa prolifération et différenciation. En moyenne, l'Homme possède environ 500 000 fibres musculaires dans 1 cm² de muscle, nombre qui diminue constamment au cours de la vie (17). Ainsi, lorsqu'on observe une augmentation de la taille du muscle, cela n'est généralement pas représentatif d'une augmentation du nombre de fibres mais d'une augmentation de leur diamètre et de leur longueur.

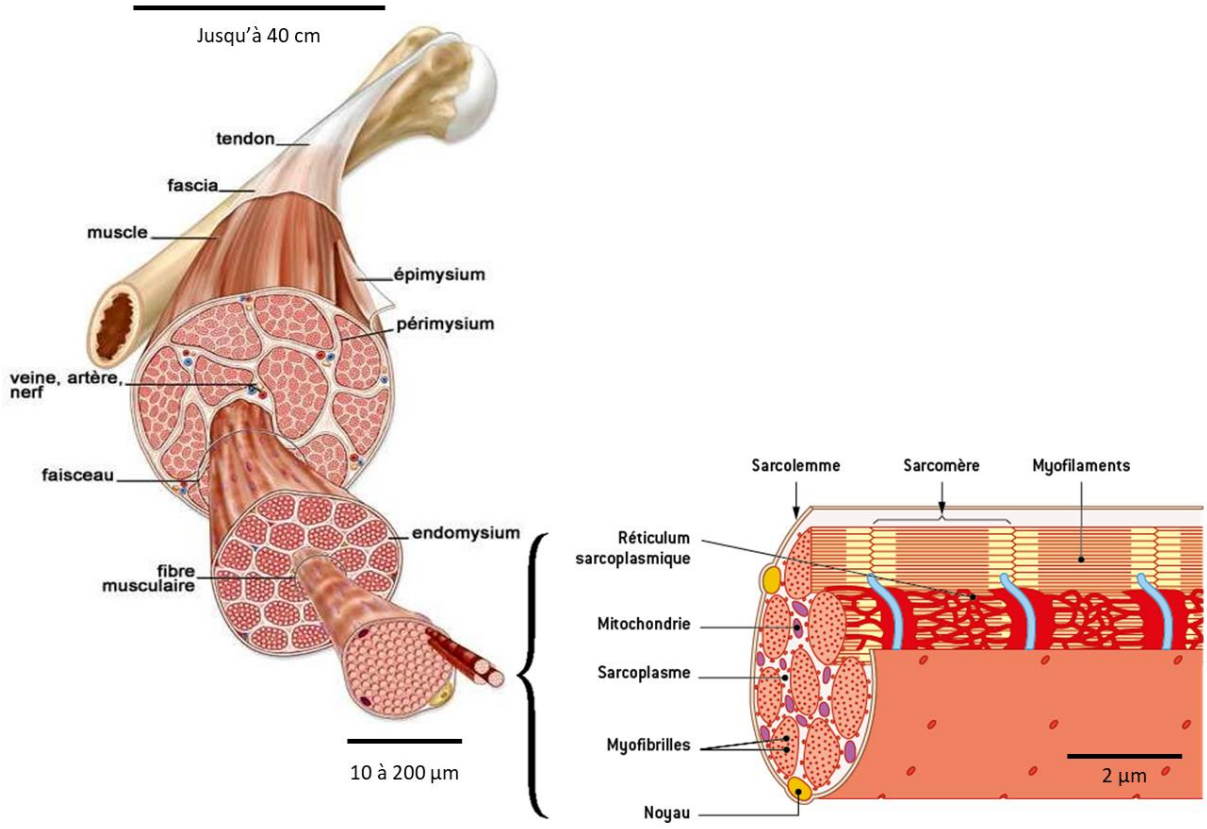

Figure 2 : Structure du muscle, de l'os jusqu'au sarcomère.
Adapté de zestedesavoir.com et annabac.com

Le diamètre des fibres est compris entre 10 et 200 µm pour une longueur maximale d'environ 12cm. Cependant, ces deux propriétés physiques dépendent à la fois du muscle en question et de l'individu. En effet, il est courant de classer les fibres musculaires en deux types (I et II) qui se distinguent par leur

métabolisme. Les fibres de type I, plus fines et plus longues, sont caractérisées par une contraction lente et prolongée. Elles nécessitent beaucoup d'oxygène pour se contracter et fonctionnent donc en aérobie. On les retrouve dans la plupart des muscles posturaux et en majorité chez les sportifs d'endurance (coureur de fond, cycliste). A l'inverse, les fibres de type II, plus larges et plus courtes, sont caractérisées par une contraction rapide et puissante. Cette catégorie est divisée en 3 sous-catégories (IIa, IIb et IIx) chacune variant par la vitesse de contraction dépendamment du ou des type(s) d'isoforme(s) de chaine de myosine exprimé(s). Ces fibres peuvent générer la force la plus importante mais elles se fatiguent aussi plus rapidement. En particulier, les fibres IIb fonctionnent grâce à l'apport de glucides pour produire l'énergie nécessaire à la contraction. Ces fibres ont souvent un diamètre plus important et on les retrouve notamment chez les bodybuilders et les sprinteurs. Si certains muscles sont connus pour être de type I (le trapèze) ou de type II (le triceps brachial), la plupart sont constitués d'un mélange des deux type de fibres et les proportions varient en fonction de l'activité physique de chaque individu. A l'échelle cellulaire, chaque fibre musculaire est composée de myofibrilles entourées par du cytosol, la phase liquide que l'on retrouve dans chaque cellule. Sa caractéristique est également la présence de multiples noyaux dont chacun assure la synthèse protéique dans son environnement proche. Les myofibrilles sont composées d'un enchainement de sarcomères qui est la plus petites unité contractile du muscle. Le sarcomère mesure environ 2 µm avec comme composants protéiques principaux : la titine, l'actine et la myosine. Leur arrangement dans l'espace est à l'origine de la striation observée au microscope avec des motifs en Z à chaque extrémité du sarcomère (Figure 3). Le phénomène de contraction musculaire a été initialement étudié par Hugh et Andrew Huxley (18). Ils ont mis au point la « théorie des filaments glissants » selon laquelle la longueur du sarcomère varie entre un muscle relaxé et un muscle contracté. Lors de la contraction, la zone H (Figure 3) disparait et la bande I se raccourcie, base d'une diminution de longueur de la fibre et donc du mouvement à l'échelle du muscle. Ce processus complexe met en jeu l'ATP (adénosine triphosphate), le nucléotide fournissant l'énergie nécessaire au fonctionnement du muscle, les chaines lourdes de myosines (MHC) et l'hélice d'actine.

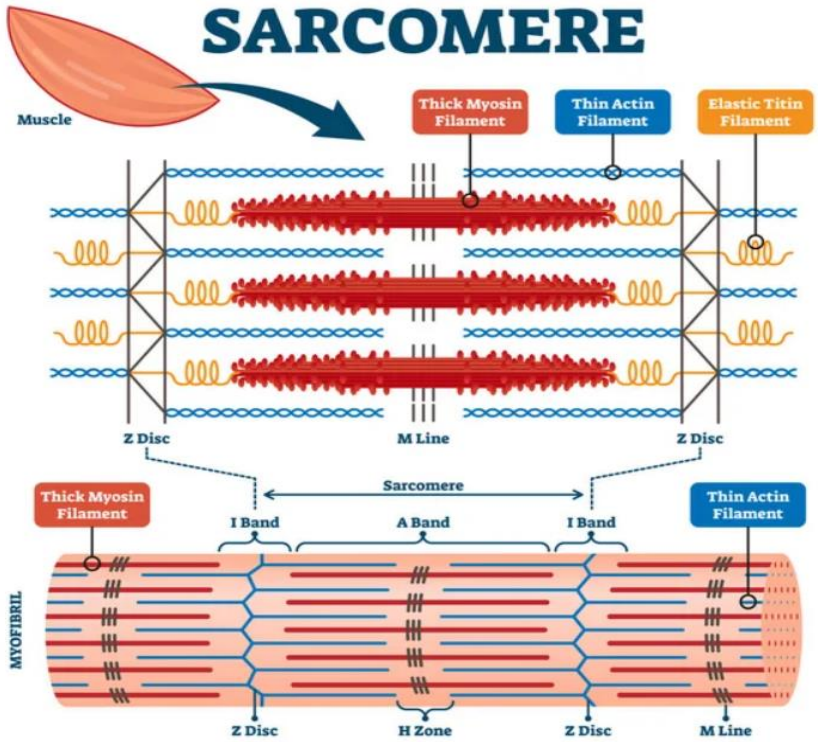

Figure 3 : Organisation du sarcomère et sa position dans la myofibrille.

La force de contraction générée lors d'une stimulation électrique sous forme d'un potentiel d'action, est dépendante de la longueur initiale du sarcomère, sous la dépendance de la tension passive appliquée à la fibre (Figure 4). Il existe un niveau de tension passive permettant d'obtenir une longueur du sarcomère menant à une force maximale suite à une stimulation électrique (2 µm dans l'exemple de la figure 4). Cette tension passive in vivo est exercée de façon continue par les tendons.

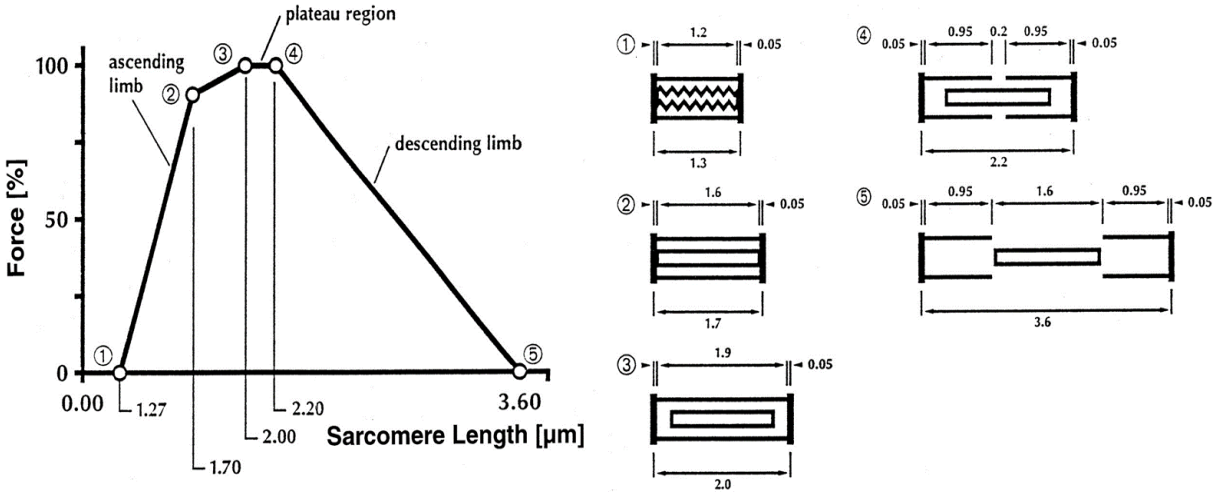

Figure 4 : Evolution de la force en fonction de la longueur du sarcomère. A droite, la simulation de la conformation du sarcomère aux différents points clés de la courbe de gauche. (issu de Rassier 1999)

B) La myogenèse

Le muscle est un organe qui possède la capacité de s'auto-régénérer (19,20). Il possède en son sein une réserve de cellules souches dites cellules satellites situées en périphérie de la fibre et qui s'activent lorsque ces fibres sont lésées (Figure 5).

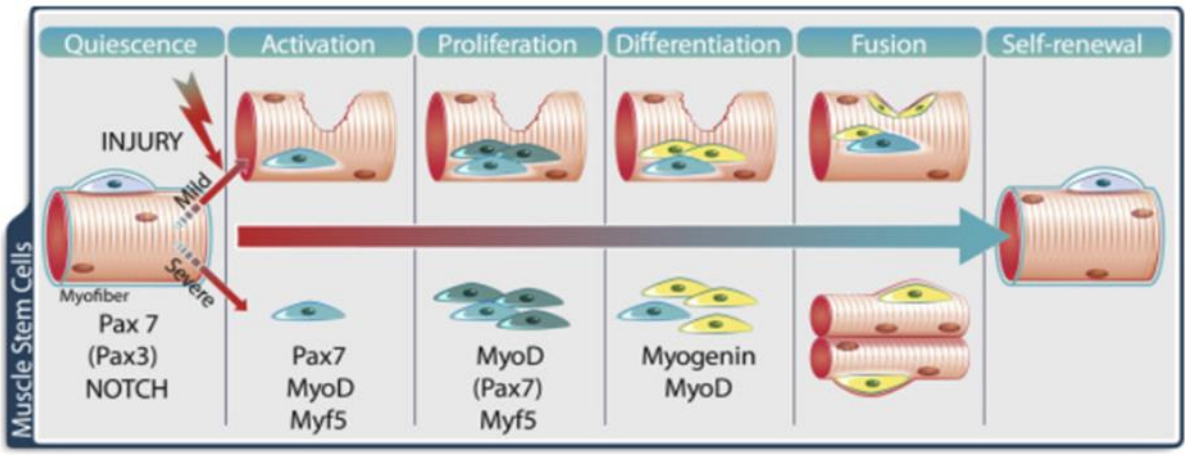

Figure 5 : Schéma du processus de régénération musculaire après une lésion et les facteurs de transcriptions impliqués.

Dans un premier temps, la fibre musculaire lésée va être le siège d'une réponse inflammatoire médiée par des protéines solubles appelés chémokines qui vont avoir un rôle d'attraction vis à vis des cellules inflammatoires comme les globules blancs (neutrophiles) et les macrophages (21). Elle active alors des facteurs de transcriptions myogénique tels que Myf5 et MyoD. En effet, sans lésion, ces cellules satellites sont dans un état quiescent. A ce moment-là, Myf5 est bloqué au niveau de l'ARN ce qui l'empêche de produire les protéines correspondantes. Une fois les cellules satellites activées par la réponse inflammatoire, elles sortent de leur de leur quiescence et migrent vers la zone lésée ce qui induit une expression rapide de Myf5 (22). De façon tout à fait intéressante, lors de la prolifération (multiplication par division cellulaire) et devenant des myoblastes, une partie se différencient pour donner par la suite, après fusion, des myotubes, alors qu'une autre partie retourne à l'état de quiescence pour être disponible plus tard, permettant de préserver le pool de cellules quiescentes, indispensables à la myogenèse. A la suite de la prolifération arrive la différenciation, processus irréversible de la sortie du cycle cellulaire. Les myoblastes s'allongent et expriment d'autres facteurs de transcription tels que Myogenin et MyoD (23,24). C'est d'ailleurs ce dernier facteur de transcription qui, lorsqu'il est surexprimé, force le myoblaste à sortir du cycle cellulaire. Les différents facteurs de transcriptions s'activent en cascade et leur expression est résumée dans la Figure 6. Les cellules s'organisent alors au niveau moléculaire avec l'alignement des filament d'actine les uns par rapport aux autres. Une fois différenciés, plusieurs myoblastes entrent en fusion pour former un myotube grâce à un remodelage de la membrane plasmique et l'activation de facteurs de transcriptions tels que Myomaker et Myomixer (25). Le myotube se transforme enfin en fibre musculaire par le processus de

maturation. Pendant cette période le système contractile se forme avec l'organisation du sarcomère, la jonction neuromusculaire se met en place pour permettre de détecter le relargage des neurotransmetteurs et les noyaux se déplacent en périphérie de la fibre. Pendant toute cette période de maturation, plusieurs protéines contractiles sont exprimées comme MHC (Myosin Heavy Chain), Acta1 (Actin alpha 1) et MCK (Muscle creatine kinase) (26). C'est ce genre de biomarqueurs que nous avons utilisé dans nos travaux inhérents à cette thèse, pour évaluer le niveau de maturation de nos cellules musculaires en culture.

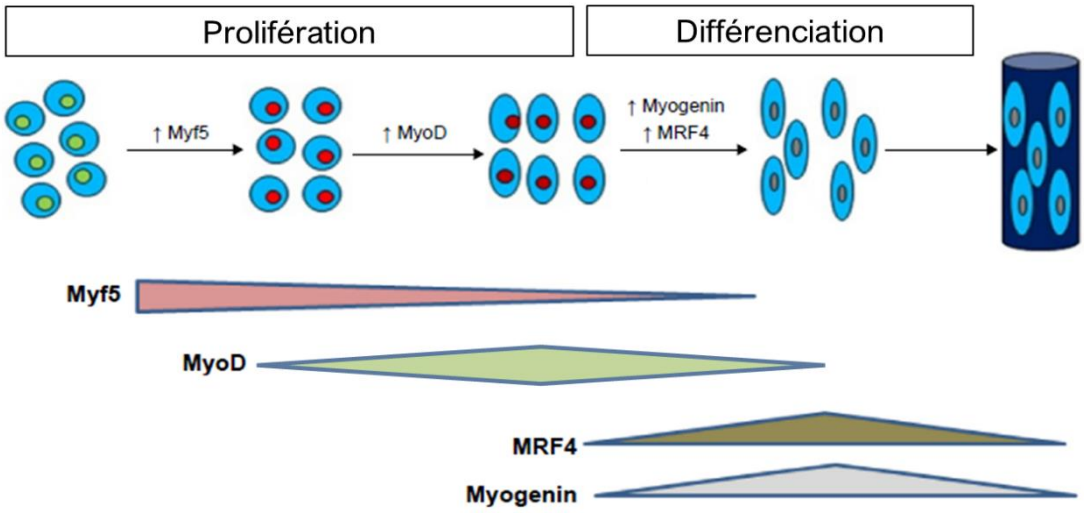

Figure 6 : Modèle d'expression des différents facteurs de croissance myogénique pendant le processus de prolifération et de différenciation.

C) La matrice extracellulaire

La Matrice Extracellulaire (MEC) est un réseau complexe de molécules qui entourent et soutiennent les cellules dans les différents tissus. Elle est caractéristique à chaque tissu mais la plupart de ces matrices sont composées de collagène, d'élastine, de laminine, de fibronectine, et d'autres protéines matricellulaires. La MEC joue un rôle dans chaque étape du développement musculaire, de la prolifération des myoblastes à la maturations des myofibres (27) mais peut aussi influencer la mort cellulaire (28). Dans le cas des tissus musculaires, la MEC contenue dans l'endomysium présente une forte proportion de collagène, de laminine et de fibronectine. Le collagène apporte la résistance mécanique aux tissus indispensable à leur différenciation et orientation, la laminine joue un rôle important dans la jonction neuromusculaire ainsi que dans l'adhésion cellulaire et la fibronectine participe grandement à structure tridimensionnelle de la MEC et à la migration des cellules satellites (29). Ainsi, la MEC peut se résumer en 4 caractéristiques principales : la composition biochimique, la rigidité, la porosité et l'alignement (30). Il est entendu par composition biochimique l'ensemble des facteurs de croissance présents naturellement dans la matrice qui améliorent la prolifération et la

différenciation des myoblastes et qui assurent donc le développement tissulaire (31). Concernant la rigidité, il est maintenant convenu que pour un développement optimal des myoblastes et myotubes, le milieu environnant doit avoir des propriétés mécaniques avec un module de Young autour de 12kPa, valeur correspondant à la rigidité du collagène présent dans la MEC (32). La porosité quant à elle favorise la diffusion des nutriments et des facteurs de croissance (33). Enfin c'est l'anisotropie de la MEC qui permet de guider les myoblastes vers une différenciation parallèle les uns des autres produisant ensuite des myotubes alignés, un paramètre primordial pour une génération optimal de force de contraction (34). C'est la fibronectine, une glycoprotéine fibreuse présente dans la MEC qui apporte cette structure anisotropique guidant les cellules lorsqu'elles prolifèrent pour qu'elles se positionnent les unes à côtés des autres pour induire ensuite l'alignement (35). La MEC apporte aussi des sites d'adhésion grâce notamment à la laminine, un ensemble de glycoprotéines qui sont reconnues par des récepteurs d'adhésion cellulaires comme les intégrines (36). Les intégrines sont des protéines transmembranaires qui permettent de faire le lien entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule, notamment dans le cadre de l'adhésion de la cellules à son milieu environnant. Elles activent alors des voies de signalisation intracellulaires qui régulent la prolifération, la migration et la différenciation des myoblastes. Les altérations de l'adhésion cellulaire peuvent affecter l'expression des gènes impliqués dans la différenciation des myoblastes, entraînant ainsi des anomalies du développement musculaire. Ainsi dans nos travaux de cette thèse, nous avons tenté d'optimiser les conditions de culture des progéniteurs myogéniques, afin de mimer au mieux les propriétés de cette matrice extracellulaire. Le but a été d'obtenir des fibres musculaires représentant au mieux le phénotype musculaire du donneur c'est à dire bien différenciés et alignés selon un axe principal.

D) Les modèles d'étude *in vivo*

Plusieurs modèles animaux ont été développés pour mieux appréhender la physiologie du muscle (4,37). Ils ont généralement deux objectifs distincts :

a) Permettre de modéliser une myopathie afin de mieux appréhender les différents mécanismes physiologiques à l'origine du phénotype musculaire des patients,
b) Permettre l'évaluation de nouvelles approches thérapeutiques avant le passage chez l'homme.

Même si ces modèles animaux ne sont pas représentatifs de la complexité de la pathologie étudiée chez l'Homme, de nombreux animaux sont utilisés pour leur similarité physiologique avec l'humain sur certains aspects. Les modèles les plus utilisés sont les rongeurs, les cochons ou le chien ((10,38). La souris reste néanmoins omniprésente dans les modèles puisqu'elle possède une très grande similarité génétique avec l'Homme et reste très facile d'accès avec un très grand panel de modèles d'inhibition

ou d’activation d’un ou plusieurs gènes d’intérêt (5). L’utilisation de modèles animaux soulèvent aussi de nombreux problèmes éthiques sur le bien-être animal et devient rapidement très couteux au niveau de l’achat et de l’entretien des animaux. C’est pourquoi d’autres modèles utilisant uniquement des cellules et non l’animal entier se sont développés : c’est le début de la modélisation *in vitro*.(5)

Chapitre 2 : La modélisation musculaire *in vitro*

La modélisation musculaire *in vitro* est une approche qui vise à reproduire, dans un environnement contrôlé en laboratoire, les caractéristiques physiques et physiologiques des muscles chez l'Homme. Elle permet de moduler de façon plus précise des paramètres expérimentaux, tels que le taux d'oxygène et de CO_2 dans le milieu environnant, la composition du milieu de culture et la température. Elle offre ainsi de nombreuses possibilités pour étudier et comprendre les mécanismes fondamentaux des muscles, ainsi que pour développer de nouvelles thérapies et techniques de régénération tissulaire (39). La modélisation musculaire *in vitro* est aussi très efficace pour évaluer l'effet des traitements pharmacologiques et des thérapies géniques (40). Cela permet de tester des cibles thérapeutiques et des biomolécules d'intérêt chez l'Homme, sans passer par les modèles pré-cliniques (41). Une fois le modèle musculaire *in vitro* validé comme représentatif de la pathologie musculaire du donneur, une variété de techniques d'analyse peut être utilisée pour évaluer sa fonctionnalité et son comportement face à une sollicitation donnée. Cela peut inclure des mesures de la contractilité musculaire, de l'excitabilité électrique, de la résistance à un stimulus mécanique, ainsi que des analyses histologiques et biochimiques pour étudier la structure et la composition des tissus musculaires. Même si les résultats obtenus *in vitro* ne peuvent représenter la totalité du comportement musculaire *in vivo*, cette alternative au modèle pré-clinique est à la fois plus rapide, moins onéreuse et en pleine expansion depuis la prise en considération du bien-être animal. La comparaison entre les avantages (en vert) et les inconvénients (en orange) des modélisations *in vivo* et *in vitro* sont récapitulés dans le Tableau 1.

Tableau 1: Comparaison des avantages et désavantages entre les études in vivo *et* in vitro.

	In vivo	In vitro
Prix et préparation	Prix élevé car les animaux doivent être achetés et entretenus. Considérations éthiques sur le bien-être animal	Il existe des lignées cellulaires commerciales purifiées qui ont une durée de vie infinie ce qui rend toute la procédure relativement peu chère et répétable
Temps	Long, plusieurs mois, voire années	Court, quelques jours à semaines
Résultats	Détaillés et spécifiques	Précis mais nécessite souvent une confirmation *in vivo*
Règlementation	Stricte car utilisation d'êtres vivants	Plus simple sauf pour certains cas particuliers avec les cellules primaires humaines

A) Les principes de la culture in vitro

LES PARAMETRES QUE L'ON RECHERCHE A REPRODUIRE

Il existe deux objectifs distincts à la modélisation *in vitro*. Le premier a pour but de créer un tissu musculaire fonctionnel pouvant ensuite être greffé *in vivo* pour favoriser la régénération tissulaire après une blessure ou une opération. Le second objectif est plus fondamental et vise à reproduire au mieux le milieu naturel des cellules *in vivo* pour pouvoir ensuite comprendre les mécanismes moléculaires derrières certaines pathologies ou l'effet de molécules bioactives. Reproduire les quatre caractéristiques de la MEC (composition chimique, rigidité, porosité, alignement) est le point crucial pour obtenir, par culture, des fibres musculaires représentatives de la pathologie du donneur. Pour mimer au mieux cet environnement, de nombreux biomatériaux sont utilisés. Dans la plupart des cas, on retrouve une matrice sur un support dont la structure 2D ou 3D et la composition favorisent la prolifération et la différenciation des cellules musculaires. Il faut différencier matrice et support (Figure 7) : La matrice sert à biofonctionnaliser le support, en interagissant avec les récepteurs d'adhésion des cellules en cultures. Cette matrice peut également être biodégradable dans un but d'implantation des fibres musculaires obtenues dans un site lésé chez l'Homme. Le support, qui est souvent non-biodégradable a une utilité plus fondamentale. Il sert d'armature à la matrice sur laquelle les cellules se développent.

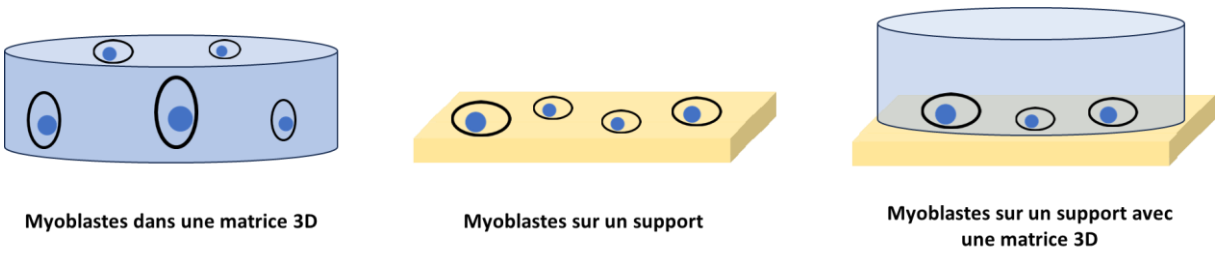

Figure 7 : A gauche, la matrice 3D avec des cellules dispersées à l'intérieur, au centre, un support solide avec des cellules dessus, à droite, un support solide avec une matrice par-dessus.

Dans les muscles du corps, les fibres musculaires sont alignées selon un axe spécifique, ce qui leur confère une fonctionnalité optimale pour la contraction et la génération de force (34). Il permet aussi l'optimisation de la différenciation des myoblastes qui est dirigé selon deux paramètres : la fin de la prolifération et leurs positions relatives les uns à côté des autres pour pouvoir fusionner (42). L'alignement permet aux fibres musculaires, grâce à l'homogénéisation des contraintes mécaniques sur un seul axe, de répondre de façon optimale à l'étirement sans phénomènes lésionnels. *In vitro* cet alignement des fibres permet de modéliser au mieux l'application d'une contrainte mécanique selon un seul axe d'étirement en culture 2D et 3D. Ainsi l'obtention de myotubes en cultures alignés, dont l'organisation et la structure s'approcheraient le plus possible du modèle *in vivo*, a nécessité une

optimisation des supports avec plusieurs pistes méthodologiques qui seront présentés dans les chapitres suivants. C'est ce que nous avons voulu faire dans les travaux de cette thèse.

LE CHOIX DES CELLULES

Lorsque l'on fait de la culture *in vitro*, le choix des cellules à utiliser est un facteur primordial (43). Dans le cas des modèles musculaires, on retrouve dans la littérature cinq types cellulaires majoritaires : les lignées humaines et animales (C25, C2C12, L6...), les cellules primaires issues d'animaux (rat, souris, poulet...), les cellules primaires humaines après biopsie puis purification et les cellules souches pluripotentes induites (iPSC). Les cellules C2C12, provenant d'un clone de souris sont très largement plébiscitées lorsqu'il s'agit de la modélisation *in vitro* du muscle car cette lignée est parfaitement caractérisée et possède un fort taux de prolifération tout en produisant des myotubes assez matures pour se contracter (44). Il n'existe cependant à ce jour pas d'étude comparant le processus et la durée de chaque étape de myogenèse pour chaque type cellulaire, mais certains ont déjà été comparé de manière individuelle. Les lignées cellulaires ne réagissent pas de la même manière que les cellules primaires à leur environnement 2D ou 3D (45). En effet, on sait que les cellules issues de lignées animales, notamment les cellules C2C12, ne se développent pas au même rythme que les cellules primaires humaines (46,47). Plusieurs théories sont émises pour justifier cette différence de comportement mais la plus reconnue s'appuie sur la différence entre le cycle cellulaire humain et murin (48). Puisque l'humain vit 30 à 50 fois plus longtemps que la souris, cela signifie que chez l'Homme, il y aura plus de division cellulaire que chez la souris. Ainsi, si les cellules humaines se développaient au même rythme que celles des souris, le risque de mutation menant à un cancer serait très élevé. Sachant qu'il augmente en fréquence chez les personnes plus âgées (49) ce ralentissement de prolifération et de différenciation chez l'Homme comparé à la souris serait une régulation naturelle du corps pour se protéger contre les pathologies dues au vieillissement. Il faut donc toujours être conscient qu'en fonction du type de cellules utilisées les résultats peuvent varier, ce qui peut introduire un biais.

LE CHOIX DE LA MATRICE

Depuis le début du XIXe siècle, les polymères sont au cœur de toutes les recherches tant pour leurs grandes variétés que pour leur stabilité chimique. Parmi eux, les hydrogels ont permis des avancées significatives dans le domaine biomédical avec notamment la culture de myoblastes en 3 dimensions permettant de tendre vers la mise au point d'organoïdes (24). Les hydrogels possèdent une nature hydrophile qui permet de stocker de grandes quantités d'eau et de fluides biologiques dans un réseau 3D (jusqu'à 90% de la masse totale). Ils bénéficient aussi de propriétés biomimétiques intéressantes

avec notamment une rigidité comparable à celle observée *in vivo* permettant d'optimiser la prolifération et la différenciation des progéniteurs myogéniques, la biocompatibilité, la non-toxicité, la biodégradabilité et la possibilité de les fonctionnaliser chimiquement pour apporter des propriétés supplémentaires. Les hydrogels sont donc majoritairement utilisés en tant que matrice pour reconstituer en 3D la MEC. De plus, la composition chimique de l'hydrogel ainsi que les variations de concentrations permettent de faire varier sa structure et ainsi apporter de nouvelles propriétés intrinsèques spécifiques à chaque application comme une meilleure adhésion cellulaire et une porosité contrôlée (51–54). Ces propriétés, notamment l'adhésion cellulaire, peuvent avoir un effet direct sur la prolifération des myoblastes et la maturation des myotubes (53) mais aussi sur la force de contraction (54). Parmi les hydrogels naturels les plus couramment utilisés dans la culture cellulaire musculaires, on retrouve le collagène (53,55–59), la fibrine/fibrinogène (51,60–68), deux composants de la MEC du muscle et le Matrigel® (48,54,69–71). Le Matrigel® est un hydrogel commercialisé issu de la membrane basale d'une tumeur provenant d'une queue de souris. Cette provenance rend la matrice particulièrement riche en protéines extracellulaire et en facteurs de croissance ce qui explique une meilleure efficacité sur le rendement de culture cellulaire par rapport aux autres hydrogels. Grefte et al. (72) ont notamment montré qu'en culture 2D, le Matrigel® améliore significativement la prolifération et la différenciation des cellules C2C12 par rapport au collagène. Ils ont aussi observé la même différence en culture 3D : les myotubes cultivés dans le Matrigel® sont plus larges, plus longs et possèdent plus de branches, comparés à ceux dans le collagène qui paraissent plus arrondis. Ces résultats seraient expliqués par une meilleure adhésion au Matrigel® par rapport au collagène puisqu'il contient des intégrines issues de la laminine-111, un composant naturel de la MEC. Cette hypothèse est aussi émise par Hinds et al. (54). Ils ont comparé deux solutions commerciales de Matrigel®, l'une avec les facteurs de croissance et l'autre où ils ont été retirés. Leurs résultats montrent que dans les deux matrices, la force de contraction reste la même. Dans ce cas-là, l'apport nutritif du Matrigel® semble être secondaire comparé à son apport structurel. L'avantage procuré par la provenance du Matrigel® constitue cependant l'un de ses plus gros inconvénients puisque la tumeur est en permanente évolution ce qui induit un manque de répétabilité entre chaque « batch » (73). Ainsi, d'un flacon vendu à l'autre, il est possible que la quantité de facteurs de croissance ainsi que la structure 3D du gel soient différentes ce qui peut impacter directement la réponse cellulaire. Même si de plus en plus d'équipe cherchent à trouver une alternative (74) pour s'exempter de ce biais de répétabilité, le Matrigel® reste l'un des hydrogels le plus utilisé dans la recherche grâce à ses capacités à former une matrice en 3D avec de très bons résultats *in vitro*. Les différents hydrogels peuvent aussi être mélangés pour cumuler chacune de leurs propriétés avantageuses (30,75–77). Wells-Cembrano et al. (75) ont par exemple préparé un hydrogel à base de fibrinogène, Matrigel® et thrombine pour former des organoïdes musculaires en 3D à partir d'une lignée humaine. Ce mélange d'hydrogel permet de

créer une synergie entre les différents hydrogels en combinant la solidité structurelle du fibrinogène transformé en fibrine grâce à la thrombine avec les capacités nutritives et d'adhésion du Matrigel®. Engler et al. ont également montré que la rigidité jouait un rôle primordial sur la prolifération et la différenciation des myoblastes (32). Il est maintenant reconnu que pour un développement idéal des myotubes, l'environnement doit présenter une rigidité comprise entre 10 et 15 kPa ce qui correspond à la rigidité naturelle de la matrice extracellulaire (78–80). Or, en culture cellulaire 2D, les substrats de base comme le polystyrène des boites de Petri sont souvent largement plus rigide que la MEC et c'est cet écart de rigidité qui expliquerait en partie la faible striation des myotubes ainsi que l'organisation peu avancée du système contractile (32). Il est intéressant de noter que lorsque la rigidité du support ne correspond pas à celle retrouvée *in vivo*, les myotubes ont tendance à produire leur propre MEC (81). Ainsi, plutôt que de moduler la rigidité du support, certaines études ont utilisé une première couche de cellules, souvent des fibroblastes qui se comportent mieux en présence de substrats plus rigides, sur lesquels sont ensuite ensemencés les myoblastes, ce qui favorise l'adhésion cellulaire (82,32,83–85). Ce n'est cependant pas la liaison directe avec les fibroblastes qui favorise le développement des myoblastes mais bien les molécules sécrétées par les différents types cellulaires pendant la prolifération (84,85).

LE CHOIX DU SUPPORT

En parallèle, d'autres polymères synthétiques sont utilisés en tant que support physique pour la culture des myoblastes. Parmi eux, on retrouve le polyuréthane (PU) (86), le poly(ethyleneglycol) (PEG) (87) et le poly(ε-caprolactame) (PCL) (88–90). Les avantages de ces polymères résident dans le fait qu'ils sont facilement synthétisables et fonctionnalisés, c'est-à-dire chimiquement modifiés pour répondre à des besoins précis (groupements chimique en extrémité, structure 3D, poids moléculaire, etc.). Néanmoins, on retrouve très rarement ce genre de support seul mais plutôt en mélange avec des hydrogels naturels (86–90). Ergene et al. (86) ont par exemple synthétisé un polyuréthane dont les extrémités de chaine ont été fonctionnalisées avec du fibrinogène. Ils ont ainsi pu produire des films d'élastomère sur lesquelles des cellules C2C12 ont été ensemencées pour ensuite générer des myotubes fonctionnels. Ce mélange polymère synthétique / polymère naturel permet de modifier certaines propriétés comme l'hydrophobicité et la rigidité. L'hydrophobicité est définie par le degré d'affinité du support avec l'eau. Un matériau hydrophile aura tendance à créer des liaisons hydrogènes avec l'eau tandis qu'un matériau hydrophobe va repousser l'eau qui ne pourra pas s'étaler. L'eau étant le premier composant des milieux de culture, un support hydrophobe complique la culture cellulaire. Les intégrines en surface des cellules sont également sensibles à cette hydrophilie ce qui explique qu'en cas de matériaux très hydrophobe, les cellules n'y adhèrent pas. En pratique, pour déterminer

l'hydrophobicité d'un matériau, la technique la plus utilisée est la mesure de l'angle de contact θ. Pour cela, une goutte d'eau est déposée sur le matériau et une photo est prise de telle sorte à mesurer l'angle θ entre le support et le bord de la goutte. La mesure de l'angle se calcule en utilisant la loi de Young-Dupré (Figure 8) :

$$\gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos\theta = \gamma_{SV} \leftrightarrow \cos\theta = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}}$$

Avec γ_{SL}, γ_{LV} et γ_{SV} les énergies d'interface respectivement solide-liquide, liquide-vapeur et solide-vapeur qui varient en fonction de chaque liquide et θ l'angle de contact à l'équilibre.

Si cet angle est inférieur à 90°C, on considère que la surface est hydrophile, si l'angle est supérieur à 90°C elle est hydrophobe.

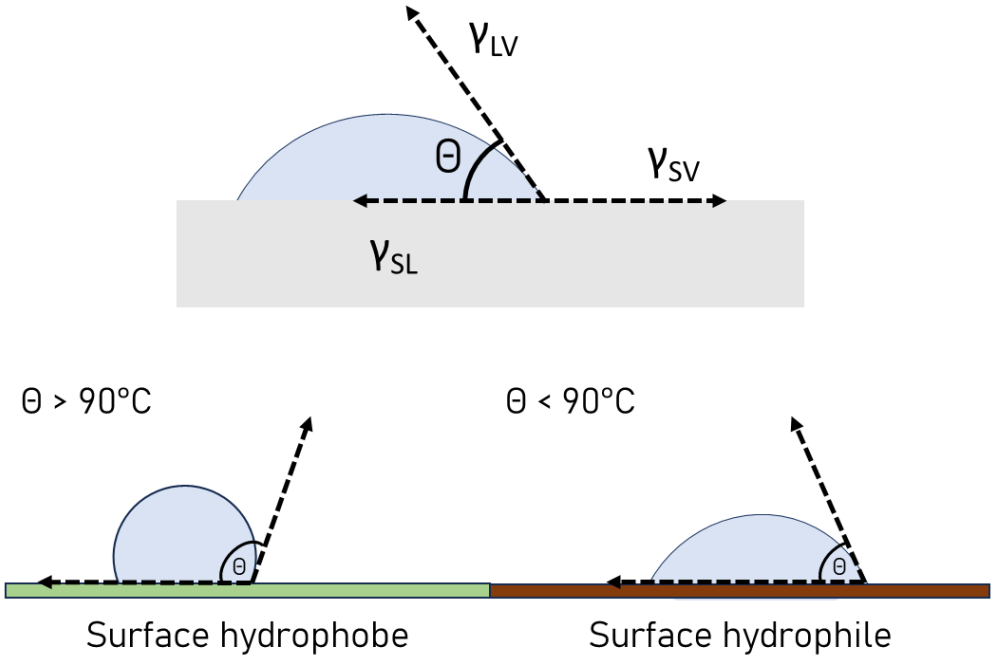

Figure 8 : Mesure de l'angle de contact. En haut le calcul de l'angle de contact selon la loi de Young-Dupré, en bas, la différence entre surface hydrophobe et hydrophile sur l'angle de contact.

Perez-Puyana et al. (89) ont par exemple fonctionnalisé du PCL avec de la gélatine ou du collagène et ont mesuré des angles de contact significativement plus petits en présence de gélatine (55°), comparé au collagène (105°). Les auteurs expliquent cette différence par le fait que la gélatine a tendance à se réorganiser de telle sorte à présenter plus de groupement glycine (et donc plus de possibilités de liaisons hydrogènes) en surface. Cette différence a été confirmée en culture cellulaire puisque le support présentant le meilleur développement des myoblastes L6 est celui à base de 4% de gélatine.

Dans une autre expérience, Yeo et al. (90) ont produit un support à base de fibres de poly(caprolactone-co-L-lactide) sur laquelle ils ont ensuite déposé une couche de collagène pour favoriser le développement des cellules musculaires. Ils se sont focalisés sur l'effet de la structure du

support sur la réponse des progéniteurs myogéniques. Les auteurs montrent que les structures en forme de fibres collées les unes aux autres jouent un rôle direct sur l'adhésion cellulaire et donc sur la prolifération et la différenciation. C'est donc un exemple de l'effet du support et plus précisément de sa topographie sur le développement cellulaire.

COMMENT CARACTERISER LES MYOTUBES OBTENUS *IN VITRO* ?

Parmi les techniques les plus utilisées pour visualiser les fibres musculaires obtenues et évaluer leur niveau de différenciation, on retrouve l'immunofluorescence. C'est une méthode de microscopie qui joue sur l'interaction antigène/anticorps. Elle comprend deux techniques similaires : l'immunofluorescence directe et indirecte. Dans les deux cas, le principe est de fixer un agent fluorochrome sur la molécule d'intérêt afin de pouvoir l'observer au microscope (Figure 9). Dans le cas du muscle, il existe une multitude de molécules d'intérêt allant de la protéine membranaire aux noyaux cellulaires en passant par toutes les protéines du système contractile ou certains composants du cytosol. La différence entre les deux techniques réside dans le nombre d'anticorps utilisé. Pour l'immunofluorescence directe, l'anticorps est directement conjugué au fluorochrome puis va interagir avec l'antigène d'intérêt et la fluorescence peut alors directement être observée au microscope après stimulation. Dans le cas de l'immunofluorescence indirecte, un anticorps intermédiaire simple est utilisé, il se fixe sur l'antigène et un second anticorps contenant le fluorochrome est alors introduit pour induire la fluorescence après stimulation. La seconde technique est la plus répandue car les anticorps sont des molécules complexes donc souvent très encombrées (importante gène stérique) et la fonctionnalisation avec un fluorochrome peut réduire sa sélectivité avec l'antigène d'intérêt. Elle permet aussi de fixer plusieurs anticorps secondaires au même anticorps primaire, ce qui peut apporter un effet d'amplification qui augmente significativement la sensibilité.

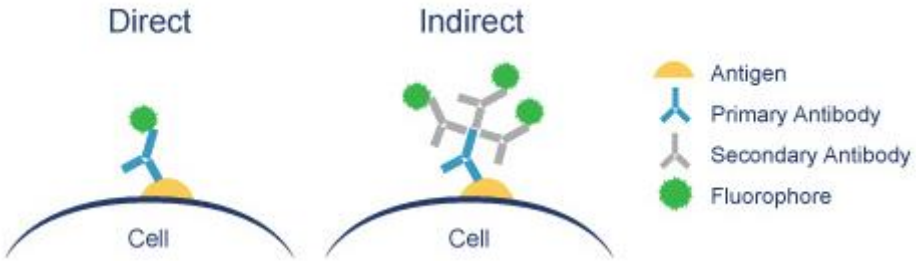

Figure 9 : Schéma du principe d'immunofluoresence directe et indirecte.

A partir des images capturées au microscopes à fluorescence, il est possible de quantifier avec un logiciel de traitement d'images de nombreuses caractéristiques comme l'alignement des fibres, leur diamètre, leur longueur et le taux de fusion, leur niveau de striation. Le taux de fusion est le rapport entre les noyaux présents dans les myotubes et le nombre totale de noyaux sur l'image. Il est un marqueur préférentiel de la différenciation.

Une autre méthode d'analyse des modèles est la RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction). Elle consiste à mesurer la quantité d'une séquence d'ARN (Acide RiboNucléique) contenue dans une solution. Pour cela, les ARN sont isolés des myotubes puis ils sont mélangés avec une transcriptase, une molécule ayant la faculté de synthétiser le brin d'ADN complémentaire à un brin d'ARN, avec une amorce pour démarrer le processus de transcription. Le brin d'ADN obtenu est alors analysé par qPCR, méthode qui consiste à amplifier par cycle consécutif le brin d'ADN (le matériel génétique est doublé entre chaque cycle). Cette amplification est suivie par spectroscopie UV à l'aide d'un marqueur fluorescent. On observe alors 3 phases : le bruit de fond qui correspond au moment où la quantité d'ADN est trop faible pour permettre la détection, la croissance exponentielle suite à la réplication rapide de l'ADN (doublement à chaque cycle) et le plateau qui intervient lorsque le milieu s'appauvrit en certains éléments nécessaires (Figure 10). C'est le signe que l'analyse est terminée. Pour comparer deux conditions, on détermine le Ct (Cycle Threshold) qui caractérise le début de la polymérisation en chaine et donc plus le Ct arrive tôt, plus cela signifie que la quantité initiale en ADN (et donc en ARN) est importante (Figure 10).

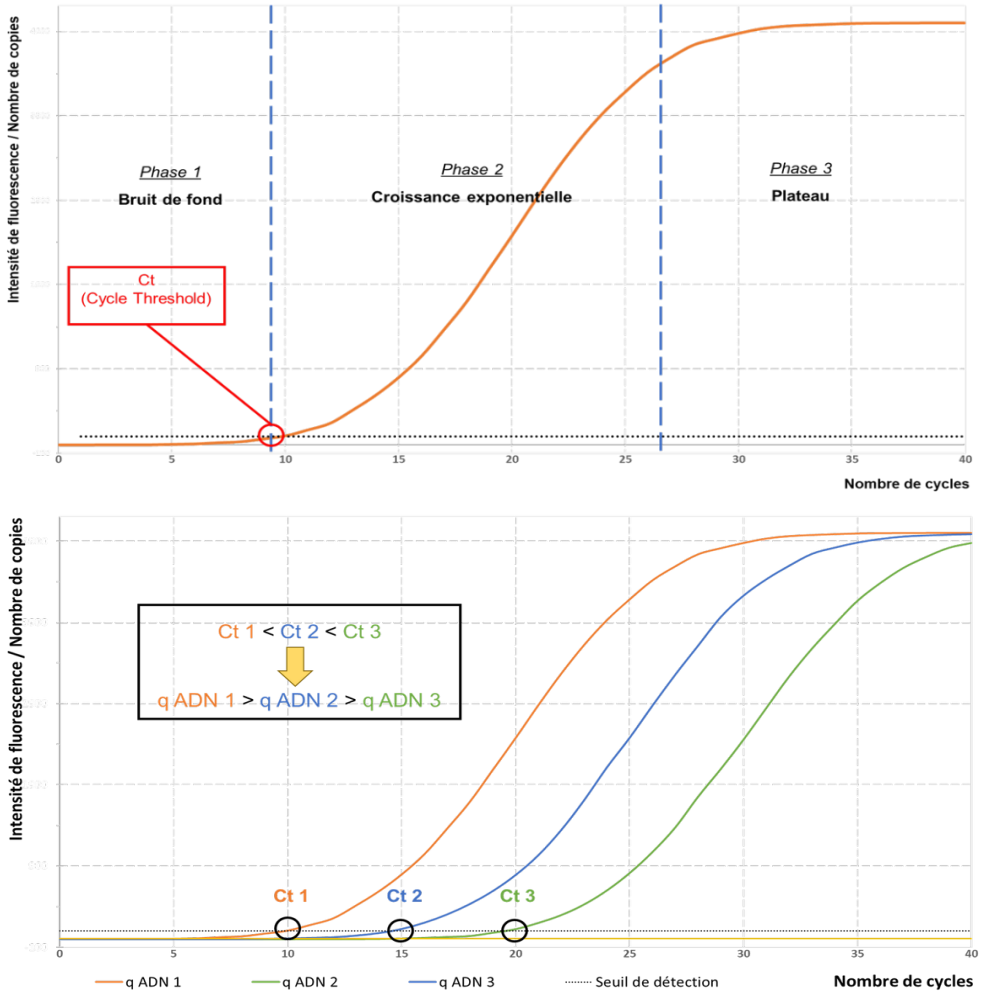

Figure 10 : Principe de la méthode de qPCR

B) La modélisation 2D du muscle

La modélisation *in vitro* 2D consiste à cultiver des myoblastes sur un support solide, créant alors une monocouche de cellules qui vont ensuite proliférer, se différencier et produire des myotubes les un à côtés des autres sur un même plan. En 2D, les manipulations sont plus simples et il est plus aisé de contrôler l'environnement cellulaire (milieu, CO_2, oxygène) car les supports sont souvent simples et facile d'accès. Il est aussi plus facile d'observer les cultures lorsqu'elles forment une seule couche. En modélisation 2D, l'un des facteurs primordial pour la culture est le choix du support. Il est possible de jouer sur plusieurs paramètres qui vont avoir un impact direct sur la culture cellulaire et ces paramètres sont ceux que l'on retrouve précédemment dans la MEC : composition chimique, rigidité, porosité et anisotropie. Ce sont ces propriétés que nous allons maintenant aborder :

FAVORISER L'ADHESION CELLULAIRE PAR LA COMPOSITION CHIMIQUE ET LA POROSITE DU SUPPORT

Il a été montré précédemment que l'adhésion joue un rôle primordial sur la survie des myoblastes. Une bonne adhésion implique une bonne prolifération ce qui est la première étape d'une myogenèse réussie en culture. Si, dès le départ, les cellules ont du mal à s'accrocher au support, elles vont se rétracter et risquent même d'entrer en apoptose. Pour favoriser l'adhésion, il est important de jouer sur la composition chimique du support ainsi que sur sa porosité. Pour cela, l'utilisation de polymères biocompatibles est la solution la plus simple. Une boite de Petri par exemple ou une lame de verre suffisent pour créer des attaches solides avec les intégrines présentes à la surface des myoblastes. Cependant, le verre en lui-même ainsi que les plastiques sont inertes, ce qui ne favorise pas le développement et la différenciation des cellules sur le long-terme. Ainsi, une technique particulièrement utilisée pour créer des supports qui augmentent l'adhésion cellulaire est l'électrospinning. L'électrospinning est une technique de production de supports à base de fibres très fines d'un polymère (Figure 11). Le polymère liquide est inséré dans une seringue dont l'extrémité est chargée électriquement. Le liquide est alors versé sous la forme d'un jet très fin sur une plaque chargée de manière opposée à la seringue. Cette différence de charge crée une force électrostatique qui guide les fibres vers la plaque permettant alors de créer des supports de différentes formes et tailles en faisant varier la forme de l'aiguille, la vitesse de projection, et la forme de la plaque. Dans l'objectif de créer des supports dont les fibres du polymère sont parallèles entre elles, la plaque du dessous est remplacée par un cylindre qui, lorsqu'il est mis en rotation, permet de contrôler la forme et la taille des supports en faisant bouger la seringue latéralement (88,91–93). Cette méthode permet de produire des fibres de polymères dont le diamètre est compris entre quelques nanomètre et plusieurs micromètres, ce qui est particulièrement utile dans la création de matériaux poreux notamment dans le domaine du biomédical (94). L'électrospinning offre une grande souplesse dans la sélection des

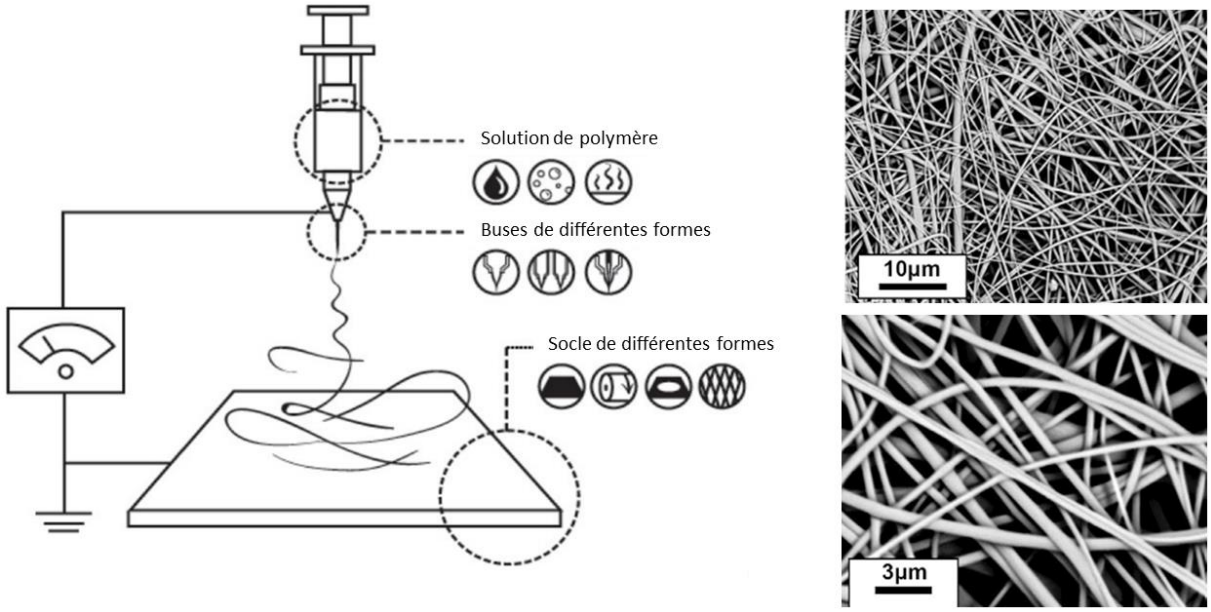

Figure 11 : Au gauche, schéma d'un système d'électrospinning. A droite, nanofibres produites par électrospinning.

polymères utilisés, ce qui permet de concevoir des supports sur mesure pour des applications spécifiques (95). On retrouve par exemple le poly(ε-caprolactone) (PCL) (88,90,96,91,97), le polyuréthane (PU) (98) mais aussi des polymères plus complexes tels que la cellulose (99), la fibrine (61,100) et la matrice extracellulaire décellularisée (92) qui est une matrice issu de muscles d'animaux dans laquelle les cellules ont été retirées ne gardant ainsi que la structure et la composition chimique de la MEC. De plus, la texture en fibres des supports crée une porosité importante, ce qui amène plus de sites d'adhésion possibles avec les myoblastes. Santos et al. (99) ont électrospinné des supports en acétate de cellulose qu'ils ont ensuite fonctionnalisés avec une molécule bioactive (extrait de roucou, un colorant alimentaire jaune). Ils ont produit des supports dont les fibres sont disposées de manière anarchiques (Figure 11) et ils ont montré qu'en fonctionnalisant leur cellulose, ils ont réduit l'angle de contact (50° contre 77°) synonyme d'une meilleure hydrophilie favorisant l'adhésion des cellules. Ils ont aussi remarqué que la taille des fibres avait un impact sur la viabilité cellulaire. Lorsque les fibres sont plus larges, elles sont moins denses pour un même volume donné. Il en résulte une plus grande porosité qui favorise l'adhésion des myoblastes et leur différenciation. Mohd Razali et al. (101) ont créé des supports avec différentes formes géométriques (demi-sphères, pyramides, demi-cylindres parallèles entre eux, prismes triangulaires parallèles entre eux) en créant un moule en PDMS sur lequel sont déposées des membranes en PCL pour obtenir des films microstructurés (Figure 12). Les myoblastes ont tendance à mieux se développer sur des microstructures avec des angles droits plutôt qu'arrondis. Cela s'explique par une plus grande surface d'adhésion pour les cellules progénitrices, paramètre primordial pour leur bon développement. C'est pourquoi, lorsque les myoblastes peuvent s'attacher à deux microstructures assez proches l'une de l'autre, ils ont tendance à mieux adhérer et prolifèrent mieux.

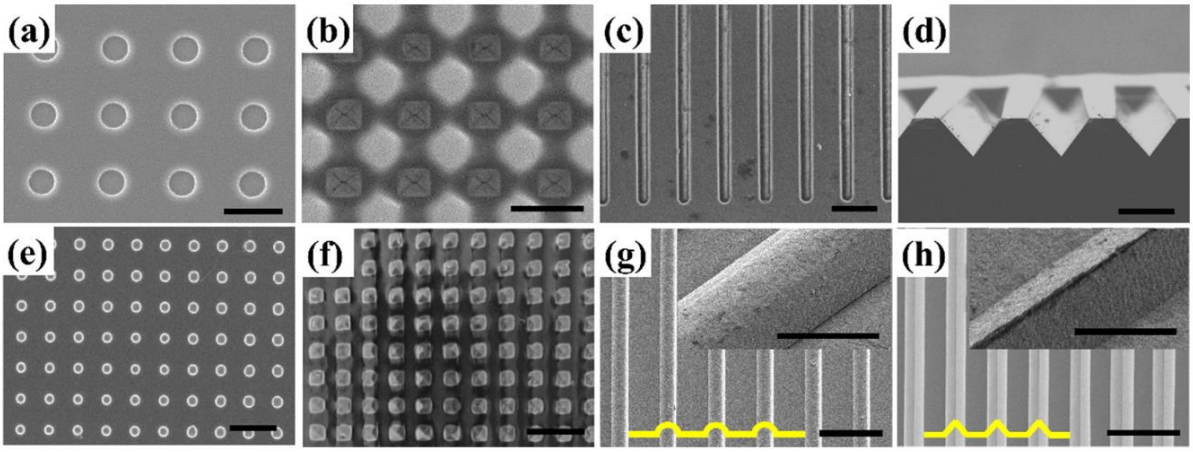

Figure 12 : Images SEM des moules en PDMS (a-d) et des films de PCL correspondants (e-h). Issu de (98)

IMPACT DE LA RIGIDITE DU SUPPORT

La rigidité du support joue aussi un rôle très important sur la prolifération et la différenciation des myoblastes. Dans leur environnement naturel, les myoblastes prolifèrent dans un milieu dont la rigidité est de l'ordre de la dizaine de kPa. Le module élastique d'une lame de verre ou une boite de Petri compris entre 5 et 70 GPa peut donc en partie expliquer les différences de maturation des myotubes observées entre les études *in vivo* et les premières *in vitro*. Ainsi, la méthode la plus rapide et la plus simple pour obtenir une rigidité plus favorable pour les myoblastes est de recouvrir les supports solides avec une matrice, la plupart du temps à base d'hydrogel, ce qui crée un environnement plus souple pour les cellules. Boonen et al. (102) ont mis en place un set d'expérience

Tableau 2: Comportement des myoblastes sur les supports de différentes élasticités en fonction des coatings. En vert les conditions sont très favorables, en vert pâle les conditions sont favorables mais ne donnent pas les meilleurs résultats, en orange les résultats sont non significatifs et en rouge défavorables. Issu de (99).

Matrice \ Support		Lamelle en verre	Gel à 3kPa	Gel à 21kPa	Gel à 80kPa
Matrigel	Prolifération				
	Différenciation				
	Maturation				
Entactine-Collagène-Laminine	Prolifération				
	Différenciation				
	Maturation				
Collagène	Prolifération				
	Différenciation				
	Maturation				
Poly-D-lysine	Prolifération				
	Différenciation				
	Maturation				
Laminine	Prolifération				
	Différenciation				
	Maturation				

ayant pour but de trouver la meilleure combinaison support / matrice pour la prolifération, la différenciation et la maturation des myoblastes de souris. Leurs résultats sont résumés dans le tableau 2.

Comme on peut le remarquer, des conditions qui favorisent la prolifération (Matrigel sur un gel à 21kPa) peuvent avoir un effet délétère sur la maturation. De même la différenciation des myoblastes est très bonne sur un gel à 3kPa avec un dépôt de poly-D-lysine mais présente un défaut de maturité ensuite. Ainsi, de manière plus générale, les auteurs montrent que les meilleurs résultats cumulés de prolifération, différenciation et maturation sont retrouvés sur des support en verre qui présentent une rigidité bien plus élevée que celle suggérée par Engler et al. (32). Ces résultats mettent en avant la grande variabilité des études sur les modèles *in vitro* musculaire. Dans une autre étude sur la rigidité des supports, Comelles et al. (103) ont utilisé la technique du moulage pour créer des supports en poly (acrylamide) (PA) avec plusieurs rigidités différentes. Le moulage est une technique très commune qui nécessite la préparation d'un master par photolithographie (Figure 13). Un substrat est recouvert d'une résine photosensible (a) qui est polymérisée suite à une insolation UV (b) à travers un masque disposé entre la source de lumière et la résine afin de produire des figures géométriques désirées. La résine non activée est ensuite solubilisée dans un solvant approprié (c). Le master obtenu est alors lavé et une solution de polymère est déposée par-dessus pour prendre la forme du master (d). Le moule en polymère est enfin méticuleusement retiré du master pour obtenir un moule avec la topographie désirée (e).

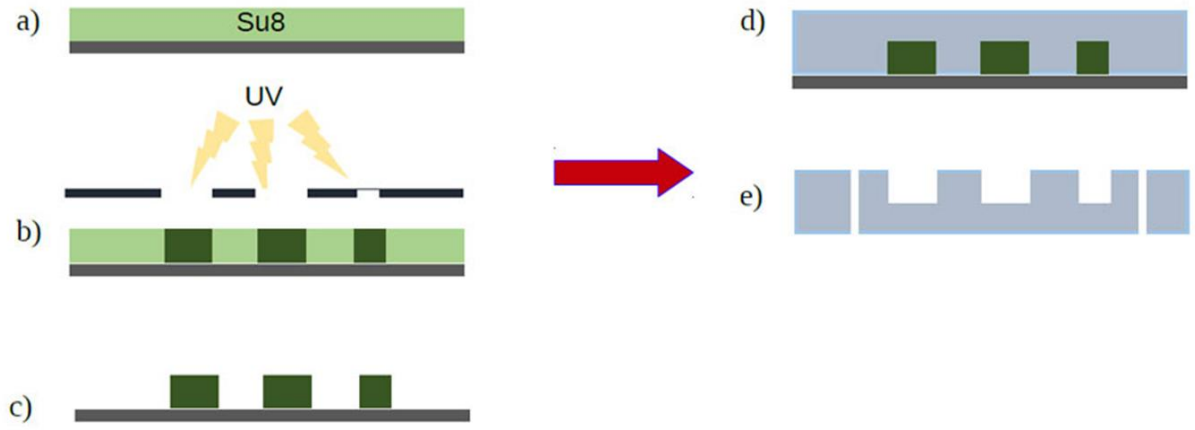

Figure 13 : Moulage d'un support polymère à l'aide d'un master créé par photolithographie

Cette technique leur a permis de créer des supports en PA dont la rigidité peut être contrôlée en modifiant la concentration en polymère. Plus celle-ci est élevée, moins le gel pourra absorber d'eau et donc plus il sera rigide. Les auteurs ont ainsi pu montrer que leur modèle produisait des myotubes dont la différenciation était hautement dépendante de la densité cellulaire ainsi que de la rigidité des supports. Plus la densité est importante, plus les myoblastes sont proches les uns des autres et ont

ensuite tendance à fusionner entre eux. Lorsque le support présente une rigidité proche de celle de la MEC (12kPa), les myoblastes y prolifèrent également plus facilement et produisent un plus grand nombre de myotubes alignés.

INDUIRE L'ALIGNEMENT DES MYOTUBES

L'alignement est le troisième paramètre à prendre en compte pour une modélisation *in vitro* avancée. Lorsque l'on ensemence les myoblastes sur une boite de Petri recouverte avec un hydrogel, les cellules vont se multiplier et fusionner mais de manière totalement anarchique. En l'absence de guide ou de tension passive favorisant leur organisation en fibres alignées, les myotubes occupent tout l'espace et ce dans toutes les directions. Plusieurs modèles se focalisent donc sur la géométrie de leur support pour induire un alignement des myotubes.

Altomare et al. (104) ont moulé un film de copolymère poly-L-lactide/trimethylene carbonate (PLLA-TMC) sur un master en silice microstructuré afin d'obtenir des films de polymère avec différentes largeurs de sillons (de 5 à 100µm) tout en jouant aussi sur la profondeur (de 0,5 à 5µm). Les myoblastes C2C12 ont tendance à s'aligner et à proliférer en plus grand nombre lorsque les sillons sont étroits (5 et 10µm) et profonds (5µm). Mais ensuite, les myotubes se sont différenciés de manière préférentielle sur les supports avec une largeur supérieure à 25µm et des profondeurs plus faibles (0,5 et 1µm). Ils en concluent que la topographie du substrat joue des rôles différents pendant la prolifération et pendant la différenciation. D'autres études ont également montré que la taille des sillons, mais également leur forme (lignes droites ou pointillées), jouent un rôle clef sur le développement des myoblastes (101,104–109).

Smoak et al. (92) ont synthétisé par électrospinning une matrice décellularisée reproduisant une structure musculaire dont l'orientation des fibres est contrôlée par la vitesse de rotation du support (cylindrique dans ce cas). Ils ont montré qu'en augmentant la vitesse de rotation les nanofibres produites avaient tendance à s'aligner (Figure 14). En ensemençant des myoblastes C2C12 sur ce support, ils ont observé un alignement dans le sens de celui des nanofibres. Choi et al. (91) ont montré que l'alignement des nanofibres augmentait la longueur moyenne des myotubes (1 mm sur le support électrospinné aligné contre 0,45 mm sur celui dont l'orientation des fibres est aléatoire) sans pour autant avoir d'effet sur le diamètre moyen (22µm dans les deux cas).

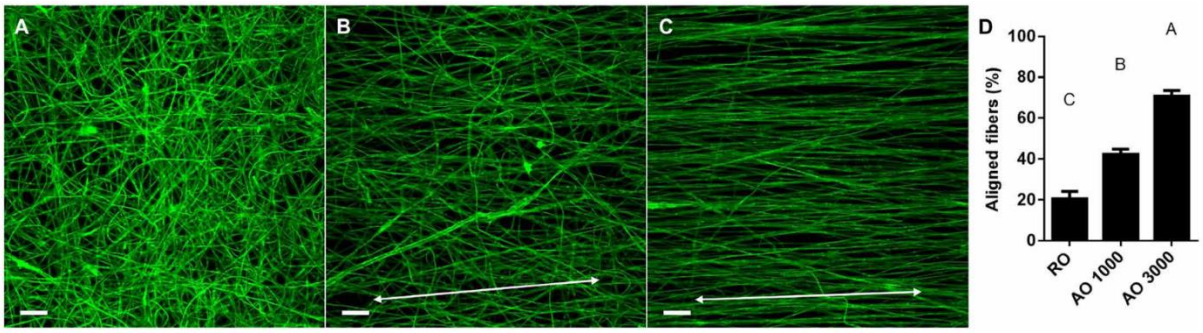

Figure 14 : Effet de la vitesse de rotation du cylindre sur l'alignement des nanofibres. Images au microscope confocal de A) des fibres orientées aléatoirement et de fibres produites sur un cylindre en rotation à B) 1000 rpm et C) 3000 rpm. Issu de (89)

Beldjilali-Labro et al. (96) et Cha et al. (97) ont tenté de combiner la technique d'électrospinning avec un dépôt par-dessus d'un hydrogel à base de PEG pour favoriser l'adhésion et le guidage avec une rigidité idéale pour le développement des cellules progénitrices. Le support, composé de nanofibres de PCL alignées d'environ 600 nm de diamètre, est recouvert d'une fine couche d'or pour réduire l'hydrophobicité puis d'un hydrogel de PEG dont des lignes ont été dessinées par polymérisation UV. L'épaisseur des lignes était fixée à 40µm et la largeur était variable entre 50 et 100µm. Les auteurs ont montré qu'en couplant des guides à la fois au niveau nanométrique et micrométrique, les myoblastes C2C12 s'alignaient de manière plus efficace pour se différencier en myotubes. Pour connaitre plus précisément l'importance relative de ces deux paramètres nano vs micro, des lignes d'hydrogel ont été créées perpendiculairement aux nanofibres. Les mêmes auteurs ont observé un alignement dans le sens des nanofibres et donc dans le sens perpendiculaire des lignes d'hydrogel. Ils ont ainsi mis en avant une prédominance de l'effet nanométrique sur celui micrométrique. Cette hypothèse est confirmée par plusieurs autres études (71,110,111). Cela met clairement en évidence l'importante de l'effet de guidage qui ne sert pas à forcer les myotubes à s'aligner en les restreignant mais plutôt à les inciter à s'aligner en les guidant.

L'impression 3D par fabrication additive peut aussi être utilisée pour modéliser et créer des supports présentant une topographie qui favorise l'alignement des myotubes. Abdalkader et al. (112) ont utilisé le polyéthylène téréphtalate glycol (PETG) pour fabriquer des sillons parallèles avec une largeur et une hauteur contrôlées et ont notamment montré qu'une largeur supérieure à 200µm était nécessaire pour induire l'alignement des myoblastes C2C12 (Figure 15a). Rimington et al. (113) ont imprimé des lignes parallèles pour 4 polymères différents (polylactic acid (PLA), acrylonitrile butadiene styrene (ABS), polyethylene terephthalate (PET) and polycarbonate (PC)) et ont ainsi pu induire une prolifération et une différenciation des myoblastes C2C12 selon un axe longitudinal (Figure 15b). Ils ont également montré qu'en réduisant l'espace entre les lignes, le diamètre des myotubes était réduit en conséquence. Lorsque les sillons sont plus étroits, le nombre de myoblastes entre les lignes est

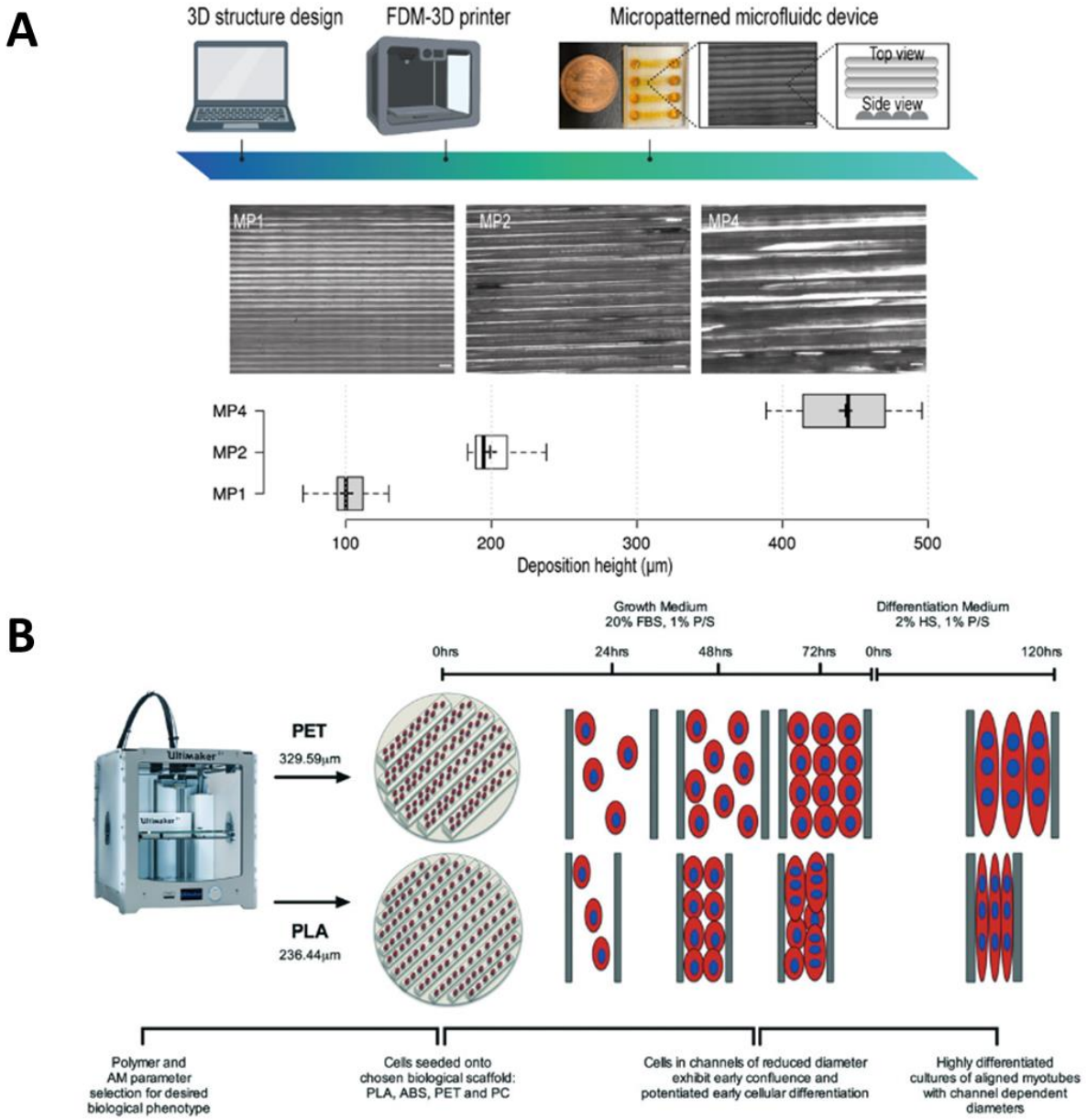

Figure 15 : Impression 3D de construits qui induisent l'alignement des myotubes. A) Design, fabrication et caractérisation des construits en PETG. B) Fabrication et schéma de la culture de myoblastes dans des construits en PET et PLA.

réduit et donc le taux de fusion diminue. Le taux de fusion est le rapport entre les noyaux présents dans les myotubes et le nombre total de noyaux dans la matrice.

Enfin, une technique émerge depuis quelques années pour regrouper à la fois le guidage topographique et la faible rigidité : le « microcontact printing » (µCP). Cette méthode utilise un moule en PDMS sur lequel une matrice est déposée de telle sorte à prendre la forme du moule. Celle-ci est alors redéposée sur un support solide tel qu'une boite de Pétri pour former des lignes parallèles d'hydrogel (56,114) (Figure 16). Bajaj et al. (34) ont par exemple utilisé le µCP pour microstructurer des boites de Petri avec une solution de fibronectine. Les auteurs ont préparé des lignes de fibronectine par µCP puis ont utilisé le Pluronic F-127, un tensio-actif connu pour ses propriétés très

hydrophobes et qui est sélectif au substrat par rapport à la fibronectine, pour s'assurer que les cellules restent sur les lignes de fibronectine plutôt que de se développer sur la boite de Pétri en dessous. Ils ont pu produire des échantillons de différentes formes (lignes droites, disques) avec des tailles plus ou moins larges. Cette expérience leur a permis de montrer que la géométrie idéale est la ligne avec une largeur assez importante (100µm) pour permettre la prolifération des myoblastes en nombre tout en favorisant leur fusion en myotubes alignés.

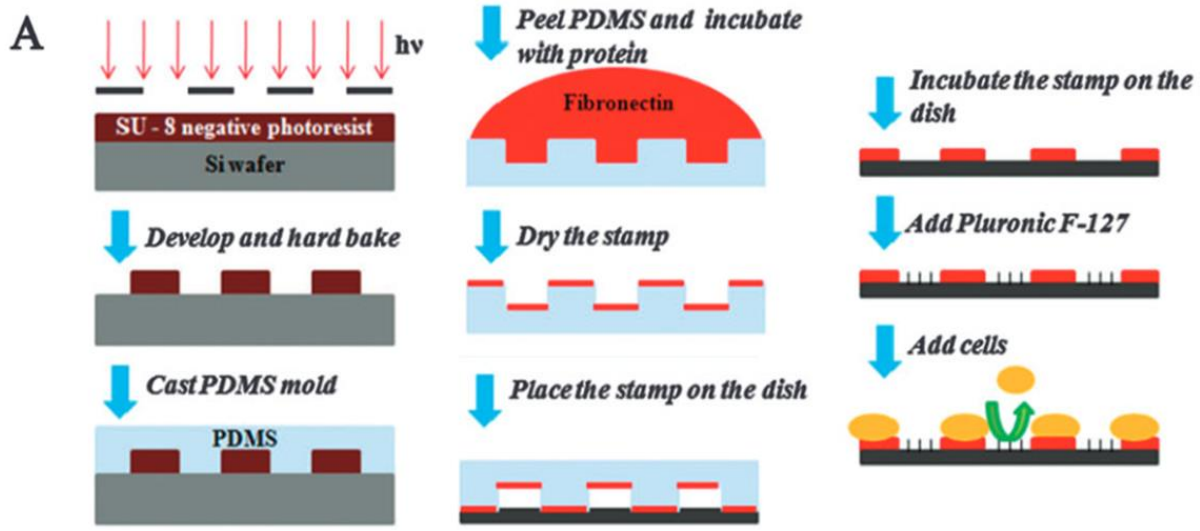

Figure 16 : Schéma de préparation des supports microstructurés par µCP.

Khadpekar et al. (115) ont aussi utilisé la µCP pour produire des lignes de collagène fonctionnalisé avec de la FITC (isothiocyanate de fluorescéine) et ont montré qu'en passant du cercle à la ligne, ils ont induit l'alignement des myotubes C2C12.

Toutes ces études montrent que la topographie du support joue un rôle important dans l'alignement des myotubes. Pour autant, il n'existe actuellement pas de dimensions parfaites. Certains ont montré qu'une épaisseur de quelques nanomètres était suffisante (71,111) tandis que d'autres ont obtenu des myotubes alignés avec des sillons dont la hauteur dépasse 30µm (116). L'espacement entre les sillons joue également un rôle important même si un alignement a été observé à la fois pour des petits espacements (<25µm) (104,116) et des espacements plus larges (>100µm) (105,117).

Afin d'évaluer l'impact de l'organisation du réseau cellulaire sur la croissance des progéniteurs myogéniques, Smith et al. (58) ont comparé la culture de myoblastes en 2D versus 3D. Les principaux résultats mettent en avant que le niveau de différenciation des myotubes est équivalent dans les deux systèmes mais avec un retard dans le cas de la 3D. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les cellules se déplacent selon 3 axes et ainsi nécessitent plus de temps pour fusionner. Cependant, la densité des myotubes est souvent plus importante en 3D, ce qui rend les modèles plus proches de la physiologie humaine. Le plus gros inconvénient de la culture 2D est la tendance des myotubes à se décoller

lorsqu'ils sont en fin de développement rendant la période de maturation très courte. Même si une partie de ce problème est surmonté en 3D (63,118), on retrouve là aussi des amas de cellules qui se détachent de la matrice et qui provoquent par réaction en chaine la réduction en taille du construit. En 3D, la visualisation des construits est bien plus délicate puisqu'elle nécessite des appareils de microscopie plus onéreux avec des durées d'analyse beaucoup plus longues. Cependant, de plus en plus d'études se focalisent sur la modélisation *in vitro* 3D qui se veut plus représentative des conditions retrouvées *in vivo*.

C) La modélisation 3D du muscle

En modélisation 3D, les hydrogels ont une place préférentielle pour créer des matrices et des construits qui permettront le développement des cellules progénitrices musculaires. On définit construit comme le support produit par bioimpression 3D qui contient à la fois une matrice et les cellules dans le même ensemble. La plupart des hydrogels utilisés dans la culture cellulaire musculaire ont des propriétés qui sont dépendantes de la température. A basse température (<10°C) ils sont suffisamment liquides pour être manipulés avec des pipettes et versés dans des boites de Petri ou sur des moules servant de support. Lorsqu'ils sont disposés dans les incubateurs à 37°C, ils ont tendance à se solidifier et prendre la forme d'un gel. Or, déposer une couche d'hydrogel sur une boite de Pétri ne vas pas favoriser l'arrangement anisotropique des myoblastes comme on le retrouve dans la MEC du muscle puisque le gel prendra uniquement la forme de la boite et les cellules s'y disperseront de manière aléatoire. C'est pourquoi lorsque les cellules se développent naturellement dans des hydrogels, elles le font de manière anarchique puisqu'il n'y a aucun élément structurel pour les guider. Pour parer à ce défaut plusieurs techniques existent :

L'ANCRAGE D'HYDROGELS

Cette technique est très utilisée pour induire l'alignement des fibres. Elle consiste à fixer l'hydrogel entre deux points fixes de telle sorte à créer une contrainte de tension lorsqu'il se solidifie. Au départ, le gel formé ne subit pas de tension particulière mais au fil de la culture, les myotubes vont se créer et produire leur propre matrice extracellulaire. Le gel initialement constitué de myoblastes va se contracter au même rythme que les myotubes fusionnent, ce qui crée une tension passive dans le système, similaire à celle observé in vivo avec le tendon et l'os. Par conséquent, une fois que la tension est apparue, les autres myotubes fusionnent alignés les uns aux autres par un effet de guidage naturel (57,58,60,64–67,69). Smith et al. (58) ont déposé un hydrogel de collagène contenant des cellules primaires de rats et fixé entre deux pinces en polyéthylène sur chaque extrémité (Figure 17.1). Ils ont observé qu'au fur et à mesure des jours de culture, l'hydrogel se cintrait en devenant plus fin au centre

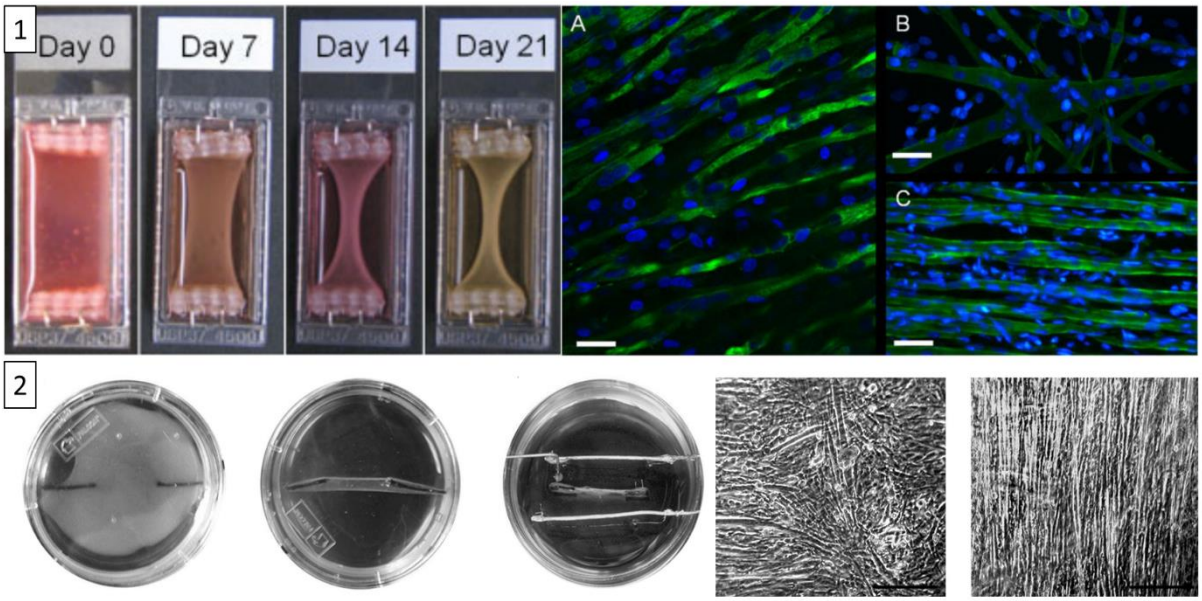

Figure 17 : Production de fibres alignées par contrainte de tension sur l'hydrogel 1) L'hydrogel de collagène est fixé entre deux pinces et les fibres produites sont alignées (A), contrairement à la culture sur boite (B), un alignement que l'on retrouve in vivo (C) Les flèches représentent la direction des myotubes. 2) L'hydrogel de fibrine est fixé entre deux fils de sutures pour induire l'alignement.
1) issu de (55) et 2) issu de (64)

par rapport aux extrémités créant ainsi une tension passive. Les auteurs expliquent cela par un remodelage de la matrice extracellulaire sous l'effet de la tension passive et des contractions spontanées des fibres musculaires. Concernant l'alignement, les auteurs ont observé une différence significative entre la culture dans le collagène sous tension (Figure 17.1A) et la culture en boite de Petri (Figure 17.1B) retrouvant presque l'alignement naturel des fibres dans le tissu natif (Figure 17.1C). Huang et al. (67) ont fixé un hydrogel de fibrine entre deux sutures. L'hydrogel s'est là aussi réduit en surface pour former un ballot avec ses fibres à l'intérieurs qui se sont alignées naturellement (Figure 17.2). D'autres techniques inspirées de l'ancrage se sont développées, permettant en particulier une mesure de la force contractile après stimulation.

Vandenburgh et al. (74) ont mis au point une méthode pour produire des micro-puits contenant deux piliers espacés de quelques millimètres. Une solution hydrophobe est versée dans les puits pour s'assurer que les cellules ne s'accrochent pas au fond puis un gel de fibrinogène/thrombine contenant les myoblastes est déposé de telle sorte qu'il se polymérise et s'accroche sur la partie supérieure des piliers. Là aussi, lorsque le mélange d'hydrogel se gélifie, il se contracte ce qui induit une tension entre les deux piliers formant un véritable "pont suspendu" (119–124) (Figure 18). La tension passive implique alors une réorganisation des protéines de fibrines qui s'alignent dans le gel. C'est cet alignement de fibrine qui sert ensuite de guidage pour les myoblastes qui fusionnent en myotubes alignés.

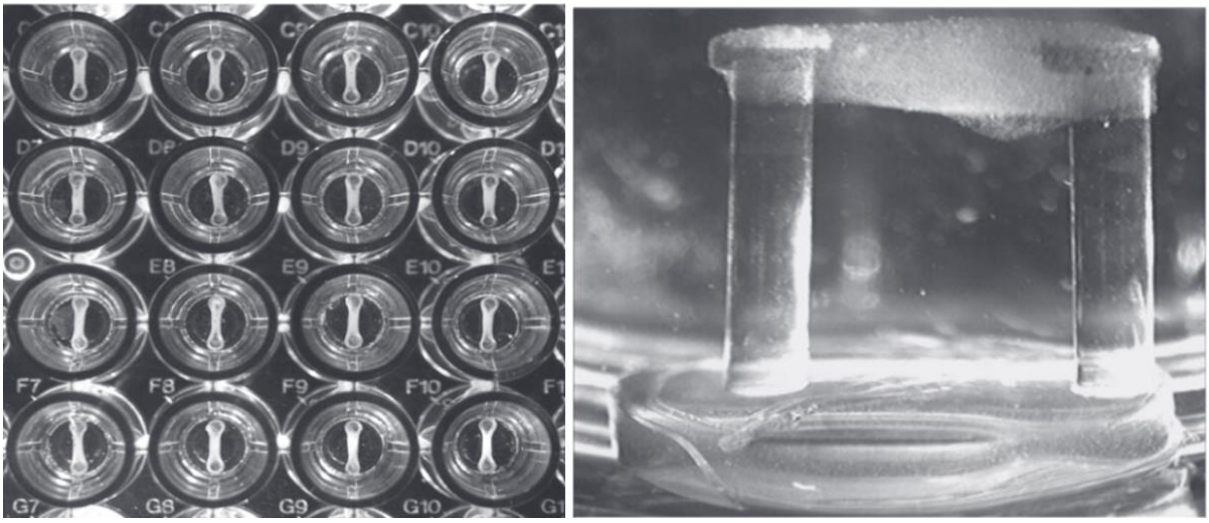

Figure 18 : Organoïde bioartificiel de muscle dans plaque 96-micropuits. A gauche, la vue du dessus des micropuits contenant les piliers, à droite, l'organoïde musculaire dans un hydrogel de fibrine vue de côté (distance entre les piliers 2,5 mm et hauteur des piliers 4mm).
Issu de (74)

Les exemples précédents mettent en avant l'auto-organisation des myoblastes pour fusionner en myotubes alignés. Cependant, comme dans la modélisation in vitro en 2D, il est possible d'induire cet alignement en guidant les cellules et notamment en construisant des modèles par impression 3D.

LES MODELES CONSTRUITS PAR IMPRESSION 3D

a) LA FABRICATION ADDITIVE

L'impression 3D, également connue sous le nom de fabrication additive, est une technique de production qui permet de créer des objets en trois dimensions à partir d'un modèle numérique en superposant des niveaux successifs de matériaux. Cette technique a révolutionné la manière dont de nombreux produits sont conçus et fabriqués, et est de plus en plus utilisée dans le domaine biomédical (125). L'impression 3D permet de produire des modèles anatomiques, des implants sur mesure, des prothèses, des tissus et même des organes artificiels (126). L'impression 3D permet également de réduire les coûts de fabrication, d'accélérer le développement de nouveaux produits, et d'offrir une alternative personnalisée à la fabrication de masse. Dans le domaine de la modélisation musculaire, l'impression 3D peut être utilisée pour créer des construits en 3D avec des géométries contrôlées. Ils sont ensuite déposés dans des boites de Petri sur lesquelles sont déposées les cellules mélangées dans le milieu de culture. Dans ce cas-là, les cellules ont tendance à rester en surface plutôt que de

s'introduire dans le construit (56) sauf si l'on introduit une porosité dans les construits (127) qui permet de laisser pénétrer le milieu de culture et ainsi d'augmenter la surface de contact possible entre le construit et les cellules. Camman et al. (30) ont par exemple déposé des cylindres de collagène dense de telle sorte à former un construit en 3D à l'intérieur duquel les myoblastes C2C12 ont été

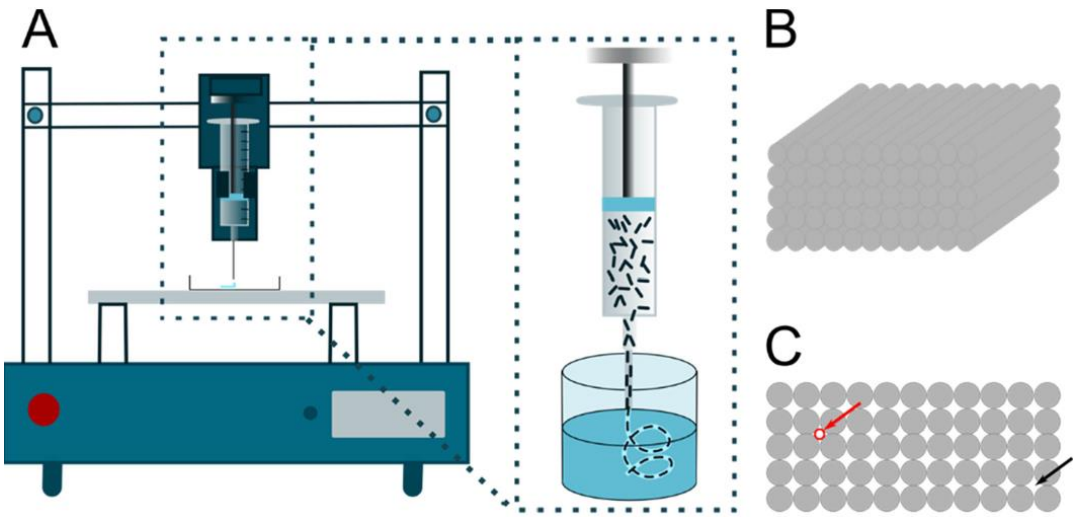

Figure 19 : Fabrication des cylindres de collagène empilés les uns sur les autres. A) Principe du système d'impression 3D B) Vue 3D des construits, C) vue latérale des construits 3D avec les flèches qui indiquent les interstices dans lequel passe la solution de Matrigel® contenant les myoblastes C2C12.
Issu de (27)

ensemencés à l'aide d'une solution de Matrigel® (Figure 19). Cela a permis d'obtenir des myotubes parallèles les uns aux autres, qui se sont différentiés le long de l'axe des interstices entre les cylindres de collagène (Figure 19c).

b) LA BIO-IMPRESSION 3D

La bio-impression 3D est un cas particulier de l'impression 3D où les cellules sont introduites dans un hydrogel, dont l'ensemble cellule-hydrogel est appellé bio-encre, puis directement sont imprimées en tant que construit. Les cellules sont directement déposées par couches et cela permet de maitriser encore plus précisément leur localisation. De plus en plus de matériaux biocompatibles sont développés pour être utilisés en bio-impression 3D que ce soit des polymères synthétique (112,113,118,128) ou issus du vivant (30,55,87,129). Le choix de l'hydrogel et son impact sur la viscosité de la bio-encre sont primordiaux car celle-ci doit être suffisamment liquide pour être imprimée mais suffisamment résistante pour protéger les cellules du cisaillement induit par le procédé d'une pression qui peut leur être fatal si les forces appliquées sont trop importantes. Les paramètres d'impression (température, vitesse de dépôt) sont aussi à maitriser pour s'assurer de la viabilité des cellules dans l'hydrogel (130). Dans les cultures 3D avec un seul type d'hydrogel, les cellules ont tendance à se déplacer laissant des zones vacantes autour, ce qui altère dans le temps la structure (131). C'est pourquoi la rigidité de l'hydrogel doit être suffisamment faible pour permettre aux

myoblastes de bouger et se rapprocher les uns des autres pour fusionner (132). La structure du gel peut être préservée dans le temps en ajoutant un matériel “sacrificiel” ou résorbable (133). Kim et al. (134) ont bio-imprimé des cylindres de gélatine et de fibrine contenant les cellules humaines primaires (Figure 20). En alternant la gélatine et la fibrine cellularisée grâce à une seringue à 3 axes, les auteurs ont pu produire un construit suffisant solide pour supporter la culture pendant 8 semaines. La disposition 3D des cylindres en quinconce permet là aussi d’assurer le renouvellement du milieu de culture entre les interstices et donc l’apport constant en nutriments pour les myoblastes. De manière encore plus originale, Kim et al. (55) ont bio-imprimé une solution de collagène cellularisée contenant

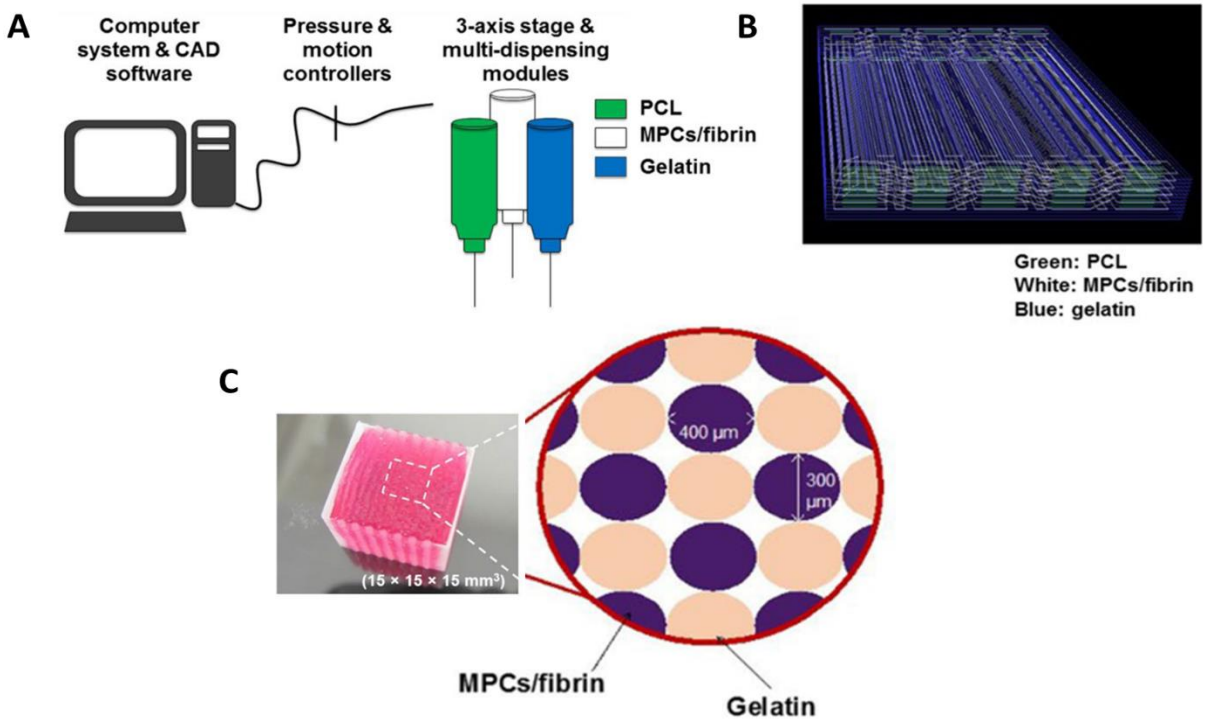

Figure 20 : Procédé de fabrication des construits 3D. A) Set up du système d’impression avec les 3 seringues, la première contenant le PCL qui assure la structure du construit, celle contenant la bio-encre et celle contenant la gélatine sacrificielle. B) Modélisation 3D du construit. C) Photographie et composition du construit 3D.
Issu de (131)

des nano-fils d’or. Une fois la bio-impression terminée, un champ électrique a été appliqué autour du construit afin de les orienter sur un seul axe forçant ainsi les myoblastes à s’aligner.

Enfin Kim et al. (129) ont développé une nouvelle technique permettant de mieux maitriser les dimensions de la microstructuration pour induire l’alignement des myoblastes (Figure 21). Ils ont pour cela, bio-imprimé un hydrogel à base de matrice extracellulaire décellularisée et fonctionnalisé par des groupements méthacrylate en bout de chaines (dECM-MA). Ces groupements sont polymérisables sous irradiations UV. Du poly (vinyl alcohol) (PVA) est aussi ajouté dans la solution en tant que polymère résorbable. Le PVA ayant une température de transition vitreuse égale à 85°C, à 20°C, les chaines de PVA s’alignent avec l’effet de cisaillement de la buse puis les UV sont appliqués pour solidifier le gel de dECM-MA. En versant de l’eau sur le construit, le PVA se dissout et crée des

interstices sous forme de cavités alignées à l'intérieur du gel de dECM-MA. Ces cavités permettent de produire des myotubes parallèles entre eux.

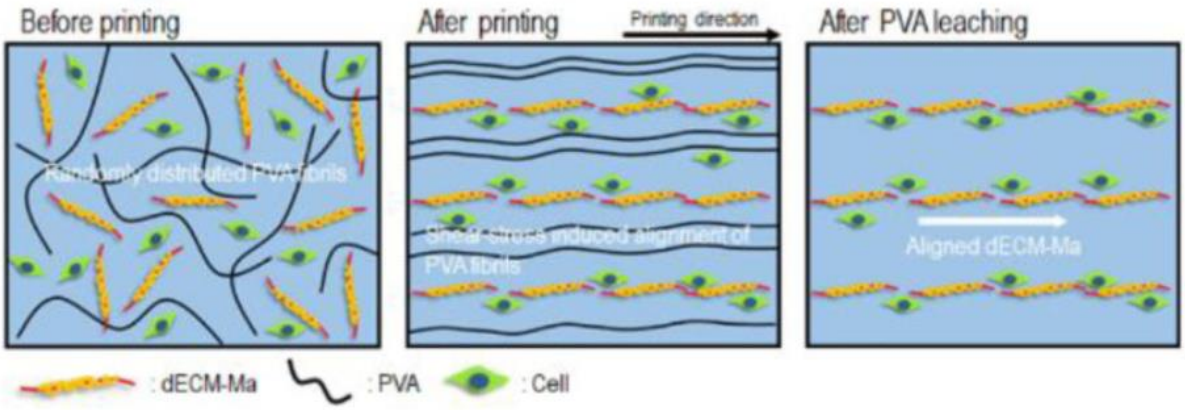

Figure 21 : Schéma du principe de construction du construit d'ECM-Ma aligné.
Issu de (126)

La bio-impression 3D ouvre donc les portes vers de nombreuses possibilités pour produire des construits cellularisée. Certains modèles sont mêmes assez développés pour pouvoir mélanger plusieurs types cellulaires dans un même construit afin de simuler la vascularisation (135) et l'innervation (136). Ce sont les premiers pas vers les organes sur puce et vers le greffage de tissus musculaires issus directement de cellules d'un patient.

Il existe donc plusieurs techniques in vitro pour produire des myotubes différenciés et alignés. Que ce soit en 2D ou en 3D, les nombreux modèles proposés ont permis de mieux appréhender les déterminants de la myogenèse liés au microenvironnement. Une liste non-exhaustive de ces travaux est résumée dans le Tableau 3. Cependant, tous ces modèles permettent d'obtenir des myotubes avec un faible niveau de différenciation. Leur optimisation nécessite d'aborder les différentes stimulations que les fibres musculaires subissent au cours de leur développement, et qui devront être modélisées également en culture pour améliorer le niveau de maturation des myotubes obtenus.

Tableau 3: Tableau récapitulatif des modèles 2D et 3D induisant l'alignement des myotubes.

Fabrication du modèle		Composition du support	Composition de la matrice	Cellules utilisées	Observations	Ref
Dimensions	**Méthode**					
3D	Ancrage hydrogel	/	Collagène	Primaires murines	Remodelage de la matrice extracellulaire induite par la tension passive appliquée à l'hydrogel par l'ancrage	(58)
	Moulage hydrogel	/	PEG	C2C12	Alignement favorisé pour les sillons les plus étroits (40µm). Les sillons plus larges permettent la culture en multicouches	(117)
	Impression 3D additive	PETG	Collagène	C2C12	Alignement observé pour les sillons les plus larges (>200µm)	(112)
		PLA / ABS / PET / PC	/	C2C12	Réduction du diamètre lorsque les sillons sont trop étroits (<250 µm). Pas d'effet de la nature du polymère sur la différenciation	(113)
	Bio-impression 3D	/	Collagène et nanofils d'or	C2C12	Alignement induit par l'organisation parallèle des nanofils d'or	(55)
			dECM-MA et PVA	C2C12	Le polymère sacrificiel (PVA) permet de créer des interstices dans la matrice qui améliore l'approvisionnement en nutriments pour les cellules	(129)
2D	µCP	Boite de Petri	Fibronectine	C2C12	Meilleure différenciation sur les lignes le plus larges (100µm)	(34)
		Lamelle en verre	Collagène	C2C12	Alignement induit par la forme de la matrice (ligne contre cercle)	(115)
	Electrospinning	PCL et collagène	/	Primaires humaines	L'alignement des fibres du support augmentent la longueur moyenne des myotubes	(91)
		PCL	PEG	C2C12	Effet nanométrique prédominant sur le micrométrique pour induire l'alignement	(96)
	Moulage polymère	PCL	Fibronectine	C2C12	Les formes à angles droits (rectangle, triangle) favorisent l'adhésion cellulaire par rapport au formes arrondies.	(101)
		PLLA-TMC	/	C2C12	Meilleure adhésion sur des sillons étroits (5µm) et meilleure différenciation sur des sillons plus larges (>25µm)	(104)

Chapitre 3 : Les différents types de stimulation modélisables *in vitro*

Que ce soit en 2D ou en 3D, les fibres musculaires obtenues après culture de myoblastes restent éloignées de ce que l'on retrouve *in vivo* chez l'Homme. En effet, quand bien même les fibres créées sont alignées entre elles, sur un support biofonctionnalisé favorisant l'adhésion et avec une rigidité idéale pour le développement des myoblastes, leur différenciation et maturation n'atteint pas l'état final observé dans les biopsies (63,102). De fait, dans son état naturel, la fibre musculaire est soumise à de nombreux stimuli de manière harmonieuse entre des stimulations chimiques, électriques et mécaniques. Ces stimuli jouent un rôle crucial à chaque étape du développement musculaire, de l'activation des cellules satellites à la maturation finale des myofibres. Il est ainsi primordial de connaitre l'importance de ces différents stimuli et notamment leur influence sur chaque étape du développement musculaire pour tendre vers un modèle le plus représentatif du vivant.

A) Stimulation chimique

Lorsque l'on parle de stimulation chimique, il faut différencier plusieurs catégories de molécules qui se distinguent par leur intérêt pour les myoblastes et myotubes. On retrouve dans un premier temps tout un ensemble de facteurs de croissances comme l'IGF-1 (Insuline-like Growth Factor 1) (137), le FGF (Fibroblast Growth Factor) (138) bien connus pour stimuler la prolifération des myoblastes ou le TGF-β (Transforming Growth Factor β) (139) qui régule la différenciation. On retrouve par ailleurs, un mélange de ces facteurs de croissance dans la plupart des milieux de culture cellulaire musculaire. Mais d'autres stimulations chimiques sont possibles pour induire une réponse des myoblastes mais aussi des myotubes plus tard dans la myogenèse. L'hypoxie est un exemple simple de stress chimique impliquant une réponse adaptative de la fibre musculaire qui dépend de la concentration en oxygène (140,141). Dans le cas de normoxie (3-6% d'O_2) qui est un niveau intracellulaire normalement rencontré au cours d'un exercice, les myoblastes prolifèrent et les auteurs ont observé une hypertrophie des myotubes, participant ainsi à l'effet global de l'exercice sur la masse musculaire. Mais lorsque l'hypoxie est sévère (< 1% d'O_2), une dysfonction mitochondriale est observée à la base d'un stress oxydant, liée à une baisse du niveau d'expression de la plupart des facteurs de transcription myogénique (Myf5, MyoD, Myogenin), impliquant une réduction de la prolifération et de la différenciation (142). Dans le même ordre d'idée, un stress oxydant peut être appliqué aux cellules en ajoutant des molécules comme H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène) dans le milieu et en observant la réponse cellulaire à ce stress. Pan et al. (143) ont montré l'efficacité anti-oxydante de la Baicaline, un composé actif naturel que l'on retrouve dans certaines plantes chinoises, en induisant un stress aux cellules C2C12 avec du H_2O_2. Des études similaires ont été mises en place pour évaluer les effets anti-oxydant du Maca (144), une plante péruvienne, du Jakyakgamcho-Tang (145), une herbe médicinale japonaise

et du Phloroglucinol (146), un composé synthétique prescrit pour atténuer les spasmes musculaires à l'origine de troubles digestifs. Le glucose peut également inhiber ou activer la prolifération et la différenciation, en fonction de sa concentration dans le milieu (147,148). D'autres molécules naturelles extraites de plantes (Matrine, Carnosol, Triptolide) peuvent également être utilisées pour inhiber certaines voies de signalisation et ainsi induire l'atrophie ou l'hypertrophie (Figure 22) (41,149,150). L'acétylcholine est un neurotransmetteur naturellement présent chez l'Homme qui a un effet excitateur au niveau de la jonction neuromusculaire. La stimulation à l'acétylcholine est souvent utilisée pour déterminer le niveau de maturation des fibres musculaires avec notamment la formation et l'organisation des récepteurs à acétylcholine (70,116,151,152). La caféine est aussi un stimulateur chimique reconnu pour ses effets d'aide ergogénique c'est-à-dire susceptible d'améliorer le travail musculaire (153). Si la caféine est couramment utilisée dans des études *in vivo* (153,154), elle l'est aussi *in vitro*, notamment en combinaison avec l'électrostimulation. Alave Reyes-Furrer et al. (69) ont bio-imprimé un construit 3D contenant des cellules primaires humaines et ont stimulé électriquement les myotubes formés en présence ou non de caféine dans le milieu. Ils ont ainsi montré une augmentation de la force (+ 43%) et de la durée (+ 413%) de la contraction en présence de caféine. Néanmoins, la caféine peut aussi avoir un effet délétère (155,156), notamment en trop grande concentration (157). Il existe donc une multitude de molécules chimiques pouvant être utilisées pour générer un stress et améliorer le développement des myoblastes. Leur combinaison avec d'autres stimulations, notamment électriques, présente un intérêt vers la possibilité de mise au point d'un modèle de cuture musculaire le plus proche possible de l'*in vivo*.

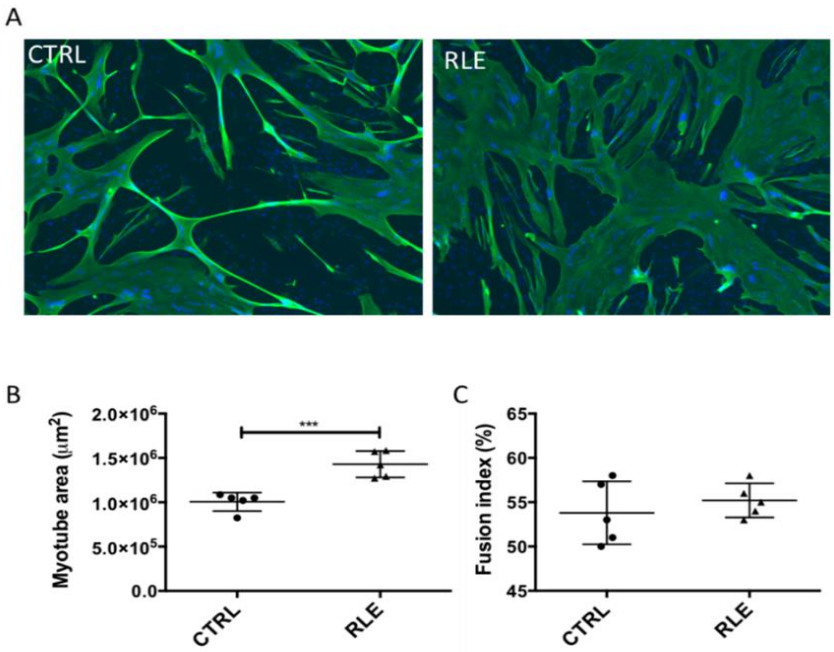

Figure 22 : Effet du carnosol sur le développement in vitro des fibres musculaires humaines. Issu de (38)

B) Stimulation électrique

La stimulation électrique fait référence à l'application contrôlée de courants électriques pour induire des contractions musculaires. Elle vise à reproduire le courant électrique transmis à la cellule musculaire par un motoneurone, l'intermédiaire de la jonction neuro-musculaire (158). Il y a déjà plus de 25 ans, il a été observé chez des patients paraplégiques une récupération de leur masse musculaire avec augmentation de le taille des myofibres suite à 2 séances de stimulations musculaire de 20 mn/j pendant 8 mois (159). La stimulation électrique est donc logiquement considérée comme une des possibilités pour améliorer le développement et la maturation des fibres musculaires *in vitro* simulant les effets de l'innervation retrouvée *in vivo* (69,160). Les montages d'électrostimulation varient en fonction de chaque laboratoire mais le principe reste le même : les cellules sont cultivées dans des boites de Petri en 2D ou en 3D et des électrodes en carbone ou en platine sont insérées de telle sorte à créer des impulsions électriques de faible intensité. Les protocoles sont généralement divisés en deux catégories : ceux qui cherchent à simuler un exercice court et intense et ceux qui cherchent à simuler un exercice plus régulier sur le long terme. En pratique, les impulsions sont produites avec une intensité contrôlée de telle sorte à activer la contraction appelée secousse musculaire selon le principe de la loi du « tout ou rien ». En effet, une fois que l'intensité seuil est atteinte, une contraction est induite mais en augmentant cette intensité, on n'augmente pas la force de la contraction. Il est au contraire fréquent d'observer une diminution de la force produite due à l'induction de microlésions sur les fibres créées par la chaleur locale produite par le courant (161). Les fréquences de stimulation peuvent aller de 1 Hz à 100 Hz pendant quelques minutes à plusieurs jours. Si l'ampérage possède une cohérence physiologique puisqu'on mesure *in vivo* un intensité de contraction (20 à 70 mA), il est difficile de mesurer la valeur exacte de la résistance des tissus musculaires, ce qui ne permet pas de convertir en tension. Néanmoins, la plupart des appareils d'électrostimulation se règle en tension et il est nécessaire de connaître la résistance pour trouver l'équivalent en intensité. C'est pourquoi on retrouve souvent des modèles d'électrostimulation qui évoquent une pulsation en tension sans préciser l'équivalent en intensité ce qui rend la reproduction des expériences souvent impossible. Nikolic et al. (162) ont par exemple modélisé les deux types d'exercices en stimulant des myotubes issus de myoblastes primaires d'un côté à basse fréquence (30V, 1Hz pendant 2j) et de l'autre à haute fréquence (30V, 100Hz pendant 1h). Le premier exercice induit des changements fonctionnels avec une amélioration des indicateurs du métabolisme aérobie comme le ferait un exercice d'endurance *in vivo*. Dans le second, on retrouve *in vitro*, à l'instar de ce que l'on observe *in vivo* lors d'un exercice plus explosif, une augmentation de la glycolyse anaérobie avec l'apparition d'acide lactique. Donnelly et al. (161) ont développé un bioréacteur en mettant en place différentes électrodes de telle sorte à pouvoir électrostimuler à la fois des cultures en 2D dans des boites de Petri mais aussi des organoïdes

3D. Les auteurs ont tout d'abord observé une différence entre la stimulation de culture 2D et 3D puisqu'en 2D, notamment en utilisant la lignée C2C12, les cellules étaient peu réactives à basse fréquence et ont commencé à présenter des contractions et une synthèse protéique accrue pour une fréquence de 100Hz. Khodabukus et al. (163) ont aussi montré un effet de la fréquence puisqu'ils ont observé une hypertrophie ainsi qu'une sarcomérisation accéléré des myotubes stimulés à 10Hz pendant 1h (Figure 23).

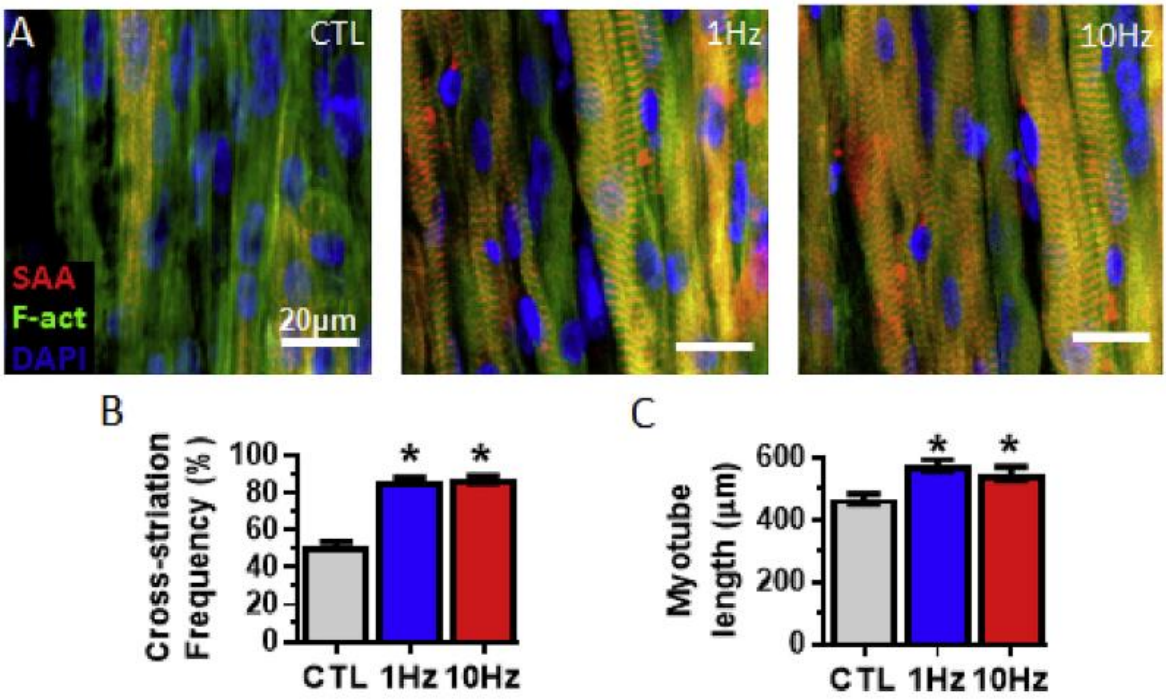

Figure 23 : Effet de l'électrostimulation sur la différenciation des myotubes C2C12. Issu de (160)

Ces résultats sont moins significatifs lorsqu'ils sont stimulés à 1Hz montrant alors un effet direct de la fréquence des pulsations sur la maturation des myotubes. Fujita et al. (164) ont montré qu'après 8 jours de différenciation, une stimulation à 1Hz pendant 2h à 40V suffisait pour que les myotubes issus de cellules C2C12 présentent une activité contractile avec une augmentation significative de la striation marquée à l'α-actinine et à la titine. Mais les auteurs ont cependant eu du mal à garder cette activité contractile dans le temps puisqu'elle a commencé à se réduire dès 4h. Ils ont également montré l'importance de la biofonctionnalisation du support, avec notamment les des peptides issus de la matrice extracellulaire, ce qui suggère l'importance de l'environnement des myotubes et plus précisément leur ancrage à la matrice extracellulaire permettant une transmission mécanique du raccourcissement de leur longueur, induite par la contraction. Cependant, l'électrostimulation ne donne pas les mêmes résultats en fonction du type cellulaire. Langelaan et al. (76) ont observé une maturation supérieure pour les cellules primaires comparées à la lignée animale C2C12. Cette hétérogénéité des réponses à la stimulation électrique se retrouve aussi parfois dans le même type cellulaire puisque Scheler et al. (165) ont développé un protocole simulant *in vitro* un entrainement en

endurance sur des fibres musculaires isolés de sujets sains afin d'évaluer la réponse des cellules musculaires ainsi que leur sécrétion de cytokines inflammatoires. Ils ont observé que la réponse cellulaire au stress électrique en termes de sécrétion de cytokines, la quantité de protéines produites et même de taux de fusion des myotubes, est différente d'un individu à l'autre, avec une probable forte dépendance vis-à-vis de facteurs épigénétiques. Langelaan et al. (76) ont aussi mis en avant un point très important dans le protocole : le moment où démarre la stimulation. En effet, ils ont obtenu des résultats optimaux lorsque les stimuli débutaient au bout de 2 jours de différenciation comparé à une stimulation dès le premier jour de différentiation. Cela s'explique par le fait que pour observer une contraction des myotubes, il est nécessaire que ceux-ci soient suffisamment fusionnés et proches les uns des autres pour être synchronisés. Dans un tout autre contexte, Sciancalepore et al. (166) ont utilisé un électromyogramme pour déterminer un modèle d'électrostimulation à partir de contractions naturelles *in vivo* du muscle et ont trouvé que la libération de Ca^{2+} est la plus importante lorsque le régime est asynchrone. Cela suggère donc que, pour réellement modéliser une contraction musculaire, il faudrait mettre au point un protocole spécifique aux cellules et à leur environnement, ce qui va à l'encontre d'une homogénéisation des protocoles. Certaines études ont aussi associé la stimulation électrique avec un étirement mécanique (51,98,167,168) et notamment Marcinczyk et al. (51) qui ont montré un effet synergétique. D'après leur étude, l'électrostimulation seule n'apporte pas d'effet bénéfique. La stimulation mécanique accélère la prolifération mais lorsque les deux sont appliquées, un alignement des myoblastes dans le sens de l'étirement est observé en plus de l'accélération de prolifération. Cependant il faut noter que toutes les études concernant la stimulation électrique ne donnent pas exclusivement des résultats positifs et certains n'ont pas observé de réponse significative, voire même parfois cela provoquerait un ralentissement du développement des myotubes (68,112).

Le Tableau 4 récapitulatif permet de montrer qu'il existe un nombre très important de protocoles différents en fonction de ce que l'on veut exprimer ou produire sur les myoblastes et les myotubes. Cependant, cette variabilité est aussi un gros inconvénient puisque cela rend difficile la réplication de certaines expériences. Ainsi la mise au point de chaque modèle de stimulation est souvent longue et fastidieuse sachant que chaque paramètre (type cellulaire, amplitude / fréquence / durée de stimulation, moment du début de la stimulation, environnement extracellulaire) peut avoir un impact sur la réponse cellulaire.

Tableau 4 : Liste non-exhaustive d'études utilisant l'électrostimulation.

Cellules utilisées	Paramètre d'électrostimulation			Résultats	Ref
	Amplitude	Fréquence	Durée		
C2C12	1V	2Hz	24h	Pas d'effet de l'électrostimulation mais synergie avec l'étirement mécanique qui induit l'alignement des cellules	(51)
C2C12	10V	/	Une seule stimulation	L'électrostimulation a permis d'observer la contraction des myotubes formés	(55)
Primaires rat	6.8mA	0,25Hz	Quelques pulsations	Effet négatif sur la différenciation (dérégulation de MyoD)	(68)
C2C12 et primaires souris	4V	2Hz	48h	Maturation supérieure pour les cellules primaires. Importance du moment où est démarré la stimulation : idéal avec des myotubes bien différenciés	(76)
C2C12	5/10V	1Hz	3h	A 10V détachement des cellules mais augmentation de la maturation à 5V (augmentation de l'expression de MYH)	(112)
Primaires humaines	30V	1 / 100Hz	2 jours / 1h	Résultats après stimulation similaire à ceux observés in vivo pour modéliser l'entrainement court et intense et l'exercice d'endurance	(169)
Primaires humaines	70mA	1 / 10Hz	1h stimulation 7h repos pendant 7j	Maturation accélérée à 10Hz avec formation plus avancée du sarcomère	(163)
C2C12	40V	0,5 / 1Hz	8h	Activité contractile maximale après 2h puis diminution progressive jusqu'à 8h + Effet de la matrice extracellulaire : stimulation plus efficace lorsque les myotubes ont plusieurs sites d'accroche	(164)
Primaires souris	1 à 6V	1 à 45 Hz	Quelques pulsations	Leur programme de stimulation simulant les résultats observés en ECM présente les meilleurs résultats niveau différenciation et maturation	(166)
Primaires humaines	11,5V	1Hz	24h	Les auteurs ont réussi à modéliser *in vitro* un entrainement de 12 semaines de vélo en observant les mêmes expression de gènes qu'*in vivo*.	(170)
Primaires humaines	14V	5Hz	2 à 24h	Très grande variabilité des réponses à l'électrostimulation entre les différents patients expliqué par les possibles facteurs épigénétiques propres à chacun.	(165)
Primaires rat	4V	100Hz	1s pulsation, 99s repos pendant 12h	Régulation d'un facteur de croissance (TGF-β) à l'origine de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose.	(171)
C2C12	1,25 à 5V	10 / 100Hz	3h / 30min pendant 7j	Effet de l'amplitude et de la fréquence sur les myotubes : la force spécifique est maximale à 2,25V et 100Hz	(161)

C) La stimulation mécanique

Le stress mécanique imposé au progéniteur myogénique tout au long de son développement peut être modélisé *in vitro* par l'application d'un étirement constant dit passif, ou périodique dite active, c'est-à-dire dont l'amplitude varie avec une fréquence donnée. Le stress mécanique qui va stimuler la prolifération et la différenciation des progéniteurs a été particulièrement bien documentée pour plusieurs types cellulaires (myoblastes, ostéoblastes, fibroblastes, ténocytes etc.) et représente les différentes tensions que l'on retrouve *in vivo*. La stimulation mécanique peut aussi être utilisée pour modéliser des pathologies musculaires caractérisées par une faible résistance au stress mécanique, comme la dystrophie musculaire de Duchenne. Elle est alors utilisée dans le but de mieux appréhender les mécanismes sous-jacents de la pathologie ou de tester l'efficacité de nouvelles thérapies.

Dans le muscle, plusieurs types de contraintes de tension sont présentes. La contrainte de tension passive par exemple se retrouve au niveau de la jonction muscle-tendon-os et permet de fixer le muscle au reste du corps. On retrouve aussi une contrainte de tension active à chaque contraction de nos muscles que ce soit à la suite d'un stimulus nerveux pour le muscle squelettique ou de manière autonome pour les muscles lisses et cardiaques. Introduire un stress mécanique aux différents modèles in vitro permet donc de simuler au mieux les tensions appliquées au muscle *in vivo*. Les modèles de stress mécanique reposent sur 5 paramètres principaux :

- Les propriétés mécaniques du support sur lequel sont ensemencées les myoblastes et sa biofonctionnalisation. Le support doit être suffisamment flexible pour être étiré mais aussi suffisamment résistant aux contraintes mécaniques. De plus, les cellules doivent adhérer au support pour que les forces exercées leur soient transmises.

- Le moment où démarre le protocole de stimulation : il est théoriquement possible de démarrer la stimulation à n'importe quel moment de la culture, de quelques heures après l'ensemencement lorsque les myoblastes commencent tout juste à adhérer (172–175), jusqu'à plusieurs jours voire semaines après la différenciation des myotubes lorsqu'ils atteignent un certain stade de maturation (86,176–178).

- L'amplitude de l'étirement : il est nécessaire d'adapter l'amplitude de la stimulation en fonction du type de cellule et de sa résistance au stress mécanique. Il existe pour chaque type de fibre, une intensité optimale qui va stimuler la myogenèse, qui se situe à mi-chemin entre l'absence d'effet et la présence d'effet délétère. Ceci rappelle la loi de Straling, qui lie la force produite par un muscle à la longueur du sarcomère avant stimulation (179). Le pic de force est atteint lorsque le sarcomère est

à la longueur de repos (notée L0) et la force diminue lorsque cette longueur est dépassée (Chapitre 1, Figure 4).

- La fréquence de l'étirement : Elle a aussi une importance puisqu'à très basse fréquence on se rapproche de l'étirement passif que subit le muscle dans le continuum os-tendon-muscle et à plus grande fréquence on peut simuler un stress mécanique induit par un exercice (174,180–182).

- La durée de l'étirement : Si, *in vivo*, les muscles sont en permanence sous contrainte, il est plus complexe de la modéliser *in vitro* puisque l'environnement des fibres n'est pas le même. Il faut donc là aussi adapter la durée d'étirement en fonction du modèle que l'on veut développer. Une longue durée avec une faible fréquence peut simuler un développement lent et naturel du muscle (48,86,183,184), tandis qu'une durée plus courte avec une fréquence plus élevée peut par exemple simuler un exercice physique (177,178,185,186).

Il existe plusieurs systèmes d'étirement sur le marché et certaines équipes ont même développé leur propre appareil (Figure 24) (62,152,161,176).

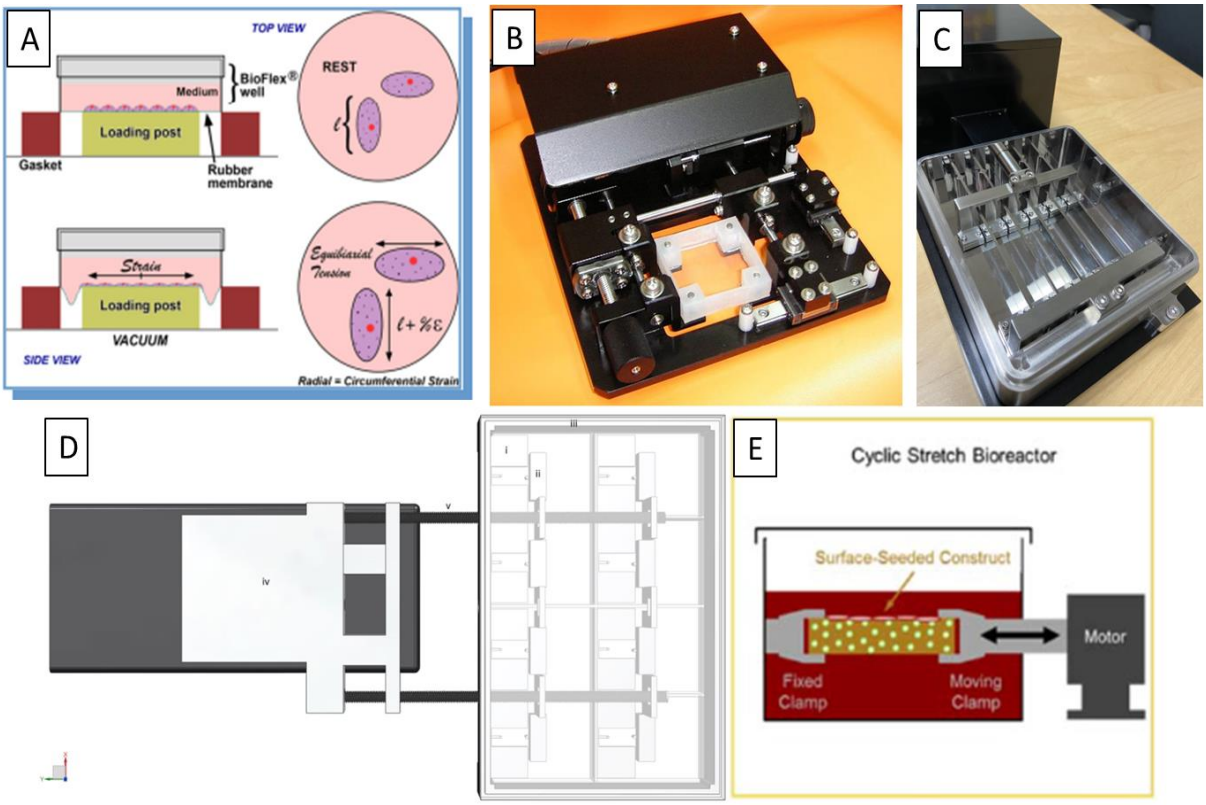

Figure 24 : Différents appareils d'étirements mécanique. A) Système d'aspiration de FlexCell, B) le ST-1900 de Strex, C) le MCT-6 de CellScale, D) le système développé par Aguilar-Agon et al. (173) et E) celui développé par Scott et al.(149).

En tête de liste on retrouve le FX-6000 de Flexcell International qui applique une contrainte de tension radiale sur le support par un effet d'aspiration (Figure 24a). Les cellules sont cultivées sur du silicone avec un revêtement biologique, puis un pilier vient se poser sous les membranes et un système de vide sur les côtés permet d'étirer les membranes. Ce système d'étirement radial permet de maitriser la

fréquence, la durée et l'amplitude d'étirement de la membrane. La compagnie japonaise Strex propose aussi plusieurs appareils d'étirement longitudinaux (Figure 24b). Là aussi les cellules sont cultivées sur des membranes en silicone ayant la forme d'un moule avec des encoches permettant à deux attaches de venir s'insérer afin de pouvoir étirer en largeur ou en longueur les membranes et donc les cellules. Ce système a même été développé pour être adaptable sur un microscope de telle sorte à pouvoir observer en direct le comportement des cellules face à un stimulus mécanique. La compagnie CellScale propose aussi un appareil d'étirement longitudinal avec la MCT-6 qui consiste à fixer le support entre une attache fixe et un bras motorisé qui va faire des allers-retours de manière contrôlée (Figure 24c). Ce système permet l'utilisation d'une plus grande variété de supports puisqu'il suffit de le pincer entre deux mors pour pouvoir l'étirer. C'est en utilisant ce même principe que la plupart des appareils « faits maison » sont développés (Figure 24d-e).

EFFET DE L'ETIREMENT SUR LA PROLIFERATION

De nombreuses études ont montré que l'étirement mécanique avait un impact positif sur la prolifération des myoblastes et expliquent cela par l'activation et la modulation des facteurs de transcription myogénique. Lorsque l'on parle d'impact sur la prolifération, il s'agit de l'augmentation du nombre de myoblastes sur le support ou dans le construit 3D. La méthodologie générale des études qui se sont intéressées à ce sujet, consiste à ensemencer des myoblastes sur un support flexible, pour ensuite mettre en place un étirement mécanique, longitudinal ou radial, dans les premiers jours de culture, c'est-à-dire avant la période de différenciation. Un tableau non exhaustif d'exemples d'études sur l'effet de l'étirement mécanique sur la prolifération résume les différents protocoles (Tableau 5). Comme précisé précédemment, quatre paramètres principaux sont relevés et on peut observer qu'il n'existe pas de protocole normalisé de stimulation mécanique. Ainsi, Tatsumi et al. (187) ont mis en avant la production de facteurs de croissance des hépatocytes (HGF) pendant 36h induit par l'étirement de cellules primaires issues de rats 12h après l'ensemencement. HGF est un facteur de croissance naturellement présent dans la matrice extracellulaire et ses effets sur l'activation des cellules satellites quiescente a déjà été démontré (188). L'étirement mécanique induit aussi la production de facteur de croissance de l'insuline 1 (IGF-1). Fu et al. (189) ont pu impliquer l'activation de kinases de type MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases) dans la production d'IGF-1. Ils ont également observé de façon intéressante, une réduction de la quantité d'IGF-1 dans le milieu lorsque ces kinases étaient inhibées. Ces mêmes auteurs ont observé sur des cellules L6, une lignée de myoblastes du rat, un effet de l'amplitude de l'étirement sur la prolifération. A 15% d'étirement, avec une fréquence de 0,5Hz, la prolifération est augmentée, tandis qu'en passant à 20% elle est considérablement diminuée.

Ces résultats sont en concordance avec d'autres études utilisant des C2C12 (190,191). Ces derniers montrent un effet de l'amplitude d'étirement sur la prolifération. En étirant à 5% ou 15%, (0,5Hz), ces auteurs n'ont pas observé d'effet sur la prolifération, alors qu'en étirant à 10%, la prolifération était améliorée et en étirant à 20% la prolifération était réduite due à la production d'espèces oxydées radicalaires (ROS) dans le milieu menant ensuite à la mort cellulaire. Pour expliquer l'effet de l'étirement mécanique sur la prolifération, plusieurs études ont évalué l'activation de différentes voies cellulaires d'intérêts par suite à stress mécanique. Otis et al. (192) se sont intéressé à COX2 (une cyclooxygenase) qui, lorsqu'elle est activée, permet la synthèse de médiateurs chimiques de l'inflammation, les prostaglandines, à partir d'un substrat, l'acide arachidonique. Ils ont alors inhibé COX2 dans des myoblastes primaires murins et ont observé une diminution de la prolifération suite à l'étirement, par rapport au contrôle.

Néanmoins, il est à noter que dans cette étude, les auteurs ont étiré leurs myoblastes à 25% tout en observant une bonne prolifération pour les contrôles, ce qui va à l'encontre des études mentionnées précédemment, et met en avant la difficulté d'homogénéisation des protocoles. Les mêmes auteurs ont observé également un effet inhibiteur de l'étirement après 12h sur l'expression de myogénine, un facteur transcriptionnel impliqué dans la myogenèse et plus précisément de la différenciation. Kumar et al. (193) ont stimulé mécaniquement par un protocole d'étirement, des myoblastes C2C12 pendant 1h par jour sur une durée de 5 jours et ont observé une augmentation du nombre de cellules dès les premières 24h. Ils ont montré qu'en inhibant NF-κB, (un facteur de transcription impliqué dans la réponse immunitaire qui joue un rôle dans la survie de la cellule lorsqu'elle est soumise à un stress avec l'activation de la transcription de gènes anti-apoptotiques) la prolifération était impactée dès la première heure d'étirement. C'est aussi ce facteur de transcription qui est mis en avant par Hua et al. (182) après avoir montré un effet de la fréquence d'étirement sur la prolifération. Ces auteurs ont étiré à 10% des myoblastes C2C12 24h après les avoir ensemencés à des fréquences croissantes de 0,125Hz à 0,5Hz pendant 2h par jour. Contrairement aux résultats précédemment observés sur l'effet de l'amplitude, ici, seule la fréquence de 0,125Hz présente un effet positif sur la prolifération. Il y a donc un effet couplé de la fréquence et de l'amplitude sur la réponse des cellules à l'étirement. Song et al. (194) se sont intéressés à la durée de l'étirement. Ils ont stimulé les myoblastes C2C12 après 2 jours de prolifération et ont observé qu'à partir de ce moment-là, plus l'étirement durait, plus les cellules entraient en apoptose. Cette mort cellulaire est due à une activation de la caspase-12 une protéase qui va ensuite induire un stress du réticulum endoplasmique. Ainsi, l'étirement mécanique et plus précisément ses paramètres de durée, fréquence et intensité, doivent être contrôlés pour obtenir un effet positif sur la myogenèse. Néanmoins, l'effet de l'étirement sur la prolifération est largement moins documenté que sur la différentiation ou la maturation. Ceci peut être expliqué par le fait

qu'améliorer la prolifération ne semble pas une étape indispensable pour le développement des myoblastes et notamment pour la fusion en myotubes. En effet, contrairement à la logique qui voudrait qu'une augmentation de la prolifération implique une fusion facilitée, plusieurs études ont observé qu'une prolifération améliorée pouvait provoquer une moins bonne différenciation (193,195–197). Il faut noter toutefois que ces résultats sont contredits par d'autres équipes (198).

Tableau 5 Liste non-exhaustive d'études évaluant l'effet de l'étirement mécanique sur la prolifération.

Cellules utilisées	Etirement	Paramètres d'étirement				Résultats	Réf.
		T0	Amplitude	Fréquence	Durée		
Primaires rat	Radial	12h après ensemencement	25%	7s pour monter à 25% et 5s en statique	12 à 36h	Activation des cellules satellites dès 2h d'étirement	(187)
C2C12	Radial	24h après ensemencement	17%	1Hz	1h par jour pendant 5 jours	Augmentation de la prolifération dès le premier jour	(193)
Primaires souris	Longitudinal	18h après ensemencement	25%	0,5Hz	5h	Augmentation de la prolifération	(192)
C2C12	Longitudinal	A 85% de confluence	9%	statique	Jusqu'à 24h	Augmentation de la prolifération et activation de la myogenèse	(198)
C2C12	Radial	A confluence	10%	2s étirement 2s repos	1h par jour pendant 5j	Les cellules continuent de proliférer	(196)
C2C12	Radial	24h après ensemencement	10%	0,125/0,25 /0,5Hz	2h par jour pendant 4j	Augmentation de la prolifération à 0,125Hz mais pas d'effet pour les autres	(182)
C2C12	Radial	24h après ensemencement	15/20%	0,5Hz	6/8h	Augmentation de la prolifération à 15% mais diminution à 20%	(190)
L6	Radial	24h après ensemencement	15/20%	0,5Hz	6h	Augmentation de la prolifération à 15% mais diminution à 20%	(189)
C2C12 + L6	Radial	A 60% de confluence	5/10/15/20%	0,5Hz	12/24h	Apoptose à 20% résultats similaires entre C2C12 et L6 avec une amplitude idéale à 10%	(191)
C2C12	Radial	A 80% de confluence	20%	0,5Hz	12/24/36h	Augmentation de l'apoptose avec le temps	(194)

EFFET DE L'ETIREMENT SUR LA DIFFERENCIATION

Dans la majorité des articles retrouvés dans la littérature, la stimulation mécanique est utilisée pour favoriser le développement des myotubes du début de la différenciation jusqu'à la maturation avec l'apparition du système contractile. En effet c'est à partir de ce moment-là que ce genre de stimulus a le plus de pertinence puisqu'il entre en jeu lorsque les sarcomères commencent à apparaitre ou plus tard commencent à se positionner les uns après les autres de telle sorte à former les stries en Z caractéristiques du muscle squelettique.

Les premiers marqueurs qui ont été mesurés pour évaluer l'effet de l'étirement mécanique sur la différenciation des myoblastes sont les MRFs (Myogenic Regulatory Factors). Ces facteurs de transcriptions sont exprimés en cascade durant la prolifération et la différenciation et permettent de suivre l'avancée de la myogenèse (Chapitre 1, Figure 6).

Moustogiannis et al. (199) ont tenté de mettre au point un protocole d'étirement pour optimiser au maximum le développement des myoblastes C2C12. Pour cela, ils ont utilisé l'appareil d'étirement de FlexCell à différentes amplitudes (2 / 10 / 15 %), différentes fréquences (0,25 / 1 Hz) pendant 15 min / 1h ou 24h. Les myotubes ont été étirés 10 jours après avoir changé le milieu de culture pour forcer la différenciation. Ils ont mesuré l'expression de MyoD, MyoG et MRF4 par PCR et ont observé un effet prononcé de l'étirement notamment à basse fréquence (0,25Hz) sur l'expression des trois facteurs de transcription. Ces auteurs ont observé logiquement une expression de MRF4 et Myog qui semble être augmenté par l'étirement puis réduite. Cependant ils rapportent que MyoD est en constante augmentation. Cette surexpression de MyoD à l'étirement n'est pas un cas isolé puisque d'autres études ont observé les mêmes résultats (174,180,200,201). Les auteurs les expliquent par une réponse différente de chaque facteur de transcription à un type d'étirement et plus particulièrement au moment où a lieu la stimulation mécanique. Pour aller dans le même sens, Abe et al. (172) ont eux aussi étiré des myoblastes C2C12 sur l'appareil FlexCell mais 24h après avoir ensemencé les cellules et ont observé une surexpression significative des 4 facteurs de transcription à la suite de l'étirement dès les 12 premières heures. Cependant, à l'inverse de Moustogiannis et al. (199), les 4 facteurs de transcription en tendance à diminuer leur expression au fil du temps, jusqu'à pratiquement disparaitre au bout de 48h. Ces résultats montrent donc un profil de développement différent. Cela peut être expliqué par le fait qu'au moment de l'étirement, les myoblastes de Abe et al. (172) n'étaient pas encore différenciés ni fusionnés comme ceux de Moustogiannis et al. (199) qui pourtant exprimaient déjà les marqueurs Myog et MRF4. Ces deux études en parallèles suggèrent donc de manière générale que les 4 facteurs de transcription sont surexprimés suite à l'étirement mais que leur expression varie dans le temps en fonction notamment du moment où le stress mécanique est appliqué. A contrario,

plusieurs modèles d'étirement mécanique ont montré, une sous-expression de ces facteurs de transcription suite à l'étirement (195,196,202,203). Parmi ces modèles, Boonen et al. (203) ont stimulé des myoblastes C2C12 et primaires murins après un jour de différenciation selon un protocole en deux parties. Dans un premier temps, les membranes étaient progressivement étirées pour atteindre 2% d'étirement en deux jours. Ensuite, un cycle de 3h d'étirement est mis en place à 1Hz et 6% en alternance avec 3h de repos. Ils ont tout d'abord montré que le pré-étirement sur les deux premiers jours n'avait aucun effet sur les cellules, voire même un effet inhibiteur sur l'expression de MyoD, Myog et MRF4 que ce soit pour les C2C12 ou les myoblastes primaires. Ces résultats négatifs pourraient être expliqués par un défaut du complexe d'adhésion qui n'est pas assez développé pour résister aux contraintes de tension appliquées. Pour Kook et al. (195,196) qui ont utilisé des cellules C2C12 et des cellules primaires bovines, l'étirement mécanique a directement bloqué la différenciation des myoblastes au profit de la prolifération malgré le changement de milieu de culture. Ce blocage de différenciation est montré par la présence de myotubes fusionnés lorsqu'ils ne sont pas étirés et des myoblastes non fusionnés lorsqu'ils ont été soumis à un étirement mécanique (Figure 25).

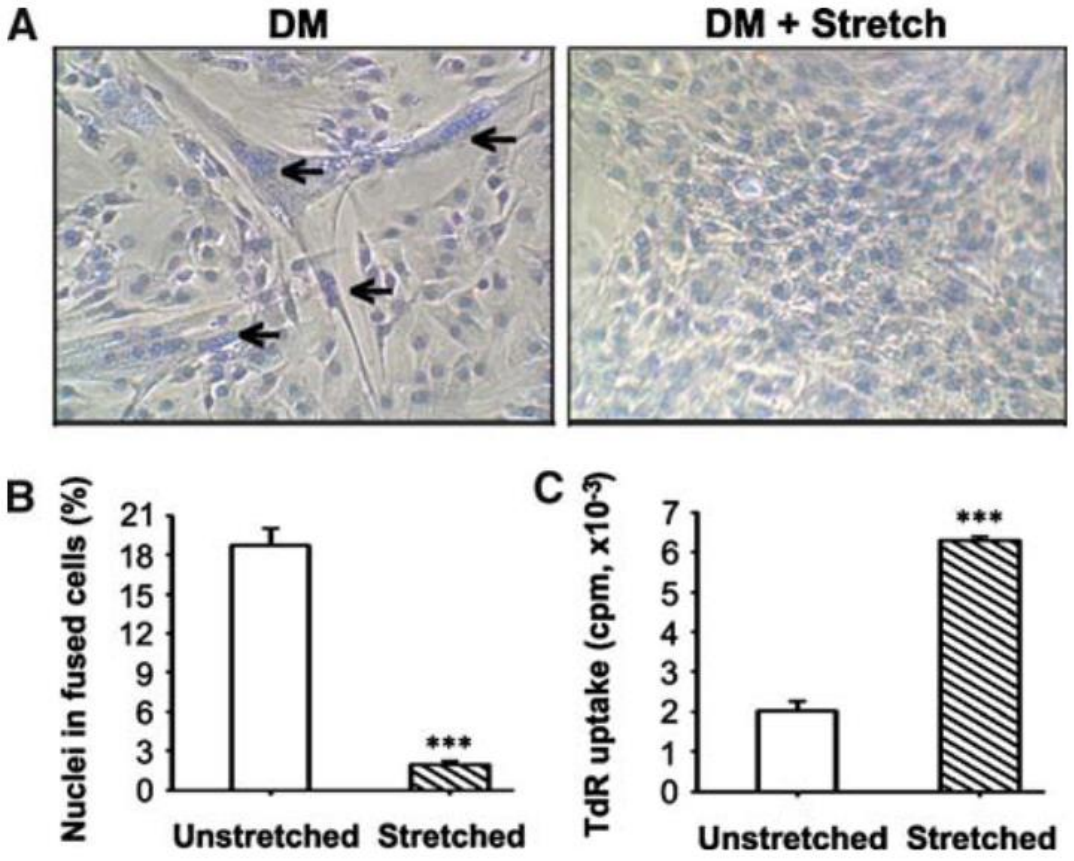

Figure 25 : Influence négative de l'étirement sur la différenciation des myotubes bovins. Issu de (192)

Au niveau des facteurs de transcription, l'expression de MyoD et Myf5 est retrouvée dans les deux paramètres mais Myog et MRF4 sont absents lorsque les myoblastes ont été étirés, ce qui justifie

l'absence de différenciation dans les myoblastes étirés. Les auteurs expliquent ces résultats par l'activation des MAPKs qui sont censés induire un signal qui enclenche la différenciation. Pourtant, comme explicité dans un précédent chapitre (189), ces kinases peuvent aussi être à l'origine d'une production d'IGF-1, un facteur de croissance favorisant la prolifération. Ainsi, si l'expression des MRFs semble donc donner des résultats parfois contradictoires, c'est aussi le cas pour l'activation des MAPKs et plus particulièrement la kinase p38 qui jouerait un rôle primordial dans le passage à la différenciation pour les myoblastes soumis à un stress mécanique. En effet, l'étirement peut activer p38 sur des C2C12, mais aussi l'inhiber chez les cellules primaires bovines (195). Ces résultats contradictoires mettent en avant la variabilité des réponses à l'étirement entre les différents types cellulaires.

Pourtant, cette variabilité de réponse n'a pas été observée par Cheng et al. (48) qui ont eu une réponse similaire à l'étirement pour des myotubes C2C12 et des myotubes issus de cellules primaires humaines. C'est cependant une autre caractéristique qui est mise en avant par leur étude : la composition du milieu. Ils ont observé un impact de la quantité de sérum dans le milieu sur l'effet de l'étirement en mesurant l'expression de certaines microARN associés à la prolifération et à la différenciation (miR-1, miR-133a et miR206). Ils ont montré que dans un milieu plus concentré en sérum, l'étirement avait tendance à augmenter l'expression des microARN tandis que dans un milieu moins concentré, l'étirement a un effet opposé, avec une réduction de l'expression des microARN.

Un autre paramètre simple pour évaluer l'effet de l'étirement sur la différenciation des myotubes est de mesurer le diamètre des fibres créées et de quantifier la fusion des myoblastes. Pour cela la méthode la plus utilisée est l'observation au microscope et la quantification à l'aide de logiciels d'analyse d'image. Powel et al. (77) ont fabriqué un construit 3D à base de cellules primaires humaines qu'ils ont étirées et ont observé une augmentation du diamètre moyen des fibres ainsi que de leur nombre d'embranchements. Ces deux résultats sont caractéristiques d'une hypertrophie suite à l'étirement. En plus de l'effet mécanique de l'étirement sur les fibres, les auteurs mettent aussi en avant la diffusion à travers la MEC des différents facteurs de croissance présent dans le milieu qui favorise ainsi le meilleur développement des fibres. Cette augmentation significative du diamètre a été observée dans de nombreuses équipes (204–208) mais ce n'est pas le cas pour toutes. Liao et al. (98) ont étiré des myotubes deux jours après la mise en différenciation et ils ont observé qu'un étirement sinusoïdal, même à faible amplitude (5%) induisait une production globale de protéines mais pas celles inhérentes au sarcomère et ont émis l'hypothèse que l'étirement avait provoqué des lésions, réactivant le processus de prolifération cellulaire. Une diminution du diamètre a aussi été observé par Ilaiwy et al. (209) mais cette fois-ci directement après l'arrêt de l'étirement. En effet, ils ont appliqué un stress mécanique à des myotubes C2C12 pendant 6h puis les ont retiré du système d'étirement et

ont observé leur évolution dans les 12h qui ont suivi. Après 6h d'étirement, une hypertrophie a été observée par rapport aux contrôles non stimulés. Mais dès 3h après la suspension de l'étirement, une atrophie a été notée. Cette atrophie s'est amplifiée pendant les 9h qui ont suivies. Les auteurs ont observé une augmentation des amino-acides dans le milieu, pouvant témoigner d'une dégradation des protéines du sarcomère à la base de l'atrophie. Une autre équipe met en avant la production d'espèces oxydantes suite à l'étirement générateur d'atrophie par stimulation de la protéolyse, après l'arrêt de la stimulation (210). Le tableau 6 regroupe les différentes études présentés ci-dessus ainsi que leurs principaux résultats.

Tableau 6: Liste non-exhaustive d'étude évaluant l'effet de l'étirement mécanique sur la différenciation.

Cellules utilisées	Etirement	Paramètres d'étirement				Résultats	Réf.
		T0	Amplitude	Fréquence	Durée		
C2C12	Radial	24h après ensemencement	15%	0,5Hz	2 jours	Surexpression de MyoD, Myf5, Myog et MRF4 mais diminution dans le temps	(172)
C2C12 et primaires souris	Radial	J1 de différenciation	6%	1Hz	3h étirement, 3h repos	Sous-expression de MyoD, Myog et MRF4 pour les deux types cellulaires, en 2D et en 3D	(203)
C2C12 et primaires bovins	Radial	J0 de différenciation	10%	0,25Hz	1h par jour pendant 5 jours	Sous-expression de Myog et MRF4. La différenciation est inhibée au profit de la prolifération	(195, 196)
C2C12	Radial	J10 de différenciation	2/10/15%	0,25/1Hz	15min/1h/ 24h	Surexpression de MyoD, Myog, MRF4	(199)
Primaires humaines	Longitudinal	J5 de différenciation	5% puis 10% puis 15%	3x5 étirements, toutes les 30 minutes		Augmentation du diamètre des fibres et de la quantité de myotubes dans le construit	(77)
C2C12	Radial	J2 de différenciation	15%	1Hz	6h	Les myotubes s'atrophient immédiatement après l'arrête de l'étirement	(209)
C2C12	Longitudinal	J3 de différenciation	5/10%	1Hz	1h étirement, 5h repos pendant 12 jours	Décollement des fibres même à plus faible amplitude (5%)	(98)

EFFET DE L'ETIREMENT SUR LA MATURATION

Une fois que les myoblastes se sont différenciés et que le processus de fusion est entamé, des myotubes se forment sur le support. Cependant, ces premières fibres sont encore loin de ressembler à celles que l'on retrouve *in vivo*. Si en apparence au microscope optique elles ressemblent à des myofibres, l'organisation du sarcomère, la clustérisassions des récepteurs à acétylcholine, la migration des noyaux vers la périphérie de la fibre ne sont pas présents. Ainsi, l'étirement mécanique pourrait également avoir tout son intérêt pour favoriser la maturation des myotubes une fois la différenciation bien avancée de telle sorte à stimuler des myotubes et non les myoblastes. La limite entre l'étape de différenciation et de maturation est assez floue ce qui explique que plusieurs études considèrent leurs myotubes matures dès lors qu'une hypertrophie est observée notamment avec un élargissement du diamètre (176,208,211–213). Aguilar-Agon et al. (176) ont aussi observé une hypertrophie suite à l'étirement mécanique et ont observé que lorsque les myotubes C2C12 ont été stimulés mécaniquement, leur force contractile mesurée au cours d'une stimulation électrique, était significativement augmentée ainsi que la tension passive. L'un des marqueurs les plus utilisés pour évaluer la maturation des fibres est l'expression des myosines, qui sont composées de deux chaines lourdes d'acides aminées. Parmi les isoformes les plus documentés, on retrouve la MHC-I, -IIa, -IIb, -IIx ainsi que les MHC embryonnaire et néonatal. Sakiyama et al. (214) ont observé une augmentation de l'expression de MHC IIa et IIb suite à l'étirement par rapport aux contrôles non-stimulés, des résultats que l'on retrouve aussi dans d'autres études (86,172,215–217). Kurokawa et al. (218) ont mis en avant un effet de la fréquence d'étirement sur l'expression des différents isoformes de MHC, avec une augmentation de l'expression des différent type de MHC lorsque les myotubes C2C12 sont étirés. Mais en modifiant la fréquence d'étirement, ils ont montré qu'à basse fréquence, c'est l'expression des MHC-IIb qui est favorisé. A l'inverse à fréquence plus importante, c'est l'expression des MHC-IIa qui devient majoritaire. Ces résultats montrent qu'un changement de fréquence peut induire une adaptation des fibres musculaires sur le même principe de ce qu'on peut observer *in vivo* entre un entrainement en endurance ou en force. Il peut aussi y avoir une interversion entre l'expression de MHC-I et MHC-II synonyme d'une adaptation vers une fibre endurante ou explosive (200). Candiani et al. (183) ont quant à eux obtenu des résultats plus mitigés puisqu'ils n'ont pas observé d'effet sur l'expression des MHC après 3 jours d'étirement mais plutôt après 7 jours d'étirement. A l'inverse, dans la continuité de leurs résultats obtenus sur les facteurs de transcription, Kook et al. (195,196) ainsi que Kumar et al. (193) ont observé un effet inhibiteur de l'étirement sur l'expression des MHC. Dans ce cas, l'étirement agit uniquement comme un activateur des cellules progénitrices par une surexpression de cdk2, un régulateur du cycle cellulaire. Ceci se fait alors au détriment de la fusion puisque les cellules reçoivent des signaux contradictoires qui les insitent d'un côté à se diviser et de l'autre à fusionner

avec les cellules voisines. Somers et al. (217) ont évalué le degré de striation des myotubes par immunofluorescence. Dans leur cas, ils ont marqué les myotubes à la MHC mais d'autres marquages sont aussi utilisés comme l'α-actinine (98,167) et la Troponine T (219). Les auteurs ont observé que l'instant où démarrait la stimulation avait une influence sur les résultats. En effet en débutant l'étirement au 3e jour de culture, la différence entre étiré et non étiré n'était pas significative et le devenait au 5ème jour. A partir du 5ème jour, la striation est plus développée, avec une organisation en forme de Z, caractéristique de la forme d'un sarcomère mature. En utilisant le même marquage fluorescent, Chen et al. (220) ont montré qu'en augmentant l'amplitude d'étirement, ils augmentaient l'hypertrophie de leurs myotubes ainsi que la longueur du sarcomère. Pour évaluer la maturation des fibres, suite à un étirement des fibres, l'expression de myostatine est un paramètre intéressant (221,222). La myostatine est un facteur de croissance connu pour limiter la croissance musculaire et utilisé parfois dans le milieu sportif en tant que dopant. En effet, l'inhibition de la myostatine dans le corps induit une hypertrophie musculaire rapide (223). Moustogiannis et al. (199) ont noté une inhibition de la myostatine après un étirement à 1Hz dès la première heure et une inhibition encore plus importante lorsque la fréquence est réduite à 0,25Hz pendant 12h. Enfin, parmi les techniques les plus utilisées pour déterminer le degré de maturation des fibres, on retrouve l'évaluation de l'homéostasie calcique par microscopie confocale qui mesure l'activité des canaux calciques, permettant la contraction musculaire suite à une excitation électrique. Ainsi une activité normale des canaux calciques est un paramètre quantifiable du niveau de maturation de la fibre musculaire. Ortuste Quiroga et al. (224) ont mesuré l'homéostasie calcique dans des myotubes qui avaient bénéficié d'un protocole de stimulation mécanique. Ils ont noté que la quantité de calcium libérée dans le cytoplasme lors d'une stimulation électrique était significativement augmentée par rapport au contrôle. Ils ont aussi mis en avant l'implication de Piezo1 qui est un canal ionique activé par la déformation de la membrane plasmique (225). Il agit ainsi comme un mécano-transducteur, c'est-à-dire qu'il convertit un stimulus mécanique par un message biologique tel que l'afflux d'ions sodium ou calcium. Enfin, Scott et al. (152) ont observé une agglomération des récepteurs d'acétylcholine suite à un étirement mécanique. Ils mettent aussi en avant la forme de ces clusters qui, en culture 2D, ont tendance à former des agrégats elliptiques éloignés les uns des autres tandis que dans ce modèle, les clusters sont interconnectés les uns aux autres. Le tableau 7 regroupe les différents exemples cités précédemment.

Tableau 7: Liste non-exhaustive d'études évaluant l'effet de l'étirement mécanique sur la maturation.

Cellules utilisées	Etirement	Paramètres d'étirement				Résultats	Réf.
		T0	Amplitude	Fréquence	Durée		
C2C12	Radial	24h après ensemencement	15%	0,5Hz	5 jours	Augmentation de la prolifération et expression plus importante de MHC-IIb	(214)
C2C12	Longitudinal	5j après ensemencement	6%	0,5Hz	10min étirement et 30min repos	Effet de l'étirement après 7 jours avec la surexpression de MHC mais rien avant	(183)
C2C12	Longitudinal	3 ou 5j après ensemencement	10%	Statique ou 0,5Hz	6h par jours pendant 7 jours	Lorsque l'étirement est démarré au 3e jour, pas d'effet sur la morphologie des myotubes. Au 5e jour par contre myotubes plus larges et plus striés	(217)
Primaires souris	Longitudinal	Après 3j de différenciation	3/6/9%	1min étirement		Augmentation de l'activité calcique qui est absente lorsque Piezo1 est inhibé.	(224)
C2C12	Longitudinal	Après 14j de culture	Progressif jusqu'à 15% pendant 1h puis 2h statique à 15%			Hypertrophie et augmentation de la force contractile	(176)
C2C12	Radial	24h après ensemencement	15%	0,1/0,5/0,9 Hz	1/3/5 jours	Transition vers MHC-IIb à basse fréquence et vers MHC-IIa à haute fréquence	(218)
Primaires rats	Longitudinal	Après 1j de différenciation	10%	0,1Hz	5min par heure pendant 5 jours	Clustérisassions des récepteurs à l'acétylcholine	(152)

EFFET DE L'ETIREMENT MECANIQUE SUR L'ALIGNEMENT

L'étirement passif est couramment utilisé pour induire l'alignement (62,66,86,184,220,226–228) notamment avec le principe d'ancrage des hydrogels (expliqué en Chapitre 2C). Heher et al. (62) ont moulé des supports à base de fibrine dans lesquels des cellules C2C12 sont introduites puis étirées de manière prolongée à 10% pendant 6h et 3% pendant les 18h suivantes. Dans cette étude, l'étirement, a commencé 3 jours après l'ensemencement et la différenciation induite après le 4e jour. Les auteurs ont observé une augmentation du diamètre, des fibres plus longues que celles non-stimulées (impliquant une hypertrophie) et surtout un alignement naturel dans le sens de l'étirement. Chen et al. (220) ont développé un système manuel d'étirement où un gel à base de gélatine fonctionnalisée est fixé sur des piliers imprimés avec une résine photostructurable. L'un des piliers reste fixe tandis que le second peut être déplacé de telle sorte à augmenter l'espacement entre les deux et ainsi créer une contrainte de tension dans l'hydrogel. En ensemençant des cellules C2C12 dans leur gel et en appliquant un étirement dont l'amplitude est comprise entre 4 et 45%, les auteurs ont observé une diminution du diamètre et une augmentation de la longueur lorsque l'amplitude d'étirement augmentait (expliquée par la conservation du volume), mais surtout un alignement marqué dans le sens de l'étirement lorsque l'amplitude d'étirement était supérieure à 25%. En dessous, il semblerait que les myotubes aient tendance là aussi à s'aligner mais avec un angle entre 30° et 45° par rapport à l'axe d'étirement. Cet angle n'est pas anodin. Ahmed et al. (229) ont mis au point un système d'étirement d'une cuve en PDMS sur laquelle ils ont déposé par µCP des lignes de fibronectine formant 3 angles différents : à 0°, 45° et 90° par rapport à l'axe d'étirement (Figure 26). Les auteurs ont tout d'abord observé sur des supports non fonctionnalisés que la stimulation mécanique là aussi induisait une déviation par rapport à l'axe d'étirement en expliquant cela par la présence de forces de compression perpendiculaires à l'axe d'étirement (230). Mais en utilisant ensuite leur support avec la fibronectine, les auteurs ont observé une réorganisation des filaments d'actine en fonction de l'angle des lignes de fibronectine. Lorsqu'elles étaient parallèles au sens d'étirement, l'actine déviait avec un angles de 47°, lorsque les lignes étaient perpendiculaire au sens d'étirement, l'actine suivait l'angle de ces lignes à 90° et enfin lorsque les lignes de fibronectine étaient disposées à 45°, l'actine suivait là aussi cet angle de 45° mais avec une variabilité plus grande ce qui met en avant la compétition entre l'étirement et la topographie pour induire l'alignement. Les auteurs mettent donc ici en avant une réorganisation de l'actine dans le sens perpendiculaire de l'étirement, une conclusion que l'on retrouve aussi dans d'autres études (231,232). Si la tension passive est un outil communément utilisé

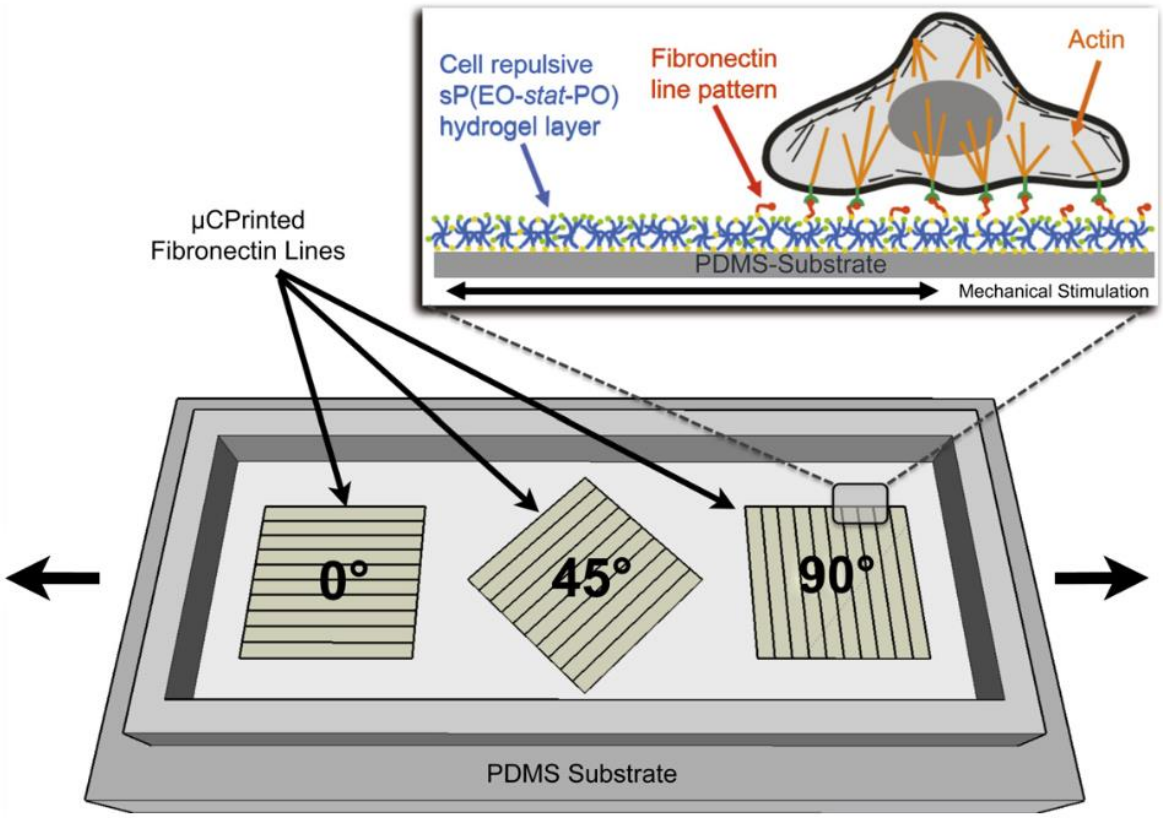

Figure 26 : Système d'étirement développé par Ahmed et al. (226).

pour induire l'alignement des myotubes, des protocoles d'étirement périodique ont aussi parfois été mis au point avec succès (216,231–233). Néanmoins, les résultats sont contradictoires puisque certains observent un alignement des fibres dans le sens de l'étirement (216,233) et d'autres perpendiculairement à l'étirement (231,232). Pour en partie expliquer cela, un modèle mathématique a été mis en place par Wang et al. (234). Celui-ci prédit que, lors d'un étirement mécanique, les filaments d'actine présents dans les myotubes se réorganisent de telle sorte à s'aligner dans la direction où la force de contrainte est la plus faible, cela correspondant à l'endroit sur le substrat subit la plus faible déformation.

La stimulation, qu'elle soit chimique, électrique ou mécanique a un effet sur le développement des cellules musculaires. In vivo, toutes ces interactions ont lieux dans un timing précis, parfois en même temps, ce qui rend la modélisation in vitro d'autant plus complexe. Cette partie montre qu'il existe énormément de protocoles de stimulation, notamment au niveau de l'étirement et qu'à ce jour il n'y a pas de standardisation qui permet d'obtenir des résultats répétables entre chaque équipe. Il est donc important de bien comprendre son propre modèle et d'adapter toutes les stimulations pour répondre aux hypothèses de travail. Dans le cadre du projet, l'étirement mécanique a été considéré comme premier choix pour favoriser la différenciation et la maturation des myotubes produits.

Chapitre 4 : Mise en place du modèle *in vitro*

L'objectif initial du projet de thèse est de produire un support permettant de guider les myotubes pour qu'ils s'alignent entre eux tout en présentant un bonne différenciation, reproduisant la physiologie naturelle du muscle. Ce support doit aussi posséder des propriétés mécaniques particulières puisqu'il est envisagé de l'étirer afin de simuler un exercice physique *in vivo*. Pour cela, le matériau doit être suffisamment flexible pour être étiré tout en restant assez résistant pour ne pas se déchirer.

Il existe plusieurs techniques pour induire l'alignement des myotubes comme l'ancrage d'hydrogels, l'électrospinning, la bio-impression 3D et la microstructuration par photolithographie. Les avantages et les inconvénients de chaque méthode sont résumés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Avantages et inconvénients des différentes méthodes induisant l'alignement des myotubes in vitro.

Technique	**Avantages**	**Inconvénients**
Ancrage hydrogel	Très bonne biocompatibilité, rigidité proche de celle *in vivo*, grande variété d'hydrogels et fonctionnalisables, possibilité de l'implanter *in vivo*	Faible résistance au stress mécanique induit par l'étirement
Electrospinning	Grande variété de polymères naturels et synthétiques pouvant être biofonctionnalisés, contrôle de la forme du construit, génération une porosité favorisant l'adhésion cellulaire	Process de fabrication très long lorsque les construits dépassent le cm^3 (235), faible résistance au stress mécanique induit par l'étirement (89)
Bio-impression 3D	Structure 3D précise et contrôlée, utilisation d'hydrogels (et donc les avantages qui vont avec)	Faible résistance au stress mécanique induit par l'étirement
Microstructuration par photolithographie	Grandes précisions et reproductibilité, utilisation d'hydrogels et de polymères pour une plus grande variété de supports	Systèmes complexes et onéreux

Si l'on se réfère au cahier des charge explicité au-dessus, seule la microstructuration par photolithographie produit des supports suffisamment résistants pour subir une contrainte mécanique. De plus, la technique est applicable sur de nombreux matériaux comme par exemple le PDMS que nous allons voir dans la prochaine partie.

A) Le PDMS

Le PolyDiMéthylSiloxane (PDMS), ou silicone, est un polymère organo-minéral de la famille des siloxanes (Figure 27a) composé d'un enchainement de groupements $O\text{-}Si(CH_3)_2$. Il est

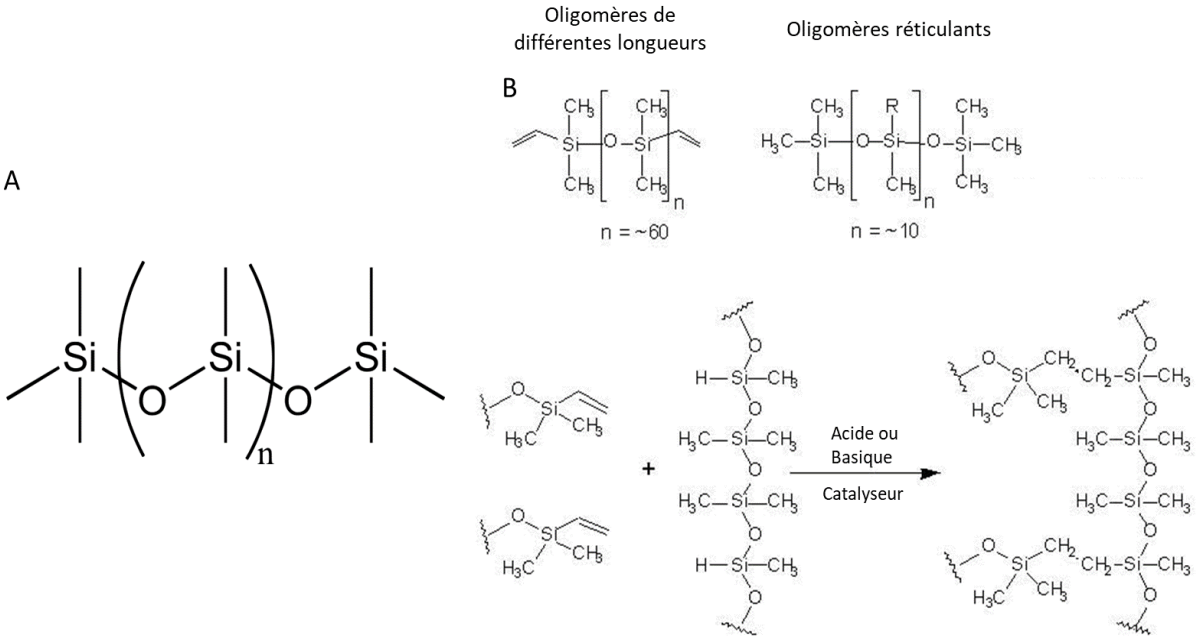

Figure 27 : Le polydiméthylsiloxane. A) Forme linéaire du PDMS B) Mécanisme de réticulation du PDMS

commercialement vendu sous la forme d'une base et d'un agent durcissant qui, lorsqu'ils sont mélangés, engendrent une réaction de polymérisation menant après dégazage à un élastomère. La base contient des oligomères de différentes longueurs donc les extrémités présentent des groupements vinyles (Figure 27b). L'agent durcissant est composé d'un mélange d'autres oligomères similaires chimiquement, ainsi qu'un activateur (un anion, un cation ou un catalyseur métallique selon le produit commercial) qui vont réagir avec les groupements vinyles et réticuler pour former le PDMS sous sa forme solide.

Il est possible de jouer sur le ratio entre la base et l'agent durcissant pour modifier la rigidité du PDMS. Dans la plupart des cas, celle-ci se situe entre 3 et 4 MPa mais certaines études ont réussi à descendre à 0,5MPa (236,237) voire même 12kPa (238). Il est connu pour être hydrophobe en raison la présence de groupements méthyl en surface qui ne favorisent pas les liaisons hydrogène avec l'eau. Le PDMS

est aussi biocompatible, transparent avec peu d'auto-fluorescence (pratique pour observer les cellules déposées dessus), peu onéreux et très facile à mouler (239).

Lorsque l'on associe microstructuration et PDMS il est important de différencier deux principes : la microstructuration **du** PDMS et la microstructuration **sur** PDMS. Dans le premier cas, il s'agit d'une modification physique du PDMS par « micro-wrinkling » (81,240), par gravure au laser qui va creuser le silicone (241,242) ou par moulage comme expliqué dans le deuxième chapitre. Le micro-wrinkling consiste à étirer une pièce de PDMS et l'installer sous tension dans une chambre à plasma. Le traitement plasma est un processus qui expose la surface du PDMS à des gaz ionisé, généralement de l'oxygène ou de l'air. Le plasma est généré en appliquant un champ électrique de haute fréquence à basse pression sur le gaz, ce qui provoque la dissociation des molécules de gaz et la formation d'espèces réactives, telles que des radicaux et des ions, qui interagissent avec la surface du matériau. Cette méthode va permettre d'oxyder la surface du silicone, ce qui va générer une anisotropie de propriété mécanique. En relâchant lentement la tension, des plis de quelques micromètres de large se créent sous en forme de vagues (Figure 28).

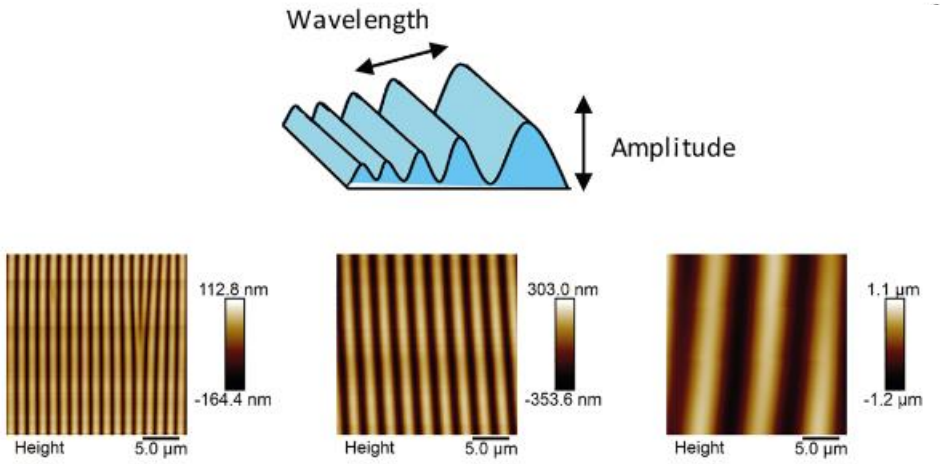

Figure 28 : Représentation schématique et observation AFM des gradients topographiques créés par micro-wrinkling du PDMS Issu de (78)

Cette technique permet de maitriser la largeur (de 1 à 10 nm) et la hauteur (de 100 nm à 2 µm) des plis en modifiant les paramètres du plasma, l'amplitude d'étirement sur PDMS et le temps de relaxation du support. En pratique néanmoins, la répétabilité devient vite un frein car les plis sont dépendants du traitement plasma et celui-ci ne provoque pas toujours exactement les mêmes modifications de surface pour deux protocoles d'activation plasma identiques (240). Le principe de la gravure au laser consiste à envoyer des micro-pulsations sur la surface du PDMS suivant des motifs préalablement défini et l'energie apportée par le laser fait fondre les zones irradiées ce qui permet de creuser des formes avec une précision de l'ordre du micromètre. Les meilleurs résultats ont été

obtenus par Alshehri et al. (242) en produisant des microsillons d'une largeur de 10 µm. Les myoblastes peuvent alors s'accrocher de part et d'autre du sillon et le suivre pour former des myotubes alignés.

Dans le cas de la microstructuration sur PDMS, un autre polymère est déposé sur le silicone et c'est ce polymère qui est ensuite microstructuré mais le PDMS en lui-même n'est pas modifié.

B) La photolithographie additive

La photolithographie additive est une « technique permettant de projeter une image sur une résine photosensible à l'aide d'une source lumineuse et à travers des objectifs, afin de l'y imprimer ». (Définition Le Robert, 2023). Cette technique, largement utilisée dans le domaine des semi-conducteurs et de la microfluidique (243), est connue pour être extrêmement reproductible avec une précision pouvant atteindre le nanomètre. Ses applications ne cessent de se diversifier notamment dans le domaine biomédical. En règle générale, la lumière ultraviolette est utilisée pour transférer un dessin géométrique d'un masque optique sur une résine sensible à la lumière déposée sur le substrat. La résine photosensible se décompose (résine positive) ou durcit (résine négative) lorsqu'elle est exposée à la lumière. Le film à motifs est ensuite créé en éliminant les parties non-polymérisées du revêtement à l'aide de solvants appropriés, également connus sous le nom de développeurs (Figure 29).

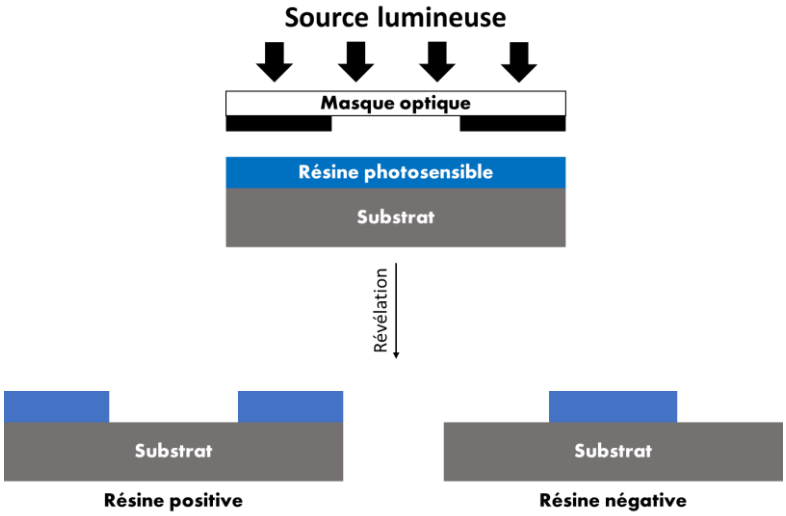

Figure 29 : Schéma du principe de la photolithographie.

Ce processus de photolithographie peut aussi se faire par un laser qui reproduit un motif préalablement dessiné dans un logiciel de modélisation. Cela permet d'offrir une plus grande variété dans les motifs photolithographiés. Pour la microstructuration sur PDMS par photolithographie directe, il est nécessaire d'utiliser des résines à base d'agents de couplage hybrides qui d'un côté ont une partie inorganique à base de siloxanes (R_2SiO) et de l'autre une partie organique à base

notamment d'époxydes ou de groupements vinyles. La partie inorganique présente des groupements chimiques proches de ceux du PDMS, ce qui permet de créer des liaisons covalentes entre la résine et le support en PDMS qui améliorent l'adhésion du polymère sur le silicone. Cette partie inorganique peut aussi se polymériser entre elle avec des étapes d'hydrolyse et de condensation. Ce mécanisme de polymérisation est expliqué plus en détail dans la partie suivante. Dans la partie organique, les groupements époxydes et vinyles peuvent eux aussi se polymériser entre eux et former un réseau suffisamment dense pour se durcir. Ils peuvent aussi réagir avec les groupement oxydés en surface de PDMS après traitement plasma, ce qui améliore d'autant plus l'adhésion du polymère sur le silicone. Parmi les hybrides couramment utilisés, on retrouve le VEPTES (4-vinyl ether-phenyltriethoxysilane)(244), le GPTMS (3-Glycidoxypropyltrimethoxysilane)(82,245), le MAPTMS (methacryloxy-propyl-trimethoxysilane)(246) et l'EETMOS (2-(3,4-epoxycyclohexylethyltrimethoxysilane))(247,248). Leur dépôt nécessite au préalable une activation de la surface du PDMS par un traitement plasma.

La plupart des recherches indiquent que l'exposition au traitement plasma provoque l'apparition d'une couche monomoléculaire composée de groupement silanol (Si-OH) en surface au détriment des méthyls ($-CH_3$) (249–252). Si le mécanisme précis de cette réaction est encore mal connu, de nombreuses études ont caractérisé les couches produites par le traitement plasma grâce à plusieurs techniques comme la Spectroscopie Photoélectronique X (XPS) (250,251), la Microscopie à Force Atomique (AFM) (253), la Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FITR) (250) et la Microscopie électronique à balayage (MEB) (252). Cette réduction de l'hydrophobicité est toutefois de courte durée puisqu'au bout de quelques heures le matériau retrouve ses propriétés initiales (250). Ce processus de rétablissement n'est lui non plus pas encore totalement compris et expliqué mais plusieurs hypothèses sont couramment acceptées dans le domaine (254): le déplacement des groupements polaires (hydrophiles) vers le centre du matériau au profit d'espèces non oxydées présentes dans le cœur du matériau, la condensation des groupements silanols en surface et la perte d'espèces fortes en oxygène vers l'environnement extérieur. Le traitement plasma peut également modifier la topographie de la surface du PDMS. Les espèces réactives du plasma peuvent provoquer la formation de microstructures, de nanostructures ou de rugosités sur la surface du matériau, ce qui peut avoir des effets significatifs sur les propriétés d'adhésion (255).

Après le dépôt, la solution contenant le précurseur hybride est activée par photolithographie ce qui crée une couche solide adhérente au PDMS. Cette couche est alors en 3D allant de la centaine de nanomètre jusqu'à plusieurs centaines de micromètre. Il est ainsi possible de créer toutes les formes imaginables sur la surface du PDMS avec des épaisseurs contrôlées et de manière répétable.

La plupart de ces hybrides sont très sensibles aux conditions de synthèse (température, acidité) et la méthode de synthèse doit donc être précautionneusement sélectionnée. Le procédé sol-gel, une méthode de synthèse de chimie douce, est en règle générale utilisée puisqu'elle permet notamment de travailler dans des conditions de température relativement basses permettant d'influer directement sur la polymérisation de la partie inorganique.

C) Le procédé sol-gel

Le procédé sol-gel est une méthode de synthèse permettant la polymérisation de molécules inorganiques ou hybrides organiques-inorganiques pour former un réseau polymérique, souvent à base de silice, grâce à la succession de deux réactions chimiques : l'hydrolyse et la polycondensation. Dans la plupart des cas, un alkoxyde couplé à un métal est utilisé comme précurseur (M-OR). En présence d'eau, le précurseur s'hydrolyse (M-OH) (Figure 30a). Ce sont ces espèces hydrolysées qui peuvent réagir entre elles pour former par polycondensation des réseau polymérique (Figure 30b).

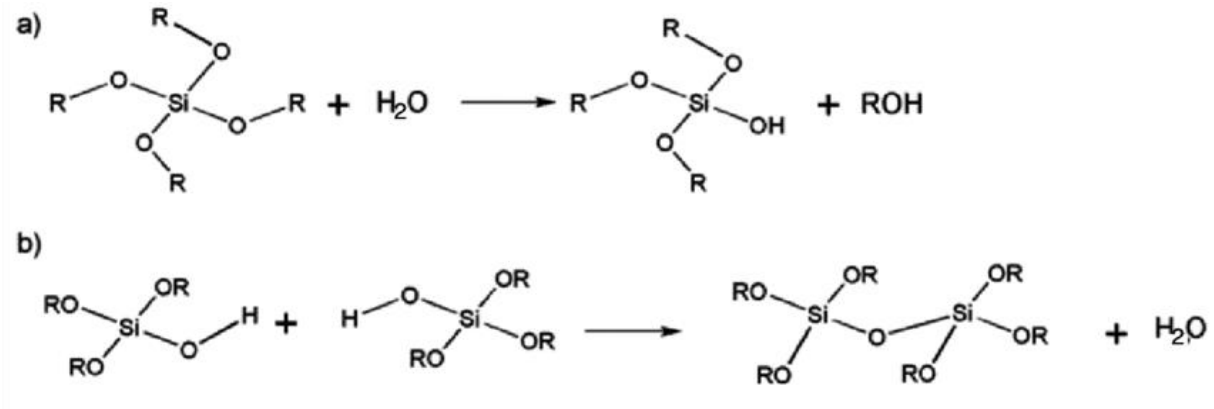

Figure 30 : Mécanisme de réaction du procédé sol-gel. a) hydrolyse et b) polycondensation d'un précurseur de silice.

Le procédé peut être catalysé en fonction du pH ce qui aura un impact direct sur la structure du gel final. En effet, en milieu acide, l'hydrolyse est favorisée et ainsi les molécules hydrolysées réagissent peu entre elles. A l'inverse, en milieu basique, c'est la polycondensation qui est favorisée et les premières molécules hydrolysées peuvent soit réagir entre elles (2 M-OH -> M-O-M + H2O), soit réagir avec le précurseur non-hydrolysé (M-OH + M-OR -> M-O-M + R-OH). Ceci à un impact sur la cinétique de la réaction mais aussi sur la texture de la solution finale. En effet, il a été montré qu'en milieu acide, les chaines de polymère créées avaient tendance à être linéaires alors qu'en milieu basique, les chaines sont plus ramifiées ce qui produit des gels plus denses (Figure 31)(256). En milieu acide, l'hydrolyse produit une espèce électrophile et sa réaction avec les molécules voisine est guidée par la gêne stérique. Ainsi, l'espèce réactive va attaquer la zone la plus libre, généralement en extrémité de chaine ce qui explique la formation de polymères linéaires. A l'inverse, en milieu basique, suite à l'hydrolyse, une espèce nucléophile est produite et elle va favoriser l'attaque vers laquelle l'intermédiaire de

réaction est le plus stable, donc celui où la charge peut se propager, généralement la macromolécule la plus ramifiée. En jouant sur le pH de la solution et la quantité d'eau dans le milieu, il est possible de créer des gels colloïdaux formés de particules distinctes les unes des autres (257).

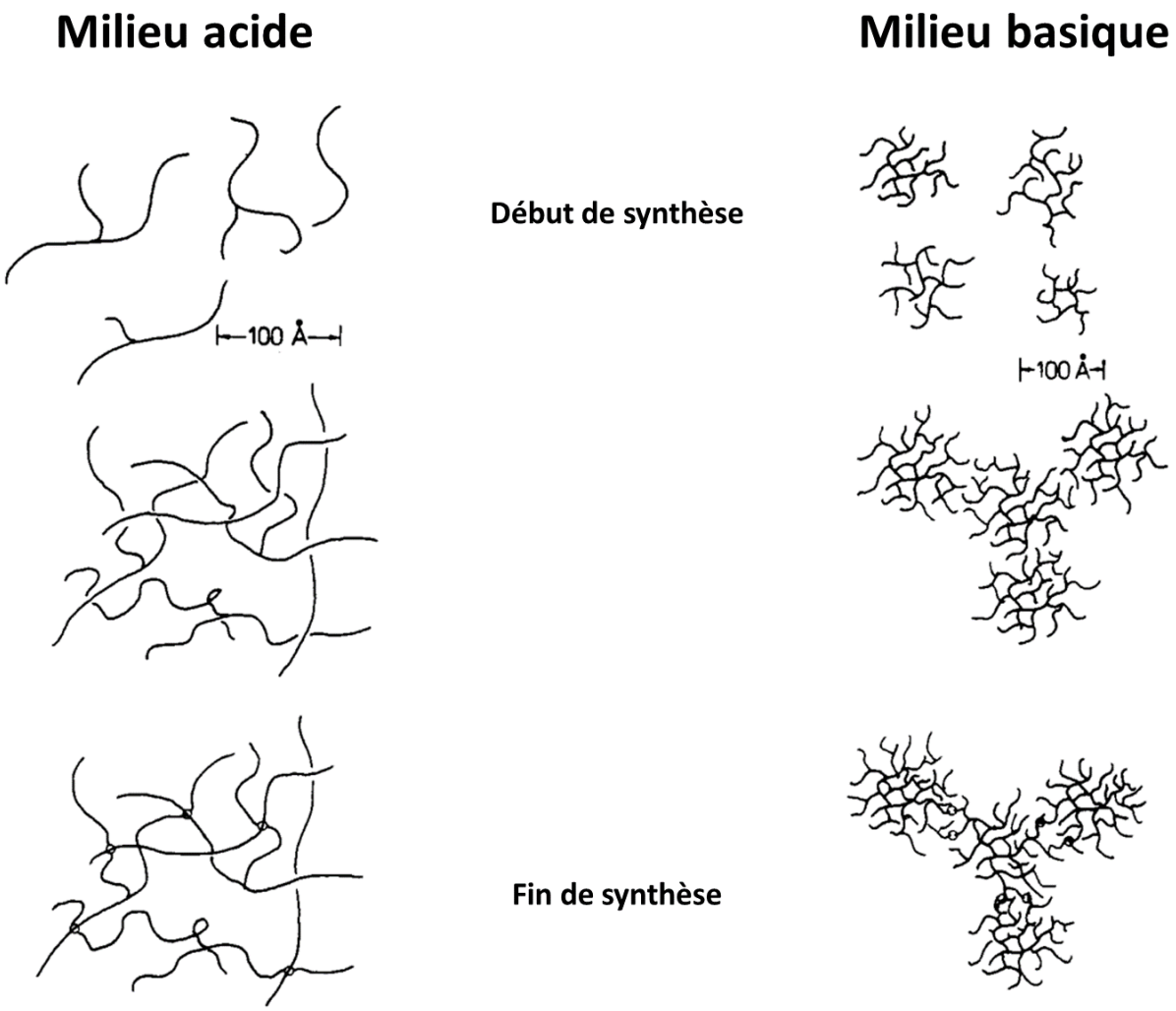

Figure 31 : Croissance polymérique et formation du gel en fonction du pH du milieu.

D) Photolithographie de l'EETMOS

L'EETMOS est le précurseur choisi pour être microstructuré dans la suite du projet. Pour pouvoir le déposer sur le PDMS et l'insoler sous forme de motif, l'EETMol doit être synthétisé. L'EETMol représente le produit de la synthèse par procédé sol-gel de l'EETMOS en présence d'eau dans un milieu acide. Si l'EETMol a entamé sa première polymérisation lors de la polycondensation, la polymérisation de sa partie organique, les époxydes, n'est pas directement enclenché lors du passage du laser UV. En effet, l'époxyde a besoin d'une espèce réactive (radicalaire, cationique ou anionique) pour entamer sa polymérisation. Le principe du photoamorceur est le même pour la génération des trois espèces réactives : la molécule absorbe un photon qui va interagir avec le nuage électronique et faire passer

un électron de son état fondamental vers un état excité. Si la molécule interagie avec d'autres molécules contenant des fonctions réactives (amines, sels d'iodonium...) le retour à l'état fondamental se fait par l'intermédiaire d'une réaction chimique à l'origine de l'espèce réactive (Figure 32).

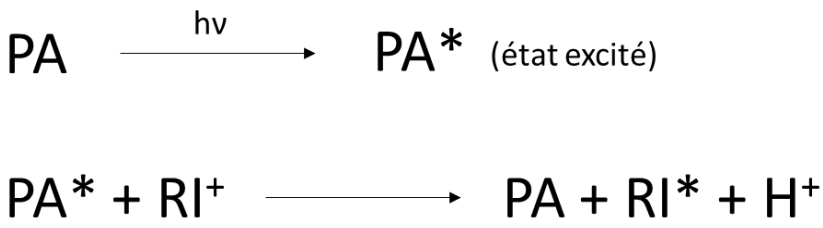

Figure 32 : Génération d'un cation (H+) par l'activation UV d'un photoamorceur (PA) avec l'aide d'un intermédiaire réactif (RI+).

L'espèce réactive, un cation ici, peu alors réagir avec l'époxyde, menant à une ouverture de cycle qui va produire une molécule cationique, elle-même à l'origine d'une seconde ouverture de chaine ce qui génère *in fine* le polymère (Figure 33).

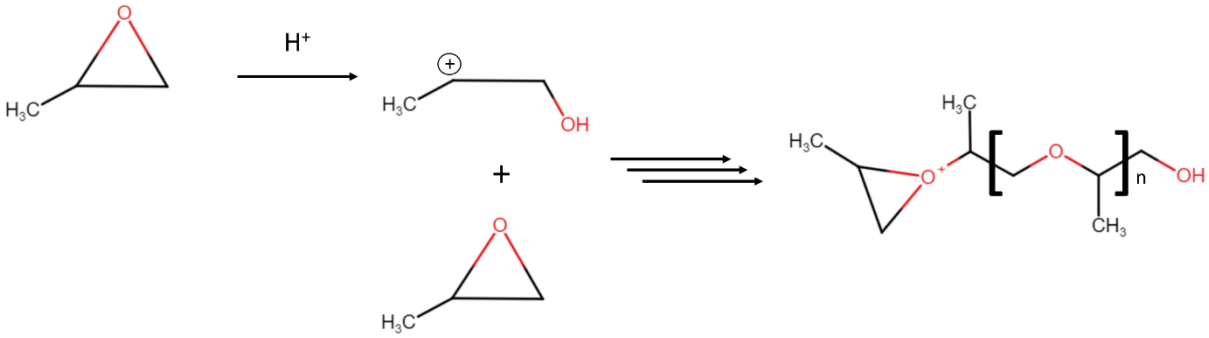

Figure 33 : Mécanisme d'ouverture de cycle et de polymérisation cationique d'un époxyde sans tenir compte de la stéréochimie.

E) La biofonctionnalisation du PDMS

Le PDMS est un matériau polymère connu pour son hydrophobicité intrinsèque, c'est-à-dire sa capacité à repousser l'eau. Cela pose des défis pour la culture cellulaire. Les cellules ont besoin d'une surface compatible pour adhérer et se développer correctement. De ce fait, sur le PDMS, les cellules adhèrent mal ce qui entraine une prolifération limitée. Pour surmonter ces limitations, la biofonctionnalisation du PDMS est souvent réalisée. La biofonctionnalisation du PDMS consiste à modifier chimiquement sa surface afin de le rendre plus compatible avec les cellules. Cela implique généralement le revêtement de la surface du PDMS avec des substances biocompatibles, telles que des peptides, des protéines ou des polymères extracellulaires. Ces revêtements bioactifs imitent les composants de la matrice extracellulaire naturelle et favorisent l'adhérence, la prolifération et la différenciation cellulaires.

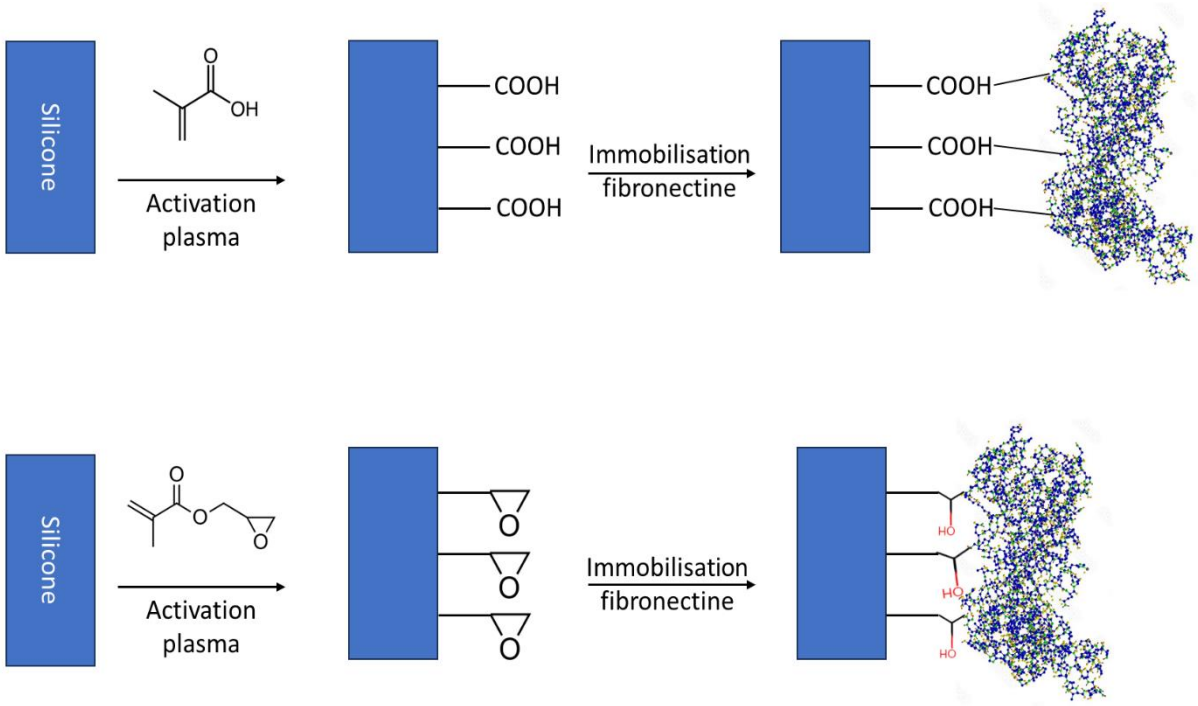

Figure 34 : Immobilisation de la fibronectine sur une membrane en silicone par l'acide métacrylique (en haut) et le métacrylate de glycidyle (en bas)

La technique la plus simple et la plus répandue est le revêtement avec des protéines de la matrice cellulaire. Le PDMS est enduit de protéines telles que la fibronectine (258), la laminine (259), le collagène (82,260,261) et le Matrigel® (48,71,77) afin de créer une matrice en surface favorisant l'adhésion des myoblastes en les éloignant du PDMS et de ses propriétés hydrophobes. Ces protéines sont connues pour favoriser le développent des myoblastes et notamment leur différenciation en myotubes. Comme expliqué précédemment, les hydrogels de manière générale offrent de nombreuses possibilités pour faire varier leur épaisseur, leur composition et leur rigidité (51). Cependant, dans le cas du collagène, la plupart des revêtements utilisés *in vitro* ne reproduisent pas le microenvironnement naturel des fibres musculaires puisqu'ils sont en général bien moins concentrés (<10 mg/mL contre 30 mg/mL dans la MEC du muscle) (262). De plus, cette faible concentration implique des propriétés mécaniques plus faibles avec risque de déchirement lors de l'application d'un stress mécanique induit par un système d'étirement (263). Il y a aussi le risque que, lors de l'étirement, le silicone soit étiré mais l'hydrogel se décolle ne subissant alors aucune contrainte mécanique à transmettre à la cellule musculaire mise en culture. Pour pallier ce décollement, une étape supplémentaire est régulièrement introduite avec notamment la présence d'une molécule intermédiaire qui va créer un lien covalent entre le PDMS et son revêtement. C'est ce que l'on retrouve chez Völcker et al. (258) qui ont immobilisé de la fibronectine sur du PDMS en utilisant 2 groupes d'intermédiaires différents : l'acide métacrylique qui forment en surface des groupements acides

carboxylique et le méthacrylate de glycidyle qui génère des groupements époxy. Ces deux fonctionnalisations étant favorables à la liaison covalente avec la fibronectine (Figure 34).

Deux autres intermédiaires souvent utilisés sont l'APTES et le polyéthylène-glycol. Ces revêtements génèrent respectivement des fonctions amines et hydroxyles en surface qui peuvent ensuite réagir avec de nombreux bio-composés (82,260,264). Siddique et al. (260) ont moulé un support en PDMS à l'aide d'un substrat microstructuré par photolitographie (résine SU-8) et ont ensuite collé le silicone coté sillon sur une lame de verre permettant de former un canal microfluidique (Figure 35). Ce système est ensuite activé par traitement plasma et enduit de collagène avec ou sans traitement à l'APTES, l'APTES étant déposé par trempage du système dans une solution diluée dans l'acétone. Pour tester la capacité d'adhésion cellulaire et la conséquence sur leur prolifération, ainsi que l'adhésion du collagène sur le PDMS, les auteurs ont fait passer du PBS dans les canaux à différents débits. Les résultats ont montré une meilleure prolifération sur le collagène avec APTES et une meilleure résistance au cisaillement induit par le flux de PBS dans le cas du collagène lié de manière covalente au PDMS.

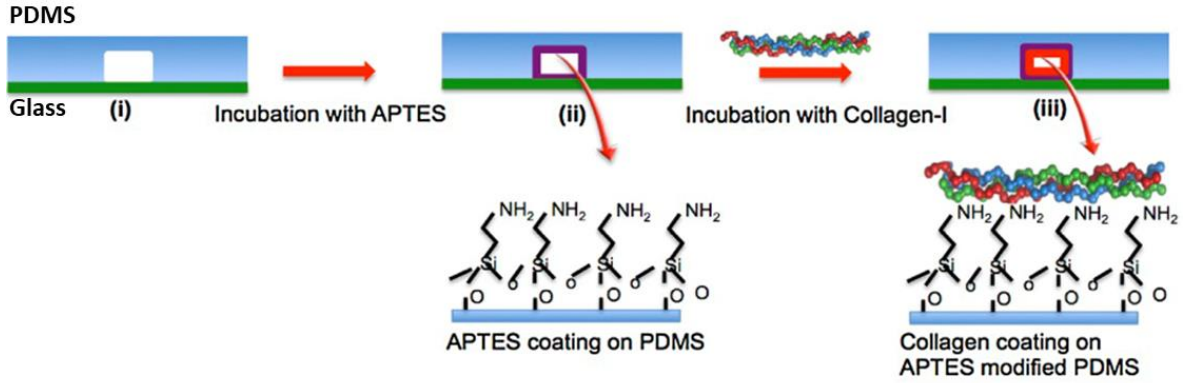

Figure 35 : La fonctionnalisation du PDMS par un hydrogel lié grâce à l'APTES.
Issu de (257)

LES SEQUENCES PEPTIDIQUES ISSUES DU VIVANT

Une autre méthode de biofonctionnalisation du PDMS consiste à greffer des peptides présents dans la matrice extra-cellulaires qui ont été reconnus comme favorisant l'adhésion des cellules. Pour cela, à l'image des hydrogels, il existe plusieurs techniques de fonctionnalisation (265):

a) L'adsorption qui consiste à déposer le peptide en surface. Yu et al. (266) ont activé le silicone par un traitement plasma puis ont déposé par dip coating une solution de peptides (Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Arg-Ala-Arg)$_2$) et ont laissé évaporer la solution pour obtenir une fine couche en surface. Le dip-coating est une technique de revêtement qui consiste à tremper un substrat dans un liquide à une vitesse contrôlée afin de maitriser l'épaisseur de la couche en surface en

fonction de la viscosité du coating. C'est une méthode très simple, répétable et qui permet d'obtenir des revêtements homogènes et sur des substrats de différentes formes et tailles.

b) Le greffage covalent à l'aide d'une molécule intermédiaire. Pinese et al. (267) ont synthétisé un peptide hybride contenant la séquence Palm-Arg-Arg-NH_2 connue pour ses propriétés antibactériennes et une terminaison silylée pour une application d'optimisation du revêtement des dispositifs médicaux implantables. Ainsi, après activation par traitement plasma du PDMS, les silanols formés en surface peuvent réagir librement avec les terminaisons silylées de l'hybride et ainsi former des liaisons covalentes Si-O-Si et fixant de ce fait le peptide en surface. Cette technique a été utilisée pour biofonctionnaliser un cathéter et les auteurs ont montré une activité antibactérienne prolongée sur 4 semaines.

c) La synthèse du PDMS contenant directement le peptide dans la base. Martin et al. (268) ont synthétisé un PDMS contentant directement soit la séquence peptidique RGD (Arg-Gly-Asp) connue pour favoriser l'adhésion cellulaire soit un peptide ayant des propriétés antibactériennes. Les auteurs ont montré l'homogénéité de la distribution du peptide dans l'huile de silicone synthétisée en fonction de la concentration grâce à une hybridation avec la fluorescéine. En faisant varier la concentration en peptides dans l'huile, les résultats obtenus ont montré un niveau satisfaisant des propriétés antibactériennes du PDMS créé mais aussi une très bonne adhésion des fibroblastes sur le PDMS biofonctionnalisé avec la séquence RGD.

Les trois méthodes de fonctionnalisation grâce aux peptides sont illustrées en Figure 36.

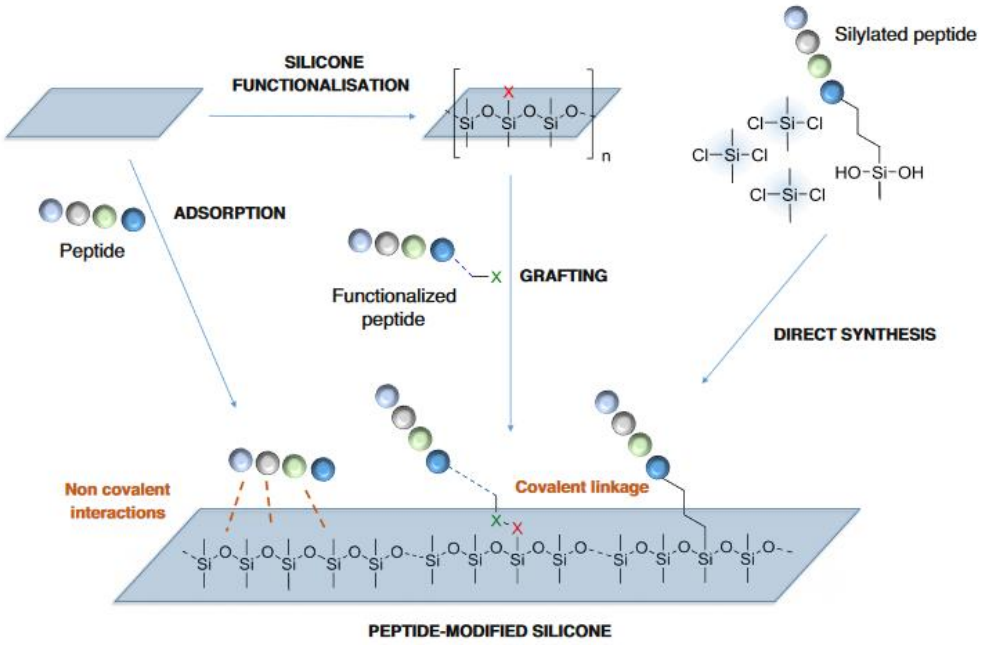

Figure 36 : Les méthodes de biofonctionnalisation du PDMS avec des peptides d'adhésion. Issu de (265)

Parmi les peptides les plus couramment utilisés, on retrouve donc la séquence RGD (Arg-Gly-Asp) (259,269–273), mais aussi la séquence YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-Cys) (259,272,274) et la séquence IKVAV (Ile-Lys-Val-Ala-Val) (273,275,276). La séquence RGD reste la plus employées et beaucoup d'étude ont été développées pour synthétiser des dérivés de plus en plus efficaces en complétant la séquence peptide avec d'autres acides aminés ou en modifiant la stéréochimie des ligands (277–279).

La concentration des séquences peptidiques utilisées joue également sur le niveau de biofonctionnalisation qui module l'adhésion cellulaire et la différenciation des myoblastes (270,278). Ainsi, Rowley et al. (270) ont biofonctionnalisé des gels d'alginates avec la séquence RGD et ont paradoxalement montré un effet négatif de la concentration sur la qualité de la biofonctionnalisation. En effet, cette étude a montré que plus la concentration des peptides RGD est importante, moins les myoblastes C2C12 ont la possibilité de se propager dans la matrice. Il semblerait que la réponse à la modulation d'intensité du réseau cellulaire, induit par des concentrations différentes de peptides soit dépendante du type cellulaire. En effet, des études antérieures sur hépatocytes et des cellules endothéliales montrent une réponse opposée face à l'augmentation de la densité peptidique (280). Le type cellulaire n'est pas seul en cause. L'hydrogel utilisé intervient également dans cette réponse cellulaire à différent niveau de concentration de peptides (106).

En accord avec ces constations, Santos et al. (278) , ont fait varier la densité de peptides RGD dans leurs gels d'alginate et ont montré qu'une trop grande densité de peptide, bien qu'elle permette aux cellules de s'allonger grâce à l'augmentation des points d'attache, pourrait avoir un impact négatif sur la prolifération. Dans le modèle idéal, la densité des peptides RGD serait donc différente entre l'étape de prolifération et de différenciation, ce qui, expérimentalement, est difficile à mettre en place.

Partie expérimentale

L'objectif principal du projet est de mettre en place un modèle musculaire *in vitro* permettant d'évaluer l'effet de l'étirement sur les myotubes humains. Le projet est subdivisé en 3 sous-objectifs : le premier consiste à la production d'un support flexible en silicone présentant des microstructures en surface. Ces microstructures servent ensuite de guide pour les myoblastes afin qu'ils se différencient et fusionnent en myotubes alignés entre eux. Le deuxième sous-objectif consiste à s'assurer que les myotubes aient une bonne adhérence sur le support microstructuré. Ceci avec l'objectif que les myotubes soient suffisamment accroché au silicone pour ne pas se décoller lors de l'étirement mécanique. Enfin le dernier sous-objectif est la mise en place d'un protocole d'étirement en contrôlant les différents paramètres (amplitude, fréquence, durée) de telle sorte à avoir un effet sur la différenciation et la maturation des myotubes.

Matériels et Méthodes

Purification et culture des myoblastes humains primaire

Les myoblastes primaires humains nécessaires et cette étude ont été isolés et mis en culture à partir de biopsies de quadriceps d'adultes jeunes sans pathologie musculaire et suivis au CHU de Montpellier (France) après accord du comité d'éthique. Les biopsies musculaires (environ 50 µg) ont ensuite été découpées et mises en boites de culture recouvertes avec du Matrigel®. Les tissus ont ensuite été purifiés selon un protocole classiquement utilisé dans l'équipe de PhyMedExp grâce au tri cellulaire magnétique en ciblant le marqueur CD56+ afin d'obtenir une solution de cellules satellites musculaires humaines (281). Ce pool de cellule est alors mélangé dans une solution de sérum de veau fœtal (SVF) dilué dans du DMSO (diméthysulfoxide) et congelé progressivement à -80°C (Mr. Frosty™, Nalgene Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Avant chaque culture cellulaire, les myoblastes sont préalablement décongelés et ensemencés dans une boite de Petri recouverte avec du collagène. Les membranes microstructurées sont nettoyées à l'éthanol, déposées dans des boites de Petri et stérilisées sous exposition aux rayons UV pendant 15 min. Dans un premier temps, les cellules sont cultivées sur des membranes déposées dans des boites de Petri de 35mm avec une concentration de 10^5 cellules par boites. Dans un second temps, des boites de 12 puits sont utilisées en gardant la concentration de 10^5 cellules par puits. Les cellules sont cultivées dans du DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) avec 10% de SVF, 0,2% d'Ultroser G et 0,2% de facteur de croissance humain à 37°C dans un air humidifié à 95% et une teneur en CO_2 de 5%. Après 3 jours la confluence est généralement atteinte et le milieu de culture est renouvelé avec une solution de DMEM/F12 et 5%

SVF pendant 3 à 5 jours. Dans le cadre de ce travail, lorsque les membranes sont soumises à un étirement mécanique, afin de stimuler la différenciation des myoblastes primaires humains, le milieu DMEM/F12 et 5% SVF est renouvelé.

Coatings avec du Matrigel®

Pour favoriser l'adhésion cellulaire, les supports microstructurés peuvent être recouverts d'un hydrogel. Pour cela, 4 mL une solution de Matrigel® (Corning, New York, NY, USA) à 5µg/mL est versée sur les membranes préalablement déposées dans une boite de Petri de 35mm de diamètre. La boite est introduite dans un incubateur pendant 4h de telle sorte à former théoriquement une couche de quelques micromètres en surface des membranes microstructurées. Cette couche reste cependant plus fine que les microstructurations c'est-à-dire inférieure à 10µm.

Immunofluorescence

Les myotubes obtenus par culture sur support microstructuré sont lavés dans une solution de PBS à 1% BSA et fixés dans une solution de paraformaldéhyde à 2%, puis perméabilisés dans une solution de PBS + 0,25% Triton X-100 à température ambiante. Les myotubes sont ensuite incubés avec un anticorps de souris monoclonal anti-Troponin T (1/200 ; Sigma-Aldrich) ou anti-α-actinine (1/200 ; Sigma-Aldrich) ou anti-desmine (1/200 ; Sigma-Aldrich) pendant 3h. Les myotubes sont ensuite incubés avec des anticorps secondaires de chèvre/singe/âne anti-souris avec un marqueur fluorescent (350 / 647 nm) (1/100 ; Thermo Fisher Scientific). Les noyaux sont marqués au DAPI (4,6-diamidino-2-phénylindole) qui se lie aux bases adénine et thymine de l'ADN et les myotubes sont figés puis observés au microscope à épifluorescence Zeiss.

Analyse d'image

L'analyse des images d'immunoflurescence est effectuée sur le logiciel ImageJ. Les noyaux positifs au marqueur DAPI sont comptés sur chaque image ayant toutes la même taille pour comparer chaque condition. Le marquage à la Troponine T révèle la présence de protéines structurelles à l'intérieur du myotube. Ce marquage permet donc de montrer les myotubes différenciés pour ensuite déterminer le diamètre et la densité des myotubes, correspondant à la surface totale occupée par les myotubes sur chaque image. On définit l'index de fusion comme le rapport entre le nombre de noyaux présents dans les myotubes marqués à la troponine T par le nombre de noyaux totaux sur chaque image. L'angle d'orientation des myotubes est, quant à lui, mesuré en comparant l'axe de chaque myotube avec un axe vertical représenté par les microstructures qui sont naturellement fluorescente dans l'UV.

Test statistique

Le nombre de noyaux, l'index de fusion, la densité de myotubes et le diamètre de ces derniers sont soumis à un t-test de student pour une distribution non-paramétrique car il se base sur la comparaison de moyennes entre deux groupes statistiques. Les résultats sont présentés en moyenne ± l'écart-type sur l'ensemble des valeurs mesurées. La significativité est définie avec un p-value < 0,02 (soit un risque de 2%).

Extraction de l'ARN et RT-qCRP

Les membranes sur lesquelles se sont développées les myotubes sont lavées au PBS et 1mL de TRIzol est rajouté permettant de déprotéiner et ainsi isoler l'ARN. Après plusieurs cycles de centrifugation (3 min,10 000g, température ambiante), le surnageant est récupéré puis mélangé avec 0,2mL de $CHCl_3$. L'Eppendorf est agité vigoureusement et centrifugé une nouvelle fois (15min, 10 000g, 4°C). Dans le tube, deux phases se sont formées, au-dessus la phase aqueuse contenant l'ARN, en dessous la phase organique contenant l'ADN et les autres composants cellulaires et à l'interface se situent les protéines. La partie supérieure est donc récupérée sans polluer la solution avec les protéines et 0,5mL d'isopropanol sont introduit pour précipiter les ARNs. La solution est incubée pendant une nuit à -20°C pour favoriser le processus de précipitation qui forme un culot blanc au fond du tube. Le surnageant est enlevé et 1mL d'éthanol à 75% est ajouté pour laver les ARNs puis la solution est centrifugée (5min, 7500g, 4°C). L'éthanol (= le surnageant) est alors retiré et l'ARN est séchée à l'air libre sous hotte pendant 1h. Les ARNs sont enfin solubilisés dans 20µL d'eau ultrapure pendant 4h à 4°C. La solution est congelée à -20°C si le dosage d'ARN n'est pas effectué dans la foulée. Le procédé de transcription inverse est réalisé sur 500 ng d'ARN en utilisant un kit Takara (Takara Bio Europe, France) et la RT-qPCR est effectuée dans le LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science, France).

Les ARNs sont amplifiées en utilisant les amorces regroupées dans le tableau 9.

Tableau 9: Séquence nucléotides des amorces utilisées durant le projet de thèse.

Nom du gène	Séquence de l'amorce	
	Sens	Anti-sens
MHC Ib	GCCGAGTCCCAGGTCAACAAG	TGAGCAGATCAAGATGTGGCAAAG
MHC IIa	TTTGTGCCTGTCTTCAGTCATTCC	TTGCTGAGTCCCAGGTGAACAA
MHC IIx	CTGAGGGTGAAGAGCAGGGAGGT	TTTTCACATTTTGTGCATTTCTTTGG
MyoG	ACCCCGTTCTATGATGG	ACACCGACTTCCTCTTACACA
Acta1	GACTTCTCAGGACGACGAATC	CATTTTCTTCCACAGGGCTT

Synthèse et Greffage des peptides

La synthèse des peptides est résumée dans un article de Pinese et al. (267) et présentée en annexe (Annexe 1). Brièvement, par un enchainement de protections et de déprotections de groupements chimiques, des acides α-aminés sont liés entre eux dans un ordre précis pour former des macromolécules en 3D. Une fois le peptide formé, ils sont fonctionnalisés avec des groupements silylés Les différentes séquences peptidiques sont ensuite silylées en extrémités de chaines pour permettre l'adhésion avec le PDMS. Une fois synthétisés, les peptides silylés sont conservés sous vide pendant quelques jours. En présence de l'humidité dans l'air, les groupements Si-OR peuvent se condenser entre eux produisant des liaisons Si-O-Si et former des agrégats insolubles en milieu acide. Dans ce cas, il est nécessaire de resolubiliser les peptides dans une solution basique et de les faire précipiter pour obtenir des peptides à nouveau solubles en milieu acide.

Les peptides sont pesés et solubilisés dans une solution d'eau à 1% d'acide trifluoroacétique (TFA) / éthanol (15/85) de telle sorte à obtenir une concentration de 2 et 15 mmol/L pour les solutions de différents peptides. Le peptide RGD sélectionné pour le reste des expériences, a été préparé en plusieurs concentrations de 1, 10, 20 mg/mL soit respectivement 0,97, 9,7 et 19,3 mmol/L. Les membranes en silicones ont été ensuite activées par traitement plasma (100% O_2 ; 0,6 mbar ; 13,56Hz ; 80W ; 1 min) et greffées par le processus de dip-coating (montée et descente à 5cm/min). Les membranes fonctionnalisées ont été ensuite laissées à 50°C pendant 24h pour accélérer la création des liaisons covalentes entre les peptides et le PDMS. L'excédent de peptide a été retiré en les nettoyant avec une solution d'eau/éthanol (30/70). Ces membranes peuvent être conservées plusieurs jours puisqu'une liaison covalente est créée entre les peptides et le silicone.

Méthode de caractérisation des couches de peptides

Les images AFM ont été obtenues sur le Step 700 équipé un système AFM (Anton Paar GmbH, Autriche) en mode contact sur une surface d'analyse de 40x40µm². Chaque échantillon a été analysé en 3 points distincts à l'intersection entre la partie biofonctionnalisée et nue des membranes.

Les analyses XPS ont été effectuées par l'équipe BIND de Vincent HUMBLOT au CNRS de Besançon. Les 6 échantillons ont été envoyés et analysés selon la méthode décrite en Annexe 2.

Résultats et Discussion

La mise en place du modèle *in vitro* s'est faite pour en tenter de répondre à plusieurs problématiques à la fois. La première concerne la microstructuration et les outils disponibles pour produire des supports qui sont à la fois flexibles et biocompatibles. La deuxième se focalise sur les caractéristiques topographiques optimales de ces supports pour favoriser au mieux l'alignement des myotubes humains obtenus en culture. La troisième porte sur l'optimisation de l'adhésion des myoblastes humains sur leur support microstructuré afin d'éviter tout décollement lors d'une application d'un stress mécanique de tension. Enfin, la dernière problématique évalue l'effet d'un étirement mécanique sur la prolifération et la différenciation des myoblastes primaires humains.

Chapitre 1 : Comment microstructurer un support flexible ?

Le choix du PDMS en tant que support de base a été choisi pour ses propriétés de biocompatibilité, de résistance mécanique, c'est-à-dire qu'il peut soutenir des forces suffisamment importantes pour être étiré sans rompre, tout en gardant une certaine flexibilité et de stabilité chimique permettant de le fonctionnaliser.

Il existe plusieurs techniques pour microstructurer le PDMS comme le micro-wrinkling et la gravure au laser (Etude bibliographique, Chapitre 4). Cependant, la première technique présente souvent des problèmes de reproductibilité et la seconde nécessite du matériel de pointe. Dans le cadre d'un prototypage, la mise au point d'un support par ces techniques est onéreuse pour changer les différents paramètres topographiques. La gravure pourrait être plutôt envisagée une fois que le modèle est optimisé et qu'il faut produire des supports en masse. Une autre méthode consiste en un dépôt sur le PDMS d'un second polymère qui vient se greffer de façon covalente sur ce dernier et qui peut être microstructuré selon la topographie voulue. Cette seconde technique a été choisie et mise en place avec l'utilisation de l'EETMOS, un précurseur organominéral hybride qui présente une partie organique qui peut se solidifier par polymérisation et une partie minérale à base de silicium qui peut se lier de façon covalente avec le PDMS lorsqu'il est activé par traitement plasma et qu'il présente en surface des groupements -OH. Mais l'EETMOS en tant que tel ne peut pas être utilisé directement pour être microstructuré sur le PDMS. Il doit être activé par synthèse sol-gel pour former un sol, l'EETMol, dans lequel est ajouté un mélange de photoamorceurs pouvant ensuite être activé par un laser. Cette activation va polymériser la solution selon des motifs précis par photolithographie et est à la base de la microstructuration.

A) Synthèse de l'EETMol par procédé sol-gel

L'EETMol représente le produit de synthèse sol-gel de l'EETMOS (2-(3,4 epoxycyclohexylethyltrimethoxysilane) en milieu acide. Le protocole de synthèse est décrit dans un brevet de Ballet et al. (282). L'amorceur hybride est dilué dans une solution d'éthanol anhydre à 50% en masse puisqu'il n'est pas soluble dans l'eau. Une solution d'acide chlorhydrique à 0,1N est ensuite ajoutée goutte à goutte dans la solution pour activer le processus d'hydrolyse du précurseur hybride (création des groupements Si-OH). Ce mécanisme est poursuivi grâce à la présence d'eau dans la solution d'acide avec un ratio moléculaire [EETMOS : eau] = [1 : 10]. La solution est ensuite chauffée à 60°C en milieu fermé et maintenue à cette température pendant 4h sous agitation pour catalyser la réaction. En parallèle de l'hydrolyse, l'étape de condensation a lieu (Figure 37).

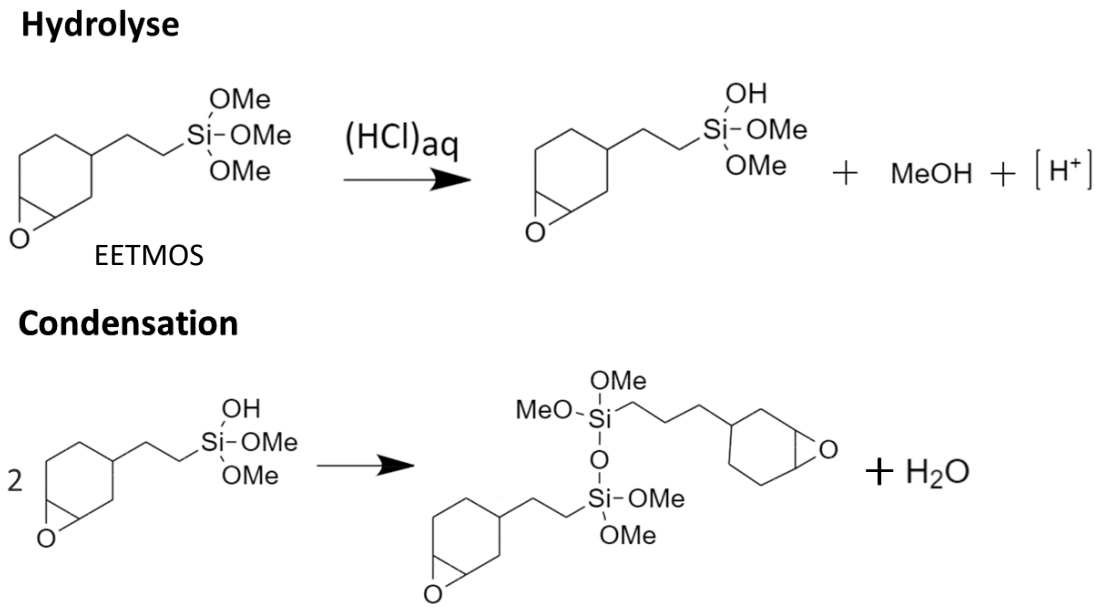

Figure 37 : Mécanisme de synthèse de l'EETMol par procédé sol-gel.

Enfin, la solution contenant les précurseurs condensés entre eux est concentrée pour faire évaporer les solvants les plus volatiles. La pression est réduite en passant de 1 bar (pression atmosphérique) à 75 mbar en utilisant un rotavapor avec un bain à 60°C. Cette étape permet d'obtenir des solution dont la concentration atteint 75% en masse d'EETMol. La concentration a un effet sur la viscosité et donc sur la capacité d'application de la couche par spin coating. Maitriser la concentration, c'est aussi s'assurer de la répétabilité de la solution entre chaque synthèse. En parallèle de cette réaction, Omnirad CPTX et Omnicat 250, les deux photoamorceurs, sont solubilisés dans du Dowanol® à respectivement 1.5% et 5% en masse de la quantité d'EETMOS, rendant ainsi ce polymère sensible à

la lumière UV. Le premier est un photosensibilisateur qui va être activé en présence d'une source UV à 375nm générant ainsi des radicaux en solution. Le second est un photo-initiateur qui va réagir avec ces radicaux pour former des acides (Figure 38a) à l'origine de la polymérisation des groupements époxydes de l'EETMOS (Figure 38b). La solution est mélangée sous ultrasons pendant 30 min à 50°C puis 4h sous agitation à température ambiante. Une fois que la solution d'EETMol est concentrée et refroidie, 35% en masse d'EETMOS de la solution de photoamorceurs est ajouté pour obtenir un produit liquide jaune visqueux. La solution d'EETMol peut être conservée à -15°C pendant plusieurs jours. Une fois la solution d'EETMol produite, elle doit ensuite être déposée sur le PDMS. Pour cela, ce

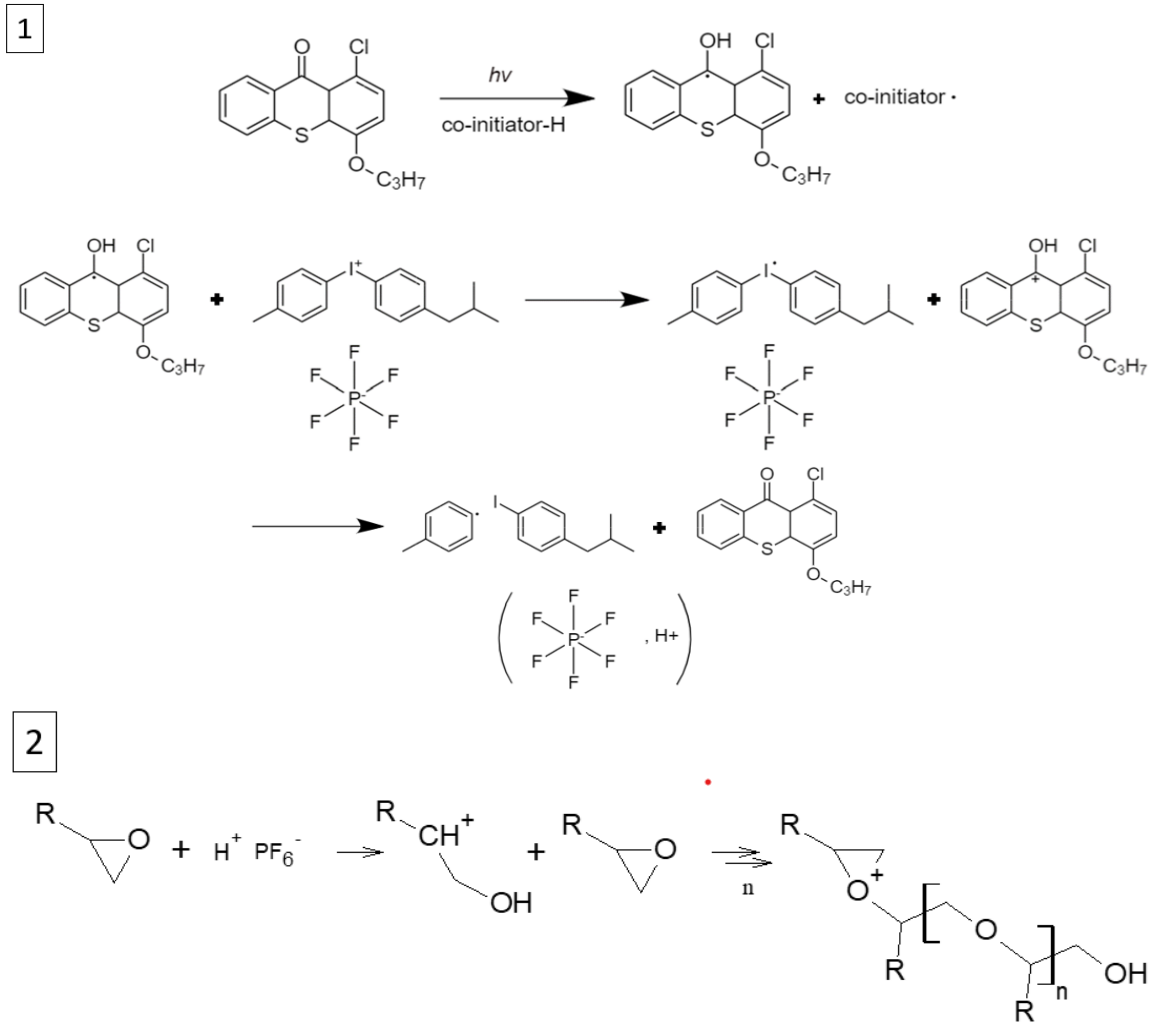

Figure 38: Mécanisme d'activation de la polymérisation de l'EETMOS. 1) Activation du premier photoinitiateur par énergie UV puis transfert du radical vers le second photoinitiateur qui produit un acide. 2) Polymérisation des groupements époxydes en milieu acide.

dernier doit tout d'abord être activé par un traitement plasma pour permettre l'adhésion avec le polymère.

B) Activation plasma du PDMS et dépôt de l'EETMol

Le PDMS utilisé est une membrane Flexer® (Flexcell Company). La membrane en silicone est nettoyée à l'éthanol puis introduite dans une chambre à plasma Diener Electronic. Un flux à 100% d'oxygène est introduit à une pression partielle de 0,6 mbar. Un champs magnétique avec une fréquence de 13,56Hz est imposé avec une puissance de 80W. Les membranes sont activées pendant 1 minute, ce qui est

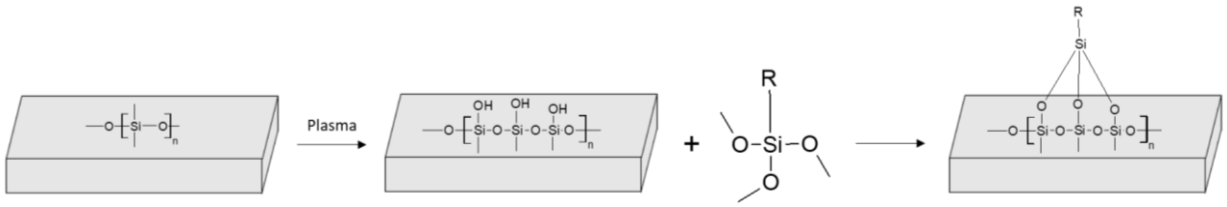

Figure 39 : Activation du PDMS par un plasma d'oxygène.

suffisant pour générer des groupements -OH en surface (Figure 39). Puisque le processus d'activation du PDMS est réversible, la solution d'EETMol est immédiatement déposée sur la membrane par spin coating (Suss Microtec).

Les paramètres de spin coating, ont été précédemment optimisé durant le projet de thèse d'Aurélien Flatres (283) pour obtenir une couche homogène d'environ 10 µm. L'épaisseur de la couche dépend de 2 paramètres : la vitesse de rotation et la viscosité de la solution. Plus la rotation sera élevée, plus le film sera fin. A l'inverse, plus la solution sera visqueuse, plus la couche sera épaisse. (Figure 40). Dans l'hypothèse de départ, les microstructures ont pour objectif de guider les myoblastes pour qu'ils s'alignent entre eux afin de fusionner en myotubes parallèles les uns aux autres. Il n'y a donc pas la nécessité de les restreindre en produisant des murs plus épais qu'un noyau cellulaire. C'est pourquoi, l'épaisseur moyenne de la couche initiale a été fixée entre 8µm et 10µm, ce qui correspond au diamètre moyen d'un noyau cellulaire.

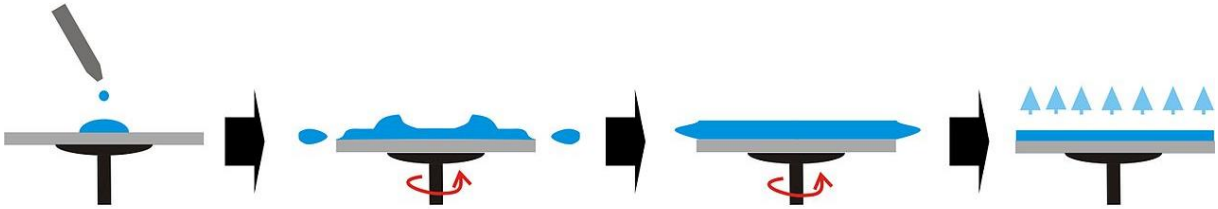

Figure 40: Principe de fonctionnement du dépôt par spin-coating. Quelques gouttes de solution sont déposées sur le substrat. Celui-ci est mis en rotation avec une vitesse contrôlée et par effet centrifuge, l'excès de solution est éjecté sur les côté pour finalement obtenir une couche homogène avec une épaisseur contrôlée. Une fois cette couche créée, le substrat est introduit dans un four pour une étape de « soft-bake » qui permet de faire évaporer les traces de solvant.

Quelques gouttes d'EETMol sont déposées sur la membrane en silicone et celle-ci est alors mise en rotation à 3250 tours/min pendant 20 secondes (accélération en 3 secondes et décélération 7 secondes). Le film d'EETMol est alors préchauffé à 50°C pendant 5min. Cette étape de « soft-bake » a pour objectif de faire évaporer une partie du solvant comprise dans la couche et d'améliorer l'adhésion

sur le silicone en favorisant la création de liaison covalentes Si-O-Si. Une fois la solution déposée sur le silicone, l'EETMol peut être microstructuré par photolithographie.

C) Photolithographie UV de l'EETMol

La photolithographie UV se fait grâce à une machine d'écriture laser (Dilase 650, KLOE France) (Figure 41). Le système consiste en un ensemble de miroirs servant à focaliser le laser en un point précis tout en permettant de visualiser la trace à travers un microscope pour que l'utilisateur puisse s'assurer du bon fonctionnement de la machine. Le substrat est quant à lui déposé sur un plateau motorisé qui peut être contrôlé selon les axes x et y. Il est important que l'échantillon reste bien en place pendant l'écriture, c'est pourquoi un système d'aspiration est appliqué à travers le plateau motorisé.

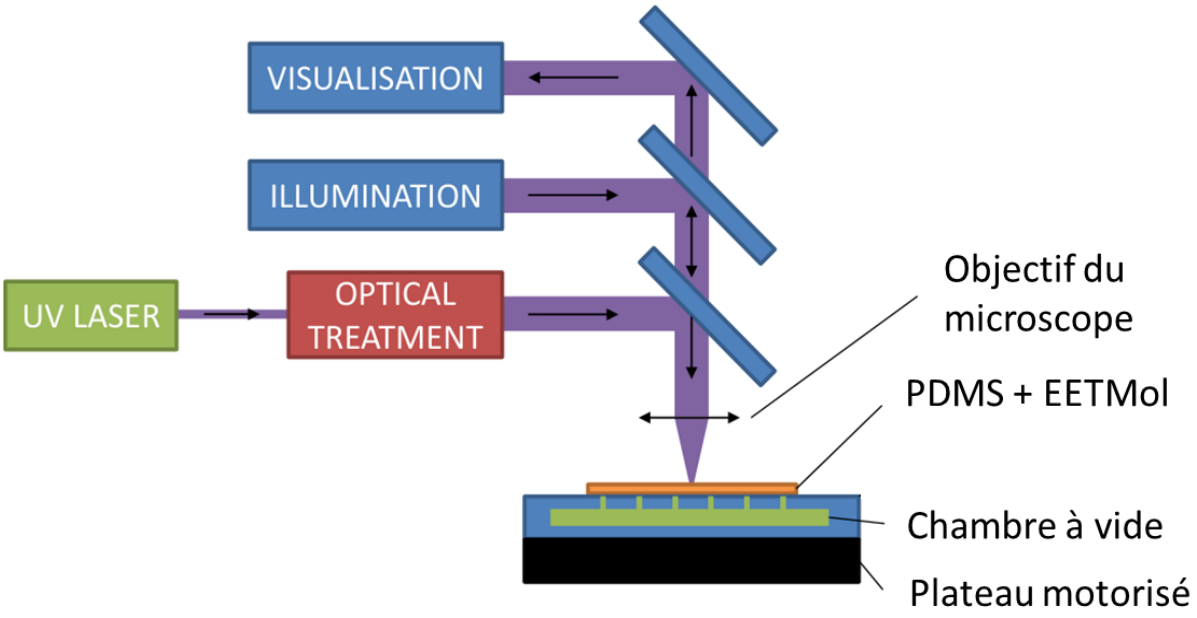

Figure 41 : Principe de fonctionnement de la Dilase 650.

Dans un premier temps, des lignes parallèles d'une longueur et d'un espacement désiré sont modélisées grâce à un logiciel de DAO (Dessin Assisté par Ordinateur, KLOE SA software). Ce dessin est ensuite transféré directement à la Dilase pour être reproduit sur le dépôt. Le système est équipé d'un laser d'une longueur d'onde de 375nm avec une intensité de 100mW et un diamètre de 2µm. Lors de la photolithographie sur le dépôt d'EETMol (et sur tous les dépôts de manière générale), il est nécessaire de prendre en compte plusieurs paramètres pour obtenir des motifs précis et répétables. Dans un premier temps, la hauteur du point focal joue un rôle sur la résolution du motif, c'est-à-dire pour s'assurer que le diamètre du laser (ici 2 µm) soit au mieux reproduit sur le dépôt. Pour obtenir un motif le plus résolu possible, le point focal du laser doit se trouver au centre de l'épaisseur du film

(Figure 6). Sur cette figure, des croix ont été modélisées grâce au logiciel de DAO et le motif a été écrit avec la Dilase en faisant varier la hauteur du point focal de Δz.

Si ce point focal est situé en dessous du film, le dessin présentera une forme en ∨ (partie gauche de la Figure 42) tandis que si le point focal est situé au-dessus du film, celui-ci présentera une forme ∧ (partie droite de la Figure 42). Ces formes sont cependant théoriques et dans la plupart des cas un simple élargissement des motifs est observé (extrémités de la frise jaune de la Figure 42).

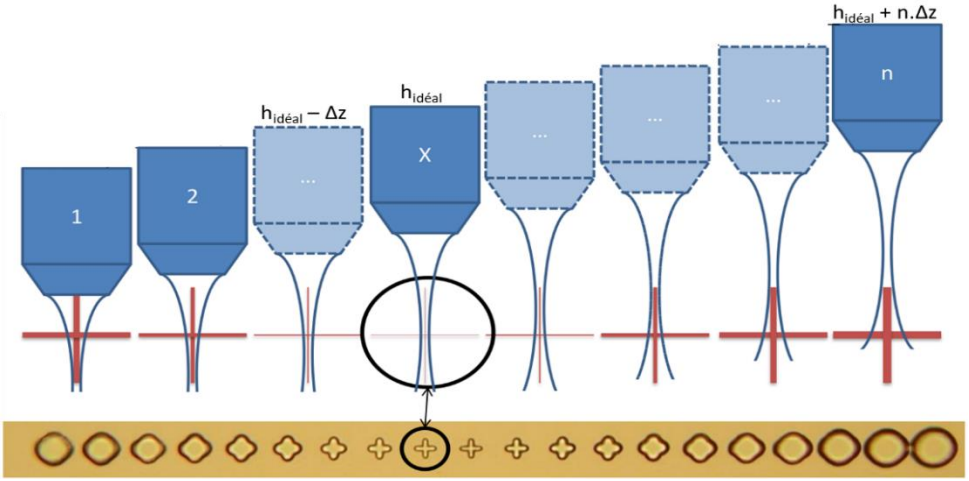

Figure 42 : Effet de la hauteur du point de focus sur la résolution du motif.

L'autre paramètre est la dose d'énergie appliquée au point focal. Ce paramètre se contrôle par la vitesse d'écriture (Figure 43a) et la puissance du laser (Figure 43b). Lorsque la vitesse est faible, le laser reste plus longtemps sur la zone du motif ce qui, par effet de dispersion de la lumière, active une partie plus large du motif. Le diamètre d'un faisceau laser est dépendant de la densité de puissance. Plus celle-ci sera importante, plus le diamètre sera large, ce qui explique les lignes plus épaisse alors que le point focal en z n'est pas changé.

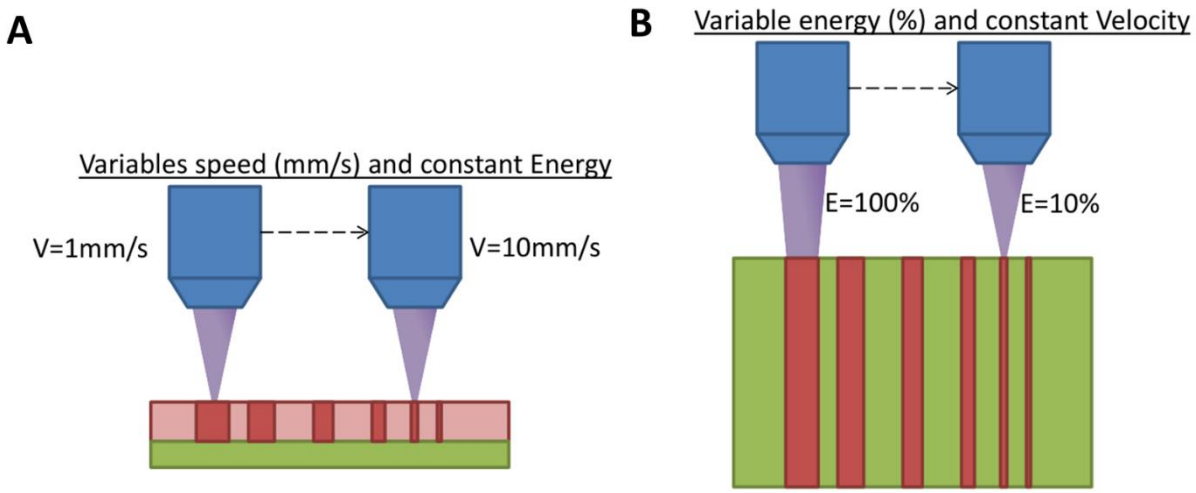

Figure 43 : Effet (A) de la vitesse d'écriture et (B) de la puissance du laser sur la résolution du motif.

La synthèse sol-gel suit un protocole précis et cadré mais une très légère modification des conditions environnementales (taux d'humidité, température extérieure) peut avoir des conséquences sur la solution finale d'EETMol comme la viscosité car cela peut impacter les étapes d'hydrolyse et de condensation. Ainsi, pour s'assurer que l'écriture au laser reste la plus précise possible, un essai de mise au point pour déterminer les valeurs optimales de hauteur de focus, de vitesse d'écriture et de

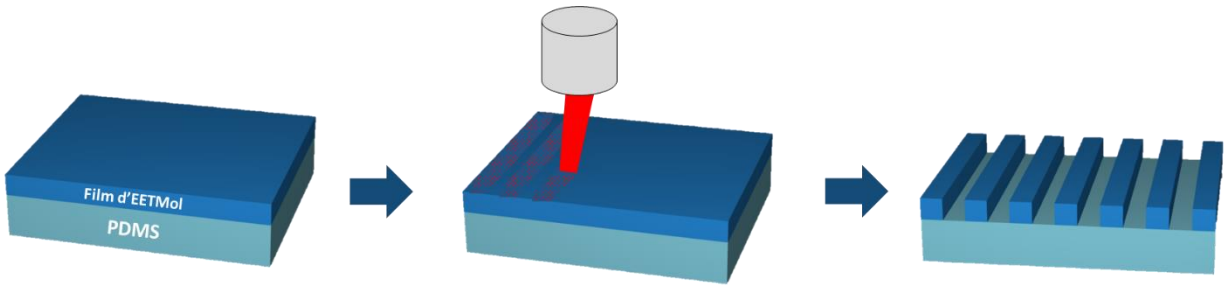

Figure 44: Photolithographie UV du film d'EETMol sur le PDMS. Après dépôt du film d'EETMol sur la membrane en PDMS par spin coating (à gauche), il est activé par photolithographie UV (au centre) et après un passage à 80°C pendant 15min et un lavage dans un bain d'isopropanol, les microstructures d'EETMol sont révélées (à droite).

puissance du laser est effectué. Une fois ces paramètres optimisés, le motif est dessiné sur le dépôt et le support est introduit dans un four à 80°C pendant 15min pour favoriser la polymérisation des chaines époxydes qui viennent d'être activées et donc de favoriser la solidification du polymère. Les membranes sont enfin plongées dans un bain d'isopropanol de telle sorte à graver les échantillons. L'EETMol non-polymérisé est soluble dans ce solvant ce qui permet d'obtenir des lignes d'EETMol polymérisé sur une membrane en silicone nu (Figure 44).

D) Observation au microscope des premiers supports microstructurés

L'avantage principal d'utiliser la microstructuration sur PDMS par photolithographie laser est de pouvoir modifier facilement l'épaisseur et l'écartement des parois composant les sillons longitudinaux. Ainsi, avec cette technique, il est possible de créer un support « sur-mesure », de sillons longitudinaux, dont la géométrie est optimisée afin d'obtenir, à partir d'une culture de myoblastes primaires humains, des myotubes bien alignés avec une différenciation de bonne qualité. Les supports microstructurés ont été caractérisés par simple observation au microscope optique équipé d'un système d'acquisition numérique (VHX-7000, Keyence). Il est alors possible de visualiser les microstructurations pour mesurer les dimensions géométriques (longueur, espacement) mais aussi d'obtenir une vue topographique en 3D des supports pour mesurer la hauteur des microstructurations. La toute première étape, afin d'obtenir des microstructures avec une bonne résolution pour avoir une largeur autour de 10 µm, consiste à effectuer un test de focus et de puissance du laser qui va insoler la résine d'EETMol préalablement déposée sur le support de silicone. Pour cela, la puissance du laser est variée entre P = 20% et P = 100% avec un pas de 20 (Figure 45), la hauteur entre 4,39 et 4,43 mm avec un pas

de 0,01 mm et une la vitesse d'écriture est fixée à 2 mm/s. Nous avons décidé de ne pas modifier le paramètre vitesse et uniquement modifier la puissance du laser pour atteindre la dose optimale.

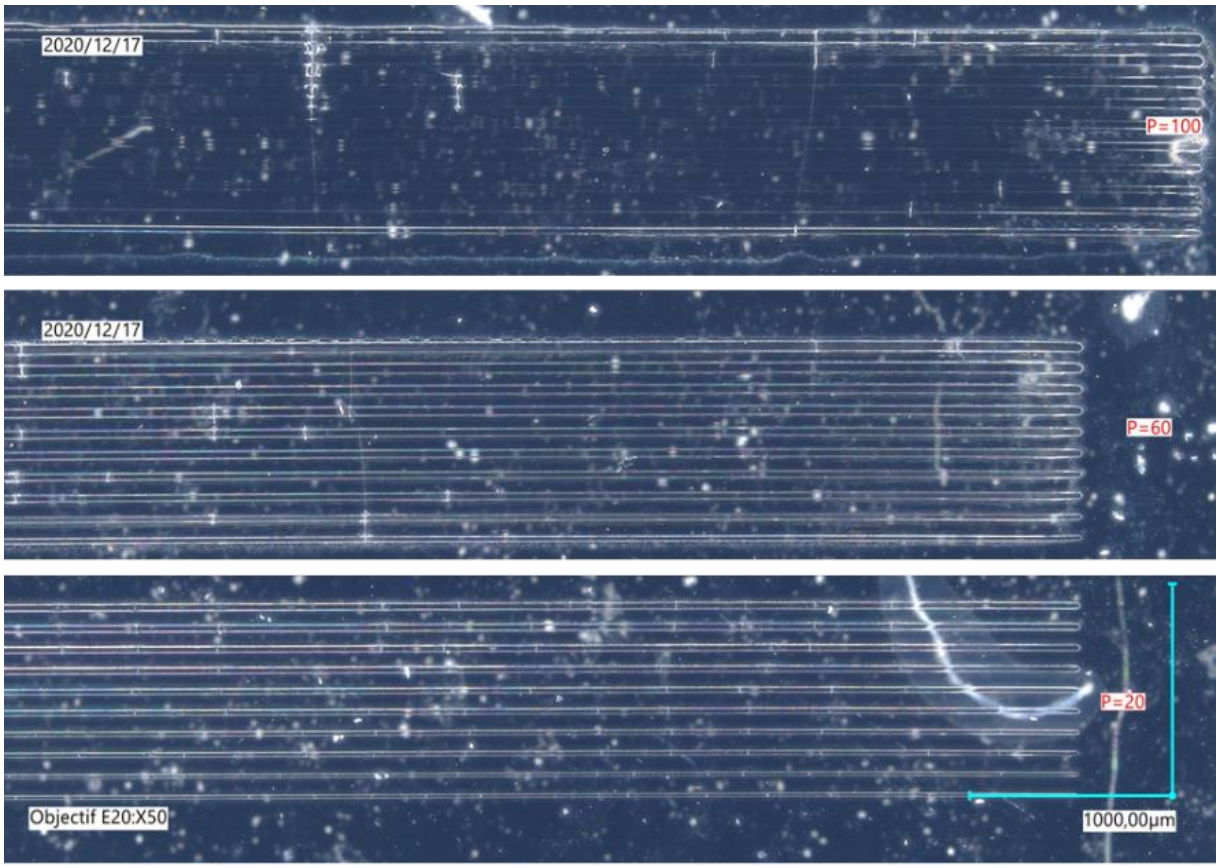

Figure 45 : Variation de la puissance du laser de 20% à 100% et son effet sur la résolution des motifs.

Lorsque la puissance est trop importante (P=100), il n'y a plus de lignes distinctes mais uniquement un seul bloc dont l'interligne est difficile distinguer et pratiquement impossible à dissoudre avec un solvant pour obtenir des lignes séparées les unes des autres. Cela signifie que l'énergie fournie par le laser s'est propagée au-delà du motif et les espèces acides ont diffusées dans les zones avoisinantes. A l'inverse, lorsque la puissance est plus faible (P=60), les lignes qui constituent les parois entre 2 sillons, sont plus distinctes, et à plus faible puissance (P=20) la largeur des lignes est plus fines, ce qui est le but recherché. Il est nécessaire de trouver le bon compromis entre une lignes suffisamment fine et précise sans pour autant qu'elle se décolle du PDMS car en diminuant la largeur des lignes, nous diminuons aussi la surface de contact entre l'EETMol et le PDMS ce qui rend les microstructures plus sensibles au flux de solvant lors du lavage à l'isopropanol. En ce qui concerne la hauteur du laser, on observe qu'en positionnant le laser à 4,37 mm, on obtient les lignes les plus fines (Figure 46). En descendant encore plus bas, on arrive à la zone ou l'épaisseur des lignes augmente signifiant que l'on est à la hauteur de focus idéale pour la résine.

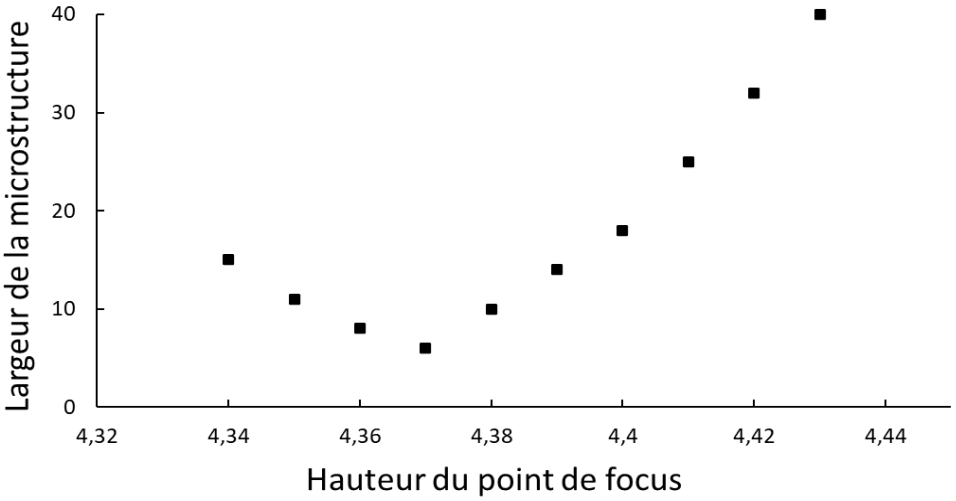

Figure 46 : Effet de la hauteur du point de focus du laser sur la largeur des microstructures.

Une fois les paramètres optimaux trouvés (hauteur du focus, puissance, vitesse), les lignes peuvent être tracées en faisant varier leur espacement (Figure 47).

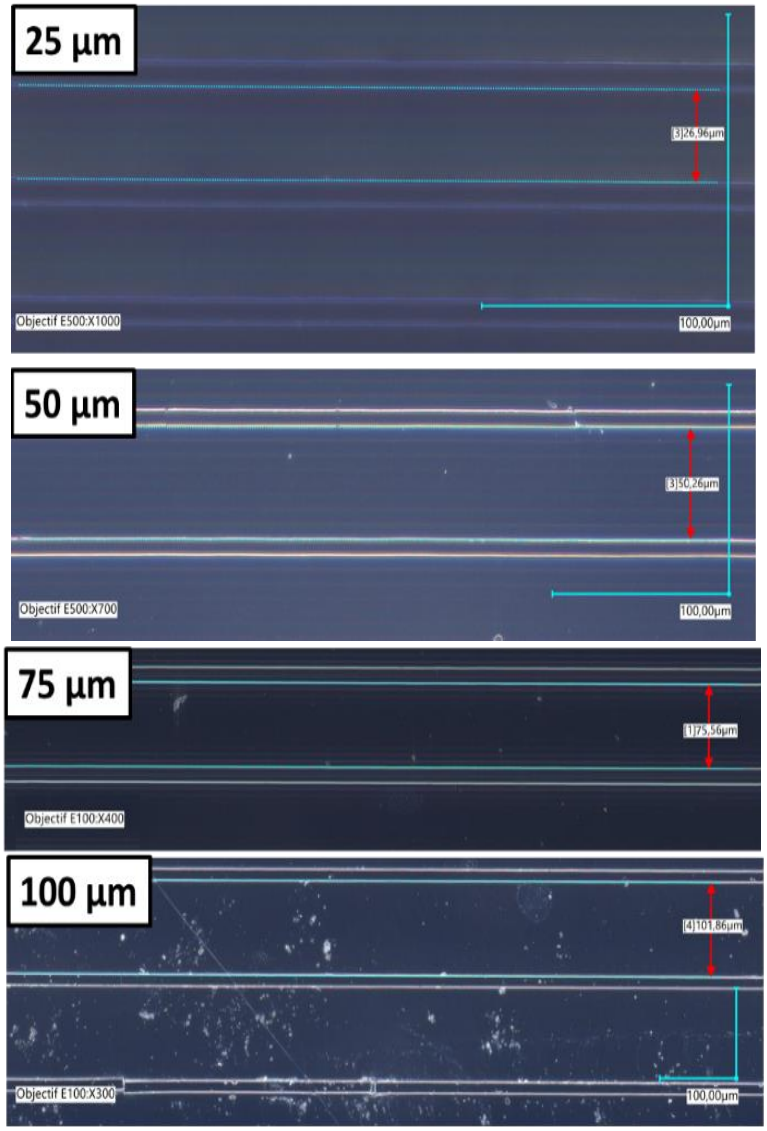

Figure 47: Microstructuration du PDMS avec des lignes d'EETMol espacées entre 30 et 100µm.

E) La viabilité des myoblastes primaires humains sur les supports microstructurés

Une fois les membranes microstructurées, il faut s'assurer que le système est viable pour que les myoblastes primaires humains puissent y adhérer et proliférer. En effet, les deux photoamorceurs peuvent avoir des propriétés cytotoxiques en fonction de leur concentration, et il faut donc trouver le bon équilibre entre une bonne efficacité de photolithographie et la survie des myoblastes. Pour s'assurer que les quantités utilisées dans le protocole sont bonnes, un Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Scientific) est utilisé. Son principe se base sur le dosage du lactate-déshydrogénase (LDH), une enzyme naturellement présente dans la plupart des cellules. Si la membrane plasmique des cellules est endommagée par une substance cytotoxique, le LDH est libéré dans le milieu et le kit permet de doser la quantité de LDH présent dans le milieu à l'aide d'une réaction enzymatique qui produit après deux réactions chimiques du Formazan, une molécule détectable à une longueur d'onde de 490 nm. Ainsi, plus la quantité de LDH dans le milieu est importante, plus la production de Formazan est importante et donc plus il sera détecté au spectromètre UV. Pour évaluer cette viabilité, un contrôle négatif contenant le Formazan a été utilisé (Ctrl -), et le milieu de culture après 3 jours de prolifération sur une membrane en PDMS non-microstructurée (PDMS) et microstructurée (PDMS + EETMol) a été récupéré, centrifugé et testé selon le protocole du kit. Les résultats sont résumés dans la figure 48a. On observe que le contrôle négatif à une absorbance proche de 1 ce qui signifie que le Formazan est présent en grande quantité. Les deux autres échantillons sont significativement plus bas ce qui montre la viabilité du PDMS à la fois microstructuré et non-microstructuré. En parallèle, les cellules ont été fixées, marquées au DAPI et analysées par immunofluorescence pour évaluer la prolifération (Figure 48b). Après 3 jours de prolifération, le nombre de cellule est sensiblement égal dans les deux conditions ce qui démontre que les supports microstructurés sont viables pour la culture de myoblastes primaires humains.

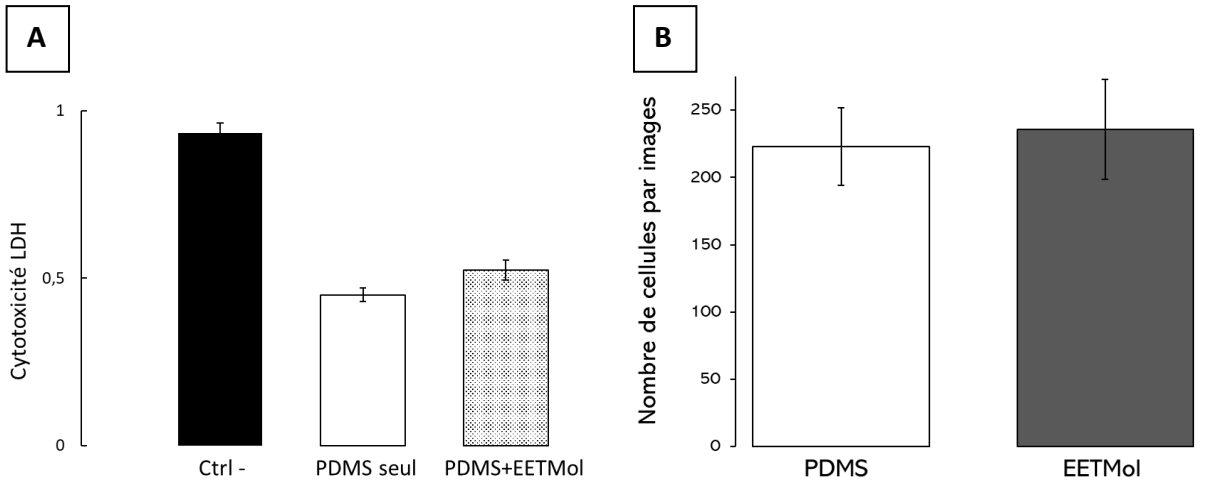

Figure 48 : Viabilité des myoblastes primaires humains sur un support en PDMS microstructuré avec de l'EETMol

Chapitre 2 : Quel topographie favorise au mieux l'alignement ?

Il est donc maintenant important de faire varier les dimensions des microstructures en termes de hauteur et d'espacement afin d'obtenir des myotubes les plus alignés possibles avec un impact négatif minimum sur leur morphologie naturelle, dans un but de se rapprocher des conditions des fibres musculaires *in vivo*.

A) Impact de la microstructuration en sillon longitudinal du support sur la culture cellulaire des myoblastes primaires humains.

Pour évaluer l'effet des microstructurations sur le développement myogénique, des myoblastes primaires humains ont été ensemencés sur une membrane avec des microstructurations espacées dans un premier temps de 50 µm, l'espacement considéré comme optimal dans la thèse d'Aurélien Flatres (283). Le support est recouvert d'une fine couche d'environ 5µm de Matrigel® pour améliorer la prolifération et la différenciation des myoblastes. La concentration en Matrigel® reste suffisamment faible pour ne pas former une matrice en 3D englobant les microstructures, et ce dans le but de s'assurer de ne pas perdre l'effet de guidage des microsillons. Les myoblastes sont mis en prolifération pendant 3 jours puis en différenciation pendant 4 jours. Les myotubes sont ensuite fixés et marqués pour révéler la troponine T, l'α-actinine et les noyaux cellulaire (Figure 49).

On observe sur la Figure 49a, sans microstructuration, que les myotubes sont orientés de manière totalement aléatoire, qu'ils ne sont pas homogènes au niveau de leur diamètre et semblent courts. A l'inverse, on remarque que la présence d'une microstructuration augmente la quantité de Troponine T (en rouge), induit un alignement des myotubes entre eux, et augmente leur longueur (Figure 49b). On remarque même que, pour certaines fibres, leurs extrémités se situent en dehors du champ. Enfin leur diamètre est plus homogène.

On remarque sur la figure 49c qu'à l'extrémité des sillons, lorsque les myotubes ne sont plus guidés, ils reprennent leur direction aléatoire ainsi qu'un diamètre hétérogène, en accord avec une précédente étude sur culture cellulaire C2C12 (284). Ces résultats s'expliquent par le fait qu'en absence de guidage, les myotubes peuvent s'allonger dans toutes les directions du plan, tandis qu'avec un guide, ils ont tendance à le suivre par effet de bord. Cet effet s'explique par le fait que les myoblastes peuvent s'accrocher à la fois sur la surface du PDMS mais aussi aux microstructures en EETMol. Ainsi, ils ont plus de points d'accroche, ce qui est recherché pour favoriser leur prolifération. Le marquage troponine montre donc l'effet positif direct de la microstructuration sur la différenciation des myotubes humains.

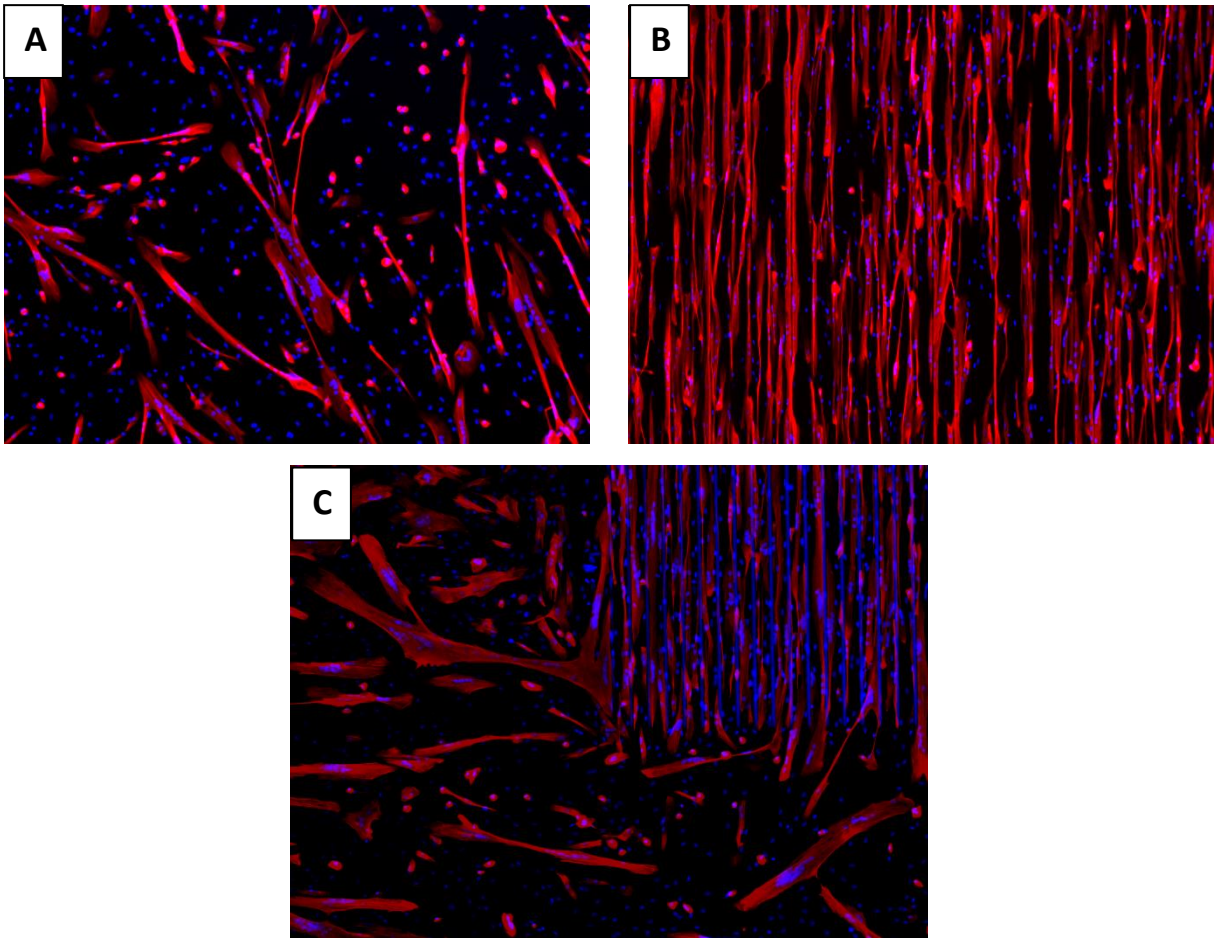

Figure 49: Effet de la microstructuration sur l'alignement et la quantité des myotubes produits. (Ici, espacement de 50µm) En bas, l'extrémité des microstructures (en bleu).

Compte tenu de l'incertitude, nous avons remarqué que la microstructuration, ne semble pas modifier significativement le nombre de noyaux. Des mesures ont été effectuées sur 5 images par conditions et 960 ± 125 noyaux par images de 1388x1040 µm² ont été comptés pour le contrôle non-microstructuré contre 995 ± 60 noyaux par images 1388x1040 µm² pour l'échantillon microstructuré. Cela montre que les microstructures n'ont pas d'effet négatif sur la prolifération des myoblastes. Cependant, cette topographie en microsillons longitudinaux trouve son intérêt au moment de la différenciation pour deux raisons distinctes :

- Elle favorise l'adhésion des myoblastes, qui se retrouvent en plus grande concentration dans les zones microstructurées ce qui réduit l'espace entre chacun favorisant alors leur fusion (109) (Figure 49c).

- Elle induit un effet de guidage, permettant aux myoblastes de fusionner avec leurs voisins selon un seul axe longitudinal, augmentant ainsi la longueur des myotubes. En effet, lorsque la membrane est non-microstructurée, les myotubes ont tendance à se développer dans le sens de la largeur en essayant d'augmenter leur surface d'adhésion avant ensuite de prendre en volume (285).

Ces résultats sont conformes à la littérature (71,109,240,286) et mettent en avant l'effet de la topographie sur la différenciation des myotubes humains.

B) Impact de géométrie des microstructures sur la différenciation des myoblastes primaires humains

Cette étude est divisée en deux parties. La première consiste à évaluer l'effet de l'espacement entre les microstructures et la seconde permet d'évaluer l'effet de la hauteur des microstructures sur la différenciation des myoblastes primaires humains.

EFFET DE L'ESPACEMENT DES MICROSTRUCTURES

Pour cette première partie d'étude, 4 échantillons dont les espacements sont respectivement de 25 µm, 50 µm, 75 µm et 100 µm ont été produits avec une hauteur de 8 µm. L'échantillon contrôle représente une membrane en PDMS non-microstructurée. Les 5 échantillons ont ensuite été recouverts d'une couche de 5µm Matrigel® puis mis en prolifération pendant 3 jours suivi d'une différenciation pendant 4 jours. Les myotubes ont été ensuite fixés et marqués pour révéler la troponine T, l'α-actinine et les noyaux cellulaire. Les paramètres évalués pour chaque écartement ont été le diamètre moyen des fibres, le taux de fusion (rapport entre le nombre de noyaux dans les fibres et le nombre de noyaux totaux), la quantité de myotubes produits (aire des myotubes) et la répartition en fonction de leur alignement suivant l'axe principal des microsillons. Les mesures d'aire et le calcul du taux de fusion sont effectuées sur 3 images par condition. La manipulation a été répétée deux fois. Les mesures de diamètre sont effectuées sur environ 6x30 myotubes par condition, ce qui représente près de 180 mesures. Une condition est considérée significative lorsque $p < 0,02$ (test de student).

La figure 50 montre une nouvelle fois l'effet d'un support microstructuré sur la quantité de myotubes produits, et le taux de fusion par rapport un support non-microstructuré. De plus, on remarque une diminution de la quantité de myotubes avec une aire qui passe de 1,37 ± 0,70 mm² à 1,06 ± 0,84 mm² quand on passe respectivement de 25 à 100 µm d'écartement entre les parois des microsillons ($p = 0,000003$). On retrouve aussi la même tendance pour le taux de fusion avec une diminution de 79 ± 2 % à 68 ± 1 % respectivement quand on passe de 25 µm à 100 µm d'écartement ($p = 0,00008$).

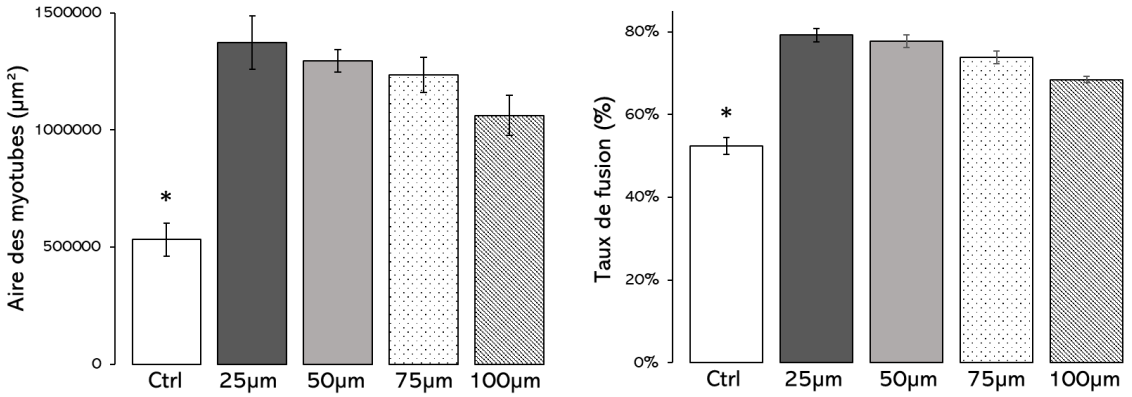

Figure 50: Effet de l'espacement des microstructurations sur la quantité de myotubes et le taux de fusion. Les mesures d'aire et le calcul du taux de fusion sont effectuées sur 3 images par condition, la manipulation a été répétée deux fois. Dans les deux graphiques, p<0,02 pour le Ctrl par rapport aux 4 autres conditions.

Ces premiers résultats suggèrent qu'il y a une corrélation négative entre l'espacement des parois des sillons et la quantité de myotubes produits et le taux de fusion (Figure 51), qui sont 2 paramètres qui décrivent le même phénomène : plus les microstructures sont espacées, moins il y a de myotubes produits.

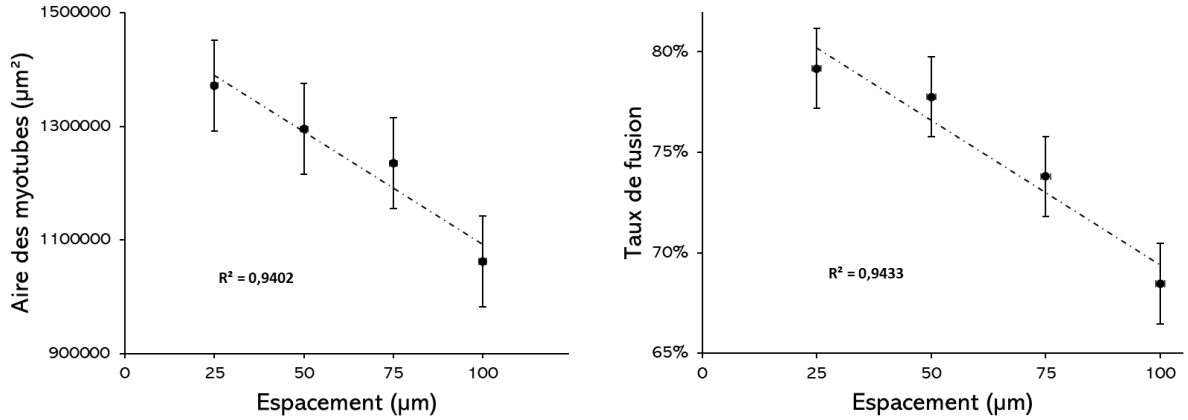

Figure 51 : Corrélation négative entre l'espacement et, à gauche, la quantité de myotubes produits, à droite, le taux de fusion.

Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui suggèrent qu'en réduisant l'espacement entre les parois des microsillons, la distance entre deux myoblastes est elle aussi réduite ce qui favorise leur fusion et augmente la densité des myotubes (42,63). Il est à noter qu'en utilisant des canaux d'hydrogel pour favoriser l'alignement, l'effet de la largeur est inverse puisque les taux de fusion les plus hauts ont été observés dans les canaux les plus larges (287,288).

A l'inverse des 2 précédents paramètres, comme la figure 52 le montre, on observe par rapport au contrôle, que le support microstructuré avec un espacement de 25 µm produits des myotubes ayant un diamètre moyen significativement plus faible un effet négatif sur le diamètre moyen des fibres, qui est statistiquement significatif pour l'écartement le plus faible avec un diamètre de 19,3 ± 0,7 µm pour l'échantillon à 25µm et 23,7 ± 0,8 µm pour l'échantillon à 50µm (p = 0,00003). On remarque également que la dispersion des mesures représentée par l'écart type du diamètre moyen des fibres est le plus importante pour les écartements des sillons les plus grands tout en restant inférieur à celui obtenu pour la culture sur le contrôle avec des valeurs passant de 0,7 à 1,9 µm pour des écartements de 25 à 100 µm, et une valeur à 2,8 µm pour la culture sur support lisse.

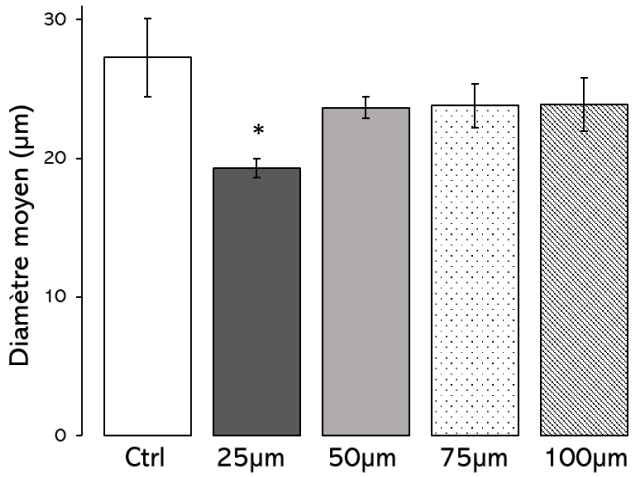

Figure 52: Effet de l'espacement entre les microstructurations sur le diamètre moyen des myotubes. Les mesures de diamètre sont effectuées sur environ 6x30 myotubes par condition, ce qui représente environ 180 mesures. Dans les deux graphiques, p<0,02 pour le 25µm par rapport aux 4 autres conditions.

Ces résultats montrent que par effet de contrainte, lorsque les microstructurations sont trop proches les unes des autres, elles créent une contrainte stérique qui limite la croissance sur un axe transversal des fibres musculaires en culture, avec réduction de leur diamètre. Une étude justifie cette diminution du diamètre par une diminution du nombre de cellules ensemencées dans les sillons, induisant, après fusion, un nombre de noyaux plus faible dans chaque myotube (113). L'effet de contrainte stérique de la microstructuration apporte également une distribution en taille des diamètres plus étroite, ce qui peut présenter un intérêt important dans l'évaluation de l'effet d'une pathologie ou d'une thérapeutique sur la fonction de régénération des cellules satellites obtenues par biopsie et mise en culture. En s'assurant que le diamètre des myotubes est homogène dans la condition, sans que cela soit induit par le support (dans le cas du 25µm), cela permet de comparer les cellules provenant d'un patient sain et d'un patient atteint d'une pathologie et d'observer une différence dans la valeur du diamètre moyen.

Enfin, l'effet de l'espacement sur la qualité de l'alignement des myotubes a été aussi évalué. Pour cela, pour chaque myotube, l'angle entre sa direction et celle du microsillon a été mesuré sur ImageJ. Les myotubes ont été ensuite réparties dans différent groupe en fonction de son angle de déviation par rapport à l'axe principale du microsillon. Chaque groupe représente une variation d'angle de 5° ([- 30° : - 25°] ; [- 25° : - 20°] ; […] ; [20° : 25°] ; [25° : 30°]). Pour chaque groupe la fréquence d'apparition a été calculée et les résultats sont présentés dans la Figure 53. Chaque mesure d'angle a été effectuée sur environ 6x30 soit 180 myotubes par conditions. On peut noter que plus les sillons sont larges, plus les myotubes ont tendance à dévier de l'axe principal de la microstructure (jusqu'à 25° pour 100µm contre 10° au plus pour 25µm).

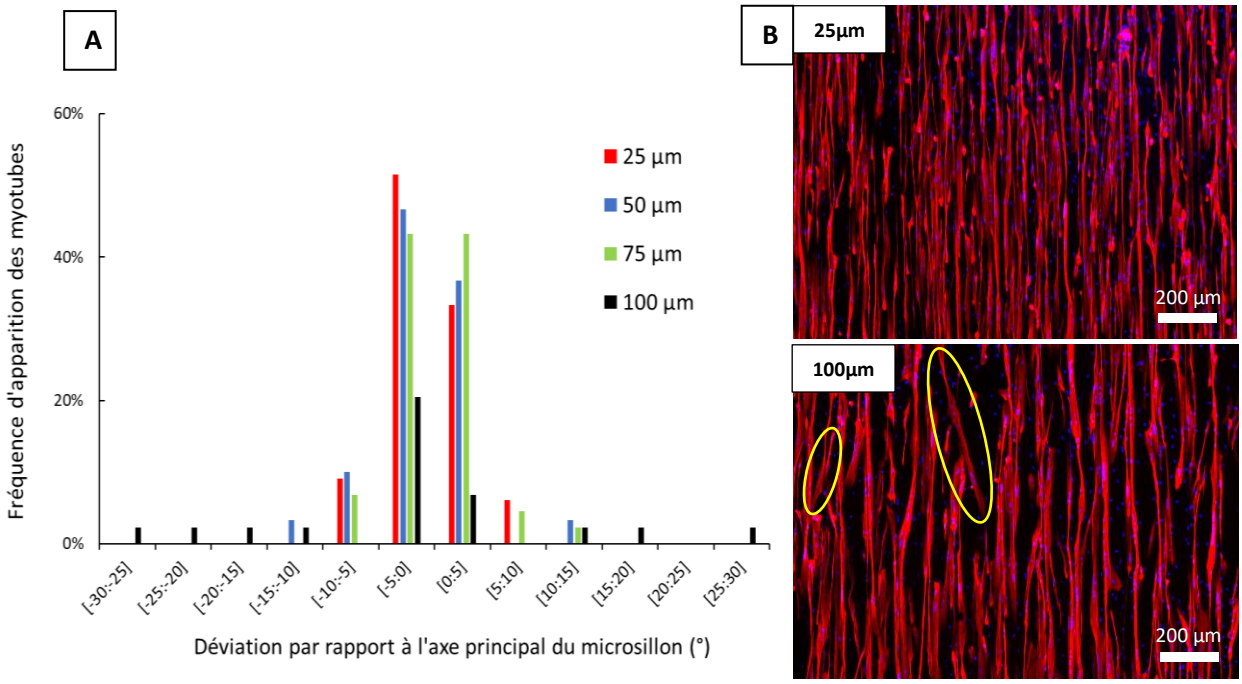

Figure 53: Effet de l'espacement sur l'alignement des fibres. A) le diagramme de dispersion des myotubes en fonction de leur déviation par rapport à l'axe principal du microsillon. B) les images d'immunofluorescence comparatives entre 25µm et 100µm. Les cercles jaunes représentent les déviations significatives. Chaque mesure d'angle a été effectuée sur environ 6x30 soit 180 myotubes par conditions.

Ainsi nos résultats sur l'effet de l'écartement des parois de microsillons gravés sur un support de culture cellulaire, montrent que ces microstructurations favorisent la différenciation des myotubes humains. L'espacement joue aussi un rôle directe sur le taux de fusion et la quantité de myotubes produits puisque plus l'espacement est large, moins il y a de myotubes et à l'inverse, c'est lorsqu'il est le plus étroit que le taux de fusion et la quantité de myotubes sont les plus élevés.

Concernant le diamètre des fibres obtenues, nos résultats montrent un effet de contrainte limitant la croissance des fibres sur leur axe transversal, réduisant leur diamètre de façon significative, pour un écartement de 25 µm. Cela indique qu'avec cet espacement, l'objectif de produire des myotubes avec une morphologie la plus proche de celle retrouvée naturellement *in vivo* n'est pas atteint. Enfin, nous

montrons également que pour obtenir un alignement satisfaisant des myotubes, l'espacement entre la paroi des microsillons doit être inférieur à 100 µm.

Le domaine le plus favorable se situe donc entre 50 µm et 75 µm. Pour la suite des expériences (Chapitre 3c et 4), le diamètre est fixé à 75 µm afin de laisser assez de place aux myotubes pour se développer normalement tout en guidant leur alignement.

EFFET DE LA HAUTEUR DES MICROSTRUCTURES

Nous avons précédemment effectué un choix de hauteur des microstructures suite aux travaux de thèse d'Aurélien Flatres (283). Cette partie est consacrée à la validation de ce choix. Plusieurs études ont montré que l'effet de guidage pouvait avoir lieu au niveau nanométrique et micrométrique (91,96), il est important de vérifier si, dans notre modèle, la hauteur des microstructures joue un rôle sur la différenciation et la morphologie des myotubes humains produits. cellulaire. Cette épaisseur a été confirmée par un profil topographique effectuée grâce au microscope optique couplé avec un logiciel de modélisation 3D (Figure 54).

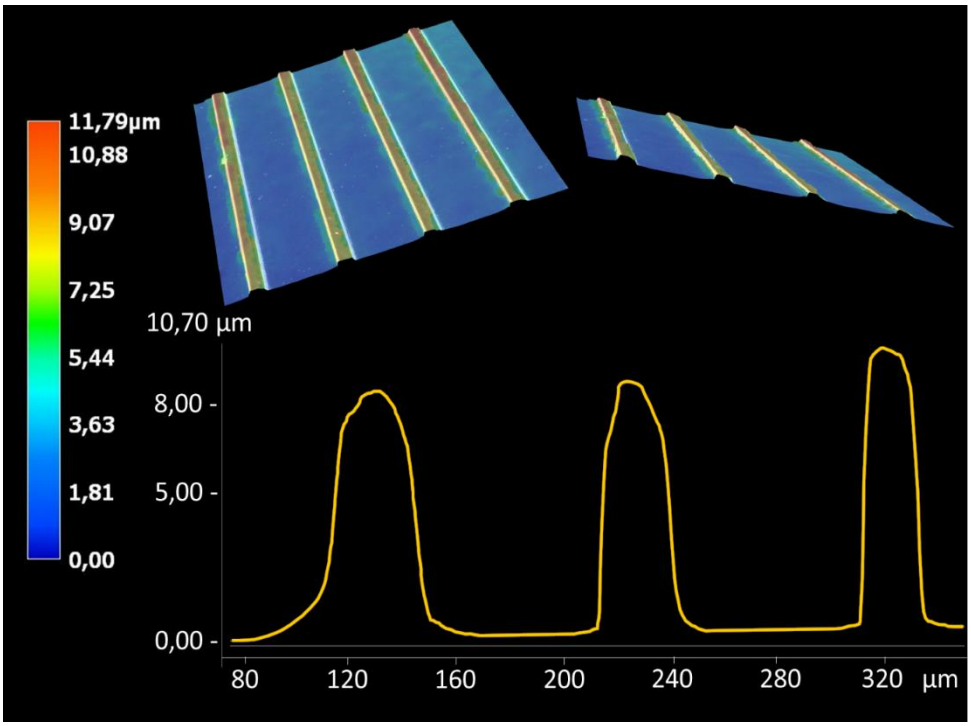

Figure 54: Profil topographique d'un support microstructuré.

Il est possible de faire varier l'épaisseur de la couche d'EETMol en réduisant la quantité de solvant dans le sol permettant d'obtenir des épaisseurs pouvant aller jusqu'à 30µm pour la vitesse de rotation de spin-coating la plus faible. Des membranes ont été produites en faisant varier l'épaisseur des microstructures entre 2 µm et 30 µm pour un même écartement choisi de 75 µm, puis mises en culture pendant 3 jours de prolifération et 4 jours de différenciation. A la fin de la culture, les myotubes sont fixés et marqués en immunofluorescence pour révéler la Troponine T et les noyaux cellulaires. Le taux

de fusion est alors calculé et l'aire des myotubes ainsi que leur diamètre sont mesurés à l'aide d'un logiciel de traitement d'images.

Le tableau 10 montre l'effet de la hauteur des microstructures sur le taux de fusion et sur le diamètre moyen des myotubes. La hauteur n'a donc pas d'effet significatif sur la différenciation des myotubes humains. Nous avons donc décider de rester sur l'hypothèse de base avec une hauteur située entre 8 µm et 10 µm car cette hauteur est proche de celle du diamètre du noyau qui peut s'accrocher tout le long de la paroi et augmenter ainsi son adhésion. Une hauteur plus élevée aurait aussi été possible mais ces hauteurs sont plutôt retrouvés dans les modèles possédant plusieurs couches cellulaires (289).

Tableau 10: Effet de la hauteur sur la différenciation des myotubes humains

Hauteur	Diamètre moyen (µm)	Taux de Fusion	Aire des myotubes (mm^2)
2µm	23,7 ± 0,9	72 ± 4 %	1,00 ± 0,74
8µm	23,9 ± 0,6	74 ± 1 %	1,18 ± 0,84
20µm	22,9 ± 1,2	74 ± 2 %	1,19 ± 0,48
30µm	23,9 ± 1,1	71 ± 2 %	1,04 ± 0,80

L'espacement ainsi que la hauteur des microstructures ont donc été optimisés pour obtenir une quantité maximale de myotubes, alignés, avec un diamètre homogène autour de 23 µm. Les dimensions choisies pour la suite sont donc un espacement de 75 µm et une hauteur autour de 8 µm.

Chapitre 3 : Comment améliorer l'adhésion des myoblastes sur le support PDMS-EETMol microstructuré ?

Le PDMS étant hydrophobe, il est indispensable de le biofonctionnaliser pour s'assurer d'une bonne adhésion des myoblastes, puis des myotubes pour garantir qu'ils ne se détachent pas de leur support lors de l'étirement.

A) Le greffage de peptides d'adhésion

Au cours de ma thèse, une collaboration avec l'IBMM et l'équipe de Gilles Subra a vu le jour. Ils produisent des peptides bioactifs dont la particularité est qu'ils sont fonctionnalisés en leurs extrémités avec des groupements siloxanes (-Si-$(OEt)_3$) ce qui leur confère la possibilité de créer des liaisons covalentes avec le PDMS oxydé en sufrace. Deux peptides favorisant l'adhésion cellulaire (259,269,271) et présentant les séquences G**RGD**SP (Gly-**Arg-Gly-Asp**-Ser-Pro) (Figure 55) et G**YIGSR** (Gly-**Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg**) (Figure 56) ont été synthétisés.

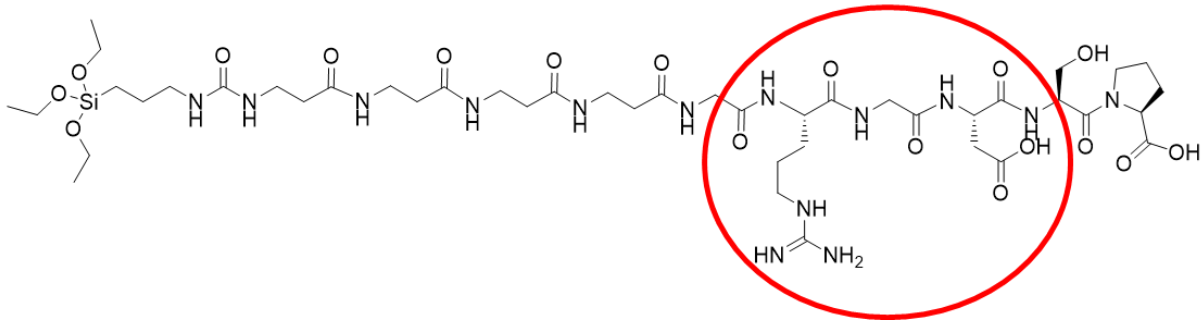

Figure 55 : Peptide GRGDSP silylé. Entourée en rouge, la séquence d'intérêt RGD.

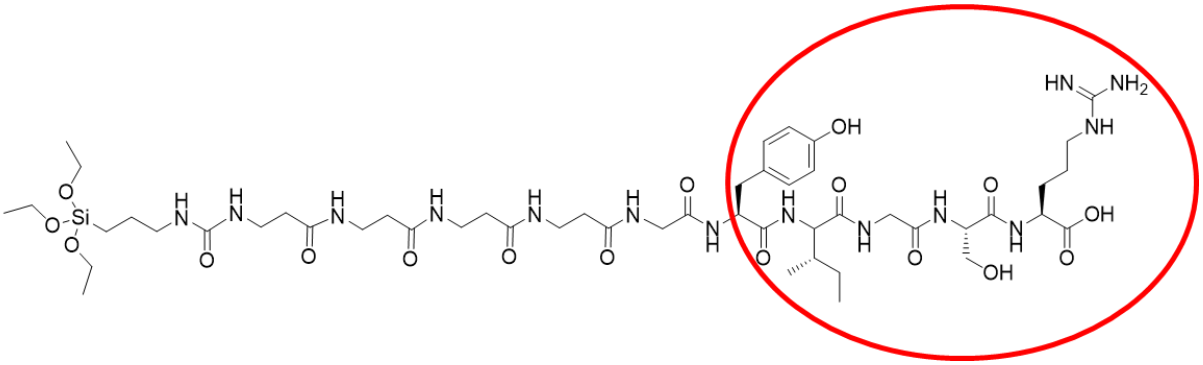

Figure 56: Peptide GYIGSR silylé. Entourée en rouge, la séquence d'intérêt YIGSR.

Parmi les trois méthodes de biofonctionnalisation mentionnées dans la partie bibliographique (Etude bibliographique, Chapitre 4). L'adsorption ne produisant pas de liaisons covalentes avec le support et utilisant des membranes en silicone industrielles prêtes à l'emploi le greffage a été choisi. Les supports en silicone, préalablement activés par traitement plasma, sont trempés par dip coating dans une solution contenant les peptides de concentration connue. La partie silylée est hydrolysée en milieu

acide pour présenter des liaisons Si-OH qui réagissent avec les -OH en surface du PDMS pour former par condensation des liaisons covalentes SI-O-Si, tout comme dans le procédé sol-gel. La synthèse des peptides et leur greffage sur le PDMS sont abordés dans un paragraphe méthodologique.

B) Effet de la séquence peptidique greffés au PDMS sur la prolifération des myoblastes primaires humains en culture

L'effet des peptides sur la prolifération a d'abord été évaluée en comparant l'impact sur le nombre de noyaux obtenus en culture. Deux types de peptides (RGD ou YIGSR) ont été étudiés par rapport à une membrane en PDMS seule (Ctrl -) ou recouvert par du Matrigel® (Ctrl +). Pour cette expérience aucune membrane n'était microstructurée. Les résultats après 3 jours de prolifération sont illustrés en Figure 57 et résumés dans la Figure 58.

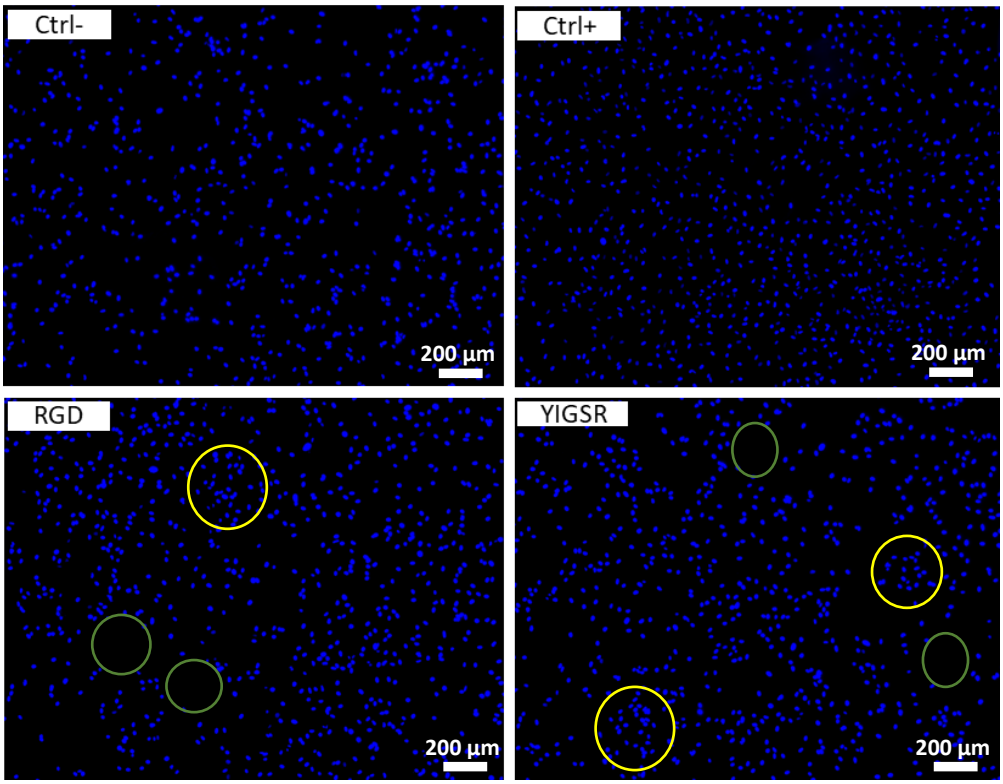

Figure 57: Visualisation par immunofluorescence de l'effet des peptides sur la prolifération. En jaune les clusters de myoblastes et en vert les zones vides.

On n'observe pas de différence significative entre les 4 conditions (p = 0,09 et 0,27 pour RGD par rapport à respectivement Ctrl+ et Ctrl- ; p = 0,023 et 0,14 pour YIGSR par rapport à respectivement Ctrl+ et Ctrl- ; p = 0,27 entre RGD et YIGSR). L'adhésion des myoblastes aux supports biofonctionnalisés (RGD ou YIGSR) n'est pas meilleure que sur le PDMS nu, ce qui peut être expliqué par deux hypothèse : soit la biofonctionnalisation n'a pas réussi, soit les peptides n'ont pas d'effet particulier sur la prolifération des myoblastes primaires humains. Cependant, il convient de noter que l'on observe certaines zones avec une forte densité de myoblastes (en jaune) et d'autres zones où il n'y en a pas

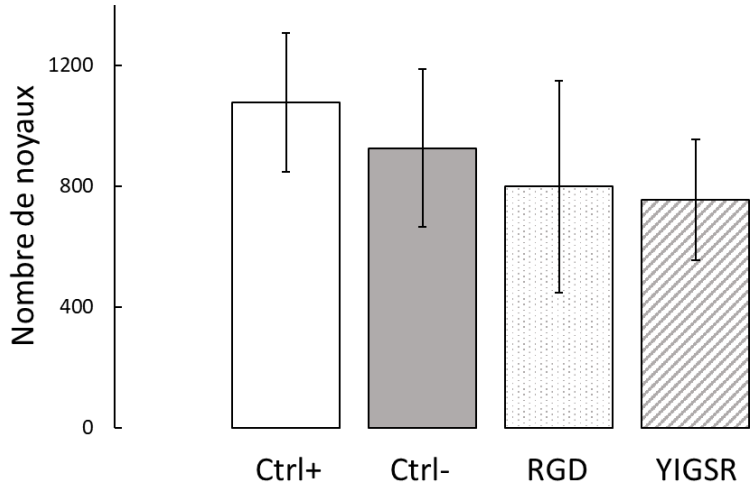

Figure 58: Quantification de la prolifération en fonction de la biofonctionnalisation du support. Le nombre de noyaux a été compté sur 3 images de 1388x1040 µm² par conditions et la manipulation a été répétée deux fois.

(en vert) ce qui suggère que les myoblastes se développent par agglomérats. Ce phénomène amène l'hypothèse selon laquelle les peptides ne seraient pas déposés de manière homogène sur la surface de la membrane mais plutôt par grappes qui présentent alors une plus grande densité de séquences peptidiques favorisant l'adhésion des myoblastes dans ces zones-là puisque les cellules reconnaissent naturellement la séquence RGD. Ces grappes pourraient être dûes à une gène stérique du peptide qui empêche la réaction de condensation avec le PDMS lorsque le côté silylé est pas ou peu accessible. Dans ce cas, le peptide n'est pas accroché au support et est retiré au moment du lavage post-greffage. Il est aussi possible que certains peptides se condensent entre eux plutôt qu'avec le PDMS ce qui réduit alors la quantité de peptides disponibles pour se greffer au support.

Ensuite, la Figure 59 montre que le taux de fusion, et le diamètre moyen des myotubes ne sont pas impactés par le greffage des peptides ou le Matrigel®.

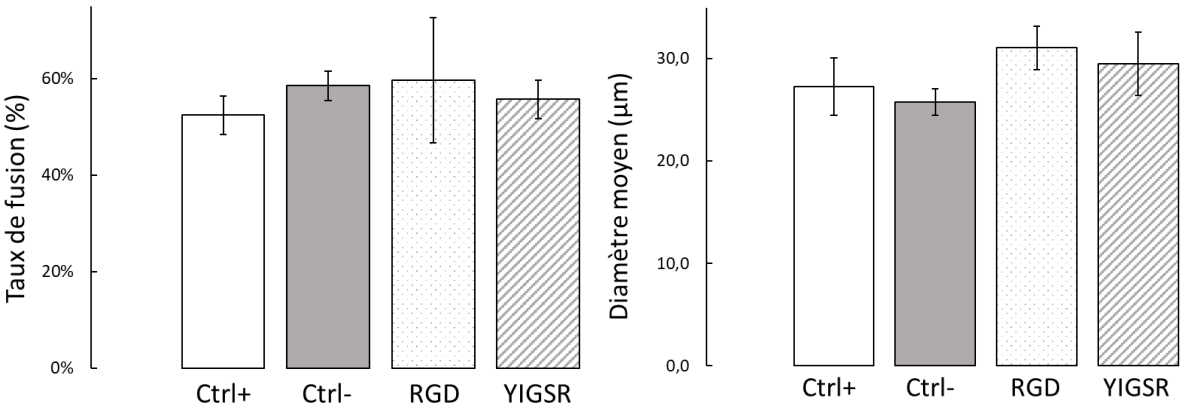

Figure 59: Effet de la biofonctionnalisation sur le taux de fusion et le diamètre moyen des myotubes humains. Le calcul du taux de fusion est effectué sur 3 images par conditions, la manipulation a été répétée deux fois. Le diamètre a été mesuré sur environ 6x30 soit 180 myotubes par conditions.

Cependant, on observe un impact direct du peptide RGD sur la production de myotubes puisque l'aire des myotubes est significativement plus importante par rapport à la membrane nue (Figure 60) impliquant un nombre de myotubes plus important.

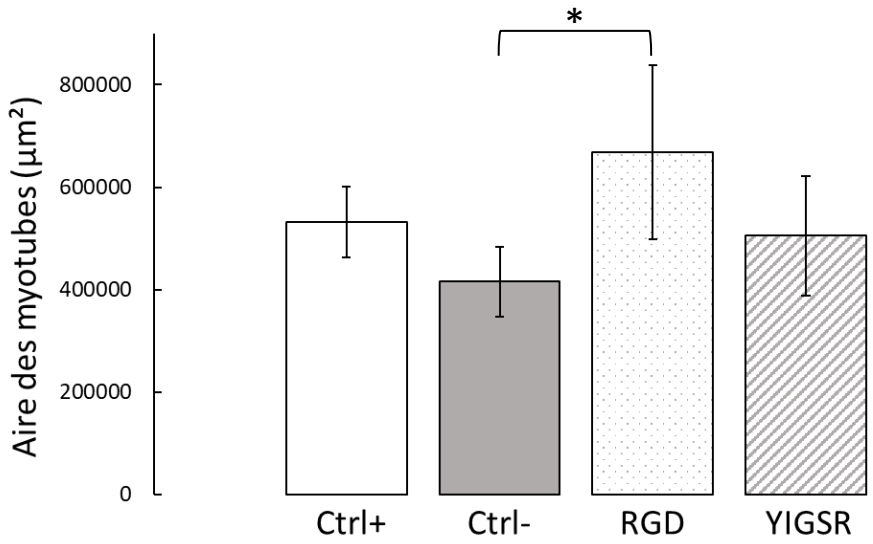

Figure 60: Effet de la biofonctionnalisation sur la quantité de myotubes produits. Les mesures d'aire sont effectuées sur 3 images par condition, la manipulation a été répétée deux fois.

Cette production de myotubes est même plus importante que la membrane recouverte de Matrigel®. Ces résultats préliminaires suggèrent donc que les peptides et plus précisément la séquence peptidique RGD pourrait être une alternative viable au Matrigel® pour la culture de myotubes humains.

C) Effet combiné de la biofonctionnalisation par greffage de peptide et du revêtement de Matrigel® sur la prolifération des myoblastes primaires humains en culture

L'étape suivante est de savoir s'il est possible d'obtenir une synergie entre le greffage des peptides et le revêtement en Matrigel®. Pour cela, seul le peptide RGD a été sélectionné pour la biofonctionnalisation car il présente de meilleurs résultats que l'YIGSR sur la quantité de myotubes produits (Figure 60). Dans cette expérience, une membrane nue de PDMS a été utilisée en tant que contrôle négatif (Ctrl -), une membrane microstructurée non-biofonctionnalisée en tant que contrôle positif (µCtrl), et deux membranes biofonctionnalisées avec des peptides RGD avec et sans Matrigel® (respectivement µRGD + M® et µRGD). De façon similaire, le taux de fusion, la quantité de myotubes (Figure 61) et le diamètre moyen (Figure 62) ont été quantifiés pour évaluer la différenciation des myotubes humains et regroupés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Effet du peptide RGD et du Matrigel sur la différenciation des myotubes humains.

Nom de la condition	Taux de fusion	Aire des myotubes (mm²)	Diamètre moyen (µm)
Ctrl -	52 ± 5%	0,59 ± 0,22	27,8 ± 9,1
µCtrl	70 ± 1%	1,13 ± 0,15	25,9 ± 1,5
µRGD	76 ± 3%	1,59 ± 0,08	23,0 ± 1,4
µRGC + M®	79 ± 4%	1,71 ± 0,08	25,3 ± 0,6

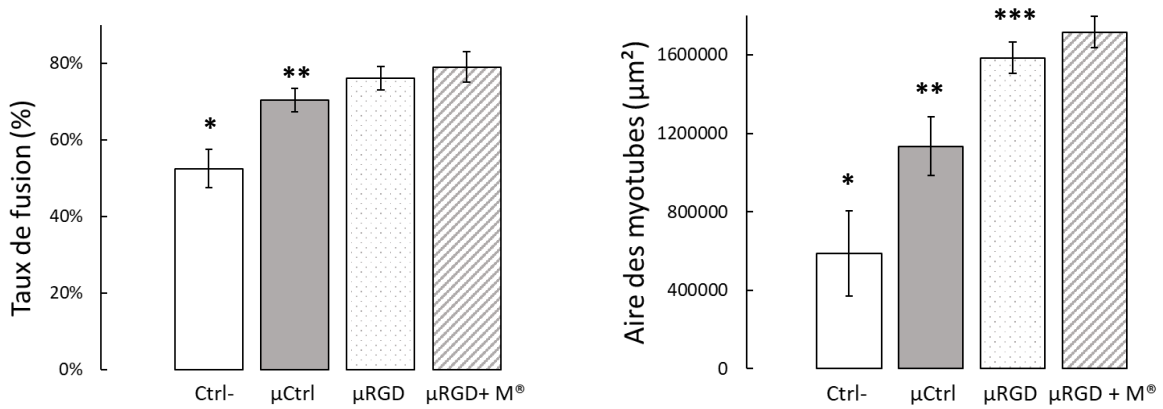

Figure 61: Effet synergique du Matrigel® et des peptides RGD sur la différenciation des myotubes humains. Les mesures d'aire et le calcul du taux de fusion sont effectuées sur 3 images par conditions, la manipulation a été répétée deux fois. p<0,02.

On observe tout d'abord sur la Figure 61 que l'aire des myotubes et le taux de fusion est plus bas dans le contrôle sans microstructures par rapport à celui avec microstructures (p = 0,0004 et 0,0001). Ces résultats confirment l'impact des microstructures sur la quantité de myotubes produits. Concernant les échantillons biofonctionnalisés avec les peptides RGD, il y a significativement plus de myotubes produits par rapport au support microstructuré non-biofonctionnalisé (p = 0,0004) ainsi qu'un taux de fusion plus important (p = 0,003). On observe les mêmes tendances avec la présence en plus de Matrigel® (p = 0,001 pour la quantité de myotubes et p = 0,0009 pour le taux de fusion). Cependant, lorsque l'on compare les deux échantillons biofonctionnalisés par le peptide RGD avec et sans Matrigel®, il n'y a une différence significative au niveau de l'aire des myotubes (p = 0,009) mais pas au niveau du taux de fusion (p = 0,09). Ces deux résultats concordent avec ceux observés dans les résultats annexes qui mettent en avant l'effet nutritif du Matrigel® dans notre modèle.

Enfin, concernant les mesures du diamètre (Figure 62), on n'observe pas de différence significative entre les 4 conditions même si on retrouve là aussi la tendance du contrôle non-structuré qui présente un écart-type plus important, synonyme d'une plus grande hétérogénéité des diamètres dans le cas du PDMS nu. Ainsi, ces résultats montrent l'effet du nutritif Matrigel® sans pour autant présenter de synergie avec les peptides RGD Matrigel®. Le support biofonctionnalisé avec les peptides RGD peut

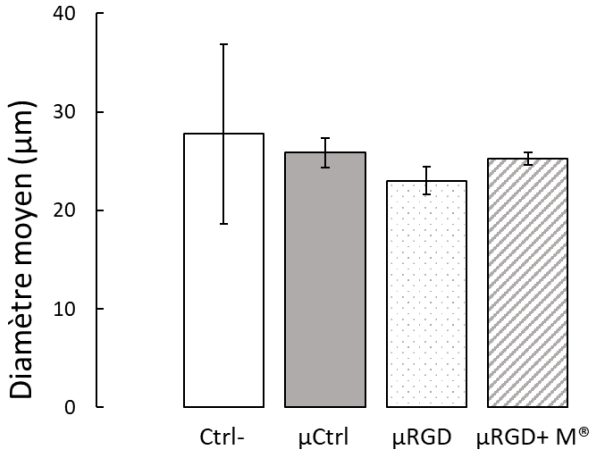

Figure 62: Effet des peptides RGD et du Matrigel® sur le diamètre moyen des myotubes humains. Le diamètre a été mesuré sur environ 6x30 soit 180 myotubes par conditions.

donc être utilisé en tant que tel, sans revêtement au Matrigel®, ce qui permet à la fois d'améliorer l'adhérence des myotubes tout en se passant des inconvénients du Matrigel®.

D) Effet synergique entre les séquences RGD et YIGSR et influence de la concentration en peptides.

Les premiers résultats concernant les peptides ont montré que la séquence RGD est la plus efficace pour améliorer la différenciation des myotubes par rapport à la séquence YIGSR même si l'effet de cette dernière sur la différenciation n'est pas nul.

Ainsi, dans un but d'optimisation nous nous somme posés deux questions : la première sur un possible effet synergique entre les deux séquences et la secondes si l'effet de l'augmentation de la concentration en peptide pouvait améliorer l'efficacité sur la différenciation des myotubes. Pour cela, RGD et YIGSR ont dans un premier temps été greffés sur des supports non-microstructurés à deux concentrations, l'une 8 fois plus importante que l'autre (1 mg/mL contre 8 mg/mL). Il est à noter que dans les deux parties précédentes, la concentration en peptide était de 2mg/mL. Néanmoins, pour observer un réel effet de concentration, il faut que le ratio soit suffisamment important, ce qui explique le choix des deux concentrations dans ce cas. Ces quatre expériences ont été comparées à un contrôle négatif représenté par une membrane non-biofonctionnalisée et les résultats sont résumés dans le tableau 12. La Figure 63 montre dans un premier temps que le contrôle non-biofonctionnalisé est systématique plus bas au niveau du taux de fusion par rapport aux conditions biofonctionnalisées et ce, quelle que soit la séquence peptidique ($p = 0,007$ pour RGD et $p = 0,0008$ pour YIGSR).

Tableau 12 : Effet de la séquence peptidique ainsi que sa concentration sur la différenciation des myotubes humains.

Nom de la condition	Taux de fusion	Aire des myotubes (mm²)
Ctrl	45 ± 11%	0,70 ± 0,18
RGD1	64 ± 7%	1,05 ± 0,07
RGD8	77 ± 4%	1,29 ± 0,09
YIGSR1	74 ± 7%	1,22 ± 0,30
YIGSR8	77 ± 3%	1,39 ± 0,12

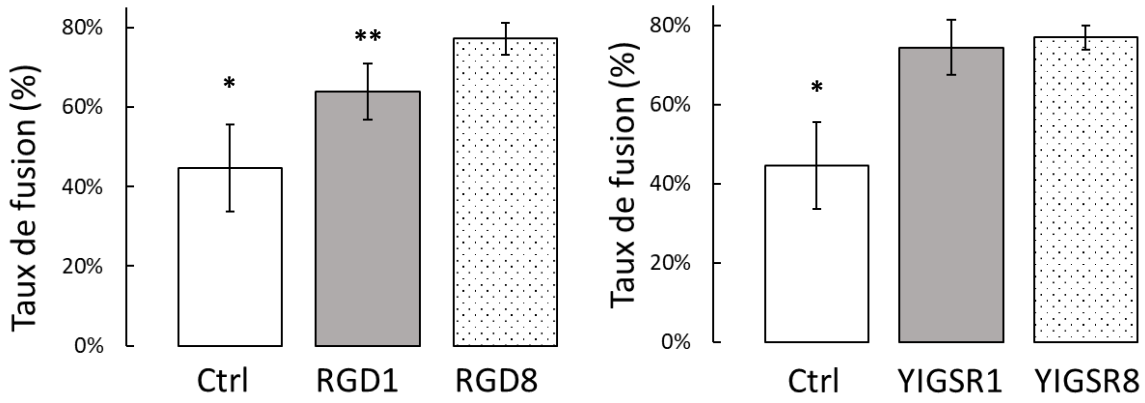

Figure 63: Effet de la concentration pour les deux séquences RGD et YIGSR sur le taux de fusion des myotubes humains.

De plus, lorsque l'on compare l'effet de la concentration pour chaque peptide, on observe que le taux de fusion est significativement plus grand lorsque l'on augmente la concentration en peptide RGD ($p = 0,004$), ce qui n'est pas le cas pour le peptide YIGSR ($p = 0,26$). La figure 64 montre la même tendance concernant l'aire des myotubes, avec un contrôle largement en dessous des échantillons biofonctionnalisés avec les peptides et un effet de concentration uniquement observable avec la séquence RGD. Cette différence peut être expliquée par une incertitude plus importante pour la séquence YIGSR qui peut être justifié par un greffage non-homogène des peptides, ce qui cause des agglomérats comme observé précédemment (Figure 57).

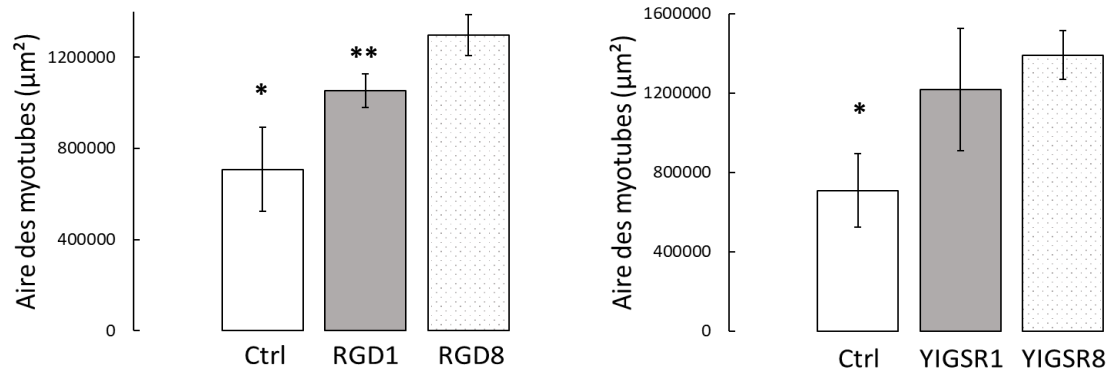

Figure 64: Effet de la concentration en peptide sur la quantité de myotubes humains produits.

Dans les deux cas, le peptide YIGSR présente des résultats proches de celle de la séquence RGD ce qui sous-entend une réponse favorable des myoblastes à ces deux séquences peptidiques. Puisque l'on retrouve ces deux séquences dans la matrice extracellulaire, nous nous sommes posé la question d'une possible synergie.

Pour vérifier cette hypothèse, deux mélanges ont été effectués, avec là aussi une différence de concentration d'un rapport 8 (Mix1 et Mix8). Pour comparer ces deux conditions, le même contrôle négatif sans biofonctionnalisation a été utilisé et les valeurs du RGD à la concentration maximale (Figure 63 et 64) ont été considérées comme contrôle positif. Le tableau 13 résume les résultats obtenus sur les myotubes.

Tableau 13: Effet synergique entre les deux séquences peptidique sur la différenciation des myotubes humains.

Nom de la condition	Taux de fusion	Aire des myotubes (mm^2)
Ctrl	45 ± 11%	0,70 ± 0,18
RGD8	64 ± 7%	1,05 ± 0,07
Mix1	72 ± 3%	1,12 ± 0,15
Mix8	73 ± 3%	1,18 ± 0,14

On observe sur la Figure 65 que les échantillons biofonctionnalisés sont significativement meilleurs par rapport au contrôle (p = 0,002 pour le taux de fusion et p = 0,001 pour l'aire des myotubes entre le Ctrl et Mix8). De plus, on peut voir que le taux de fusion et l'aire des myotubes produits est plus important pour la condition RGD8 correspondant à la séquence peptidique RGD seule à la concentration maximale, par rapport aux deux mélanges. Cela suggère donc qu'il n'y a pas d'effet synergique entre les deux peptides et que l'utilisation d'une seule séquence de peptide donne les meilleurs résultats. Les séquences peptidiqu,es que l'on retrouve dans la matrice extracellulaire ne doivent pas se situer dans les mêmes zones ce qui pourrait expliquer cette absence de synergie.

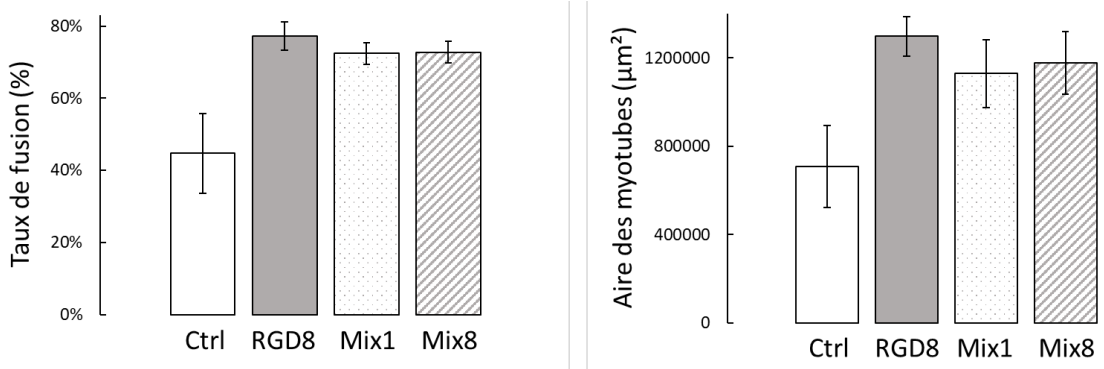

Figure 65: Effet synergique de la séquence RGD et YIGSR sur le taux de fusion et la quantité de myotubes humains produits.

E) Impact de la sylilation du peptide sur la biofonctionnalisation du PDMS

Il a été prouvé dans la littérature que la géométrie du peptide pouvait avoir un impact sur l'adhésion cellulaire (290) et en particulier pour celle des myoblastes (291). Afin d'optimiser la structure du peptide, une seconde génération a été synthétisée à l'IBMM par l'équipe de Gilles Subra. Cette modification chimique répond à deux besoins : améliorer l'adhésion du peptide sur le PDMS pour s'assurer que son application est homogène et mettre encore plus en avant la séquence d'intérêt en jouant sur la conformation chimique du peptide. La nouveauté réside donc dans la silylation qui est maintenant présente de part et d'autre de la séquence peptidique d'intérêt. On se retrouve ainsi avec un peptide qui n'est plus mono mais bi-silylé (Figure 66).

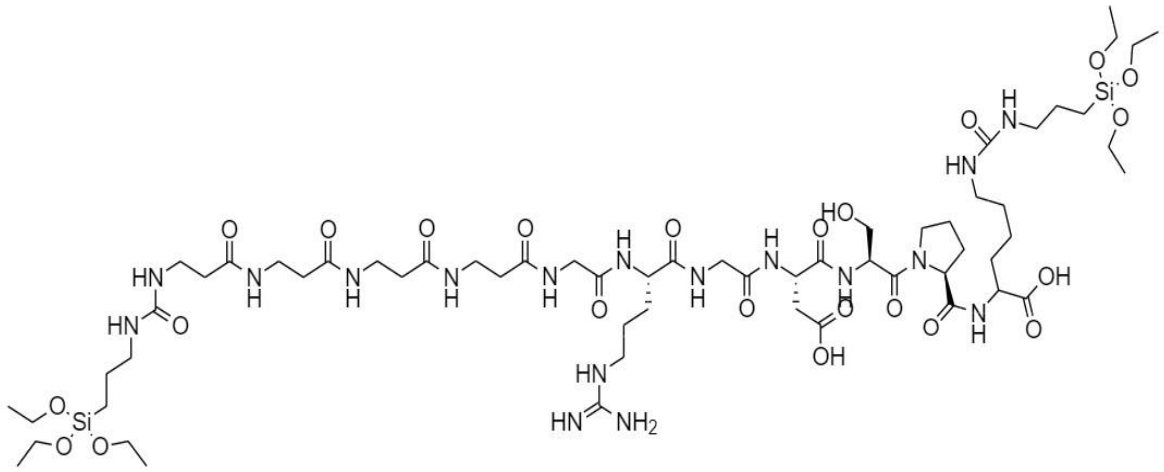

Figure 66: Peptide bi-silylé en ses deux extrémités contenant la séquence RGD.

Théoriquement, cette bi-fonctionnalisation apporte trois avantages : le premier est une meilleure accroche au support en silicone puisqu'il peut créer non pas un mais deux groupes de liaisons covalentes avec la membrane. Deuxièmement, en s'accrochant en deux point, la séquence peptidique d'intérêt étant située en milieu du peptide, elle est plus facilement accessible en surface pour les myoblastes (Figure 67).

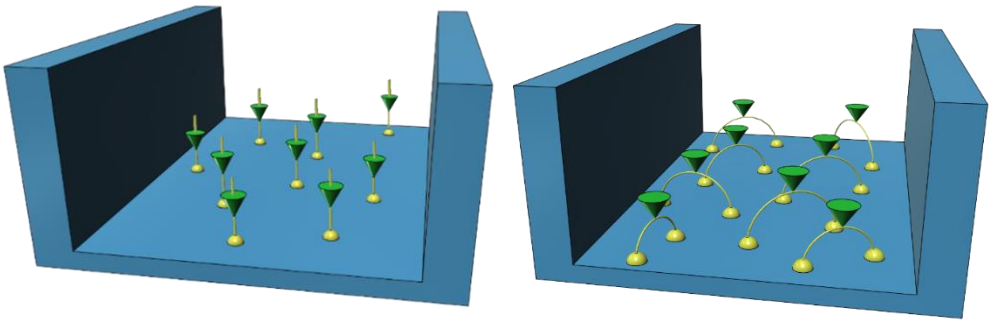

Figure 67: Modélisation de l'accroche des peptides. A gauche la structure des peptides mono-silylés, à droite, celle des peptides bi-silylés. Les demi-cercles représentent les parties silylées qui s'accrochent au PDMS et les cônes verts représentent la séquence RGD. Les cylindres jaunes représentent les autres acides aminés qui composent le peptide.

Enfin, les extrémités silylées peuvent aussi réagir entre elles pour créer des enchainements de peptides qui peuvent alors former une couche plus épaisse favorisant alors encore plus l'adhésion cellulaire puisque la surface présenterait des groupements d'adhésion dans un réseau 3D (Figure 68). Ces hypothèses restent cependant très théoriques et difficiles à vérifier expérimentalement.

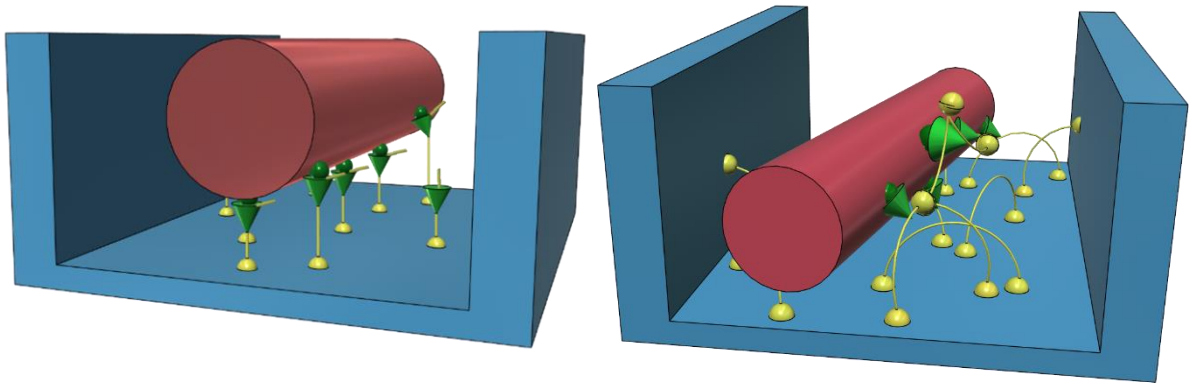

Figure 68 : Modélisation des deux formes de peptides avec une fibre musculaire. A gauche, les peptides mono-silylés et à droite, les peptides bi-silylés pouvant former une couche en 3D en réagissant entre eux. Les demi-cercles représentent les parties silylées qui s'accrochent au PDMS et les cônes verts représentent la séquence RGD. Les cylindres jaunes représentent les autres acides aminés qui composent le peptide. Les ronds verts représentent les intégrines présentes à la surface du myotube.

Pour pouvoir comparer l'effet entre les peptides RGD mono-silylé et bi-silylés, deux membranes ont été produites par dip-coating, l'une avec le peptide mono-silylé à 10 mg/mL et la seconde avec le peptide bi-silylé à 10 mg/mL. Ces deux membranes ont ensuite été stérilisées et mises en culture avec des myoblastes humains. Après 3 jours de prolifération et 4 jours de différenciation, les myotubes ont été fixés et observés par immunofluorescence. La Figure 69 montre la différence entre une membrane contrôle sans peptide (Figure 69a), une membrane biofonctionnalisée avec le peptide mono-silylé (Figure 69b) et une membrane biofonctionnalisée avec le peptide bi-silylé (Figure 69c). On observe une nette différence entre les deux membranes biofonctionnalisées par rapport au contrôle. De façon intéressante nous avons observé que sur les membranes bi-silylées, après 3 jours de culture, les myotubes sont plus larges. Ils sont aussi plus longs et possèdent plus d'embranchements par rapport aux membranes mono-silylées, mettant en avant une probable différenciation plus avancée.

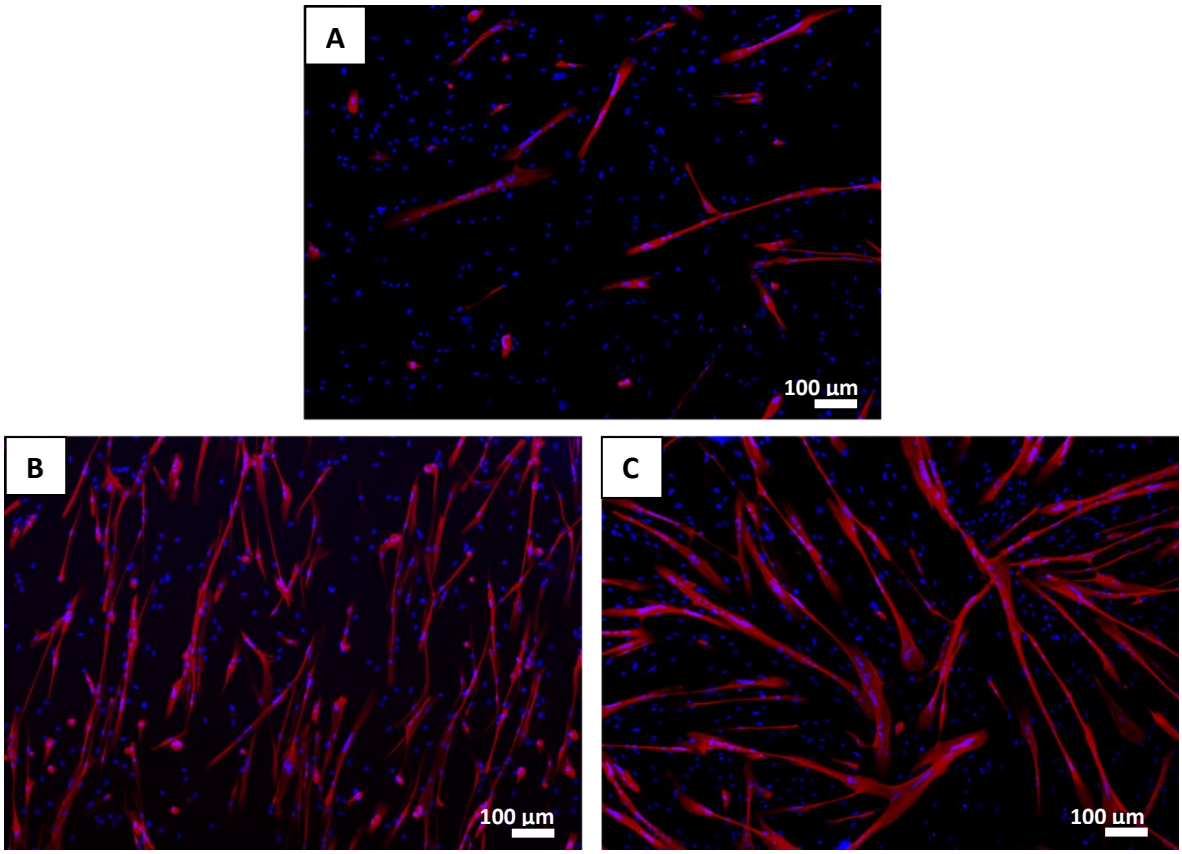

Figure 69: Effet de la silylation du peptide RGD sur la différenciation des myotubes humains. A) le contrôle négatif non-biofonctionnalisé, B) la membrane avec les peptides mono-silylés et C) la membrane avec les peptides bi-silylés.

Pour essayer de comprendre ce qui distingue la biofonctionnalisation avec le peptide mono-silylé de celle avec le peptide bi-silylé, les membranes ont été analysées par XPS (Spectrométrie Photoélectronique X). Ces deux méthodes de caractérisation physique permettent d'évaluer l'efficacité de la biofonctionnalisation et notamment de visualiser si une couche s'est formée en surface du PDMS. Pour cela 6 échantillons ont été produits : une membrane en PDMS simple servant de contrôle (PDMS), une membrane fonctionnalisée avec un peptide dont la séquence d'acide aminé a été modifiée de telle sorte à ne pas présenter l'enchainement RGD tout en gardant le même poids moléculaire et quasiment la même structure en 3D (Ctrl N), trois membranes biofonctionnalisées avec le peptide RGD bi-silylé à 3 concentrations différentes 1 mg/mL, 10 mg/mL et 20 mg/mL et une membrane biofonctionnalisée avec le peptide RGD mono-silylé à 10 mg/mL. La séquence peptidique du contrôle négatif (Gly-Arg-**Ala**-Asp-Ser-Pro) a été synthétisée de telle sorte à être le plus proche possible au niveau de sa forme et de sa charge de celle du RGD (Gly-Arg-**Gly**-Asp-Ser-Pro) pour ne pas induire de biais. Néanmoins, en modifiant un acide aminé à la séquence RGD, celle-ci n'est théoriquement plus reconnaissable par les intégrines en surface des myoblastes. Dans chacun des échantillons biofonctionnalisés, une partie de la membrane n'est pas trempée dans la solution contenant les peptides et cette zone est marquée de telle sorte à pouvoir la retrouver pour les analyses ensuite. Dans un premier temps, une caractérisation XPS a été effectuée pour valider la présence du

peptide sur la membrane de PDMS. Cela a été possible grâce à une collaboration avec l'équipe BIND de Vincent HUMBLOT au CNRS de Besançon. La technique XPS (X-Ray Photoelectron Spectrometry) consiste à envoyer des rayons X avec une longueur d'onde connue sur la surface de l'échantillon. Ces rayons X arrivent avec une grande d'énergie ce qui déséquilibre les niveaux énergétiques des électrons au cœur et dans la bande de valence des atomes en surface. Ce principe de photoluminescence émet alors des photoélectrons qui sont détectés par le capteur de l'appareil. Chaque élément chimique possède une énergie de photoélectron qui lui est propre ce qui permet une caractérisation à l'échelle atomique de la surface de l'échantillon jusqu'à une profondeur de 5 µm. La méthodologie précise utilisée est reportée en Annexe 2. Pour déterminer l'efficacité de la biofonctionnalisation sur le PDMS, 4 atomes ont été sélectionnés, le carbone, l'oxygène et le silicium qui sont les principaux composants du PDMS et l'azote qui sert de marqueur spécifique puisqu'on le retrouve uniquement dans les acides aminés des peptides (Tableau 14).

*Tableau 14: Résultats des analyses XPS des 6 échantillons. *Dans deux conditions, seules deux analyses ont été effectuées car les échantillons étant transparents, il est difficile de distinguer le côté biofonctionnalisé de celui non-biofonctionnalisé notamment au moment de déposer la membrane dans l'appareil.*

		% atomique			
Nom	N° échantillon	Carbone	Azote	Oxygène	Silicium
PDMS contrôle	1	39,5	-	29,6	30,9
	2	41,6	-	28,5	29,9
	3	41,0	-	29,0	30,0
		40,7 ± 1,1	**-**	**29,0 ± 0,6**	**30,0 ± 0,6**
Peptide mono-silylé	1	30,3	1,6	39,5	28,6
	2	24,8	1,3	36,3	27,6
	3	35,0	1,4	36,1	27,5
		30 ± 5,1	**1,4 ± 0,2**	**37,3 ± 1,9**	**27,9 ± 0,6**
Peptide non-RGD	1	52,0	13,0	24,0	11,1
	2	49,0	11,0	26,3	13,7
	3	51,1	11,3	24,2	13,5
		50,7 ± 1,5	**11,8 ± 1,1**	**24,8 ± 1,3**	**12,8 ± 1,4**
Peptide RGD 1mg/mL*	1	31,4	1,8	38,4	28,1
	2	31,2	2,4	39,1	27,4
		31,3 ± 0,1	**2,1 ± 0,4**	**38,8 ± 0,5**	**27,8 ± 0,5**
Peptide RGD 10 mg/mL*	1	49,0	11,6	26,4	13,1
	2	53,6	12,4	23,7	10,1
		51,3 ± 3,3	**12,0 ± 0,6**	**25,1 ± 1,9**	**11,6 ± 2,1**
Peptide RGD 20 mg/mL	1	53,5	12,0	23,9	10,6
	2	51,6	12,2	24,6	11,6
	3	55,8	11,1	22,0	11,2
		53,6 ± 2,1	**11,8 ± 0,6**	**23,5 ± 1,3**	**11,1 ± 0,5**

En utilisant des modèles mathématiques, il est aussi possible de déterminer une épaisseur de couches en comparant la quantité de carbone, d'oxygène et de silicium entre un échantillon de PDMS non-biofonctionnalisé et un avec des peptides. Ces modèles sont cependant dépendant de nombreux paramètres comme le matériau de base, la forme des peptides et l'épaisseur de la couche estimée. On observe sur la Figure 70 la présence de Carbone dans les 6 échantillons, ce qui ne donne pas d'indication particulière sur la qualité de la biofonctionnalisation. On remarque que la tendance de pourcentage atomique du PDMS correspond à la sa formule chimique $(C_2H_6OSi)_n$. Néanmoins, on peut observer que les échantillons à 10mg/mL, à 20 mg/mL ainsi que la séquence non-RGD présentent plus de carbone ce qui pourrait signifier qu'il existe une couche par-dessus la surface du PDMS (en blanc). Les valeurs de l'azote valident cette hypothèse puisqu'on n'observe pas d'azote sur le PDMS nu, une

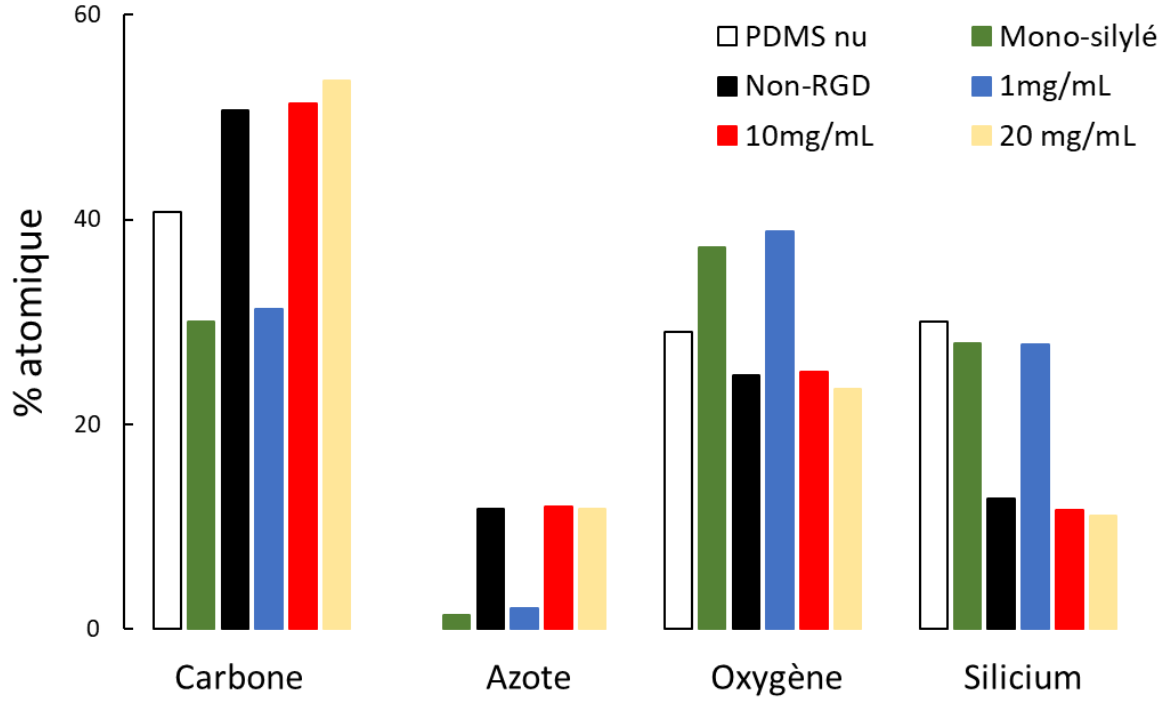

Figure 70 : Résultats de l'analyse XPS des 6 échantillons.

faible quantité d'azote sur les échantillons à 1 mg/mL et mono-silylé contrairement aux trois autres échantillons. Ces deux conditions se distinguent aussi au niveau de l'oxygène ce qui suggère que la biofonctionnalisation a fonctionné puisqu'on n'observe pas les mêmes tendances que pour le PDMS nu. Cependant, seule une monocouche est formée ce qui explique aussi la tendance du silicium.

Dans le cadre du silicium, les rayons X qui ont été envoyés sur la surface des échantillons ont probablement dépassé l'épaisseur de la monocouche et les deux pics représentent la partie du support en silicone. Enfin, On observe pour les trois échantillons non RGD, 10 mg/mL et 20 mg/mL que les pourcentages de chaque élément sont équivalents ce qui implique que la couche créée est supérieure à la profondeur jusqu'à laquelle pénètrent les rayons X dans l'échantillons. Ces résultats montrent donc que la biofonctionnalisation a fonctionné pour tous les échantillons, qu'une monocouche s'est

formée pour deux d'entre eux (mono-silylé et 1 mg/mL) et que pour les 3 autres échantillons, une couche plus épaisse existe en surface mais elle est trop épaisse pour avoir une estimation de son épaisseur par XPS.

Une analyse AFM (Atomic Force Microscopy) a donc été effectuée avec pour objectif principal de déterminer l'épaisseur des couches présentes dans les 3 échantillons. Les analyse AFM ont été effectuées à la frontière entre la zone greffée et non greffée. Les résultats des analyses sont présentés dans les Figure 63 à 67. Le H sur les images de gauche représente la zone d'analyse. On peut observer pour chacune d'elle l'épaisseur de la couche représenté par la courbe Axe-Z en fonction du déplacement. Ainsi, pour le PDMS nu, on peut observer une certaine rugosité présente sur toute la surface de la membrane (Figure 71).

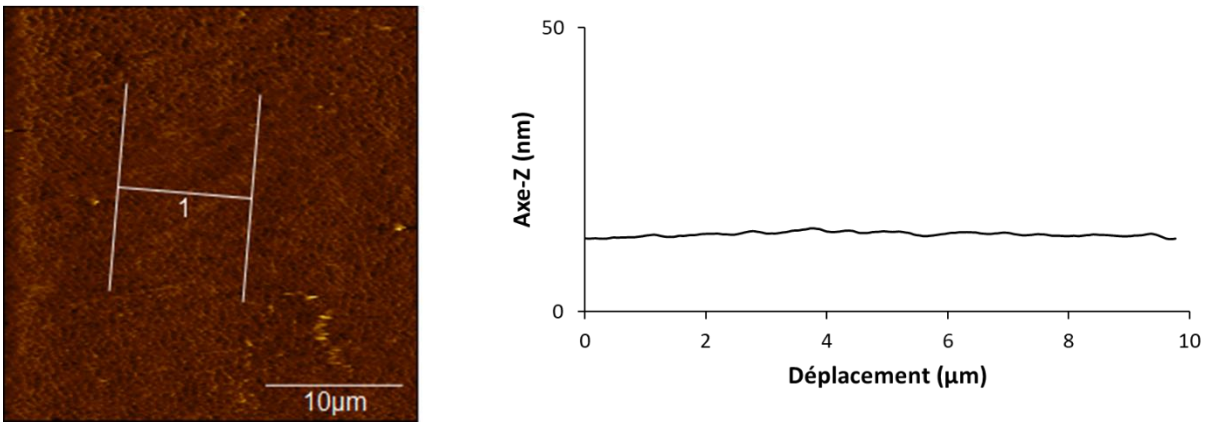

Figure 71: Analyse AFM de l'échantillon de PDMS non-biofonctionnalisé.

Pour le contrôle avec le peptide non-RGD, une fine couche de 12,0 ± 0,8 nm est détectée en AFM (Figure 72).

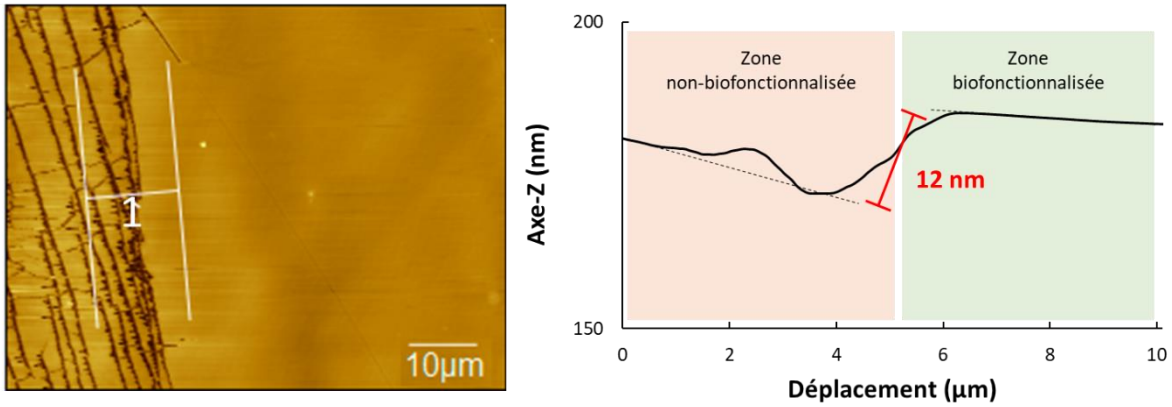

Figure 72 : Analyse AFM de l'échantillon avec le peptide non-RGD à 10 mg/mL.

Concernant le peptide RGD bi-silylé, la frontière n'est pas identifiable au microscope optique. La mesure a donc été effectuée dans une zone biofonctionnalisée du PDMS. On observe un effet de la concentration puisqu'à 1 mg/mL, on retrouve des résultats similaires au PDMS signifiant qu'au mieux, une couche mono-moléculaire s'est formée mais pas détectable ici (Figure 73).

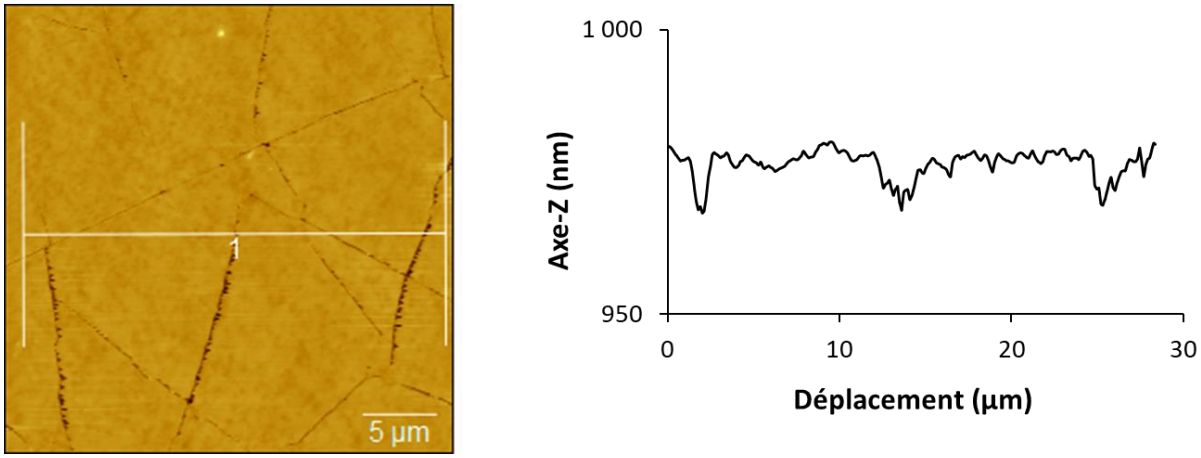

Figure 73 : Analyse AFM de l'échantillon RGD bi-silylé à 1 mg/mL.

C'est probablement due à la trop faible concentration en peptides dans la solution. Cela ne signifie pas que le coating n'a pas fonctionné mais plutôt que les peptides en surface ne se sont pas liés entre eux pour former le réseau 3D mentionné précédemment. A l'inverse, dès une concentration de 10 mg/mL, une couche de 150 ± 9 nm est observée (Figure 74).

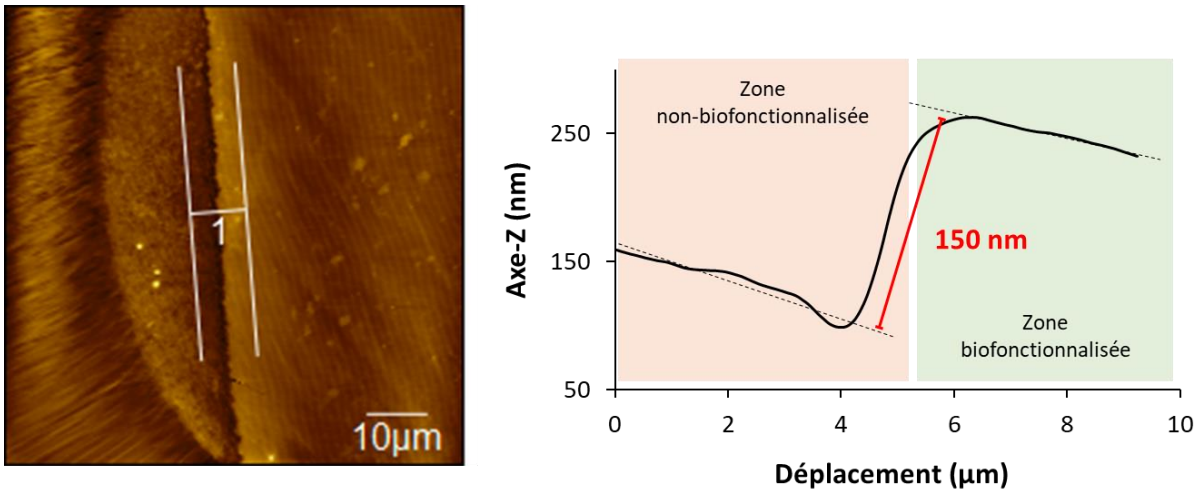

Figure 74 : Analyse AFM de l'échantillon RGD bi-silylé à 10 mg/mL.

On ne retrouve pas le facteur x10 de la concentration par rapport à l'échantillon à 1 mg/mL ce qui implique que la corrélation entre l'épaisseur de la couche et la concentration en peptide n'est pas llinéaire. Cela peut s'expliquer par les différents types de liaisons qui peuvent se créer entre les peptides. La principale est la réaction entre deux extrémités silylées qui produit une liaison Si-O-Si. Mais il est aussi possible que des liaisons hydrogènes se forment entre les différents acides aminés. Ces liaisons faibles peuvent induire une conformation spécifique du peptide ce qui va modifier sa

structure 3D. Cela est possible car la molécule ne contient pas de groupes fonctionnels qui la rigidifie comme des doubles liaisons C=C. Ainsi, on ne retrouve pas un facteur x10 car cette couche n'est pas la superposition de 10 couches les unes au-dessus des autres mais plutôt un agencement particulier des peptides formant une entité à part entière.

De plus, on observe une différence d'un facteur x10 par rapport à l'épaisseur de la couche du peptide non-RGD Cette différence peut aussi s'expliquer par la structure 3D des deux peptides. En effet, cette séquence peptidique est Gly-Arg-**Ala**-Asp-Ser-Pro contre Gly-Arg-**Gly**-Asp-Ser-Pro pour le RGD. On remarque donc que la glycine a été remplacée par une alanine. Ces deux acides α-aminés sont très proches chimiquement (Figure 75a) mais la présence du méthyl dans l'alanine est joue probablement un rôle lors de la conformation 3D du peptide. En effet, les peptides ne forment pas une molécule linéaire mais plutôt une espèce en 3D avec les liaisons faibles intramoléculaires (292). De ce fait, la simple présence d'un méthyl supplémentaire, peut créer une gêne stérique et altérer les interactions faibles entre les peptides ce qui peut alors augmenter l'épaisseur de la couche formée. C'est ce que

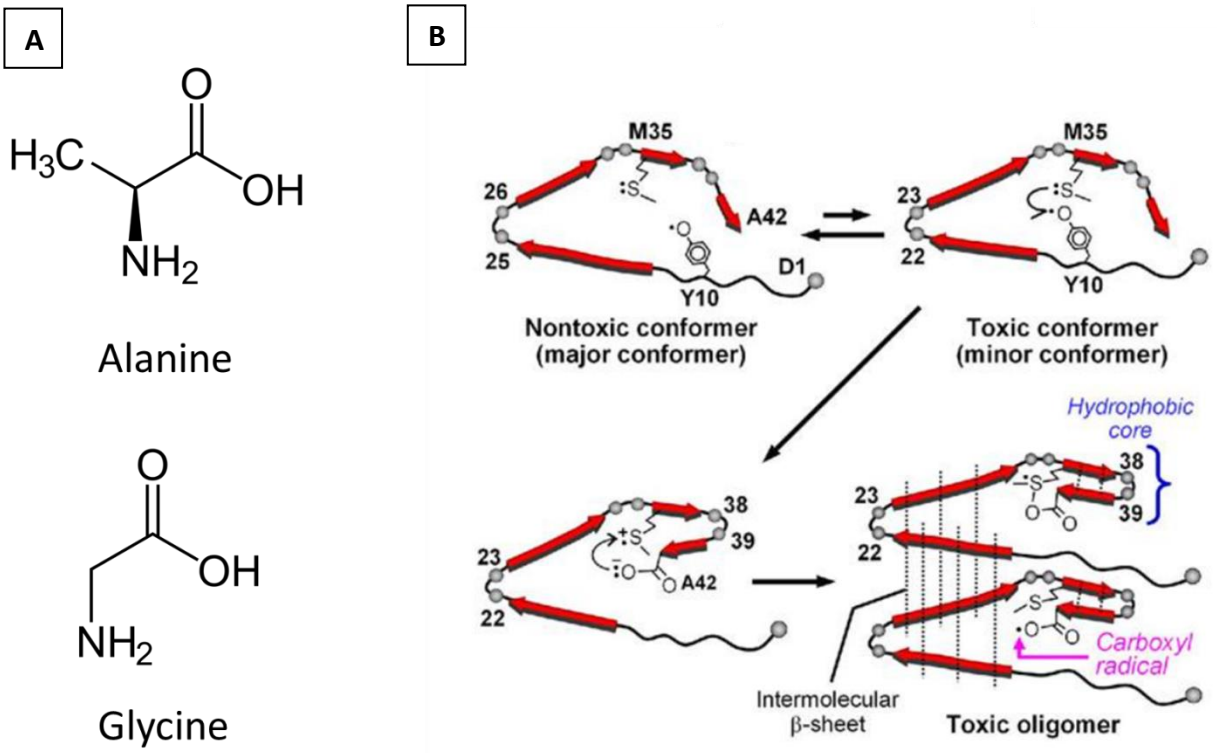

Figure 75 : A) Structure chimique de l'alanine et de la glycine. B) Changement de conformation d'un même peptide et son effet sur sa toxicité.
Issu de (289).

montre l'étude de Masuda et al. (292). Si le peptide se plie à deux endroits différents (entre 25 les acides aminées 25-26 ou 22-23), des interactions peuvent avoir lieu avec le composant Y10 qui induit alors une toxicité. La figure 75b illustre avec les « intermolecular β-sheet » le genre d'interactions possibles entre deux peptides mentionnées dans le paragraphe précédent.

Enfin, pour l'échantillon à 20 mg/mL, une couche encore plus épaisse de 320 ± 44 nm est mesurée (Figure 76) mettant ainsi en avant un effet direct de la concentration sur l'épaisseur du revêtement. Ici encore le facteur x2 de l'épaisseur de la couche par rapport à l'échantillon à 10 mg/mL n'est pas retrouvé mais cela suggère une nouvelle fois que l'épaisseur de la couche n'est corrélée de manière linéaire à la concentration en peptide mais plutôt de manière polynomial (Figure 77).

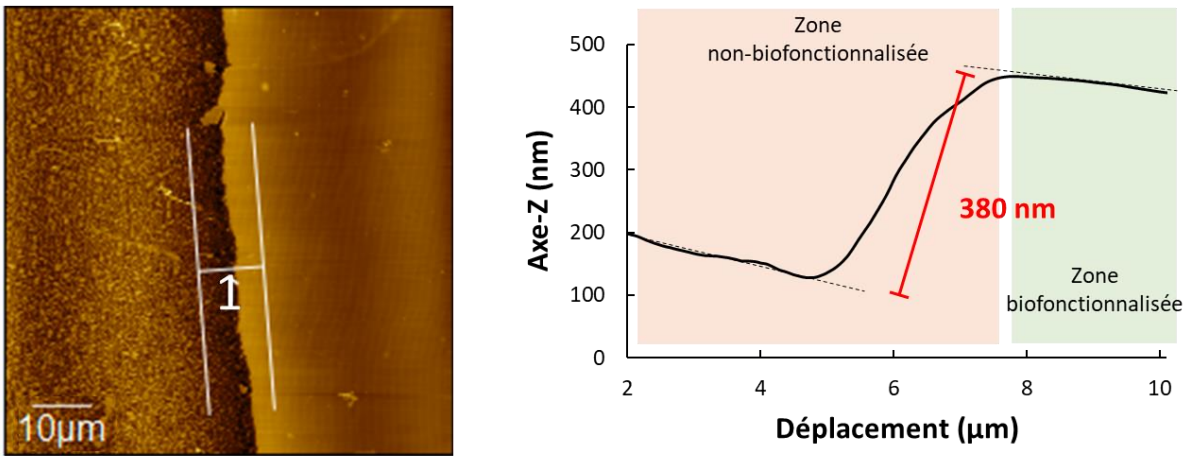

Figure 76 : Analyse AFM de l'échantillon RGD bi-silylé à 20 mg/mL.

Pour conclure, ces deux analyses ont permis de confirmer la réussite des greffages de peptides par la présence d'azote dans chacun des échantillons. Ensuite, un effet de la concentration en peptide est mesuré en AFM et en partie confirmé par XPS. La séquence peptidique joue aussi un rôle puisqu'en modifiant l'ordre des acides aminés, l'épaisseur de la couche peut-être 60 fois plus importante pour une même concentration.

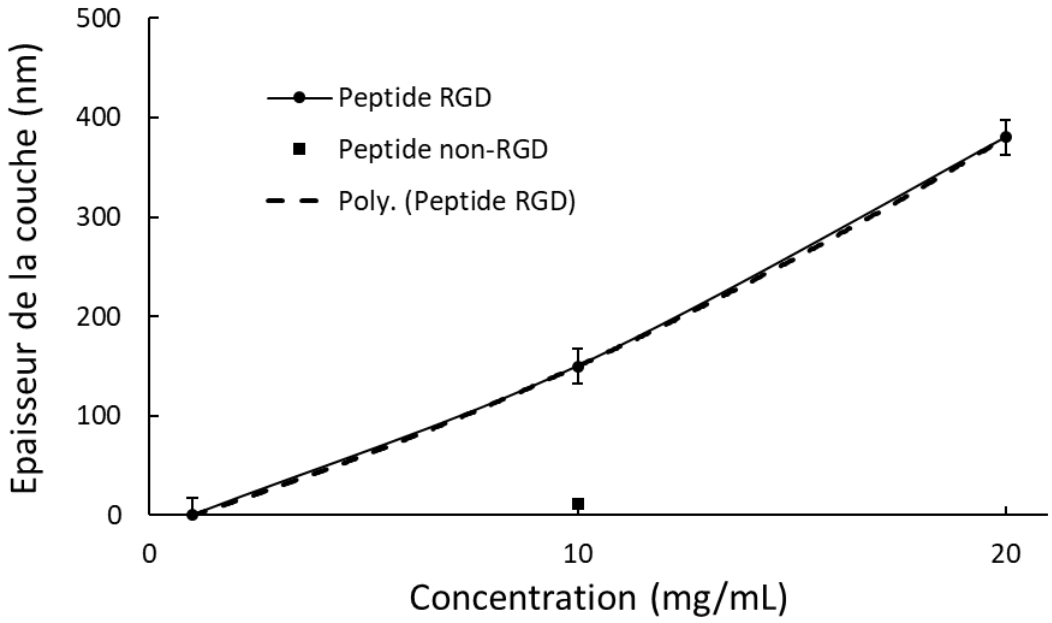

Figure 77 : Effet de la concentration du peptide sur l'épaisseur de la couche.

F) Effet de l'épaisseur de la couche de peptides sur la prolifération et la différenciation des myoblastes primaires humains en culture

Une membrane a été biofonctionnalisée sur une partie avec une solution de peptide RGD bi-silylé à 1 mg/mL et sur l'autre partie avec une solution de peptide RGD bi-silylé à 20 mg/mL en trempant la membrane par dip-coating dans deux solutions différentes. La partie basse est d'abord trempée dans la première solution, puis elle est retournée et la nouvelle partie basse (celle qui était située au-dessus au départ) est trempée dans la seconde solution. La suite du protocole de biofonctionnalisation est ensuite la même. La membrane a ensuite été stérilisée et mise en culture avec des myoblastes primaires humains. Après 3 jours de prolifération et 3 jours de différenciation, les myotubes sont fixés et marqués à la troponine T et au DAPI pour être observés par immunofluorescence.

La Figure 77 montre dans l'encadré en jaune la partie à 1 mg/mL et dans l'encadré en vert la partie à 20 mg/mL. On observe que les myoblastes migrent préférentiellement vers la partie de la membrane avec la concentration en peptide la plus importante pour s'y développer et se différencier en myotubes plus larges et en plus grande quantité. Cela peut s'expliquer par la couche en surface qui est plus homogène et ainsi on ne retrouve pas les clusters observés précédemment lors des premiers essais de biofonctionnalisation avec les peptides (Figure 57). L'épaisseur de la couche étant plus importante

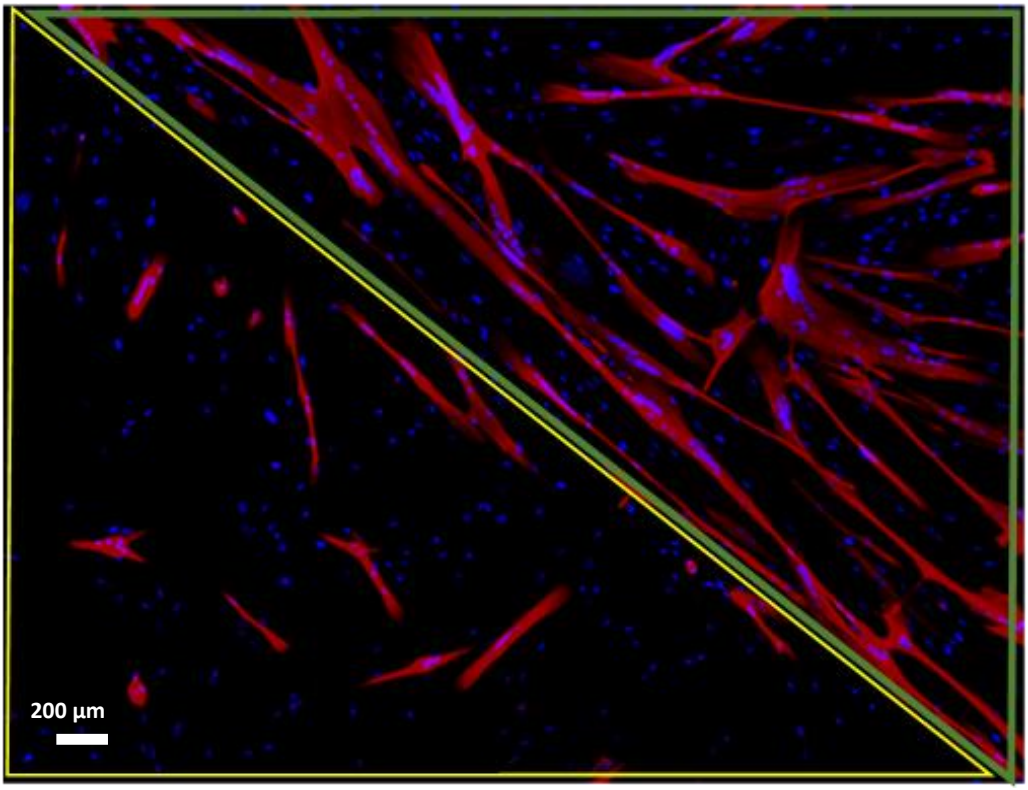

Figure 78: Effet de l'épaisseur de la couche de peptides sur la différenciation des myotubes humains.

lorsque la concentration augmente, cela crée un environnement plus favorable aux myoblastes qui ont plus de zones d'attache pour les intégrines ce qui leur permet de mieux proliférer et de mieux se développer.

On observe la même tendance avec les peptides RGD et non-RGD, expliqué là aussi par une couche plus épaisse dans la première condition (Figure 79).

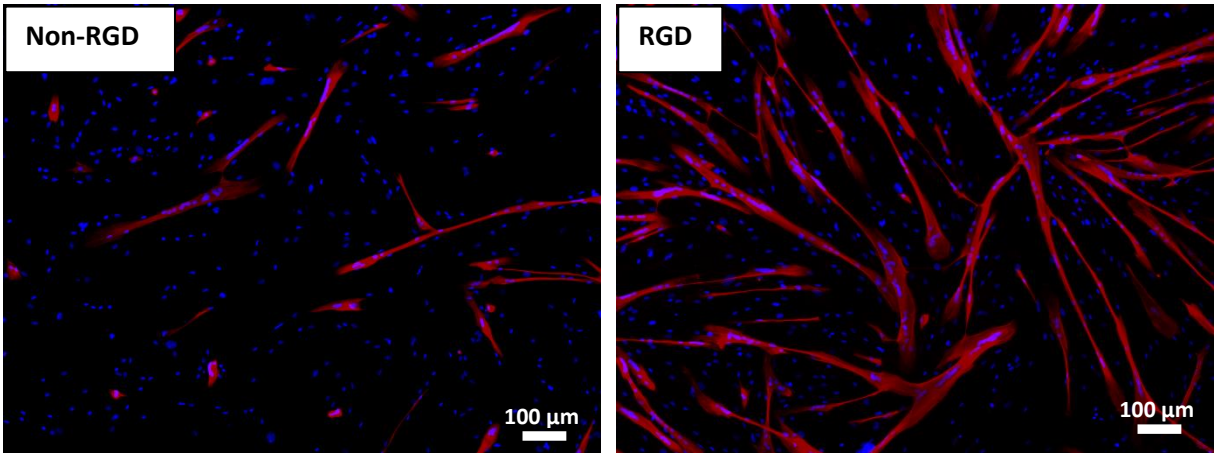

Figure 79: Effet de la séquence peptidique sur la différenciation des myotubes humains.

Ainsi dans la troisième partie expérimentale de cette thèse, nous sommes arrivés à proposer un support en silicone étirable optimal, présentant une microstructuration en sillons d'une hauteur de 8µm à 10µm, un espacement entre les microstructures de 75µm et avec des peptides RGD bi-silylés greffés à une concentration de 20 mg/mL sur le silicone de telle sorte à former une couche de plusieurs centaines de nanomètres favorisant la prolifération et la différenciation des myotubes humains (Figure 80).

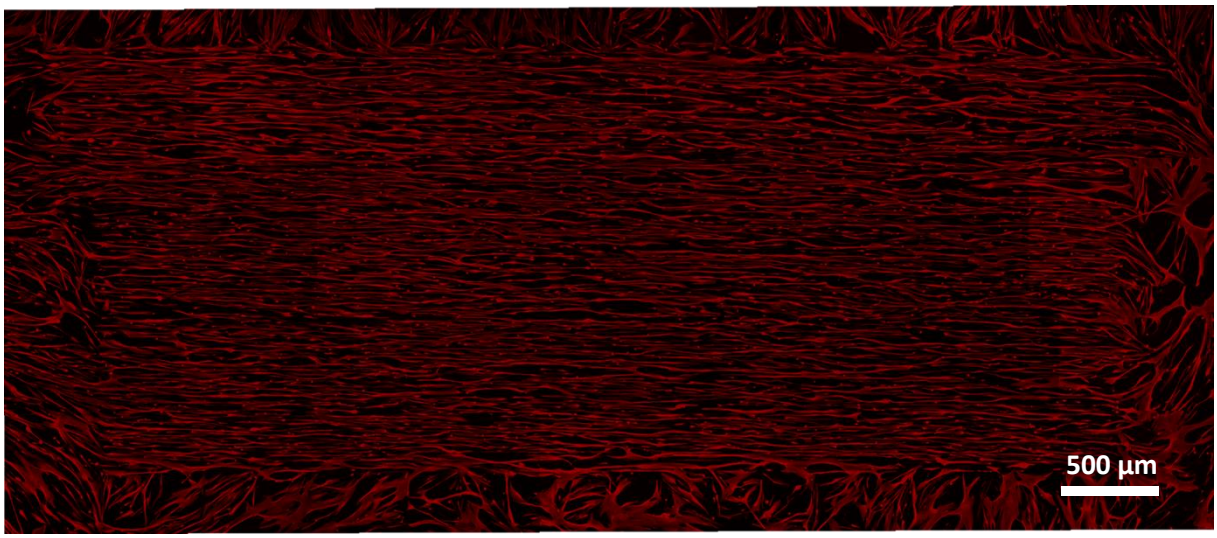

Figure 80: Reconstitution par immunofluorescence de la membrane microstructurée optimale avec les myotubes différenciés.

Chapitre 4 : Mise en place d'un protocole d'étirement mécanique permettant de stimuler in vitro la différenciation des myotubes en culture sur support microstructuré en sillon longitudinal.

L'un des inconvénients majeurs actuel de la culture *in vitro* est que les myotubes ont tendance à se décoller rapidement, souvent avant même d'avoir obtenu une maturation suffisante avec l'apparition d'un système contractile bien développé (217). Dans notre système, cela arrive généralement au-delà du quatrième jour de différenciation. Ainsi, notre premier objectif a été la mise au point d'un protocole permettant d'améliorer la différenciation des myotubes alignés avec l'obtention de stries caractéristiques du système contractile. Pour cela, on a vu précédemment dans la revue de littérature, qu'il n'existe pas de protocole unique mais qu'il faut l'adapter à son support et à sa machine d'étirement. L'appareil le plus utilisé dans la littérature est le FX-600 de Flexcell (Figure 81a)

Dans le cadre du projet, nous avons utilisé le système d'étirement MCT6 de CellScale (Figure 81b) qui a l'avantage par rapport à des systèmes comme FLEXCELL FX-600 de permettre d'étirer tout type de support et de manière unidirectionnel. La première condition est nécessaire car pour pouvoir microstructurer les membranes en silicone, il faut qu'elles puissent notamment être compatible avec la méthode du spin-coating, ce qui n'est pas le cas dans la plupart des supports commerciaux vendus avec les appareils d'étirement. L'étirement unidirectionnel est aussi un avantage selon nous car il représente mieux les contraintes auxquelles est soumis le muscle *in vivo* lors d'un exercice.

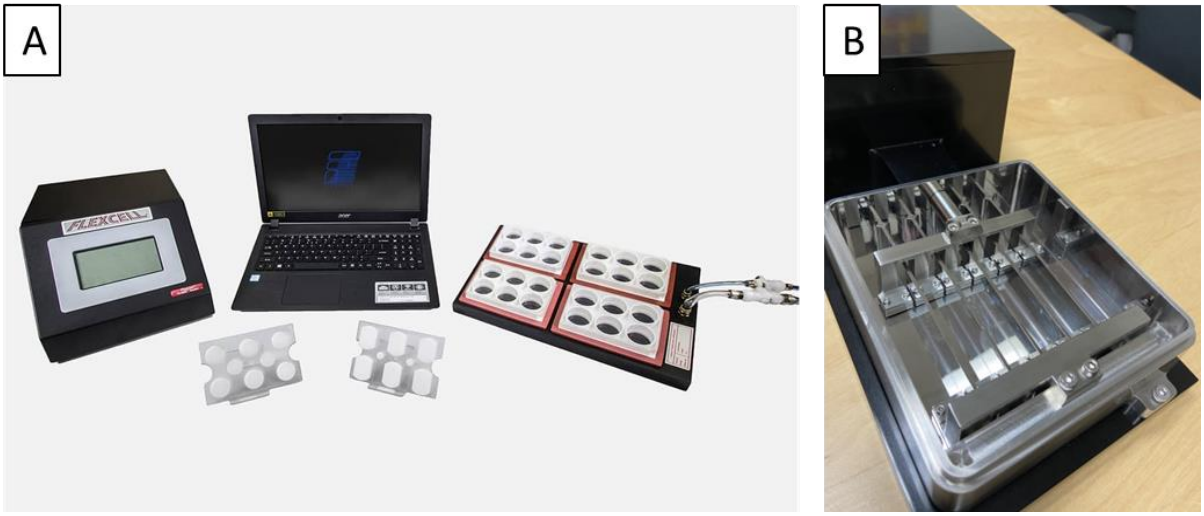

Figure 81: Les deux systèmes d'étirement disponibles au laboratoire. A) le système pneumatique de FlexCell FS-6000T et B) le système d'étirement uniaxial MCT6 de CellScale.

On a aussi vu précédemment que, pour l'étirement mécanique, quatre paramètres sont à optimiser pour obtenir une réponse des myotubes au stress : l'amplitude d'étirement, la fréquence d'étirement, la durée de l'étirement et quand il démarre. Dès le départ, la fréquence d'étirement a été fixée à 1Hz et n'a jamais été modifiée. Cette valeur a été choisie car c'est celle qui est le plus couramment utilisée dans les modèles d'étirement mécanique *in vitro*. Nous avons préféré modifier l'amplitude et la durée qui semblent avoir un impact plus important sur la différenciation des myotubes.

Concernant l'amplitude, la plupart des articles présentent ce paramètre sous la forme d'un pourcentage, souvent compris entre 5% et 30% de la longueur initiale, en fonction de l'effet recherché (étirement chronique entre 5% et 15% ou étirement pour provoquer des lésions entre 15% et 30%). Il est cependant rarement mentionné à partir de quelle longueur est calculé ce pourcentage. Nous avons choisi de le calculer sur la base de la longueur initiale des microstructures. Etant de 1,5 cm un étirement par exemple de 10% correspond à un déplacement de 1,5 mm. L'objectif étant d'améliorer la différenciation, l'étirement a été démarré à J0 de différenciation, ce qui correspond au moment où le milieu de culture est changé au profit d'un milieu plus restreint en nutriments. Enfin, la durée a été fixée à 4 jours maximum avec un étirement périodique en continu 24h/24. Pour connaitre le pourcentage optimal à appliquer, nous avons donc dû, dans un premier temps, évaluer l'effet de l'amplitude d'étirement choisi sur la différenciation des myotubes en culture. C'est l'objectif du prochain chapitre.

A) Effet de l'amplitude d'étirement sur la différenciation des myotubes humains en culture

Les supports microstructurés et biofonctionnalisés avec le peptide RGD bi-silylé sont déposés dans des boites de Petri et les myoblastes primaires humains sont ensemencés par-dessus. A confluence, les membranes sont délicatement retirées de la boite et déposées dans la machine MCT6 puis étirées pendant 4 jours (1,5mm, 1Hz, en continu). Des membranes ont été retirées pendant les premières heures de l'étirement puis 3 autres espacées de 12h pour suivre l'effet de l'étirement sur les myotubes humains dès les premières heures. Les myotubes sont ensuite fixés et marqués à la troponine T et au DAPI. La Figure 82 montre les premiers résultats d'étirement. On observe que les myoblastes restent accrochés au support pendant les 4 premières heures avec aussi un marquage à la troponine T synonyme de la présence de quelques myotubes. Cependant, lorsque l'on passe à 24h on observe une différence significative entre les myotubes étirés et non étirés. Comme attendu, on observe des myotubes différenciés et alignés dans la condition non-étirée. De manière surprenante, les myotubes de la membrane étirée ont tous disparu et il ne reste que peu de myoblastes entourés d'un voile rouge synonyme de cellules fantômes qui se sont probablement décollées. La tendance se poursuit à 36h et

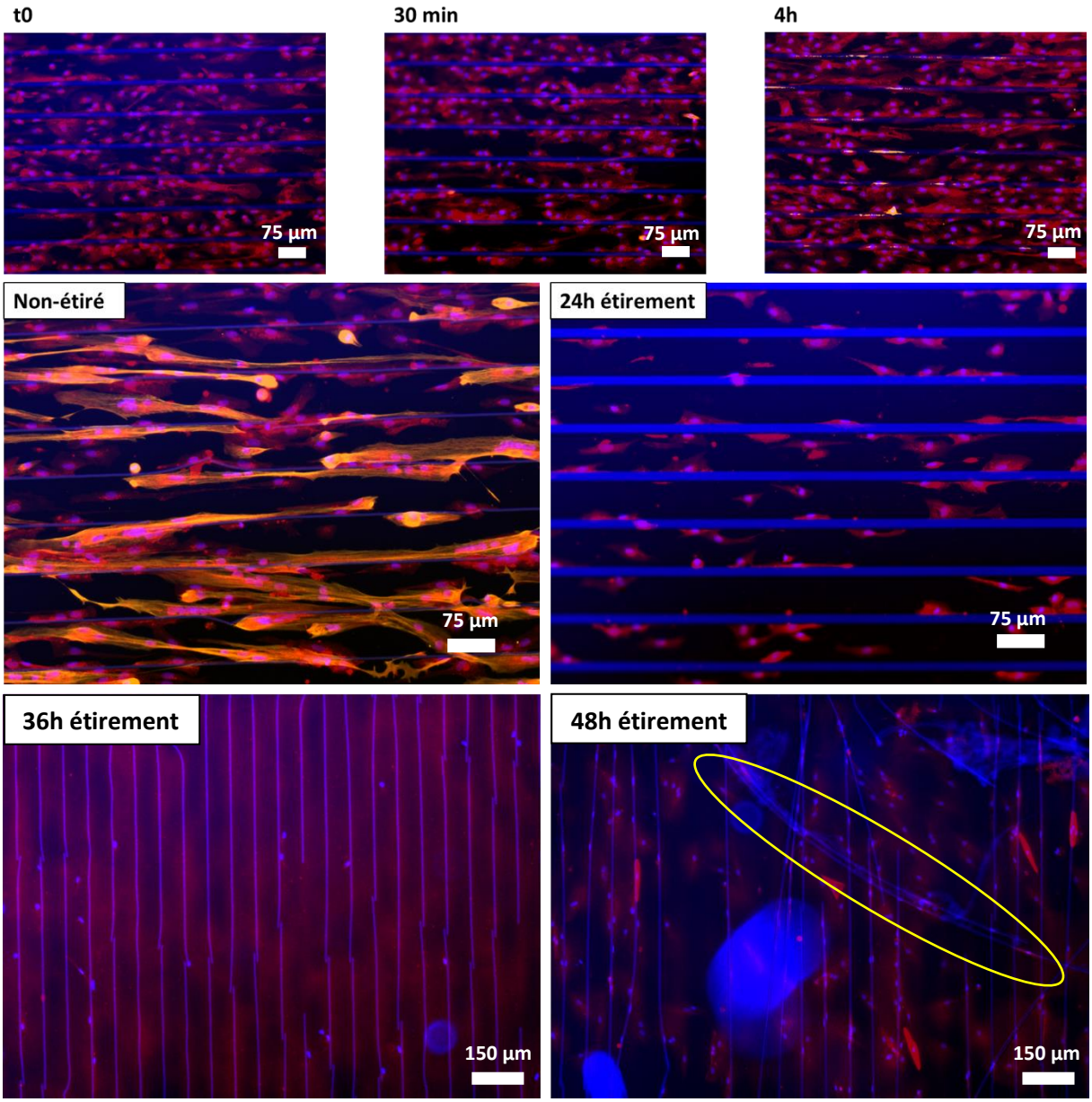

Figure 82: Effet de l'étirement à confluence dans les 4 premières heures après le démarrage.

48h avec un nombre de myoblastes qui continue de diminuer. Des microstructures qui se cassent voire qui se décollent (en jaune) sont également observées. Le silicone est plus flexible et possède un module de Young plus faible (4,1 MPa contre 9,2MPa pour une couche d'EETMol mesurés par nanoindentation). Ainsi, lorsque l'étirement mécanique est appliqué, les forces ne sont pas égales entre les deux matériaux et les liaisons entre le silicone et l'EETMol rompent. En effet, la loi de Hooke donne : $\sigma = E \times \varepsilon$ avec σ la contrainte appliquée (en Pa), E le module de Young du matériaux (en Pa) et ε la déformation (sans unité). Ainsi, puisque $E_{PDMS} < E_{EETMOL}$, pour une même déformation ε, $\sigma_{PDMS} < \sigma_{EETMOL}$. Lorsque cette différence de contrainte est supérieure à $\sigma_{interface}$, la contrainte d'interface entre l'EETMOL et le PDMS, la liaison entre les deux polymères se rompt, ce qui mène au décollement des microstructures.

Ces résultats suggèrent donc que ce protocole d'étirement n'est pas adapté aux myoblastes humains. Ce résultat met aussi en avant le fait que ce ne sont pas les myotubes différenciés qui se décollent mais bien les myoblastes qui n'ont pas fusionné et pour qui le stress mécanique imposé est délétère, avec une réponse apoptotique déjà observée dans d'autres études (98,184,293).

Suite à ces résultats non concluants, nous avons choisi de recalculer le pourcentage d'étirement mais cette fois-ci en fonction de la longueur maximale des fibres mesurée sur des supports microstructurés biofonctionnalisés (Figure 83).

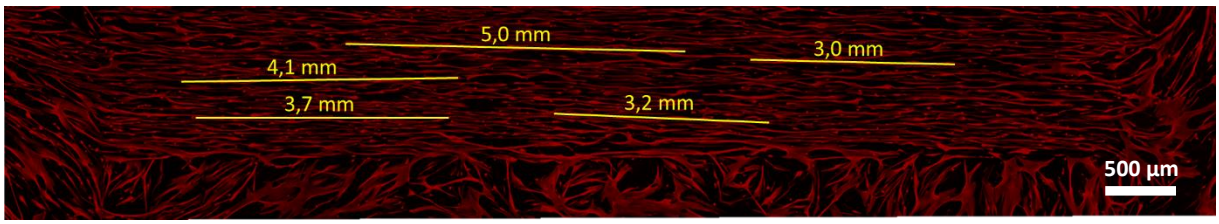

Figure 83: Mesure de la longueur maximale des myotubes produits sur les supports microstructurés biofonctionnalisés.

Ces mesures donnent une longueur maximale moyenne autour de 4 mm ce qui, pour 10% d'étirement, correspond à un déplacement de 0,4 mm soit presque 4 fois moins que l'expérience précédente. Dans le protocole précédent, un étirement de 1,5mm correspond donc à un étirement de 30% pour les myotubes les plus longs, ce qui est utilisé pour induire des lésions et qui explique pourquoi les myotubes se sont décollés. Puisqu'il s'agit de la longueur maximale, pour la suite des manipulations, l'amplitude d'étirement a été fixée à 0,2 mm soit 5% d'étirement pour les myotubes les plus longs. Cette valeur a aussi été choisie afin de s'assurer de ne pas dépasser les 10% d'amplitude d'étirement pour la majorité des myotubes.

L'effet de cette diminution de l'amplitude a donc été testé sur les myotubes humains. Les mêmes conditions de culture et d'étirement que l'expérience précédente ont été mises en place à l'exception de la réduction de l'amplitude d'étirement (0,2 mm au lieu de 1,5 mm, 1Hz, 4 jours en continu, à partir de J0 de différenciation). Une étude cinétique a de nouveau été effectuée pour s'assurer que les myotubes restent attachés au support durant l'étirement. Au bout de 24h d'étirement, nous avons observé que les myotubes étaient toujours en place sur les membranes (Figure 84).

Dans les 2 conditions, avec et sans étirement, le nombre de noyaux est équivalent tout comme le nombre de myotubes même si ceux après étirement semblent visuellement plus larges.

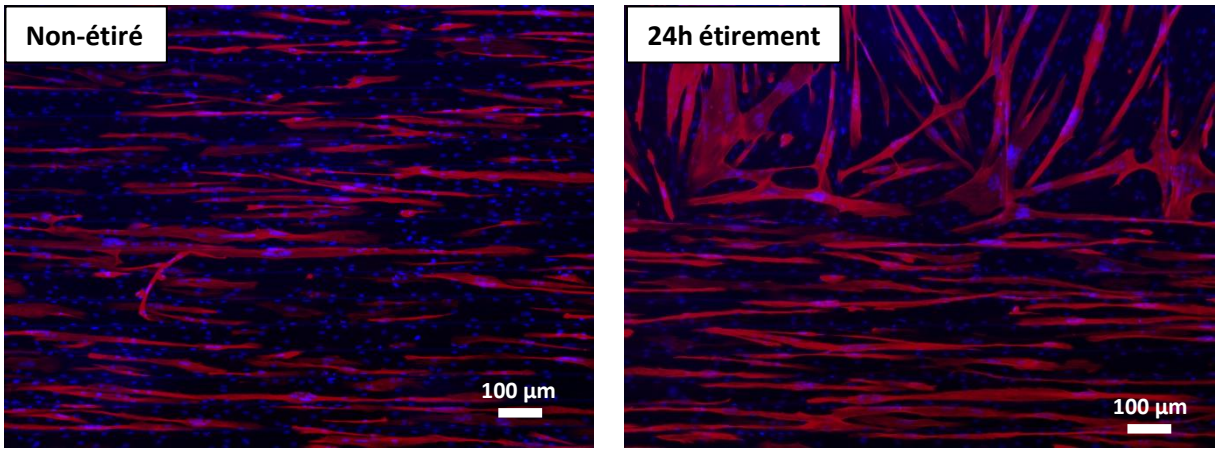

Figure 84: Effet de 24h d'étirement sur la différenciation des myotubes.

Ensuite, lorsque l'on continue l'étirement, les myotubes tendent à se décoller progressivement pour quasiment disparaitre au bout de 3 jours d'étirement en continu (Figure 85).

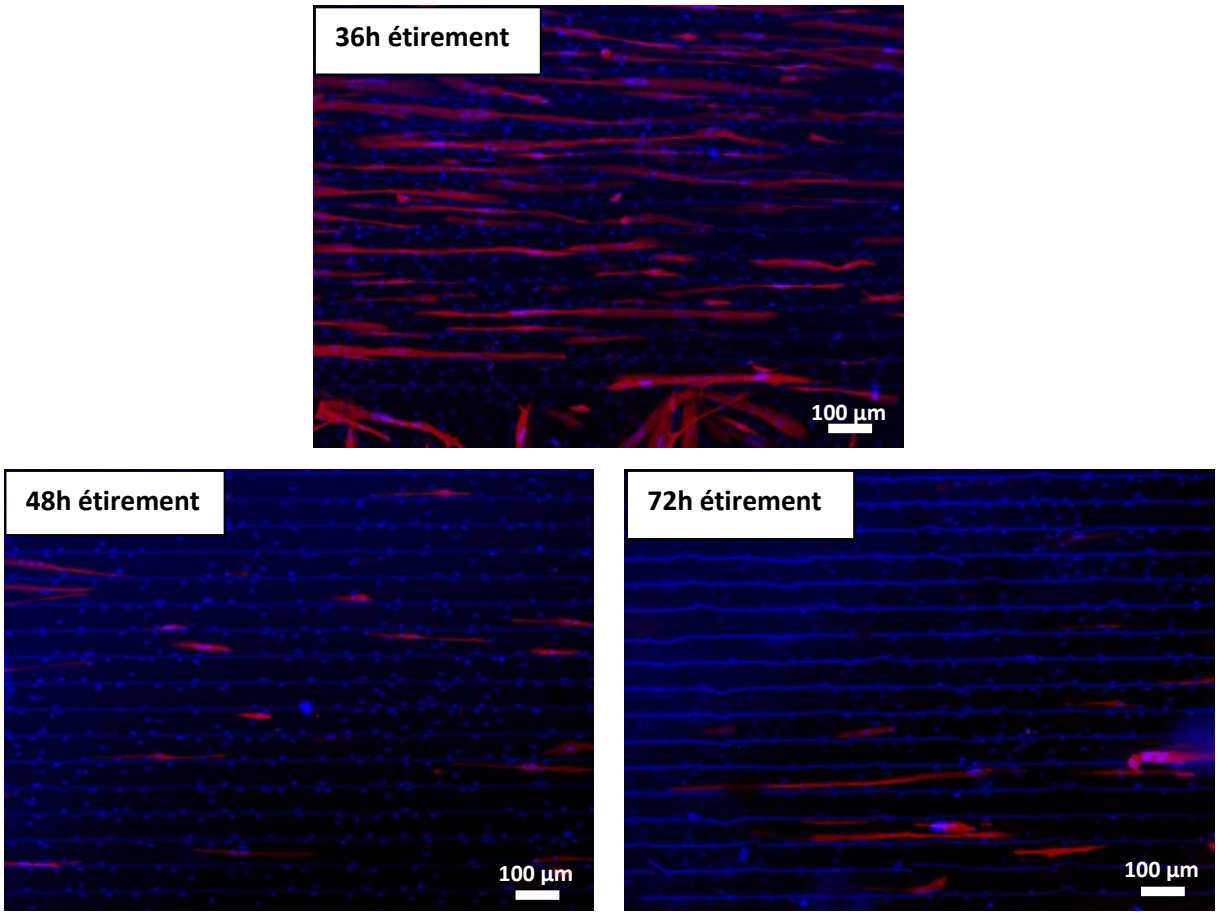

Figure 85: Effet de l'étirement continu pendant 36h, 48h et 72h.

On en conclut donc que l'amplitude d'étirement choisie convient à notre système puisque les myotubes humains restent accrochés pendant au moins 36h d'étirement continu.

B) Effet de la fréquence et de la durée de l'étirement sur la différenciation des myotubes humains en culture.

Nous avons comparé, avec les mêmes conditions de culture, un étirement continu pendant 24h et un étirement pendant 24h avec une alternance entre 1h d'étirement et 3h de repos. Les autres paramètres sont restés inchangés (0,2 mm, 1Hz, à partir de J0 de différenciation). Les résultats obtenus entre les deux modes d'étirement sont présentés dans la Figure 86.

Lors de l'étirement continu, nous avons observé visuellement un nombre de fibre plus faible avec certaines microstructures qui se décollaient (en jaune). Ces résultats suggèrent qu'un protocole incluant des périodes d'étirement entrecoupées par des périodes de repos semble être le plus optimal pour ne pas dégrader la fibre et s'assurer qu'elle reste sur les supports. Cela est plus représentatif de ce que l'on retrouve in vivo puisque le muscle du quadriceps ne subit pas d'étirement périodique en continu, mais plutôt par intervalles plus courts entrecoupés de périodes de repos.

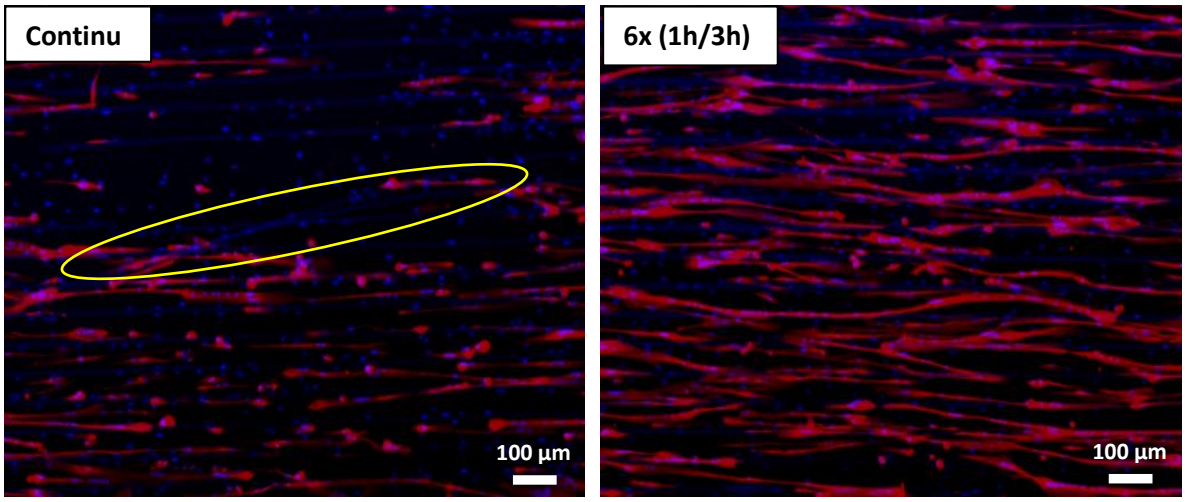

Figure 86: Différence entre l'étirement continu et avec repos sur la différenciation des myotubes humains.

En ce qui concerne la différenciation et la maturation des myotubes, nous avons observé, toujours visuellement, la présence de sarcomère striés dans les myotubes non-étirés (Figure 87, en jaune), un phénomène absent dans les deux conditions étirées. Les sarcomères ne sont pas aussi bien organisés avec une alternance de clair et de sombre et pas suffisamment ordonnée pour représenter la strie Z. Le dernier paramètre à optimiser dans notre protocole d'étirement est le démarrage de l'étirement et plus précisément quel jour est enclenchée la stimulation mécanique. C'est l'objectif de la prochaine partie.

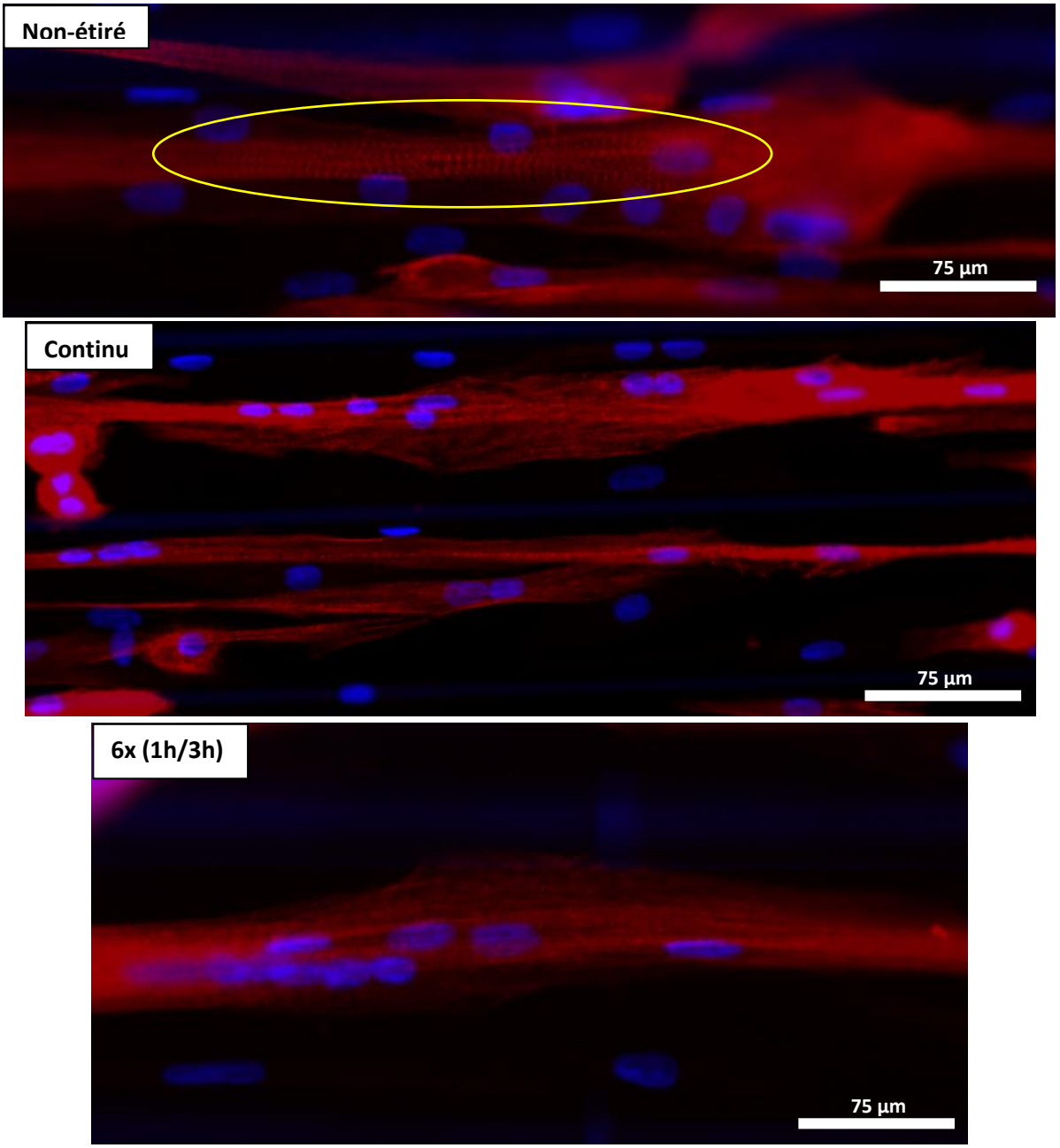

Figure 87: Evaluation de la maturation des fibres en fonction de l'étirement.

C) Effet du moment où démarre l'étirement sur la différenciation des myotubes humains mise en culture.

Plusieurs publications ont montré que le moment où démarrait l'étirement pouvait avoir un impact direct sur la réponse des myotubes (86,217). En retardant le démarrage de l'étirement, on s'assure que les myoblastes ont suffisamment de temps pour fusionner et entamer leur différenciation. De plus, au bout de 2 jours de différenciation, les myotubes commencent à mettre en place leur système contractile. C'est ce que l'on a pu observer chez certains myotubes particulièrement précoces avec un

début de striation. Ainsi, en démarrant l'étirement mécanique plus tard, cela pourrait avoir un impact plus spécifique sur la maturation des myotubes afin d'obtenir des myofibres plus matures et alignées avant qu'elles ne se décollent de leur support. Après plusieurs essais de mise au point, nous avons abouti à un protocole optimisé (Figure 88).

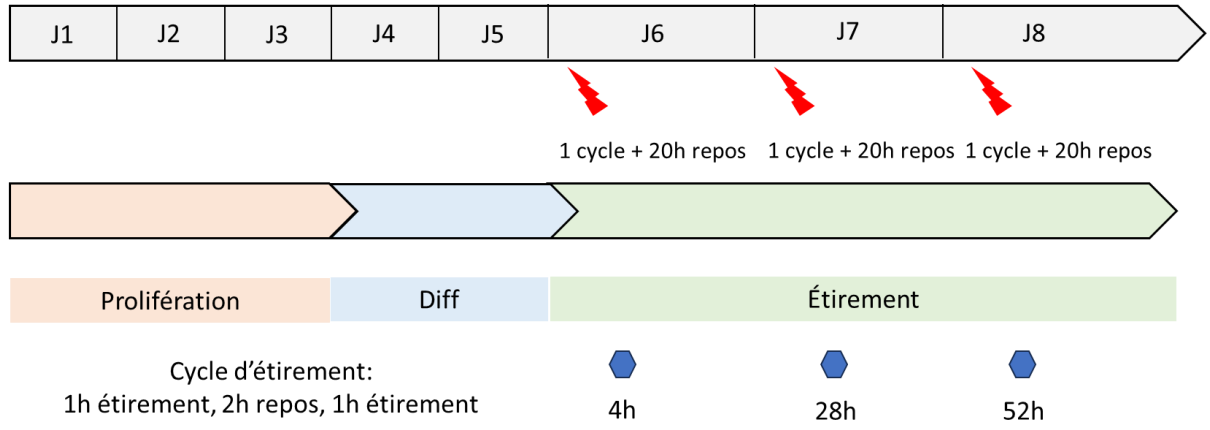

Figure 88: Protocole optimisé d'étirement des myotubes humains. Les éclairs en rouge représentent le moment où un cycle d'étirement est démarré. Les hexagones bleus représentent les moments où les membranes sont retirées de la machine pour être fixées et marquées pour l'immunofluorescence.

Ce protocole consiste en trois cycles d'étirement sur trois jours. Chaque cycle est composé d'une heure d'étirement, de deux heures de repos et d'une heure d'étirement. Les supports sont étirés à 0,2 mm, à une fréquence de 1 Hz et le système est démarré après 48h de différenciation. Pour mieux appréhender l'effet de l'étirement, des myotubes avec leur support ont été prélevés après le premier cycle d'étirement, au bout de 4h, juste après le deuxième cycle à 28h et enfin après le troisième étirement à 52h. Ils ont été ensuite fixés et analysés par immunofluorescence en observant le niveau de maturation (marquage à la Troponine T) et l'expression du facteur de transcription d'intérêt impliqués dans la différenciation comme la Myogénine. Les résultats ont été comparés par rapport aux mêmes conditions mais sans l'application d'un étirement (Figure 89).

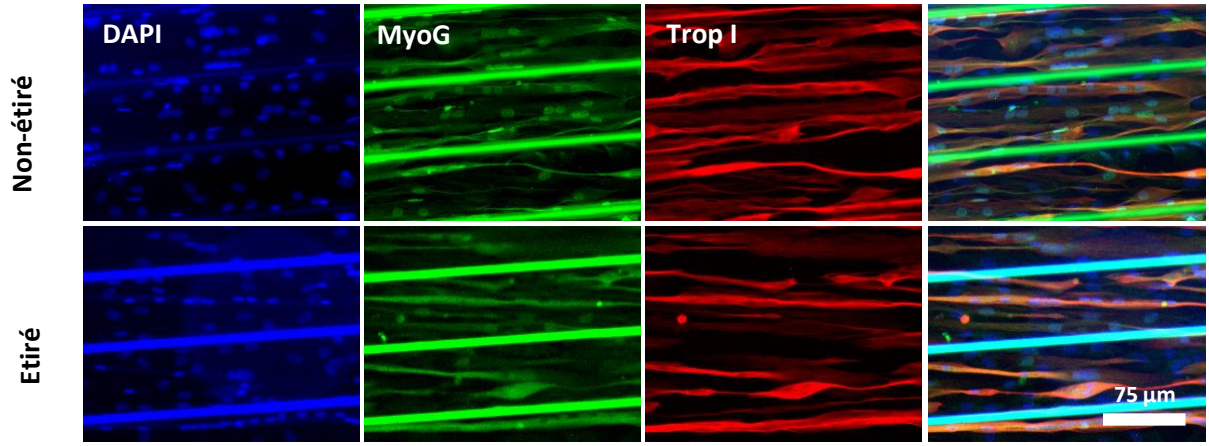

Figure 89: Comparaison par immunofluorescence de l'effet d'un cycle d'étirement sur l'expression de MyoG et la quantité de troponine T dans les myotubes humains.

On observe sur la figure 88 qu'avec la condition étirée, le nombre de noyau marqué à la myogénine en vert est moins important que celle non-étirée. Cela suggère un effet direct de l'étirement sur le facteur de transcription. La Figure 90 montre l'effet de l'étirement mécanique sur l'aire des myotubes produits. On n'observe pas de différence significative entre les supports étirés et non-étirés. Ce résultat montre donc que l'on a réussi à mettre au point un protocole d'étirement produisant autant de myotubes que lorsqu'ils ne sont pas étirés.

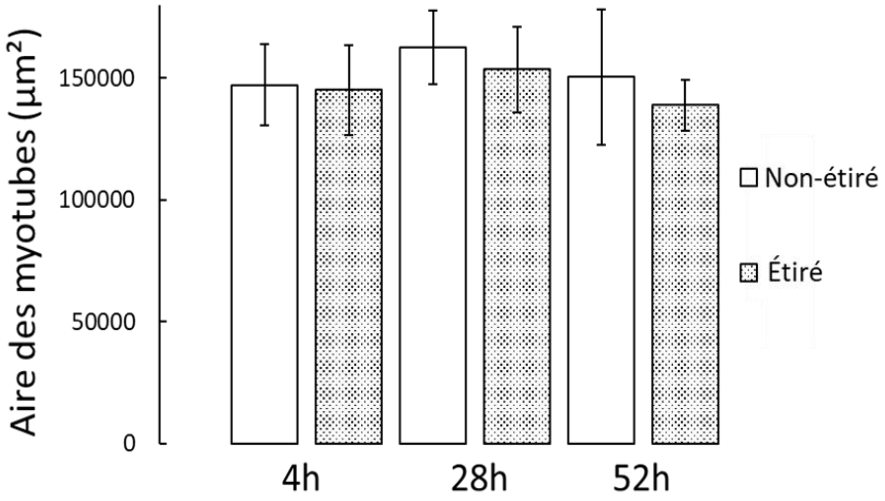

Figure 90: Effet de l'étirement mécanique sur la quantité de myotubes produits.

La myogénine est un facteur de transcription qui est exprimé en début de différenciation jusqu'à atteindre un pic au bout de quelques jours pour ensuite réduire son expression au fil du temps (Figure 6). Les noyaux ont donc été marqués au DAPI et un anticorps anti-myogénine a été ajouté dans les myotubes fixés pour observer par immunofluorescence l'expression de ce facteur transcription.

L'expression de myogénine après les 3 cycles d'étirement est résumée dans la Figure 91. Cette expression donne un indice sur l'initiation de la différenciation. En effet, ce facteur de transcription est tout d'abord exprimé par le noyau des myoblastes, qui, associé avec d'autres facteurs transcriptionnel tel que myomaker et myomixer, vont enclencher le processus de fusion des myoblastes en myotubes. L'échelle des ordonnées représente la proportion de noyaux exprimant myogénine situés dans les myotubes par rapport au nombre total de noyaux qui expriment myogénine. Les résultats montrent une augmentation non statistiquement significative ($p = 0,026$) du nombre de noyaux exprimant la myogénine après la première séquence d'étirement. La différence entre les deux conditions tend à disparaitre, jusqu'à atteindre 100% des noyaux exprimant la myogénine situés dans les myotubes. Ces résultats mettent en avant l'effet d'accélération de l'étirement, ce qui avait déjà été observé dans d'autres études (48,177,178,294).

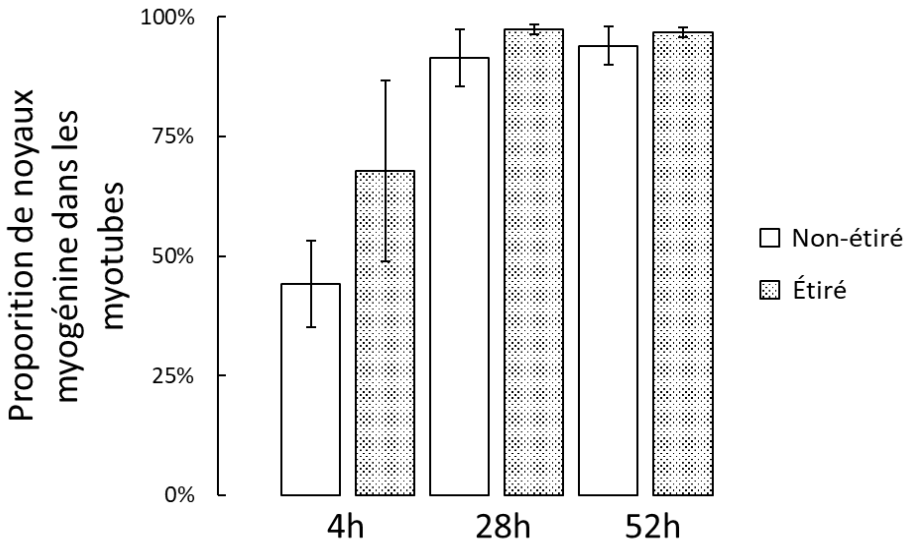

Figure 91: Effet de l'étirement sur l'expression de myogénine dans les myotubes humains

Dans un second temps, afin de mieux décrire au cours du temps les effets de la stimulation mécanique sur les myotubes humains, nous avons suivi le processus de différenciation sur une durée plus courte mais en incluant des points clés supplémentaires : deux avant le démarrage de l'étirement, c'est à dire un à confluence et un après 24h de différenciation qui permettent de créer le profil d'expression des différents marqueurs dès la mise en différenciation, et un point après la première heure d'étirement pour vérifier si l'effet de l'étirement est retrouvé dès la première partie du cycle (Figure 92).

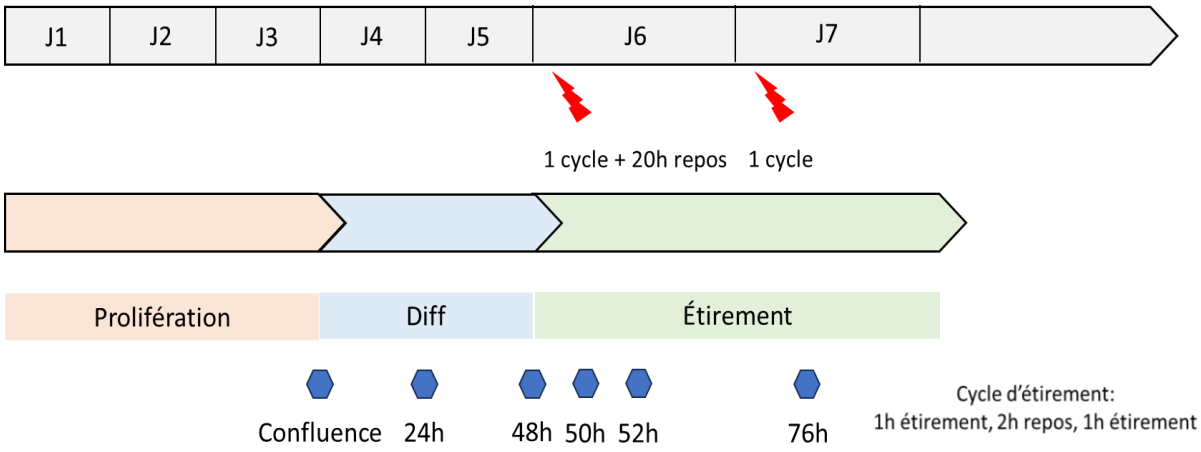

Figure 92: Protocole d'étirement des myotubes humains le plus optimisé. Les éclairs en rouge représentent le moment où un cycle d'étirement est démarré. Les hexagones bleus représentent les moments où les membranes sont fixées et marquées pour l'immunofluorescence.

Dans cette expérience, les myotubes ne sont pas fixés et marqués en immunofluorescence mais leur ARN a été extrait afin d'évaluer par RT-qPCR l'expression de plusieurs marqueurs d'intérêt dont la myogénine. Cette technique d'analyse a été choisi car il est possible qu'un facteur soit exprimé dans les myotubes mais que le marquage ne soit pas suffisamment efficace pour pouvoir l'observer au microscope, soit parce que son expression est trop faible, soit parce que son expression est terminée au moment de la fixation. Le premier facteur mesuré par RT-qPCR est MyoG pour vérifier si la tendance

de l'expression de Myogénine (MyoG) présente dans les myotubes humains étirés est équivalente à celle observée par immunofluorescence. Ces résultats sont cependant préliminaires car il n'ont été mesurés à partir d'une seule expérience et ainsi l'absence d'incertitude ne permet que d'émettre des hypothèses. De façon similaire au précédent résultat obtenu par immunofluorescence, nous avons observé un effet direct de l'étirement sur l'expression de MyoG (Figure 93).

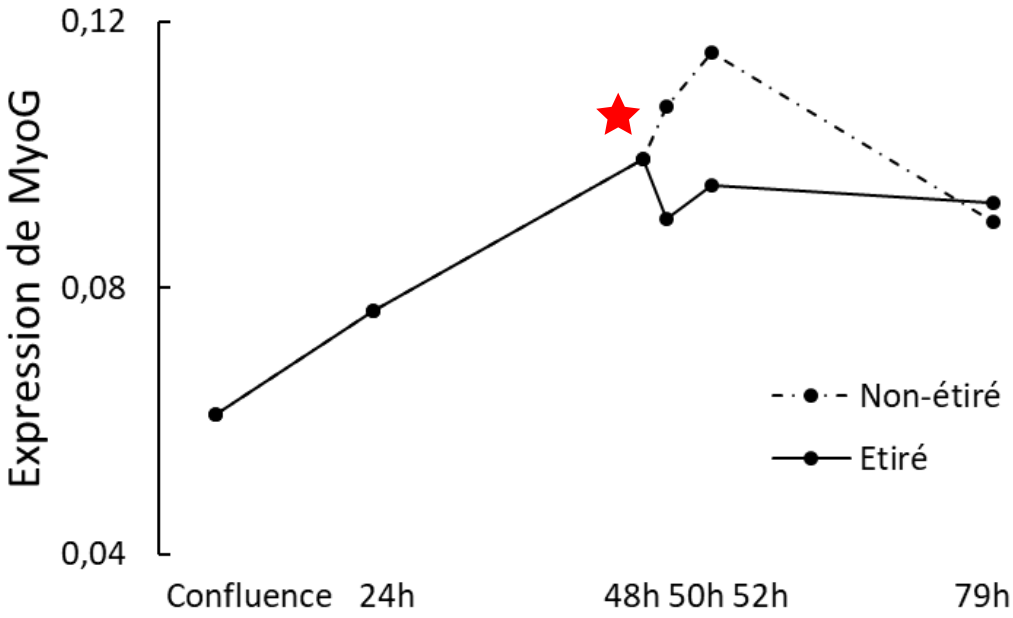

Figure 93: Effet de l'étirement sur l'expression de MyoG dans les myotubes humains. L'étoile représente le début de l'étirement.

Le profil d'expression au cours du temps de MyoG pour les myotubes non-étirés que nous avons observé est équivalente à celle retrouvée dans d'autres publications (172,174,177), avec une augmentation constante jusqu'à obtenir un pic à partir duquel sont expression réduit, synonyme d'une différenciation avancée.

Cependant, comme le montre la figure 93, lorsque les myotubes sont étirés, MyoG semble être sous-exprimé et ce dès la première heure d'étirement (point à 50h), mettant en avant l'effet quasi instantané de l'étirement sur l'expression de MyoG.

Ce résultat peut être interprétée de deux façon :

a) Soit l'étirement bloque l'expression de MyoG impactant alors négativement la différenciation des myotubes,
b) Soit l'étirement augmente très rapidement l'expression de MyoG, avec un pic hypothétique atteint dès le début de l'étirement,entre 48h et 50h, ce qui pourrait nous faire considérer que le point à 50h correspond à la redescente normalement observée mais décalé chez les myotubes non étirés.

Pour valider l'une de ces deux hypothèses, il est donc nécessaire de combiner ces résultats avec l'expression d'autres marqueurs de différenciation et de maturation. Acta1 a été choisi pour détecter l'α-actinine, un composant majeur du système contractile et donc un marqueur du niveau de maturité des fibres. La figure 94 montre là encore le même profil d'expression que celui obtenu pour MyoG suite à la première heure d'étirement.

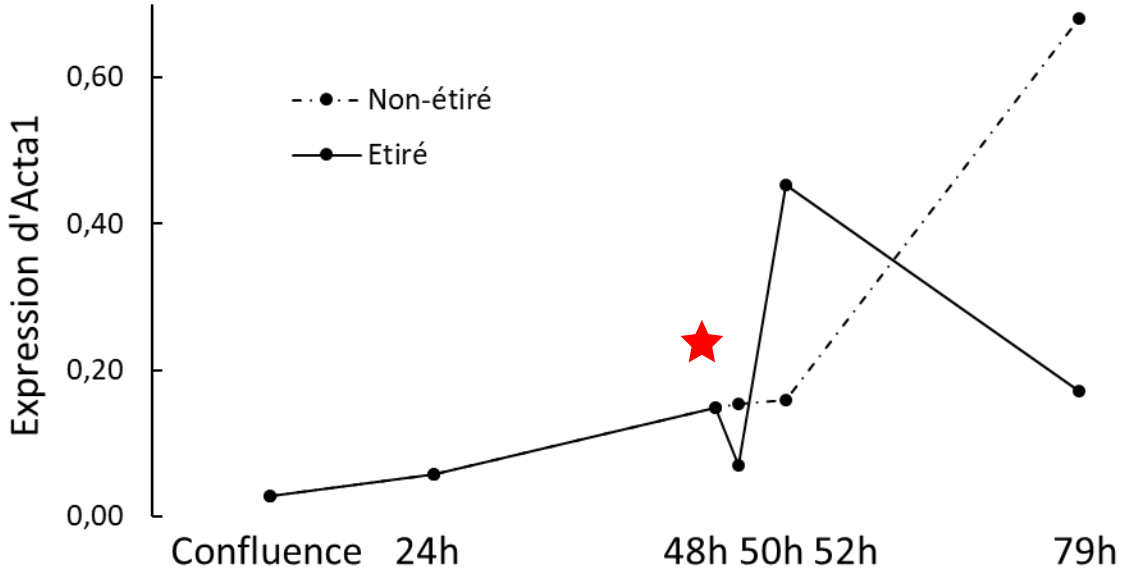

Figure 94: Effet de l'étirement sur l'expression d'Acta1 dans les myotubes humains. L'étoile représente le début de l'étirement.

Mais contrairement à MyoG, nous avons observé à 52h, une surexpression d'Acta1 dans les myotubes étirés. Cette surexpression peut être interprétée comme une accélération de la mise en place de l'α-actinine, l'un des composant principal du sarcomère, ce qui suggère une stimulation plus précoce de la maturation. Cette augmentation de l'expression d'Acta1 est aussi retrouvée dans les myotubes non-étirés après 79h de différenciation, tandis qu'à ce même moment, suite au deuxième cycle d'étirement, l'expression d'Acta1 chute dans les myotubes stimulés. Ce dernier résultat permet là encore d'émettre deux hypothèses :

a) Soit l'expression d'Acta1 est similaire à MyoG auquel cas à partir d'un certain temps, son expression diminue et ici l'étirement mécanique a permis d'accélérer cette séquence,
b) Soit l'expression d'Acta1 est en constante augmentation au fil du temps et l'étirement mécanique provoque un effet négatif sur son expression ce qui pourrait alors fortement réduire l'efficacité du système contractile.

La première hypothèse semble toutefois la plus probable, considérant l'étude de Stern-Straeter et al. (295) qui a montré que lorsque la différenciation était enclenchée chez des myotubes humains, l'expression d'Acta1 atteint un pic au bout de quelques jours puis redescend en suivant la même tendance que MyoG.

Nous avons ensuite selon le même protocole, évalué au cours du temps, l'expression de MHC Ib, IIa et IIx qui sont des marqueurs de maturation des myotubes (Figure 95).

Dans les trois cas, une tendance semble ressortir avec une diminution rapide de l'expression de ces marqueurs induite par l'étirement, suivie d'un pic d'expression à la fin du premier cycle d'étirement qui n'est pas observé dans la condition non étirée. En particulier pour MHC IIa et MHC IIx, à la fin du premier cycle d'étirement, les marqueurs des chaines de myosine sont respectivement 2,6 et 2,7 fois plus exprimés dans les myotubes étiré par rapport à ceux non stimulés. Ce pic d'expression n'est pas observé néanmoins pour la MHC Ib.

Cette différence d'expression entre les différents isoformes de myosine peut être expliquée par le fait que les fibres de type II sont associées à une contraction rapide mettant en avant un profil de stimulation mécanique qui se rapproche de notre protocole d'étirement. En effet, celui-ci possède une fréquence assez élevée (1Hz) pendant une durée relativement courte (2x1h sur 24h). Ces deux paramètres pourraient expliquer la tendance des fibres à exprimer en plus grande quantité les marqueurs de type II par rapport à ceux de type I. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'en réduisant la fréquence d'étirement ainsi qu'en augmentant sa durée, les fibres pourraient exprimer à l'inverse plus de MHC I.

On a donc montré que notre dernier protocole permet d'obtenir une réponse des myotubes à un étirement mécanique. Il s'agit d'une première étape importante qui montre la viabilité du modèle. Celui-ci doit cependant encore être encore optimisé pour obtenir plus de myotubes matures. L'objectif serait de bénéficier d'un modèle in vitro permettant d'obtenir, à partir d'un patient, des fibres musculaires alignés suffisamment mature pour reproduire leur pathologie en termes de régulation de leur masse musculaire, de fonction sarcomérique et de réponse au stress mécanique.

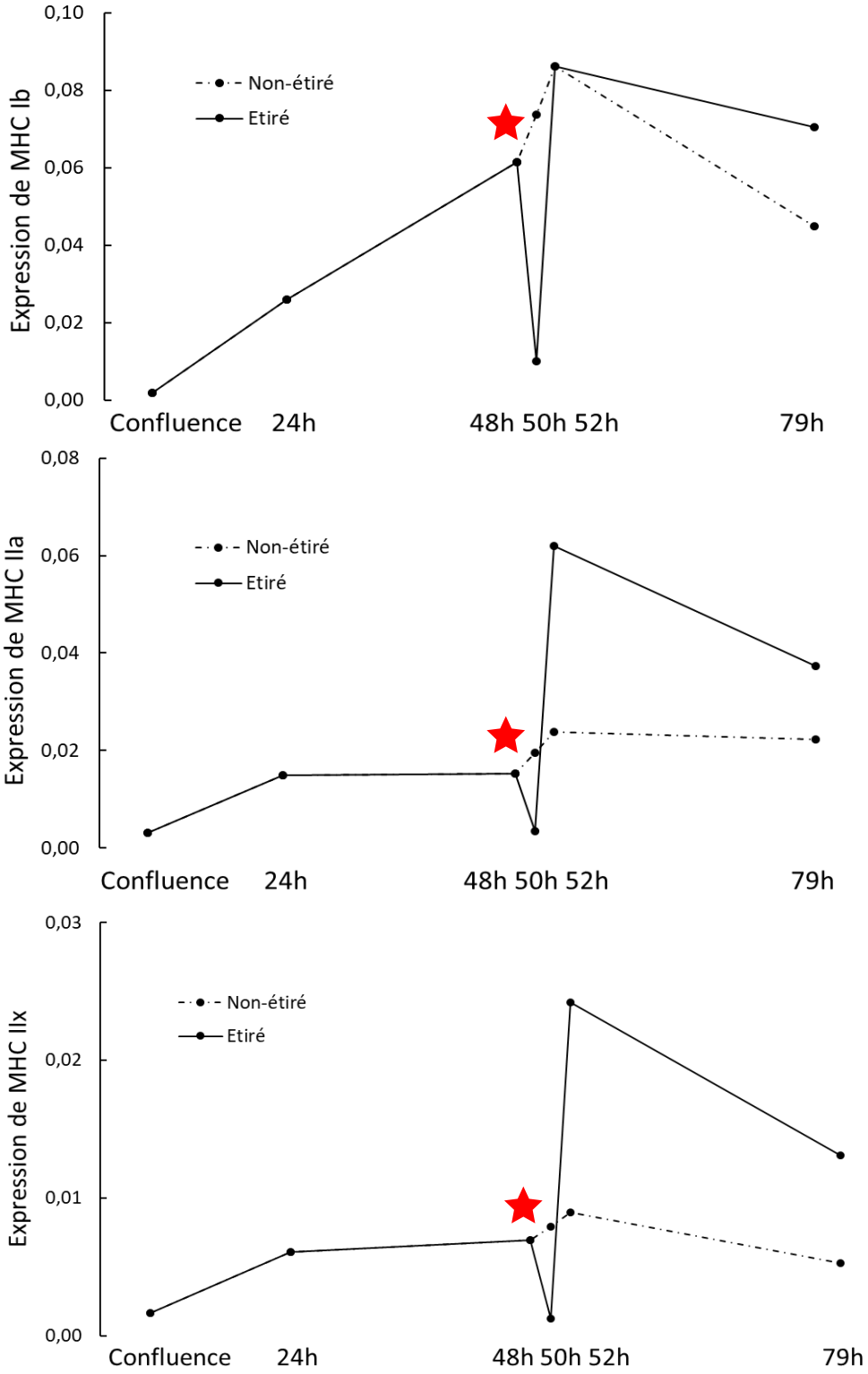

Figure 95 : Effet de l'étirement sur l'expression de MHC Ib, IIa et IIx

Conclusion et perspectives

Le projet de thèse était tourné vers la mise en place d'un modèle *in vitro* de culture de myoblastes primaires humains pour mimer les contraintes mécaniques que l'on retrouve dans le muscle *in vivo*. Pour cela, le modèle a été optimisé selon quatre grandes étapes :

1. Fabrication de supports microstructurés

Nous avons sélectionné le PDMS comme base du support pour sa bonne biocompatibilité et son élasticité lui permettant d'être étirer sans rompre. L'EETMOS a été choisi comme précurseur pour ses propriétés hybride organique-inorganique qui offre à la fois une grande affinité avec le silicone (partie inorganique) avec une très bonne capacité à se solidifier par polymérisation (partie organique). L'EETMol représente le produit de synthèse sol-gel de l'EETMOS en milieu acide auquel est ajouté un mélange de deux photoamorceurs qui génèrent des espèces acides lorsqu'ils sont activés à une longueur d'onde de 375 nm. Nous avons effectué la microstructuration de l'EETMol sur le PDMS par photolithographie UV. Après activation par un traitement plasma, nous avons déposé la solution d'EETMol sur la membrane en PDMS par spin coating afin de maitriser l'épaisseur de la couche. Nous avons ensuite microstructuré l'EETMol en dessinant des lignes parallèles les unes aux autres par photolithographie UV. Les parties activées par le rayonnement UV se solidifient tandis que le reste se dissout dans un bain d'isopropanol.

Nous nous sommes ensuite assuré de la biocompatibilité de l'EETMol avec les myoblastes primaires humains à l'aide d'un test de viabilité. Nous avons aussi pu observer par immunofluorescence que les microstructures induisent à la fois un alignement des myotubes mais aussi une plus grande quantité de myotubes produits par rapport à des membranes en PDMS simples. Ces résultats mettent en avant l'effet bénéfique de la microstructuration et s'expliquent par plusieurs raisons :

- Les myoblastes ressentent la topographie du support sur lequel ils sont ensemencés. En particulier, lorsque cette topographie présente des angles doits, cela permet de créer un effet de bord, qui va offrir plus de zones d'accroche pour le myoblaste et ainsi favoriser son adhésion et donc ensuite sa prolifération.
- Les microstructurations permettent aussi aux myoblastes d'être plus proches les uns des autres ce qui favorise ensuite leur fusion et leur différenciation en myotubes.
- Par effet de guidage, les microstructurations servent aussi à diriger les myotubes dans une même direction pour qu'il fusionnent dans le même sens et soient parallèles les uns aux autres.

Les supports microstructurés permettent donc d'obtenir plus de myotubes sur une même surface par rapport à une simple membrane en PDMS mais aussi qu'ils soient alignés entre eux, comme nous le retrouvons *in vivo*.

2. Optimisation de la topographie du support microstructuré

Une fois la biocompatibilité validée, nous avons optimisé les paramètres géométriques de la topographie du support (espacement et hauteur des microstructures). Pour déterminer l'effet de l'espacement entre les microstructures sur la différenciation des myotubes, des myoblastes primaires humains ont été ensemencés sur 4 échantillons avec des espacements de 25 µm, 50 µm, 75 µm et 100 µm. Nous avons pu remarquer que plus les microstructures sont proches les unes des autres, plus la quantité de myotubes produites et importantes. Cependant, si les microstructures sont trop proches les unes des autres (25 µm), le diamètre moyen des myotubes produits est diminué. A l'inverse, si les microstructures sont trop éloignées les unes des autres (100 µm), elles ont tendances à dévier par rapport à l'axe principal des sillons. Ces résultats ont donc montré qu'un espacement idéal se situe entre 50 µm et 75µm, c'est pourquoi notre modèle présente des microstructures espacées de 75 µm. La hauteur quant à elle n'a pas montré d'effet particulier sur la différenciation des myotubes humains donc celle-ci a été fixée à 8 µm. Ces résultats montrent que dans notre modèle, les microstructures ont un effet de guidage et non de contrainte. Elles ne servent pas à forcer le myotubes à se développer entre deux murs mais plutôt à l'orienter dans la direction voulue sans modifier sa morphologie afin que les myotubes restent le plus proche possible de ceux retrouvés *in vivo*.

Le support microstructuré optimisé est donc constitué de lignes parallèles entre elles, espacées de 75 µm avec une hauteur de 8 µm.

3. La biofonctionnalisation des supports microstructurés

Pour s'assurer que les myotubes créés restent accrochés au support microstructuré lorsque ce dernier est étiré mécaniquement, une méthode de biofonctionnalisation a été privilégiée : le greffage covalent de peptides issus de la matrice extracellulaire. Deux séquences peptidiques (RGD et YIGSR) ont été synthétisées et silylées en leur extrémité pour pouvoir être, après activation plasma du PDMS, liées de manière covalente au silicone. L'effet de la concentration en peptide sur la différenciation des myotubes a été évalué ainsi que les possibles synergies entre les deux séquences et avec le Matrigel®. Nous avons observé qu'en augmentant la concentration des peptides, la quantité de myotubes produits ainsi que le taux fusion étaient plus importants. Cela s'explique par la plus grande quantité de peptides en surface ce qui permet alors au myoblastes d'avoir une meilleure adhésion car plus de points d'accroches et donc de favoriser sa prolifération puis sa différenciation en myotube.

De plus, en comparant la séquence RGD par rapport à celle YIGSR, nous avons obtenus des résultats similaires ce qui s'explique par la présence de ces deux séquence dans la matrice extracellulaire. L'idée d'une synergie entre les deux a alors germé mais *in vitro*, celle-ci n'a pas été observée. Cela s'explique probablement par le fait que ces deux séquences sont certes dans la MEC mais elles ne proviennent pas du même composant (Fibronectine pour RGD et Laminine pour YIGSR). Il n'est donc pas certain que ces deux séquences soient proches l'une de l'autre dans la matrice extracellulaire ce qui explique leur bons résultats séparément mais l'absence de synergie ensemble.

Durant le projet, la biofonctionnalisation a été secondairement optimisée avec une silylation sur les deux extrémités des peptides. Cette bi-silylation a donné des résultats encore plus satisfaisants par rapport aux supports mono-silylés et cela a été expliqué par la présence d'une couche dont l'épaisseur est dépendante de la concentration en peptide.

Ainsi, cette thèse nous a permis de proposer un support microstructuré optimisé grâce à sa biofonctionnalisation avec des peptides RGD bi-silylés à une concentration de 20 mg/mL créant une couche de 300 nm.

4. <u>La mise en place du protocole d'étirement des supports microstructurés</u>

La mise en place du protocole d'étirement afin d'améliorer la différenciation des myotubes, s'est focalisée sur 3 paramètres importants : l'amplitude d'étirement, la durée pendant laquelle les myotubes sont étirés et le moment où est lancée le protocole de stimulation. Dès le départ, le paramètre fréquence a été fixé à 1 Hz, une valeur que l'on retrouve régulièrement dans les études d'étirement mécanique, afin de réduire le nombre de facteurs pouvant influencer la différenciation des myotubes et se focaliser sur les 3 autres.

Dans un premier temps, l'amplitude a été optimisée de telle sorte à s'assurer que les myotubes étirés restent accrochés au support. Cette amplitude a été calculée en fonction, non pas de la taille des supports mais de la longueur moyenne des myotubes pour que le pourcentage d'étirement ait une pertinence physiologique. Cette valeur a été fixée à 0,2 mm ce qui correspond à un étirement de 5% pour les myotubes les plus longs. Le mode d'étirement a aussi été optimisé en choisissant d'entrecouper deux périodes d'étirement (1h) avec une période de repos (3h). Ce cycle d'étirement a été appliqué une fois par jour. Cela correspond donc à une stimulation totale de 2h par jour pour les myotubes. Dans cette thèse nous avons opter de démarrer le protocole d'étirement au bout de deux jours de différenciation, de telle sorte à permettre aux myoblastes de fusionner entre eux afin de s'assurer que ce sont bien les myotubes qui sont soumis au stress mécanique et non des myoblastes en cours de fusion.

Le protocole optimisé est donc le suivant : 0,2 mm d'amplitude, 1 Hz, 1h d'étirement, 3h de repos, 1h d'étirement, répété pendant 2 jours en commençant 48h après la mise en différenciation. Ce protocole a permis enfin d'observer une réponse des myotubes sur l'expression de MyoG, d'Acta1 et de différents isoformes de MHC mettant en avant l'effet positif de notre protocole d'étirement sur la différenciation et la maturation des myotubes humains.

Ce travail de thèse pluridisciplinaire ouvre les portes à de nombreuses perspectives :

- Le PDMS est un polymère facilement synthétisable qui peut être moulé selon des formes prédéfinies. Puisque la géométrie du support a été optimisée, il pourrait par la suite, être envisageable de créer un master pour produire rapidement des supports en PDMS au laboratoire. Des support dont on pourrait aisément faire varier aussi bien leur rigidité que leur biofonctionnalisation, en introduisant par exemple directement les peptides dans le PDMS qui ne ferait qu'un et donc qui résisterait d'autant plus à l'étirement mécanique.
- Les conditions de culture utilisées durant le projet de thèse sont relativement faibles en facteurs de croissance. Ceux-ci pourraient être augmentés afin d'induire une hypertrophie chez les myotubes, ce qui augmenterait leur diamètre et donc leur surface d'accroche au support et qui permettrait de les étirer pendant plusieurs jours de suite.
- En parallèle de l'étirement mécanique, la stimulation électrique pourrait être un bon complément pour améliorer la différenciation et la maturation des myotubes humains. Ce genre de stimuli est retrouvé en permanence dans le muscle in vivo et semble indispensable pour obtenir des myotubes matures. Il est cependant difficile de mettre en place des protocoles alliant les deux stimulations puisque chacune séparément possède plusieurs paramètres qui peuvent avoir un impact sur la différenciation des myotubes (fréquence, durée de stimulation, mode de stimulation). Il est aussi probable que ces deux stimulations aient un effet bénéfique a deux moments différents de la myogenèse et il est donc nécessaire de comprendre les mécanisme de chacune d'elles avant d'envisager de regrouper les deux.
- Enfin, la partie la plus prometteuse de la suite de cette thèse consiste à utiliser le modèle mis en place pour évaluer non seulement l'impact de biomolécules et leur effet hypertrophiant chez le sujet sains ou atteint de myopathie. Mais il permettrait également des avancées exploratrices dans des pathologies musculaires dont le stress mécanique peut être délétère comme les myopathies de type Duchenne ou les Titinopathies. La titine par exemple est impliquée dans l'intégrité et la stabilité des sarcomères ainsi que dans le contrôle des tensions passives. Sa fonction est de stabiliser lors de l'étirement les positions relatives des filaments

de myosine et d'actine. Ainsi, notre modèle permettrait d'évaluer l'impact fonctionnel au niveau cellulaire des variants génétiques TITIN sur l'adaptation des fibres musculaires à un stress mécanique standardisé et ses conséquences sur l'expression des gènes et à comprendre le phénotype observé sur les patients.

Ce modèle pourrait aussi être utilisé dans un cadre sportif afin de comparer le comportement *in vitro* de myoblastes issus de biopsies de différents athlètes pour mieux comprendre la grande diversité de réponses à un même entrainement physique et permettre d'adapter celui-ci à chaque individu.

Références

1. Gesner (1516-1565) C. Historia animalium [Internet]. 1551 [cité 17 juill 2023]. Disponible sur: https://data.bnf.fr/14618298/conrad_gesner_historia_animalium/

2. Steensen N. Nicolai Stenonis Elementorum myologiæ specimen seu Musculi descriptio geometrica. Cui accedunt canis carchariæ dissectum caput, et dissectus piscis ex canum genere ad serenissimum Ferdinandum II. Magnum etruriae ducem. Amstelodami, Pays-Bas: Apud J. Janssonium, & viduam E. Weyerstraet; 1669. 3; 7 p.

3. Bernard C. Introduction à l'étude de la médecine expérimentale. 1865;

4. Gaina G, Popa (Gruianu) A. Muscular dystrophy: Experimental animal models and therapeutic approaches (Review). Exp Ther Med. 1 juin 2021;21(6):1-9.

5. Brown SDM. Advances in mouse genetics for the study of human disease. Hum Mol Genet. 1 oct 2021;30(R2):R274-84.

6. Lu J, Liu J, Guo Y, Zhang Y, Xu Y, Wang X. CRISPR-Cas9: A method for establishing rat models of drug metabolism and pharmacokinetics. Acta Pharm Sin B. oct 2021;11(10):2973-82.

7. Han SK, Lee Y, Hong JJ, Yeo HG, Seo J, Jeon CY, et al. In vivo study of paraspinal muscle weakness using botulinum toxin in one primate model. Clin Biomech Bristol Avon. mars 2018;53:1-6.

8. Daya A, Donaka R, Karasik D. Zebrafish models of sarcopenia. Dis Model Mech. 30 mars 2020;13(3):dmm042689.

9. Ono S. Regulation of structure and function of sarcomeric actin filaments in striated muscle of the nematode Caenorhabditis elegans. Anat Rec Hoboken NJ 2007. sept 2014;297(9):1548-59.

10. Cone SG, Warren PB, Fisher MB. Rise of the Pigs: Utilization of the Porcine Model to Study Musculoskeletal Biomechanics and Tissue Engineering During Skeletal Growth. Tissue Eng Part C Methods. 1 nov 2017;23(11):763-80.

11. Volpi M, Paradiso A, Costantini M, Święszkowski W. Hydrogel-Based Fiber Biofabrication Techniques for Skeletal Muscle Tissue Engineering. ACS Biomater Sci Eng. 14 févr 2022;8(2):379-405.

12. Duc P, Vignes M, Hugon G, Sebban A, Carnac G, Malyshev E, et al. Human neuromuscular junction on micro-structured microfluidic devices implemented with a custom micro electrode array (MEA). Lab Chip. 26 oct 2021;21(21):4223-36.

13. Beldjilali-Labro M, Garcia Garcia A, Farhat F, Bedoui F, Grosset JF, Dufresne M, et al. Biomaterials in Tendon and Skeletal Muscle Tissue Engineering: Current Trends and Challenges. Materials. juill 2018;11(7):1116.

14. Dessauge F, Schleder C, Perruchot MH, Rouger K. 3D in vitro models of skeletal muscle: myopshere, myobundle and bioprinted muscle construct. Vet Res. 19 mai 2021;52(1):72.

15. Moyle LA, Davoudi S, Gilbert PM. Innovation in culture systems to study muscle complexity. Exp Cell Res. 1 févr 2022;411(1):112966.

16. Oleaga C, Bernabini C, Smith AST, Srinivasan B, Jackson M, McLamb W, et al. Multi-Organ toxicity demonstration in a functional human in vitro system composed of four organs. Sci Rep. 3 févr 2016;6:20030.

17. Lexell J, Taylor CC, Sjöström M. What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. J Neurol Sci. avr 1988;84(2-3):275-94.

18. Squire JM. Muscle contraction: Sliding filament history, sarcomere dynamics and the two Huxleys. Glob Cardiol Sci Pract. 2016(2):e201611.

19. Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle Injuries: Biology and Treatment. Am J Sports Med. 1 mai 2005;33(5):745-64.

20. Karalaki M, Fili S, Philippou A, Koutsilieris M. Muscle Regeneration: Cellular and Molecular Events. In Vivo. 1 sept 2009;23(5):779-96.

21. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol. févr 2005;288(2):R345-53.

22. Crist CG, Montarras D, Buckingham M. Muscle satellite cells are primed for myogenesis but maintain quiescence with sequestration of Myf5 mRNA targeted by microRNA-31 in mRNP granules. Cell Stem Cell. 6 juill 2012;11(1):118-26.

23. Ishikawa K, Araki M, Nagano Y, Motoda A, Shishido T, Kurashige T, et al. Knockdown of optineurin controls C2C12 myoblast differentiation via regulating myogenin and MyoD expressions. Differ Res Biol Divers. 2022;123:1-8.

24. Singh K, Dilworth FJ. Differential modulation of cell cycle progression distinguishes members of the myogenic regulatory factor family of transcription factors. FEBS J. 2013;280(17):3991-4003.

25. Chen B, You W, Wang Y, Shan T. The regulatory role of Myomaker and Myomixer–Myomerger–Minion in muscle development and regeneration. Cell Mol Life Sci. 1 avr 2020;77(8):1551-69.

26. Chen L, Hassani Nia F, Stauber T. Ion Channels and Transporters in Muscle Cell Differentiation. Int J Mol Sci. janv 2021;22(24):13615.

27. Zhang W, Liu Y, Zhang H. Extracellular matrix: an important regulator of cell functions and skeletal muscle development. Cell Biosci. 31 mars 2021;11(1):65.

28. Stupack DG, Cheresh DA. Apoptotic cues from the extracellular matrix: regulators of angiogenesis. Oncogene. déc 2003;22(56):9022-9.

29. Gillies AR, Lieber RL. Structure and Function of the Skeletal Muscle Extracellular Matrix. Muscle Nerve. 1 sept 2011;44(3):318-31.

30. Camman M, Joanne P, Brun J, Marcellan A, Dumont J, Agbulut O, et al. Anisotropic dense collagen hydrogels with two ranges of porosity to mimic the skeletal muscle extracellular matrix. Biomater Adv. janv 2023;144:213219.

31. Gresham RCH, Bahney CS, Leach JK. Growth factor delivery using extracellular matrix-mimicking substrates for musculoskeletal tissue engineering and repair. Bioact Mater. 24 déc 2020;6(7):1945-56.

32. Engler AJ, Griffin MA, Sen S, Bönnemann CG, Sweeney HL, Discher DE. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness. J Cell Biol. 13 sept 2004;166(6):877-87.

33. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature. sept 2000;407(6801):249-57.

34. Bajaj P, Reddy B, Millet L, Wei C, Zorlutuna P, Bao G, et al. Patterning the differentiation of C2C12 skeletal myoblasts. Integr Biol Quant Biosci Nano Macro. sept 2011;3(9):897-909.

35. Garrison CM, Schwarzbauer JE. Fibronectin fibril alignment is established upon initiation of extracellular matrix assembly. Mol Biol Cell. 15 avr 2021;32(8):739-52.

36. Taylor L, Wankell M, Saxena P, McFarlane C, Hebbard L. Cell adhesion an important determinant of myogenesis and satellite cell activity. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res. 1 févr 2022;1869(2):119170.

37. Barré-Sinoussi F, Montagutelli X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. Future Sci OA. nov 2015;1(4):FSO63.

38. Kornegay JN. The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy. Skelet Muscle. 19 mai 2017;7(1):9.

39. Wang J, Khodabukus A, Rao L, Vandusen K, Abutaleb N, Bursac N. Engineered skeletal muscles for disease modeling and drug discovery. Biomaterials. nov 2019;221:119416.

40. Zschüntzsch J, Meyer S, Shahriyari M, Kummer K, Schmidt M, Kummer S, et al. The Evolution of Complex Muscle Cell In Vitro Models to Study Pathomechanisms and Drug Development of Neuromuscular Disease. Cells. 5 avr 2022;11(7):1233.

41. Morel S, Hugon G, Vitou M, Védère M, Fons F, Rapior S, et al. A Bioassay-Guided Fractionation of Rosemary Leaf Extract Identifies Carnosol as a Major Hypertrophy Inducer in Human Skeletal Muscle Cells. Nutrients. 23 nov 2021;13(12):4190.

42. Wang PY, Yu HT, Tsai WB. Modulation of alignment and differentiation of skeletal myoblasts by submicron ridges/grooves surface structure. Biotechnol Bioeng. 2010;n/a-n/a.

43. Fishman JM, Tyraskis A, Maghsoudlou P, Urbani L, Totonelli G, Birchall MA, et al. Skeletal Muscle Tissue Engineering: Which Cell to Use? Tissue Eng Part B Rev. déc 2013;19(6):503-15.

44. Abdelmoez AM, Sardón Puig L, Smith JAB, Gabriel BM, Savikj M, Dollet L, et al. Comparative profiling of skeletal muscle models reveals heterogeneity of transcriptome and metabolism. Am J Physiol - Cell Physiol. 1 mars 2020;318(3):C615-26.

45. Grabowska I, Szeliga A, Moraczewski J, Czaplicka I, Brzóska E. Comparison of satellite cell-derived myoblasts and C2C12 differentiation in two- and three-dimensional cultures: changes in adhesion protein expression. Cell Biol Int. 1 févr 2011;35(2):125-33.

46. Sengupta D, Gilbert PM, Johnson KJ, Blau HM, Heilshorn SC. Protein-Engineered Biomaterials to Generate Human Skeletal Muscle Mimics. Adv Healthc Mater. 2012;1(6):785-9.

47. Mierzejewski B, Archacka K, Grabowska I, Florkowska A, Ciemerych MA, Brzoska E. Human and mouse skeletal muscle stem and progenitor cells in health and disease. Semin Cell Dev Biol. 1 août 2020;104:93-104.

48. Cheng CS, El-Abd Y, Bui K, Hyun YE, Hughes RH, Kraus WE, et al. Conditions that promote primary human skeletal myoblast culture and muscle differentiation in vitro. Am J Physiol - Cell Physiol. 15 févr 2014;306(4):C385-95.

49. Rangarajan A, Weinberg RA. Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. Nat Rev Cancer. déc 2003;3(12):952-9.

50. Jalal S, Dastidar S, Tedesco FS. Advanced models of human skeletal muscle differentiation, development and disease: Three-dimensional cultures, organoids and beyond. Curr Opin Cell Biol. 1 déc 2021;73:92-104.

51. Marcinczyk M, Elmashhady H, Talovic M, Dunn A, Bugis F, Garg K. Laminin-111 enriched fibrin hydrogels for skeletal muscle regeneration. Biomaterials. 1 oct 2017;141:233-42.

52. Sánchez-Cid P, Jiménez-Rosado M, Romero A, Pérez-Puyana V. Novel Trends in Hydrogel Development for Biomedical Applications: A Review. Polymers. janv 2022;14(15):3023.

53. Hu LY, Mileti CJ, Loomis T, Brashear SE, Ahmad S, Chellakudam RR, et al. Skeletal muscle progenitors are sensitive to collagen architectural features of fibril size and cross linking. Am J Physiol-Cell Physiol. août 2021;321(2):C330-42.

54. Hinds S, Bian W, Dennis RG, Bursac N. The role of extracellular matrix composition in structure and function of bioengineered skeletal muscle. Biomaterials. mai 2011;32(14):3575-83.

55. Kim W, Jang CH, Kim GH. A Myoblast-Laden Collagen Bioink with Fully Aligned Au Nanowires for Muscle-Tissue Regeneration. Nano Lett. 11 déc 2019;19(12):8612-20.

56. Chen S, Nakamoto T, Kawazoe N, Chen G. Engineering multi-layered skeletal muscle tissue by using 3D microgrooved collagen scaffolds. Biomaterials. 1 déc 2015;73:23-31.

57. Sharples AP, Player DJ, Martin NRW, Mudera V, Stewart CE, Lewis MP. Modelling in vivo skeletal muscle ageing in vitro using three-dimensional bioengineered constructs. Aging Cell. 2012;11(6):986-95.

58. Smith A s. t., Passey S, Greensmith L, Mudera V, Lewis M p. Characterization and optimization of a simple, repeatable system for the long term in vitro culture of aligned myotubes in 3D. J Cell Biochem. 2012;113(3):1044-53.

59. Evans RM, Harridge SDR, Velloso CP, Yang SY, Goldspink G, Orrell RW. Investigation of MGF mRNA expression in patients with amyotrophic lateral sclerosis using parallel in vivo and in vitro approaches. Amyotroph Lateral Scler. mars 2010;11(1/2):172-7.

60. Turner DC, Gorski PP, Seaborne RA, Viggars M, Murphy M, Jarvis JC, et al. Mechanical loading of bioengineered skeletal muscle in vitro recapitulates gene expression signatures of resistance exercise in vivo. J Cell Physiol. sept 2021;236(9):6534-47.

61. Guo Y, Gilbert-Honick J, Somers SM, Mao HQ, Grayson WL. Modified cell-electrospinning for 3D myogenesis of C2C12s in aligned fibrin microfiber bundles. Biochem Biophys Res Commun. 20 août 2019;516(2):558-64.

62. Heher P, Maleiner B, Prüller J, Teuschl AH, Kollmitzer J, Monforte X, et al. A novel bioreactor for the generation of highly aligned 3D skeletal muscle-like constructs through orientation of fibrin via application of static strain. Acta Biomater. 15 sept 2015;24:251-65.

63. Martin NRW, Passey SL, Player DJ, Khodabukus A, Ferguson RA, Sharples AP, et al. Factors affecting the structure and maturation of human tissue engineered skeletal muscle. Biomaterials. 1 juill 2013;34(23):5759-65.

64. Bian W, Juhas M, Pfeiler TW, Bursac N. Local Tissue Geometry Determines Contractile Force Generation of Engineered Muscle Networks. Tissue Eng Part A. mai 2012;18(9-10):957-67.

65. Bian W, Bursac N. Engineered skeletal muscle tissue networks with controllable architecture. Biomaterials. 1 mars 2009;30(7):1401-12.

66. Matsumoto T, Sasaki JI, Alsberg E, Egusa H, Yatani H, Sohmura T. Three-Dimensional Cell and Tissue Patterning in a Strained Fibrin Gel System. Isalan M, éditeur. PLoS ONE. 21 nov 2007;2(11):e1211.

67. Huang YC, Dennis RG, Larkin L, Baar K. Rapid formation of functional muscle in vitro using fibrin gels. J Appl Physiol. févr 2005;98(2):706-13.

68. Stern-Straeter J, Bach A d., Stangenberg L, Foerster V t., Horch R e., Stark G b., et al. Impact of electrical stimulation on three-dimensional myoblast cultures - a real-time RT-PCR study. J Cell Mol Med. 2005;9(4):883-92.

69. Alave Reyes-Furrer A, De Andrade S, Bachmann D, Jeker H, Steinmann M, Accart N, et al. Matrigel 3D bioprinting of contractile human skeletal muscle models recapitulating exercise and pharmacological responses. Commun Biol. 14 oct 2021;4:1183.

70. Brunetti J, Koenig S, Monnier A, Frieden M. Nanopattern surface improves cultured human myotube maturation. Skelet Muscle. 5 mai 2021;11(1):12.

71. Xu B, Magli A, Anugrah Y, Koester SJ, Perlingeiro RCR, Shen W. Nanotopography-responsive myotube alignment and orientation as a sensitive phenotypic biomarker for Duchenne Muscular Dystrophy. Biomaterials. 1 nov 2018;183:54-66.

72. Grefte S, Vullinghs S, Kuijpers-Jagtman AM, Torensma R, Hoff JWV den. Matrigel, but not collagen I, maintains the differentiation capacity of muscle derived cells in vitro. Biomed Mater. juill 2012;7(5):055004.

73. Aisenbrey EA, Murphy WL. Synthetic alternatives to Matrigel. Nat Rev Mater. juill 2020;5(7):539-51.

74. Kozlowski MT, Crook CJ, Ku HT. Towards organoid culture without Matrigel. Commun Biol. 10 déc 2021;4(1):1387.

75. Wells-Cembrano K, Sala-Jarque J, Del Rio JA. Development of a simple and versatile in vitro method for production, stimulation, and analysis of bioengineered muscle. PloS One. 2022;17(8):e0272610.

76. Langelaan MLP, Boonen KJM, Rosaria-Chak KY, van der Schaft DWJ, Post MJ, Baaijens FPT. Advanced maturation by electrical stimulation: Differences in response between C2C12 and primary muscle progenitor cells. J Tissue Eng Regen Med. juill 2011;5(7):529-39.

77. Powell CA, Smiley BL, Mills J, Vandenburgh HH. Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle. Am J Physiol-Cell Physiol. 1 nov 2002;283(5):C1557-65.

78. Kshitiz null, Park J, Kim P, Helen W, Engler AJ, Levchenko A, et al. Control of stem cell fate and function by engineering physical microenvironments. Integr Biol Quant Biosci Nano Macro. sept 2012;4(9):1008-18.

79. Richardson L, Wang D, Hughes R, Johnson CA, Peckham M. RNA-Seq analysis of a Pax3-expressing myoblast clone in-vitro and effect of culture surface stiffness on differentiation. Sci Rep. 18 févr 2022;12:2841.

80. Van Santen VJB, Klein-Nulend J, Bakker AD, Jaspers RT. Stiff matrices enhance myoblast proliferation, reduce differentiation, and alter the response to fluid shear stress in vitro. Cell Biochem Biophys. mars 2022;80(1):161-70.

81. Almonacid Suarez AM, Brinker MGL, Brouwer LA, van der Ham I, Harmsen MC, van Rijn P. Topography-Mediated Myotube and Endothelial Alignment, Differentiation, and Extracellular Matrix Organization for Skeletal Muscle Engineering. Polymers. sept 2020;12(9):1948.

82. Babaei M, Bonakdar S, Nasernejad B. Selective biofunctionalization of 3D cell-imprinted PDMS with collagen immobilization for targeted cell attachment. Sci Rep. 27 juill 2022;12(1):12837.

83. Mackey AL, Magnan M, Chazaud B, Kjaer M. Human skeletal muscle fibroblasts stimulate in vitro myogenesis and in vivo muscle regeneration. J Physiol. 2017;595(15):5115-27.

84. Bechshøft CJL, Schjerling P, Kjaer M, Mackey AL. The influence of direct and indirect fibroblast cell contact on human myogenic cell behavior and gene expression in vitro. J Appl Physiol. août 2019;127(2):342-55.

85. Hicks MR, Cao TV, Campbell DH, Standley PR. Mechanical strain applied to human fibroblasts differentially regulates skeletal myoblast differentiation. J Appl Physiol. août 2012;113(3):465-72.

86. Ergene E, Yagci BS, Gokyer S, Eyidogan A, Aksoy EA, Yilgor Huri P. A novel polyurethane-based biodegradable elastomer as a promising material for skeletal muscle tissue engineering. Biomed Mater Bristol Engl. 25 févr 2019;14(2):025014.

87. Costantini M, Testa S, Mozetic P, Barbetta A, Fuoco C, Fornetti E, et al. Microfluidic-enhanced 3D bioprinting of aligned myoblast-laden hydrogels leads to functionally organized myofibers in vitro and in vivo. Biomaterials. 1 juill 2017;131:98-110.

88. Pacilio S, Costa R, Papa V, Rodia MT, Gotti C, Pagnotta G, et al. Electrospun Poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) Scaffold Potentiates C2C12 Myoblast Bioactivity and Acts as a Stimulus for Cell Commitment in Skeletal Muscle Myogenesis. Bioengineering. 11 févr 2023;10(2):239.

89. Perez-Puyana V, Wieringa P, Yuste Y, de la Portilla F, Guererro A, Romero A, et al. Fabrication of hybrid scaffolds obtained from combinations of PCL with gelatin or collagen via electrospinning for skeletal muscle tissue engineering. J Biomed Mater Res A. 2021;109(9):1600-12.

90. Yeo M, Kim G. Micro/nano-hierarchical scaffold fabricated using a cell electrospinning/3D printing process for co-culturing myoblasts and HUVECs to induce myoblast alignment and differentiation. Acta Biomater. 15 avr 2020;107:102-14.

91. Choi JS, Lee SJ, Christ GJ, Atala A, Yoo JJ. The influence of electrospun aligned poly(ε-caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes. Biomaterials. 1 juill 2008;29(19):2899-906.

92. Smoak MM, Hogan KJ, Grande-Allen KJ, Mikos AG. Bioinspired electrospun dECM scaffolds guide cell growth and control the formation of myotubes. Sci Adv. 14 mai 2021;7(20):eabg4123.

93. Ricotti L, Polini A, Genchi GG, Ciofani G, Iandolo D, Mattoli V, et al. Nanostructured, highly aligned poly(hydroxy butyrate) electrospun fibers for differentiation of skeletal and cardiac muscle cells. Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc IEEE Eng Med Biol Soc Annu Int Conf. 2011;2011:3597-600.

94. Muthukrishnan L. An overview on electrospinning and its advancement toward hard and soft tissue engineering applications. Colloid Polym Sci. 1 août 2022;300(8):875-901.

95. Abarzúa-Illanes PN, Padilla C, Ramos A, Isaacs M, Ramos-Grez J, Olguín HC, et al. Improving myoblast differentiation on electrospun poly(ε-caprolactone) scaffolds. J Biomed Mater Res A. 2017;105(8):2241-51.

96. Beldjilali-Labro M, Jellali R, Brown AD, Garcia Garcia A, Lerebours A, Guenin E, et al. Multiscale-Engineered Muscle Constructs: PEG Hydrogel Micro-Patterning on an Electrospun PCL Mat Functionalized with Gold Nanoparticles. Int J Mol Sci. janv 2022;23(1):260.

97. Cha SH, Lee HJ, Koh WG. Study of myoblast differentiation using multi-dimensional scaffolds consisting of nano and micropatterns. Biomater Res. 11 janv 2017;21(1):1.

98. Liao IC, Liu JB, Bursac N, Leong KW. Effect of Electromechanical Stimulation on the Maturation of Myotubes on Aligned Electrospun Fibers. Cell Mol Bioeng. 1 sept 2008;1(2):133-45.

99. Santos AEA dos, Cotta T, Santos JPF, Camargos JSF, Carmo ACC do, Alcântara EGA, et al. Bioactive cellulose acetate nanofiber loaded with annatto support skeletal muscle cell attachment and proliferation. Front Bioeng Biotechnol [Internet]. 2023 [cité 30 mars 2023];11. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2023.1116917

100. Gilbert-Honick J, Iyer SR, Somers SM, Lovering RM, Wagner K, Mao HQ, et al. Engineering functional and histological regeneration of vascularized skeletal muscle. Biomaterials. 1 mai 2018;164:70-9.

101. Mohd Razali NA, Lin WC, Norzain NA, Yu ZW. Controlling cell elongation and orientation by using microstructural nanofibre scaffolds for accelerating tissue regeneration. Mater Sci Eng C. 1 sept 2021;128:112321.

102. Boonen KJM, Rosaria-Chak KY, Baaijens FPT, van der Schaft DWJ, Post MJ. Essential environmental cues from the satellite cell niche: optimizing proliferation and differentiation. Am J Physiol-Cell Physiol. juin 2009;296(6):C1338-45.

103. Comelles J, Fernández-Majada V, Berlanga-Navarro N, Acevedo V, Paszkowska K, Martínez E. Microfabrication of poly(acrylamide) hydrogels with independently controlled topography and stiffness. Biofabrication. 4 mars 2020;12(2):025023.

104. Altomare L, Gadegaard N, Visai L, Tanzi MC, Farè S. Biodegradable microgrooved polymeric surfaces obtained by photolithography for skeletal muscle cell orientation and myotube development. Acta Biomater. 1 juin 2010;6(6):1948-57.

105. Gao H, Xiao J, Wei Y, Wang H, Wan H, Liu S. Regulation of Myogenic Differentiation by Topologically Microgrooved Surfaces for Skeletal Muscle Tissue Engineering. ACS Omega. 17 août 2021;6(32):20931-40.

106. Oyama TG, Oyama K, Kimura A, Yoshida F, Ishida R, Yamazaki M, et al. Collagen hydrogels with controllable combined cues of elasticity and topography to regulate cellular processes. Biomed Mater. juin 2021;16(4):045037.

107. Denes LT, Riley LA, Mijares JR, Arboleda JD, McKee K, Esser KA, et al. Culturing C2C12 myotubes on micromolded gelatin hydrogels accelerates myotube maturation. Skelet Muscle. 7 juin 2019;9(1):17.

108. Marques-Almeida T, Cardoso VF, Ribeiro S, Gama FM, Ribeiro C, Lanceros-Mendez S. Tuning Myoblast and Preosteoblast Cell Adhesion Site, Orientation, and Elongation through Electroactive Micropatterned Scaffolds. ACS Appl Bio Mater. 15 avr 2019;2(4):1591-602.

109. Piscioneri A, Morelli S, Ritacco T, Giocondo M, Peñaloza R, Drioli E, et al. Topographical cues of PLGA membranes modulate the behavior of hMSCs, myoblasts and neuronal cells. Colloids Surf B Biointerfaces. 1 févr 2023;222:113070.

110. Takayama I, Kondo N, Kalies S, Heisterkamp A, Terakawa M. Myoblast adhesion and proliferation on biodegradable polymer films with femtosecond laser-fabricated micro through-holes. J Biophotonics. 2020;13(7):e202000037.

111. Wu C, Chin CSM, Huang Q, Chan HY, Yu X, Roy VAL, et al. Rapid nanomolding of nanotopography on flexible substrates to control muscle cell growth with enhanced maturation. Microsyst Nanoeng. 2021;7:89.

112. Abdalkader R, Konishi S, Fujita T. The Development of Biomimetic Aligned Skeletal Muscles in a Fully 3D Printed Microfluidic Device. Biomim Basel Switz. 21 déc 2021;7(1):2.

113. Rimington RP, Capel AJ, Christie SDR, Lewis MP. Biocompatible 3D printed polymers via fused deposition modelling direct C2C12 cellular phenotype in vitro. Lab Chip. 22 août 2017;17(17):2982-93.

114. Huang NF, Lee RJ, Li S. Engineering of aligned skeletal muscle by micropatterning. Am J Transl Res. 1 janv 2010;2(1):43-55.

115. Khadpekar AJ, Khan M, Sose A, Majumder A. Low Cost and Lithography-free Stamp fabrication for Microcontact Printing. Sci Rep. 31 janv 2019;9(1):1024.

116. Charest JL, García AJ, King WP. Myoblast alignment and differentiation on cell culture substrates with microscale topography and model chemistries. Biomaterials. mai 2007;28(13):2202-10.

117. Hume SL, Hoyt SM, Walker JS, Sridhar BV, Ashley JF, Bowman CN, et al. Alignment of multi-layered muscle cells within three-dimensional hydrogel macrochannels. Acta Biomater. 1 juill 2012;8(6):2193-202.

118. Ronzoni FL, Aliberti F, Scocozza F, Benedetti L, Auricchio F, Sampaolesi M, et al. Myoblast 3D bioprinting to burst in vitro skeletal muscle differentiation. J Tissue Eng Regen Med. mai 2022;16(5):484-95.

119. Agrawal G, Aung A, Varghese S. Skeletal muscle-on-a-chip: an in vitro model to evaluate tissue formation and injury. Lab Chip. 11 oct 2017;17(20):3447-61.

120. Ebrahimi M, Lad H, Fusto A, Tiper Y, Datye A, Nguyen CT, et al. De novo revertant fiber formation and therapy testing in a 3D culture model of Duchenne muscular dystrophy skeletal muscle. Acta Biomater. 15 sept 2021;132:227-44.

121. Maffioletti SM, Sarcar S, Henderson ABH, Mannhardt I, Pinton L, Moyle LA, et al. Three-Dimensional Human iPSC-Derived Artificial Skeletal Muscles Model Muscular Dystrophies and Enable Multilineage Tissue Engineering. Cell Rep. avr 2018;23(3):899-908.

122. Vandenburgh H, Shansky J, Benesch-Lee F, Skelly K, Spinazzola JM, Saponjian Y, et al. Automated drug screening with contractile muscle tissue engineered from dystrophic myoblasts. FASEB J. 2009;23(10):3325-34.

123. Kalman B, Picart C, Boudou T. Quick and easy microfabrication of T-shaped cantilevers to generate arrays of microtissues. Biomed Microdevices. juin 2016;18(3):43.

124. Rose N, Estrada Chavez B, Sonam S, Nguyen T, Grenci G, Bigot A, et al. Bioengineering a miniaturized in vitro 3D myotube contraction monitoring chip to model muscular dystrophies. Biomaterials. 1 févr 2023;293:121935.

125. Chung JJ, Im H, Kim SH, Park JW, Jung Y. Toward Biomimetic Scaffolds for Tissue Engineering: 3D Printing Techniques in Regenerative Medicine. Front Bioeng Biotechnol [Internet]. 2020 [cité 28 juill 2023];8. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.586406

126. Pugliese L, Marconi S, Negrello E, Mauri V, Peri A, Gallo V, et al. The clinical use of 3D printing in surgery. Updat Surg. sept 2018;70(3):381-8.

127. Gokyer S, Yilgor E, Yilgor I, Berber E, Vrana E, Orhan K, et al. 3D Printed Biodegradable Polyurethaneurea Elastomer Recapitulates Skeletal Muscle Structure and Function. ACS Biomater Sci Eng. 8 nov 2021;7(11):5189-205.

128. Gasparotto M, Bellet P, Scapin G, Busetto R, Rampazzo C, Vitiello L, et al. 3D Printed Graphene-PLA Scaffolds Promote Cell Alignment and Differentiation. Int J Mol Sci. 3 févr 2022;23(3):1736.

129. Kim W, Lee H, Lee J, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ, et al. Efficient myotube formation in 3D bioprinted tissue construct by biochemical and topographical cues. Biomaterials. févr 2020;230:119632.

130. Dufaud M, Solé L, Maumus M, Simon M, Perrier-Groult E, Subra G, et al. 3D bioprinting of articular cartilage: Recent advances and perspectives. Bioprinting. 1 déc 2022;28:e00253.

131. Tomasch J, Maleiner B, Heher P, Rufin M, Andriotis OG, Thurner PJ, et al. Changes in Elastic Moduli of Fibrin Hydrogels Within the Myogenic Range Alter Behavior of Murine C2C12 and Human C25 Myoblasts Differently. Front Bioeng Biotechnol [Internet]. 2022 [cité 11 juill 2023];10. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2022.836520

132. Costantini M, Testa S, Fornetti E, Barbetta A, Trombetta M, Cannata SM, et al. Engineering Muscle Networks in 3D Gelatin Methacryloyl Hydrogels: Influence of Mechanical Stiffness and Geometrical Confinement. Front Bioeng Biotechnol. 7 avr 2017;5:22.

133. Bolívar-Monsalve EJ, Ceballos-González CF, Chávez-Madero C, de la Cruz-Rivas BG, Velásquez Marín S, Mora-Godínez S, et al. One-Step Bioprinting of Multi-Channel Hydrogel Filaments Using Chaotic Advection: Fabrication of Pre-Vascularized Muscle-Like Tissues. Adv Healthc Mater. déc 2022;11(24):e2200448.

134. Kim JH. 3D Bioprinted Human Skeletal Muscle Constructs for Muscle Function Restoration. Sci Rep. 2018;

135. Skylar-Scott MA, Uzel SGM, Nam LL, Ahrens JH, Truby RL, Damaraju S, et al. Biomanufacturing of organ-specific tissues with high cellular density and embedded vascular channels. Sci Adv. 6 sept 2019;5(9):eaaw2459.

136. Kim JH, Kim I, Seol YJ, Ko IK, Yoo JJ, Atala A, et al. Neural cell integration into 3D bioprinted skeletal muscle constructs accelerates restoration of muscle function. Nat Commun. 24 févr 2020;11(1):1025.

137. Sacheck JM, Ohtsuka A, McLary SC, Goldberg AL. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. Am J Physiol-Endocrinol Metab. oct 2004;287(4):E591-601.

138. Vishal K, Lovato TL, Bragg C, Chechenova MB, Cripps RM. FGF signaling promotes myoblast proliferation through activation of wingless signaling. Dev Biol. 1 août 2020;464(1):1-10.

139. Massagué J, Cheifetz S, Endo T, Nadal-Ginard B. Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. nov 1986;83(21):8206-10.

140. Lundby C, Calbet JAL, Robach P. The response of human skeletal muscle tissue to hypoxia. Cell Mol Life Sci. 1 nov 2009;66(22):3615-23.

141. Chaillou T, Lanner JT. Regulation of myogenesis and skeletal muscle regeneration: effects of oxygen levels on satellite cell activity. FASEB J. 2016;30(12):3929-41.

142. McGarry T, Biniecka M, Veale DJ, Fearon U. Hypoxia, oxidative stress and inflammation. Free Radic Biol Med. 1 sept 2018;125:15-24.

143. Pan Y, Song D, Zhou W, Lu X, Wang H, Li Z. Baicalin inhibits C2C12 myoblast apoptosis and prevents against skeletal muscle injury. Mol Med Rep. 1 juill 2019;20(1):709-18.

144. Zhu H, Xu W, Wang N, Jiang W, Cheng Y, Guo Y, et al. Anti-fatigue effect of Lepidium meyenii Walp. (Maca) on preventing mitochondria-mediated muscle damage and oxidative stress in vivo and vitro. Food Funct. 13 avr 2021;12(7):3132-41.

145. Kim YS, Yuk HJ, Kim DS. Effect of Jakyakgamcho-Tang Extracts on H2O2-Induced C2C12 Myoblasts. Molecules. 4 janv 2021;26(1):215.

146. Park C, Cha HJ, Hwangbo H, Ji SY, Kim DH, Kim MY, et al. Phloroglucinol Inhibits Oxidative-Stress-Induced Cytotoxicity in C2C12 Murine Myoblasts through Nrf-2-Mediated Activation of HO-1. Int J Mol Sci. 27 févr 2023;24(5):4637.

147. Furuichi Y, Kawabata Y, Aoki M, Mita Y, Fujii NL, Manabe Y. Excess Glucose Impedes the Proliferation of Skeletal Muscle Satellite Cells Under Adherent Culture Conditions. Front Cell Dev Biol. 2021;9:640399.

148. Fulco M, Cen Y, Zhao P, Hoffman EP, McBurney MW, Sauve AA, et al. Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. Dev Cell. mai 2008;14(5):661-73.

149. Chen L, Chen L, Wan L, Huo Y, Huang J, Li J, et al. Matrine improves skeletal muscle atrophy by inhibiting E3 ubiquitin ligases and activating the Akt/mTOR/FoxO3α signaling pathway in C2C12 myotubes and mice. Oncol Rep. août 2019;42(2):479-94.

150. Fang WY, Tseng YT, Lee TY, Fu YC, Chang WH, Lo WW, et al. Triptolide prevents LPS-induced skeletal muscle atrophy via inhibiting NF-κB/TNF-α and regulating protein synthesis/degradation pathway. Br J Pharmacol. 2021;178(15):2998-3016.

151. Choi YJ, Kim TG, Jeong J, Yi HG, Park JW, Hwang W, et al. 3D Cell Printing of Functional Skeletal Muscle Constructs Using Skeletal Muscle-Derived Bioink. Adv Healthc Mater. 2016;5(20):2636-45.

152. Scott JB, Ward CL, Corona BT, Deschenes MR, Harrison BS, Saul JM, et al. Achieving Acetylcholine Receptor Clustering in Tissue-Engineered Skeletal Muscle Constructs In vitro through a Materials-Directed Agrin Delivery Approach. Front Pharmacol [Internet]. 2017 [cité 10 mars 2023];7. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2016.00508

153. Graham TE. Caffeine and Exercise. Sports Med. 1 sept 2001;31(11):785-807.

154. Neyroud D, Cheng AJ, Donnelly C, Bourdillon N, Gassner AL, Geiser L, et al. Toxic doses of caffeine are needed to increase skeletal muscle contractility. Am J Physiol-Cell Physiol. févr 2019;316(2):C246-51.

155. Kolnes AJ, Ingvaldsen A, Bolling A, Stuenæs JT, Kreft M, Zorec R, et al. Caffeine and theophylline block insulin-stimulated glucose uptake and PKB phosphorylation in rat skeletal muscles. Acta Physiol. 2010;200(1):65-74.

156. Egawa T, Tsuda S, Ma X, Hamada T, Hayashi T. Caffeine modulates phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and impairs insulin signal transduction in rat skeletal muscle. J Appl Physiol. déc 2011;111(6):1629-36.

157. Moore TM, Mortensen XM, Ashby CK, Harris AM, Kump KJ, Laird DW, et al. The effect of caffeine on skeletal muscle anabolic signaling and hypertrophy. Appl Physiol Nutr Metab. juin 2017;42(6):621-9.

158. Hopkins PM. Skeletal muscle physiology. Contin Educ Anaesth Crit Care Pain. 1 févr 2006;6(1):1-6.

159. Neumayer C, Happak W, Kern H, Gruber H. Hypertrophy and Transformation of Muscle Fibers in Paraplegic Patients. Artif Organs. mars 1997;21(3):188-90.

160. Carter S, Solomon TPJ. In vitro experimental models for examining the skeletal muscle cell biology of exercise: the possibilities, challenges and future developments. Pflüg Arch - Eur J Physiol. 1 mars 2019;471(3):413-29.

161. Donnelly K, Khodabukus A, Philp A, Deldicque L, Dennis RG, Baar K. A Novel Bioreactor for Stimulating Skeletal Muscle In Vitro. Tissue Eng Part C Methods. août 2010;16(4):711-8.

162. Nikolić N, Skaret Bakke S, Tranheim Kase E, Rudberg I, Flo Halle I, Rustan AC, et al. Electrical Pulse Stimulation of Cultured Human Skeletal Muscle Cells as an In Vitro Model of Exercise. PLoS ONE. 22 mars 2012;7(3):e33203.

163. Khodabukus A, Madden L, Prabhu NK, Koves TR, Jackman CP, Muoio DM, et al. Electrical stimulation increases hypertrophy and metabolic flux in tissue-engineered human skeletal muscle. Biomaterials. 1 avr 2019;198:259-69.

164. Fujita H, Nedachi T, Kanzaki M. Accelerated de novo sarcomere assembly by electric pulse stimulation in C2C12 myotubes. Exp Cell Res. 15 mai 2007;313(9):1853-65.

165. Scheler M, Irmler M, Lehr S, Hartwig S, Staiger H, Al-Hasani H, et al. Cytokine response of primary human myotubes in an in vitro exercise model. Am J Physiol-Cell Physiol. 15 oct 2013;305(8):C877-86.

166. Sciancalepore M, Coslovich T, Lorenzon P, Ziraldo G, Taccola G. Extracellular stimulation with human “noisy” electromyographic patterns facilitates myotube activity. J Muscle Res Cell Motil. 1 oct 2015;36(4):349-57.

167. De Deyne PG. Formation of sarcomeres in developing myotubes: role of mechanical stretch and contractile activation. Am J Physiol-Cell Physiol. déc 2000;279(6):C1801-11.

168. Guigni BA, Fix DK, Bivona JJ, Palmer BM, Carson JA, Toth MJ. Electrical stimulation prevents doxorubicin-induced atrophy and mitochondrial loss in cultured myotubes. Am J Physiol - Cell Physiol. 1 déc 2019;317(6):C1213-28.

169. Nikolić N, Görgens SW, Thoresen GH, Aas V, Eckel J, Eckardt K. Electrical pulse stimulation of cultured skeletal muscle cells as a model for in vitro exercise – possibilities and limitations. Acta Physiol. 2017;220(3):310-31.

170. Hjorth M, Norheim F, Meen AJ, Pourteymour S, Lee S, Holen T, et al. The effect of acute and long-term physical activity on extracellular matrix and serglycin in human skeletal muscle. Physiol Rep. 19 août 2015;3(8):e12473.

171. Ugarte G, Brandan E. Transforming Growth Factor β (TGF-β) Signaling Is Regulated by Electrical Activity in Skeletal Muscle Cells: TGF-β TYPE I RECEPTOR IS TRANSCRIPTIONALLY REGULATED BY MYOTUBE EXCITABILITY* *This work was supported in part by Grant 13980001 from FONDAP-Biomedicine and Grant 3790 from the Muscular Dystrophy Association. The costs of publication of this

article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact. J Biol Chem. 7 juill 2006;281(27):18473-81.

172. Abe S, Rhee S, Iwanuma O, Hiroki E, Yanagisawa N, Sakiyama K, et al. Effect of Mechanical Stretching on Expressions of Muscle Specific Transcription Factors MyoD, Myf-5, Myogenin and MRF4 in Proliferated Myoblasts. Anat Histol Embryol. août 2009;38(4):305-10.

173. Cho-Lim JJ, Caiozzo VJ, Tseng BP, Giedzinski E, Baker MJ, Limoli CL. Satellite Cells Say NO to Radiation. Radiat Res. mai 2011;175(5):561-8.

174. Egusa H, Kobayashi M, Matsumoto T, Sasaki JI, Uraguchi S, Yatani H. Application of Cyclic Strain for Accelerated Skeletal Myogenic Differentiation of Mouse Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells with Cell Alignment. Tissue Eng Part A. mars 2013;19(5-6):770-82.

175. Feng Y, Tian XY, Sun P, Cheng ZP, Shi RF. Simultaneous Study of Mechanical Stretch-Induced Cell Proliferation and Apoptosis on C2C12 Myoblasts. Cells Tissues Organs. 2018;205(4):189-96.

176. Aguilar-Agon KW, Capel AJ, Martin NRW, Player DJ, Lewis MP. Mechanical loading stimulates hypertrophy in tissue-engineered skeletal muscle: Molecular and phenotypic responses. J Cell Physiol. 2019;234(12):23547-58.

177. Atherton PJ, Szewczyk NJ, Selby A, Rankin D, Hillier K, Smith K, et al. Cyclic stretch reduces myofibrillar protein synthesis despite increases in FAK and anabolic signalling in L6 cells. J Physiol. 2009;587(14):3719-27.

178. Chambers MA, Moylan JS, Smith JD, Goodyear LJ, Reid MB. Stretch-stimulated glucose uptake in skeletal muscle is mediated by reactive oxygen species and p38 MAP-kinase. J Physiol. 2009;587(13):3363-73.

179. Rassier DE, MacIntosh BR, Herzog W. Length dependence of active force production in skeletal muscle. J Appl Physiol. mai 1999;86(5):1445-57.

180. Chandran R, Knobloch TJ, Anghelina M, Agarwal S. Biomechanical signals upregulate myogenic gene induction in the presence or absence of inflammation. Am J Physiol-Cell Physiol. juill 2007;293(1):C267-76.

181. Chen R, Feng L, Ruan M, Liu X, Adriouch S, Liao H. Mechanical-Stretch of C2C12 Myoblasts Inhibits Expression of Toll-Like Receptor 3 (TLR3) and of Autoantigens Associated with Inflammatory Myopathies. PLoS ONE. 4 nov 2013;8(11):e79930.

182. Hua W, Zhang M, Wang Y, Yu L, Zhao T, Qiu X, et al. Mechanical stretch regulates microRNA expression profile via NF-κB activation in C2C12 myoblasts. Mol Med Rep. 1 déc 2016;14(6):5084-92.

183. Candiani G, Riboldi SA, Sadr N, Lorenzoni S, Neuenschwander P, Montevecchi FM, et al. Cyclic Mechanical Stimulation Favors Myosin Heavy Chain Accumulation in Engineered Skeletal Muscle Constructs. J Appl Biomater Biomech. 1 mai 2010;8(2):68-75.

184. Corona BT, Machingal MA, Criswell T, Vadhavkar M, Dannahower AC, Bergman C, et al. Further Development of a Tissue Engineered Muscle Repair Construct In Vitro for Enhanced Functional Recovery Following Implantation In Vivo in a Murine Model of Volumetric Muscle Loss Injury. Tissue Eng Part A. juin 2012;18(11-12):1213-28.

185. Bonakdar N, Luczak J, Lautscham L, Czonstke M, Koch TM, Mainka A, et al. Biomechanical characterization of a desminopathy in primary human myoblasts. Biochem Biophys Res Commun. 23 mars 2012;419(4):703-7.

186. Chang YJ, Chen YJ, Huang CW, Fan SC, Huang BM, Chang WT, et al. Cyclic Stretch Facilitates Myogenesis in C2C12 Myoblasts and Rescues Thiazolidinedione-Inhibited Myotube Formation. Front Bioeng Biotechnol [Internet]. 2016 [cité 8 mars 2023];4. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2016.00027

187. Tatsumi R, Sheehan SM, Iwasaki H, Hattori A, Allen RE. Mechanical Stretch Induces Activation of Skeletal Muscle Satellite Cells in Vitro. Exp Cell Res. 1 juill 2001;267(1):107-14.

188. Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. Dev Biol. 1 févr 1998;194(1):114-28.

189. Fu S, Yin L, Lin X, Lu J, Wang X. Effects of Cyclic Mechanical Stretch on the Proliferation of L6 Myoblasts and Its Mechanisms: PI3K/Akt and MAPK Signal Pathways Regulated by IGF-1 Receptor. Int J Mol Sci. juin 2018;19(6):1649.

190. Ma Y, Fu S, Lu L, Wang X. Role of androgen receptor on cyclic mechanical stretch-regulated proliferation of C2C12 myoblasts and its upstream signals: IGF-1-mediated PI3K/Akt and MAPKs pathways. Mol Cell Endocrinol. 15 juill 2017;450:83-93.

191. Song J, Wang Y, Yuan X, Ji Q, Fan C, Zhao H, et al. Stretching magnitude–dependent inactivation of AKT by ROS led to enhanced p53 mitochondrial translocation and myoblast apoptosis. Mol Biol Cell. mai 2019;30(10):1182-97.

192. Otis JS, Burkholder TJ, Pavlath GK. Stretch-induced myoblast proliferation is dependent on the COX2 pathway. Exp Cell Res. 1 nov 2005;310(2):417-25.

193. Kumar A, Murphy R, Robinson P, Wei L, Borie AM. Cyclic mechanical strain inhibits skeletal myogenesis through activation of focal adhesion kinase, Rac-1 GTPase, and NF-kB transcription factor. FASEB J. 2004;18(13):1524-35.

194. Song J, Zhang Q, Wang S, Yang F, Chen Z, Dong Q, et al. Cleavage of caspase-12 at Asp94, mediated by endoplasmic reticulum stress (ERS), contributes to stretch-induced apoptosis of myoblasts. J Cell Physiol. 2018;233(12):9473-87.

195. Kook SH, Son YO, Choi KC, Lee HJ, Chung WT, Hwang IH, et al. Cyclic mechanical stress suppresses myogenic differentiation of adult bovine satellite cells through activation of extracellular signal-regulated kinase. Mol Cell Biochem. 1 févr 2008;309(1):133-41.

196. Kook SH, Lee HJ, Chung WT, Hwang IH, Lee SA, Kim BS, et al. Cyclic Mechanical Stretch Stimulates the Proliferation of C2C12 Myoblasts and Inhibits Their Differentiation via Prolonged Activation of p38 MAPK. Mol Cells. 30 juin 2008;25(4):479-86.

197. Kuang W, Tan J, Duan Y, Duan J, Wang W, Jin F, et al. Cyclic stretch induced miR-146a upregulation delays C2C12 myogenic differentiation through inhibition of Numb. Biochem Biophys Res Commun. 9 janv 2009;378(2):259-63.

198. Zhan M, Jin B, Chen SE, Reecy JM, Li YP. TACE release of TNF-α mediates mechanotransduction-induced activation of p38 MAPK and myogenesis. J Cell Sci. 15 févr 2007;120(4):692-701.

199. Moustogiannis A, Philippou A, Zevolis E, Taso O, Chatzigeorgiou A, Koutsilieris M. Characterization of Optimal Strain, Frequency and Duration of Mechanical Loading on Skeletal Myotubes' Biological Responses. In Vivo. 1 juill 2020;34(4):1779-88.

200. Rauch C, Loughna PT. Cyclosporin-A inhibits stretch-induced changes in myosin heavy chain expression in C2C12 skeletal muscle cells. Cell Biochem Funct. 2006;24(1):55-61.

201. Jo SB, Erdenebileg U, Dashnyam K, Jin GZ, Cha JR, El-Fiqi A, et al. Nano-graphene oxide/polyurethane nanofibers: mechanically flexible and myogenic stimulating matrix for skeletal tissue engineering. J Tissue Eng. 1 janv 2020;11:2041731419900424.

202. Akimoto T, Ushida T, Miyaki S, Tateishi T, Fukubayashi T. Mechanical stretch is a down-regulatory signal for differentiation of C2C12 myogenic cells. Mater Sci Eng C. 1 nov 2001;17(1):75-8.

203. Boonen KJM, Langelaan MLP, Polak RB, van der Schaft DWJ, Baaijens FPT, Post MJ. Effects of a combined mechanical stimulation protocol: Value for skeletal muscle tissue engineering. J Biomech. 28 mai 2010;43(8):1514-21.

204. Adachi R, Yabusaki K, Obinata T. Uptake of Albumin is Coupled with Stretch-Induced Hypertrophy of Skeletal Muscle Cells in Culture. Zoolog Sci. mai 2003;20(5):557-65.

205. Gao S, Carson JA. Lewis lung carcinoma regulation of mechanical stretch-induced protein synthesis in cultured myotubes. Am J Physiol - Cell Physiol. 1 janv 2016;310(1):C66-79.

206. Halle JL, Counts-Franch BR, Prince RM, Carson JA. The Effect of Mechanical Stretch on Myotube Growth Suppression by Colon-26 Tumor-Derived Factors. Front Cell Dev Biol [Internet]. 2021 [cité 8 mars 2023];9. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.690452

207. Sasai N, Agata N, Inoue-Miyazu M, Kawakami K, Kobayashi K, Sokabe M, et al. Involvement of PI3K/Akt/TOR pathway in stretch-induced hypertrophy of myotubes. Muscle Nerve. janv 2010;41(1):100-6.

208. Clarke MSF, Feerack DL. Mechanical load induces sarcoplasmic wounding and FGF release in differentiated human skeletal muscle cultures. FASEB J. 1996;10(4):502-9.

209. Ilaiwy A, Quintana MT, Bain JR, Muehlbauer MJ, Brown DI, Stansfield WE, et al. Cessation of biomechanical stretch model of C2C12 cells models myocyte atrophy and anaplerotic changes in metabolism using non-targeted metabolomics analysis. Int J Biochem Cell Biol. 1 oct 2016;79:80-92.

210. Soltow QA, Zeanah EH, Lira VA, Criswell DS. Cessation of cyclic stretch induces atrophy of C2C12 myotubes. Biochem Biophys Res Commun. 3 mai 2013;434(2):316-21.

211. Vandenburgh H, Kaufman S. In Vitro Model for Stretch-Induced Hypertrophy of Skeletal Muscle. Science. 19 janv 1979;203(4377):265-8.

212. Hornberger TA, Armstrong DD, Koh TJ, Burkholder TJ, Esser KA. Intracellular signaling specificity in response to uniaxial vs. multiaxial stretch: implications for mechanotransduction. Am J Physiol-Cell Physiol. janv 2005;288(1):C185-94.

213. Carson JA, Booth FW. Effect of serum and mechanical stretch on skeletal α-actin gene regulation in cultured primary muscle cells. Am J Physiol-Cell Physiol. déc 1998;275(6):C1438-48.

214. Sakiyama K, Abe S, Tamatsu Y, Ide Y. Effects of stretching stress on the muscle contraction proteins of skeletal muscle myoblasts. Biomed Res. 2005;26(2):61-8.

215. Rauch C, Loughna PT. Static stretch promotes MEF2A nuclear translocation and expression of neonatal myosin heavy chain in C2C12 myocytes in a calcineurin- and p38-dependent manner. Am J Physiol-Cell Physiol. mars 2005;288(3):C593-605.

216. Moon DG, Christ G, Stitzel JD, Atala A, Yoo JJ. Cyclic Mechanical Preconditioning Improves Engineered Muscle Contraction. Tissue Eng Part A. avr 2008;14(4):473-82.

217. Somers SM, Zhang NY, Morrissette-McAlmon JBF, Tran K, Mao HQ, Grayson WL. Myoblast maturity on aligned microfiber bundles at the onset of strain application impacts myogenic outcomes. Acta Biomater. 1 août 2019;94:232-42.

218. Kurokawa K, Abe S, Sakiyama K, Takeda T, Ide Y, Ishigami K. Effects of stretching stimulation with different rates on the expression of MyHC mRNA in mouse cultured myoblasts. Biomed Res. 2007;28(1):25-31.

219. Pomiès P, Rodriguez J, Blaquière M, Sedraoui S, Gouzi F, Carnac G, et al. Reduced myotube diameter, atrophic signalling and elevated oxidative stress in cultured satellite cells from COPD patients. J Cell Mol Med. 2015;19(1):175-86.

220. Chen X, Du W, Cai Z, Ji S, Dwivedi M, Chen J, et al. Uniaxial Stretching of Cell-Laden Microfibers for Promoting C2C12 Myoblasts Alignment and Myofibers Formation. ACS Appl Mater Interfaces. 15 janv 2020;12(2):2162-70.

221. Juffer P, Bakker AD, Klein-Nulend J, Jaspers RT. Mechanical Loading by Fluid Shear Stress of Myotube Glycocalyx Stimulates Growth Factor Expression and Nitric Oxide Production. Cell Biochem Biophys. 1 juill 2014;69(3):411-9.

222. Heinemeier KM, Olesen JL, Schjerling P, Haddad F, Langberg H, Baldwin KM, et al. Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential effects of specific contraction types. J Appl Physiol. févr 2007;102(2):573-81.

223. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-p superfamily member. Nature. mai 1997;387(6628):83-90.

224. Ortuste Quiroga HP, Ganassi M, Yokoyama S, Nakamura K, Yamashita T, Raimbach D, et al. Fine-Tuning of Piezo1 Expression and Activity Ensures Efficient Myoblast Fusion during Skeletal Myogenesis. Cells. janv 2022;11(3):393.

225. Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, et al. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. Science. 1 oct 2010;330(6000):55-60.

226. Burkholder TJ. Permeability of C2C12 myotube membranes is influenced by stretch velocity. Biochem Biophys Res Commun. 30 mai 2003;305(2):266-70.

227. Cheema U, Yang SY, Mudera V, Goldspink G g., Brown R a. 3-D in vitro model of early skeletal muscle development. Cell Motil. 2003;54(3):226-36.

228. Collinsworth AM, Torgan CE, Nagda SN, Rajalingam RJ, Kraus WE, Truskey GA. Orientation and length of mammalian skeletal myocytes in response to a unidirectional stretch. Cell Tissue Res. 1 nov 2000;302(2):243-51.

229. Ahmed WW, Wolfram T, Goldyn AM, Bruellhoff K, Rioja BA, Möller M, et al. Myoblast morphology and organization on biochemically micro-patterned hydrogel coatings under cyclic mechanical strain. Biomaterials. 1 janv 2010;31(2):250-8.

230. Takemasa T, Yamaguchi T, Yamamoto Y, Sugimoto K, Yamashita K. Oblique alignment of stress fibers in cells reduces the mechanical stress in cyclically deforming fields. Eur J Cell Biol. 1 oct 1998;77(2):91-9.

231. Pennisi CP, Olesen CG, de Zee M, Rasmussen J, Zachar V. Uniaxial cyclic strain drives assembly and differentiation of skeletal myocytes. Tissue Eng Part A. oct 2011;17(19-20):2543-50.

232. Wang D, Zheng W, Xie Y, Gong P, Zhao F, Yuan B, et al. Tissue-specific mechanical and geometrical control of cell viability and actin cytoskeleton alignment. Sci Rep. 22 août 2014;4(1):6160.

233. Okano T, Matsuda T. Hybrid Muscular Tissues: Preparation of Skeletal Muscle Cell-Incorporated Collagen Gels. Cell Transplant. 1 mars 1997;6(2):109-18.

234. Wang JHC. Substrate Deformation Determines Actin Cytoskeleton Reorganization: A Mathematical Modeling and Experimental Study. J Theor Biol. 7 janv 2000;202(1):33-41.

235. Xu H, Yagi S, Ashour S, Du L, Hoque ME, Tan L. A Review on Current Nanofiber Technologies: Electrospinning, Centrifugal Spinning, and Electro-Centrifugal Spinning. Macromol Mater Eng. 2023;308(3):2200502.

236. Wang Z, Volinsky AA, Gallant ND. Crosslinking effect on polydimethylsiloxane elastic modulus measured by custom-built compression instrument. J Appl Polym Sci [Internet]. 2014 [cité 29 juin 2022];131(22). Disponible sur: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.41050

237. Seghir R, Arscott S. Extended PDMS stiffness range for flexible systems. Sens Actuators Phys. 1 juill 2015;230:33-9.

238. Ochsner M, Dusseiller MR, Grandin HM, Luna-Morris S, Textor M, Vogel V, et al. Micro-well arrays for 3D shape control and high resolution analysis of single cells. Lab Chip. 24 juill 2007;7(8):1074-7.

239. Miranda I, Souza A, Sousa P, Ribeiro J, Castanheira EMS, Lima R, et al. Properties and Applications of PDMS for Biomedical Engineering: A Review. J Funct Biomater. mars 2022;13(1):2.

240. Almonacid Suarez AM, Zhou Q, van Rijn P, Harmsen MC. Directional topography gradients drive optimum alignment and differentiation of human myoblasts. J Tissue Eng Regen Med. 2019;13(12):2234-45.

241. Sun L, Ding A, Chen Y, Yang X, Yin Z, Fang Y. Fabrication of PDMS chips by laser engraving for protein enrichments. J Electr Eng. 1 févr 2022;73(1):43-9.

242. Alshehri AM. Femtosecond-laser-assisted spatial cell adhesion to microstructured surface geometry. AIP Adv. 1 août 2021;11(8):085017.

243. Nihtianov S. Smart Sensors and MEMS : Intelligent Sensing Devices and Microsystems for Industrial Applications Ed. 2 [Internet]. Elsevier Science; 2018 [cité 15 mai 2023]. Disponible sur: https://univ.scholarvox.com/book/88864319

244. Yaacoub S, Calas-Etienne S, Jabbour J, Amro K, Tauk R, Khoury A, et al. Design and controlled synthesis by dual polymerization of new organic–inorganic hybrid material for photonic devices. RSC Adv. 4 avr 2014;4(33):17210-7.

245. Della Giustina G, Brusatin G, Guglielmi M, Palazzesi C, Orsini E, Prosposito P. Doubly patternable epoxy based sol–gel structures by UV and soft lithography. Solid State Sci. 1 nov 2010;12(11):1890-3.

246. dos Anjos DSC, Revoredo ECV, Galembeck A. Silicone-polyacrylate chemical compatibilization with organosilanes. Polym Eng Sci. 2010;50(3):606-12.

247. Briche S, Riassetto D, Gastaldin C, Lamarle C, Dellea O, Jamon D, et al. Sol–gel processing and UVA patterning of epoxy-based hybrid organic–inorganic thin films. J Mater Sci. 1 sept 2008;43(17):5809-22.

248. Jabbour J, Calas S, Smaihi M, Gatti S, Etienne P. Study of EETMOS hydrolysis and polycondensation by 29Si NMR spectroscopy. Application to optical 3D waveguides fabrication. J Non-Cryst Solids. 1 févr 2008;354(10):1001-9.

249. Bhattacharya S, Datta A, Berg JM, Gangopadhyay S. Studies on surface wettability of poly(dimethyl) siloxane (PDMS) and glass under oxygen-plasma treatment and correlation with bond strength. J Microelectromechanical Syst. juin 2005;14(3):590-7.

250. Morra M, Occhiello E, Marola R, Garbassi F, Humphrey P, Johnson D. On the aging of oxygen plasma-treated polydimethylsiloxane surfaces. J Colloid Interface Sci. 1 juin 1990;137(1):11-24.

251. Owen MJ, Fritz JL. Surface Modification of Silicones. In: Prasad PN, Mark JE, Fai TJ, éditeurs. Polymers and Other Advanced Materials: Emerging Technologies and Business Opportunities [Internet]. Boston, MA: Springer US; 1995 [cité 10 févr 2023]. p. 201-11. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0502-4_21

252. Bodas D, Khan-Malek C. Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment—An SEM investigation. Sens Actuators B Chem. 10 avr 2007;123(1):368-73.

253. Tinku S, Iacob E, Lorenzelli L, Dahiya R. Surface characterization of polydimethylsiloxane: An AFM study. In: 2015 XVIII AISEM Annual Conference. 2015. p. 1-4.

254. Kim J, Chaudhury MK, Owen MJ, Orbeck T. The Mechanisms of Hydrophobic Recovery of Polydimethylsiloxane Elastomers Exposed to Partial Electrical Discharges. J Colloid Interface Sci. déc 2001;244(1):200-7.

255. Tserepi A, Gogolides E, Tsougeni K, Constantoudis V, Valamontes ES. Tailoring the surface topography and wetting properties of oxygen-plasma treated polydimethylsiloxane. J Appl Phys. 2 déc 2005;98(11):113502.

256. Livage J, Sanchez C. Sol-gel chemistry. J Non-Cryst Solids. janv 1992;145:11-9.

257. Brinker CJ, Scherer GW. Sol → gel → glass: I. Gelation and gel structure. J Non-Cryst Solids. 1 avr 1985;70(3):301-22.

258. Vo¨lcker N, Klee D, Ho¨cker H, Langefeld S. Functionalization of silicone rubber for the covalent immobilization of fibronectin. J Mater Sci Mater Med. 1 févr 2001;12(2):111-9.

259. Boateng SY, Lateef SS, Mosley W, Hartman TJ, Hanley L, Russell B. RGD and YIGSR synthetic peptides facilitate cellular adhesion identical to that of laminin and fibronectin but alter the physiology of neonatal cardiac myocytes. Am J Physiol-Cell Physiol. janv 2005;288(1):C30-8.

260. Siddique A, Meckel T, Stark RW, Narayan S. Improved cell adhesion under shear stress in PDMS microfluidic devices. Colloids Surf B Biointerfaces. 1 févr 2017;150:456-64.

261. Iqbal MH, Revana FJR, Pradel E, Gribova V, Mamchaoui K, Coirault C, et al. Brush-Induced Orientation of Collagen Fibers in Layer-by-Layer Nanofilms: A Simple Method for the Development of Human Muscle Fibers. ACS Nano. 27 déc 2022;16(12):20034-43.

262. Wilson L. Characterization of Human Muscle Extracellular Matrix. Grad Theses Diss [Internet]. 1 juill 2015; Disponible sur: https://scholarworks.uark.edu/etd/1191

263. Antoine EE, Vlachos PP, Rylander MN. Review of Collagen I Hydrogels for Bioengineered Tissue Microenvironments: Characterization of Mechanics, Structure, and Transport. Tissue Eng Part B Rev. déc 2014;20(6):683-96.

264. Keranov I, Vladkova T, Minchev M, Kostadinova A, Altankov G. Preparation, characterization, and cellular interactions of collagen-immobilized PDMS surfaces. J Appl Polym Sci. 2008;110(1):321-30.

265. Martin J, Martinez J, Mehdi A, Subra G. Silicone grafted bioactive peptides and their applications. Curr Opin Chem Biol. 1 oct 2019;52:125-35.

266. Yu X, Xiao J, Dang F. Surface Modification of Poly(dimethylsiloxane) Using Ionic Complementary Peptides to Minimize Nonspecific Protein Adsorption. Langmuir. 2 juin 2015;31(21):5891-8.

267. Pinese C, Jebors S, Echalier C, Licznar-Fajardo P, Garric X, Humblot V, et al. Simple and Specific Grafting of Antibacterial Peptides on Silicone Catheters. Adv Healthc Mater. 2016;5(23):3067-73.

268. Martin J, Wehbi M, Echalier C, Hunger S, Bethry A, Garric X, et al. Direct Synthesis of Peptide-Containing Silicones: A New Way to Bioactive Materials. Chem – Eur J. 6 oct 2020;26(56):12839-45.

269. Li B, Chen J, Wang JHC. RGD peptide-conjugated poly(dimethylsiloxane) promotes adhesion, proliferation, and collagen secretion of human fibroblasts. J Biomed Mater Res A. 31 août 2006;79A(4):989-98.

270. Rowley JA, Mooney DJ. Alginate type and RGD density control myoblast phenotype. J Biomed Mater Res. mai 2002;60(2):217-23.

271. Lateef SS, Boateng S, Hartman TJ, Crot CA, Russell B, Hanley L. GRGDSP peptide-bound silicone membranes withstand mechanical flexing in vitro and display enhanced fibroblast adhesion. Biomaterials. 1 août 2002;23(15):3159-68.

272. Wang PY, Wu TH, Tsai WB, Kuo WH, Wang MJ. Grooved PLGA films incorporated with RGD/YIGSR peptides for potential application on skeletal muscle tissue engineering. Colloids Surf B Biointerfaces. 1 oct 2013;110:88-95.

273. Yasa IC, Gunduz N, Kilinc M, Guler MO, Tekinay AB. Basal Lamina Mimetic Nanofibrous Peptide Networks for Skeletal Myogenesis. Sci Rep. 10 nov 2015;5:16460.

274. Kuddannaya S, Chuah YJ, Lee MHA, Menon NV, Kang Y, Zhang Y. Surface Chemical Modification of Poly(dimethylsiloxane) for the Enhanced Adhesion and Proliferation of Mesenchymal Stem Cells. ACS Appl Mater Interfaces. 9 oct 2013;5(19):9777-84.

275. Silva Garcia JM, Panitch A, Calve S. Functionalization of hyaluronic acid hydrogels with ECM-derived peptides to control myoblast behavior. Acta Biomater. 15 janv 2019;84:169-79.

276. Lin X, Takahashi K, Liu Y, Zamora PO. Enhancement of cell attachment and tissue integration by a IKVAV containing multi-domain peptide. Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj. 1 sept 2006;1760(9):1403-10.

277. Gribova V, Pignot-Paintrand I, Fourel L, Auzely-Velty R, Albigès-Rizo C, Gauthier-Rouvière C, et al. Control of the Proliferation/Differentiation Balance in Skeletal Myoblasts by Integrin and Syndecan Targeting Peptides. ACS Biomater Sci Eng. 14 mars 2016;2(3):415-25.

278. Santos E, Garate A, Pedraz JL, Orive G, Hernández RM. The synergistic effects of the RGD density and the microenvironment on the behavior of encapsulated cells: In vitro and in vivo direct comparative study. J Biomed Mater Res A. 2014;102(11):3965-72.

279. Dalheim MØ, Vanacker J, Najmi MA, Aachmann FL, Strand BL, Christensen BE. Efficient functionalization of alginate biomaterials. Biomaterials. 1 févr 2016;80:146-56.

280. Ingber DE, Folkman J. Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. J Cell Biol. juill 1989;109(1):317-30.

281. Jean E, Laoudj-Chenivesse D, Notarnicola C, Rouger K, Serratrice N, Bonnieu A, et al. Aldehyde dehydrogenase activity promotes survival of human muscle precursor cells. J Cell Mol Med. janv 2011;15(1):119-33.

282. Ballet J, Biver C, Cano JP, Deliane F, Etienne P, Llosa M. Method for preparing a photo-crosslinkable composition [Internet]. US8574818B2, 2013 [cité 23 sept 2022]. Disponible sur: https://patents.google.com/patent/US8574818B2/en

283. Flatres A. Elastographie clinique et ingénierie tissulaire : approche diagnostique translationnelle de la faiblesse musculaire acquise en réanimation [Internet] [These de doctorat]. Montpellier; 2021 [cité 11 sept 2023]. Disponible sur: https://www.theses.fr/2021MONTT006

284. Gingras J, Rioux RM, Cuvelier D, Geisse NA, Lichtman JW, Whitesides GM, et al. Controlling the Orientation and Synaptic Differentiation of Myotubes with Micropatterned Substrates. Biophys J. 15 nov 2009;97(10):2771-9.

285. Ishikawa K, Yoshida K, Kanie K, Omori K, Kato R. Morphology-Based Analysis of Myoblasts for Prediction of Myotube Formation. SLAS Discov. 1 janv 2019;24(1):47-56.

286. Zhao Y, Zeng H, Nam J, Agarwal S. Fabrication of skeletal muscle constructs by topographic activation of cell alignment. Biotechnol Bioeng. 2009;102(2):624-31.

287. Takayama Y, Wagatsuma A, Hoshino T, Mabuchi K. Simple micropatterning method for enhancing fusion efficiency and responsiveness to electrical stimulation of C2C12 myotubes. Biotechnol Prog. 2015;31(1):220-5.

288. Zatti S, Zoso A, Serena E, Luni C, Cimetta E, Elvassore N. Micropatterning Topology on Soft Substrates Affects Myoblast Proliferation and Differentiation. Langmuir. 7 févr 2012;28(5):2718-26.

289. Chen S, Nakamoto T, Kawazoe N, Chen G. Engineering multi-layered skeletal muscle tissue by using 3D microgrooved collagen scaffolds. Biomaterials. 1 déc 2015;73:23-31.

290. Duffy F, Maheshwari N, Buchete NV, Shields D. Computational Opportunities and Challenges in Finding Cyclic Peptide Modulators of Protein-Protein Interactions. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2019;2001:73-95.

291. Rosa E, de Mello L, Castelletto V, Dallas ML, Accardo A, Seitsonen J, et al. Cell Adhesion Motif-Functionalized Lipopeptides: Nanostructure and Selective Myoblast Cytocompatibility. Biomacromolecules. 9 janv 2023;24(1):213-24.

292. Masuda Y. Bioactive 3D structures of naturally occurring peptides and their application in drug design. Biosci Biotechnol Biochem. 7 janv 2021;85(1):24-32.

293. Liu J, Wang Y, Yuan X, Feng Y, Liu H. Cyclic-stretch induces the apoptosis of myoblast by activation of Caspase-3 protease in a magnitude-dependent manner. Int J Biochem Cell Biol. 1 déc 2010;42(12):2004-11.

294. Cheema U, Brown R, Mudera V, Yang SY, McGrouther G, Goldspink G. Mechanical signals and IGF-I gene splicing in vitro in relation to development of skeletal muscle. J Cell Physiol. janv 2005;202(1):67-75.

295. Stern-Straeter J, Bonaterra GA, Kassner SS, Zügel S, Hörmann K, Kinscherf R, et al. Characterization of human myoblast differentiation for tissue-engineering purposes by quantitative gene expression analysis. J Tissue Eng Regen Med. août 2011;5(8):e197-206.

296. Niu A, Wen Y, Liu H, Zhan M, Jin B, Li YP. Src mediates the mechanical activation of myogenesis by activating TNFα-converting enzyme. J Cell Sci. 1 oct 2013;126(19):4349-57.

297. Player DJ, Martin NRW, Passey SL, Sharples AP, Mudera V, Lewis MP. Acute mechanical overload increases IGF-I and MMP-9 mRNA in 3D tissue-engineered skeletal muscle. Biotechnol Lett. 1 mai 2014;36(5):1113-24.

298. Dugan JM, Cartmell SH, Gough JE. Uniaxial cyclic strain of human adipose–derived mesenchymal stem cells and C2C12 myoblasts in coculture. J Tissue Eng. 1 janv 2014;5:2041731414530138.

299. Oliver WC, Pharr GM. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. J Mater Res. juin 1992;7(6):1564-83.

300. Wang Z, Volinsky AA, Gallant ND. Nanoindentation study of polydimethylsiloxane elastic modulus using Berkovich and flat punch tips. J Appl Polym Sci [Internet]. 2015 [cité 29 juin 2022];132(5). Disponible sur: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.41384

301. Jin C, Wang Z, Volinsky AA, Sharfeddin A, Gallant ND. Mechanical characterization of crosslinking effect in polydimethylsiloxane using nanoindentation. Polym Test. 1 déc 2016;56:329-36.

Annexes

Annexe 1 : Synthèse et caractérisation des peptides

All solvents and reagents were used as supplied. Anhydrous DMF was used and purchased from Acros. NMR solvents were obtained from Eurisotop. Isocyanatopropyl triethoxysilane was obtained from TCI Europe. All amino acid derivatives and HATU (1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate were purchased from Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Germany). 2.2-Cl-Chlorotrityl resin was acquired from Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Germany) and Amphispheres 40-RAM (Rink amide 40 (40% w/w PEG)) from Agilent Technologies (Santa-Clara, USA). Solvents were purchased from Carlo Erba reagents (Val de Reuil, France). Trifluoroacetic acid, 99% extra pure, was obtained from Acros Organics (New Jersey, USA). DPBS (DPBS - Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) buffer was purchased from Thermo Fischer (Waltham, USA). Other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The polypropylene reaction vessels (syringes with frits) were purchased from Biotage (Uppsala, Sweden).

LC/MS analyses samples were prepared in an acetonitrile/water (50/50 v/v) mixture, containing 0.1% TFA. The LC/MS system consisted of a Waters Alliance 2695 HPLC, coupled to a Micromass (Manchester, UK) ZQ spectrometer (electrospray ionization mode, ESI+). Identification was carried out using a Merck Chromolith Speed rod C18, 25 × 4.6 mm reversed-phase column. A flow rate of 3 mL/min and a gradient of (0–100) % B over 2.5 min were used. Eluent A: water 0.1% HCO2H; eluent B: acetonitrile 0.1% HCO2H. Retention times (RT) are given in minutes. Positive ion electrospray mass spectra were acquired at a solvent flow rate of 200 mL/min. Nitrogen was used for both nebulizing and drying gas. The data were obtained in a scan mode ranging from 200 to 1600 m/z in 0.1 s intervals; 10 scans were summed up to get the final spectrum.

RP-preparative HPLC purification was performed on a Gilson HPLC 2250, equipped with a C18 reversed-phase column. Standard conditions were eluent system A (water 0.1% TFA) and system B (acetonitrile 0.1% TFA). A flow rate of 50 mL/min and a gradient of (0-100) % B with adapted times were used, at a detection wavelength of 214 nm.

1H NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III HD 400 MHz spectrometer equipped with a BBFO probe and 29Si and 13C NMR spectra were recorded on a Bruker Advance III 500 MHz spectrometer equipped with a Helium BBO cryoprobe at the “Laboratoire de Mesures Physiques” of the University of Montpellier.

29Si, 13C and 1H NMR spectra were recorded at 310 K in D2O or DMSO d6. Chemical shifts (δ) were reported in parts per million (ppm) using residual non-deuterated solvents as internal references (D2O, δH = 4.79 ppm; DMSO d6, δH = 2.50 ppm). Signals were indicated as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), dd (double doublet), m (multiplet). Coupling constants were measured in Hertz.

Spectra were processed, visualized and analysed using Topspin 3.5 (Bruker Biospin).

Synthesis of H-(βAla)4-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-OH, 2 TFA (RGD)

Synthesis by FPPS was made using the 2.2-Cl-Chlorotrytil resin (0.80 mmol/g, 0.80 g) resin in DMF. The first coupling reaction was performed using a Fmoc-Pro-OH (2.56 mL, 2.0 eq) / DIEA (0.450 mL, 4.0 eq) / DMF (10.0 mL) mixture overnight. The second to the sixth coupling reactions were performed using a Fmoc amino acid (6.4 mL, 5.0 eq) / DIEA (1.124 mL, 10.0 eq)) / HATU (6.4 mL, 5.0 eq) mixture for 5 minutes twice with a DMF washing step in between. The seventh to the tenth coupling reactions were

performed using a Fmoc-βAla-OH (3.84 mL, 3.0 eq) / DIEA (0.674 mL, 6.0 eq)) / HATU (3.84 mL, 3.0 eq) mixture for 1 hour, once. The Fmoc removal steps were realized using a piperidine/DMF 20/80 v/v solution (15 mL) for 1 minute and performed twice. All washings were done with DMF twice (15 mL) after coupling steps and thrice (15 mL) after deprotection steps. N-Terminal acetylation was performed with 20 % Ac2O in DMF and DIEA (1 %) for 15 minutes twice. The peptide was cleaved from the resin with pure TFA (2x1h30), concentrated under reduced pressure, recovered by precipitation in diethyl ether, then taken up in ACN/H2O 50/50 v/v mixture and freeze-dried.

The crude peptide was solubilized in H2O with 1‰ TFA and purified in two injections by RP-preparative HPLC. The purification was performed on the Gilson system. Eluents were H2O 1‰ TFA (A) and ACN 1‰ TFA (B). The purification gradient started with 5 minutes at 0% of B, then increased from 0 to 20% of B in 20 min. Collected fractions were concentrated and freeze-dried to yield 480 mg of the pure RGD peptide as a TFA salt (white powder) with 68% yield.

Silylation of H-(βAla)4-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-OH (RGD-1Si)

RGD (0.020 g, 0.0182 mmol) was solubilized in anhydrous DMF (0.40 mL). DIEA (16 µL, 0.092 mmol, 5.0 eq) and ICPTES (7 µL, 0.026 mmol, 1.4 eq) were added under stirring and inert atmosphere (argon). The solution was stirred at RT for 1h30. The product was precipitated by addition of diethyl ether and the obtained white solid was washed 3 times with diethyl ether and vacuum-dried. 31 mg of RGD-1Si was quantitatively obtained. This silylated peptide should be kept under inert atmosphere on the freeze before use until few months to prevent condensation.

Annexe 2 : Méthode d'anlayse XPS

Les mesures XPS ont été effectuées à l'aide d'un appareil Scienta Omicron Argus (Taunusstein, Allemagne), équipé d'une source monochromatique à anticathode d'aluminium Al (hν=1486,6 eV) avec une puissance de 300 W. Les spectres sont réalisés sous ultra vide (≤10^{-9} mBar), dans une direction faisant un angle de 90 ° avec la surface, avec une énergie de 100 eV pour le spectre général et de 20eV pour les régions C(1s), O(1s), N(1s), et Si(2p). Les régions correspondantes au carbone, à l'oxygène et au silicium ont été choisies pour servir de base que l'on retrouve à la fois dans le PDMS et dans les peptides permettant une quantification de la quantité de peptides en surface. L'azote est quant à lui uniquement présent dans les peptides et permet donc de déterminer l'efficacité du greffage, à savoir si les peptides sont bien présents en surface. Les énergies de liaison sont calibrées par rapport à l'énergie de liaison associée à C1s à 284.8 eV. Les intensités des pics sont déterminées après soustraction d'un fond de Shirley. Les décompositions sont réalisées à l'aide du logiciel Casa XPS (Casa Software Ltd, U.K.).

Annexe 3 : Résultats complémentaires

EFFET DU MATRIGEL® SUR LA DIFFERENCIATION DES MYOTUBES SUR PDMS MICROSTRUCTURE

La technique de biofonctionnalisation la plus simple à mettre en place est le dépôt d'une couche d'hydrogel à la surface du PDMS. Dans le cadre de la culture cellulaire musculaire, le Matrigel® l'hydrogel le plus couramment utilisé. Pour évaluer l'effet du Matrigel® dans notre modèle de supports microstructurés, des myoblastes primaires humains ont été ensemencés sur des membranes microstructurées avec et sans Matrigel®. Après 3 jours de prolifération et 4 jours de différenciation, les myotubes ont été fixés et marqués pour l'immunofluorescence de telle sorte à mesurer le taux de fusion, l'aire des myotubes et le diamètre moyen. Les mesures d'aire et le calcul du taux de fusion sont effectuées sur 3 images par condition, la manipulation a été répétée deux fois. Le diamètre a été mesuré sur environ 6x30 soit 180 myotubes par conditions. Les résultats sont regroupés dans la Figure 96.

On observe que le diamètre moyen des myotubes n'est pas différent (p = 0,06). A l'inverse, le Matrigel® sur le support microstructuré a un effet positif sur le taux de fusion (p = 0 ,001) et sur la quantité de myotubes créée (p = 0 ,0001).

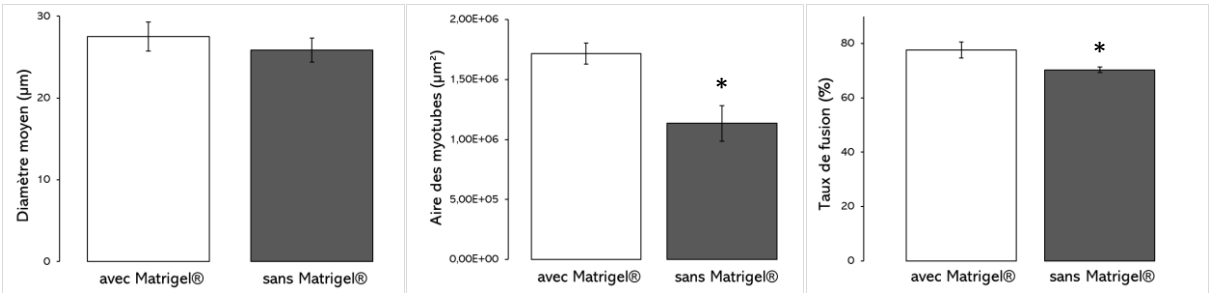

Figure 96: Effet du Matrigel® sur la différenciation des myotubes. Les mesures d'aire et le calcul du taux de fusion sont effectuées sur 3 images par condition, la manipulation a été répétée deux fois. Le diamètre a été mesuré sur environ 6x30 soit 180 myotubes par conditions.

Ces résultats suggèrent que le Matrigel® ne semble pas avoir ici d'effet structurel particulier mais uniquement un effet nutritif. Pour aller plus loin en utilisant le Matrigel®, il faudrait utiliser un intermédiaire chimique comme l'APTES pour lier de manière covalente l'hydrogel sur le PDMS.

EFFET DE L'ELECTROSTIMULATION SUR LA DIFFERENCIATION DES MYOTUBES HUMAINS MISE EN CULTURE

On a vu dans la revue bibliographique que l'électrostimulation était couramment utilisée pour simuler des protocoles d'exercice d'endurance et de force, mais aussi pour améliorer la maturation des fibres musculaires en imitant les influx nerveux reçu par les fibres au niveau de la jonction neuro-musculaire. Ainsi, nous avons appliqué un protocole d'électrostimulation sur des myotubes alignés produits sur le support microstructuré et biofonctionnalisé présenté dans les chapitres précédents de cette thèse.

Ce protocole consistait à stimuler les myotubes après 3 jours de différenciation à 12V pendant 2ms avec une fréquence de 1Hz et cela pendant 24h. Ces myotubes électrostimulés ont été comparés avec un groupe contrôle mais non-électrostimulé. Les myotubes ont été ensuite fixés et marqués en immunofluorescence à la Troponine T et au DAPI. Pour évaluer l'effet de l'électrostimulation, l'aire des myotubes produits ainsi que le taux de fusion ont été quantifié sur ImageJ (Figure 97).

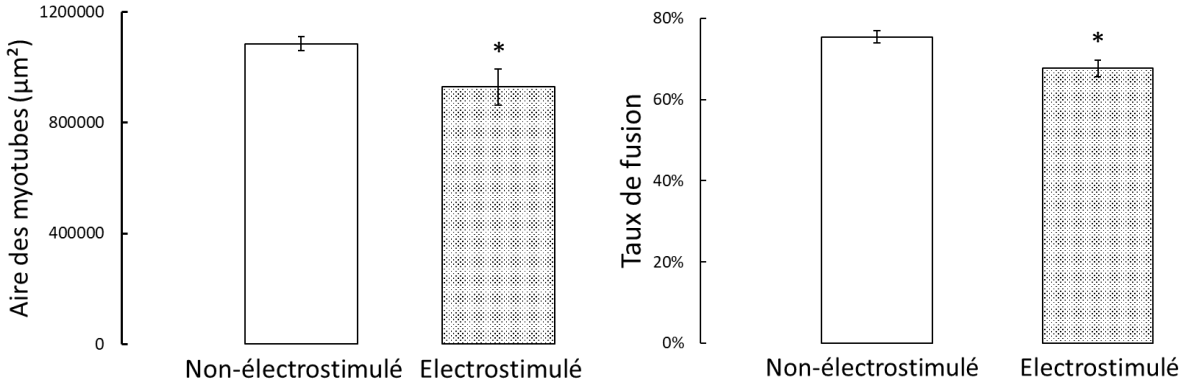

Figure 97: Effet de l'électrostimulation sur les myotubes humains

Ces premiers résultats préliminaires semblent montrer que l'électrostimulation a un effet négatif sur la quantité de myotubes produits, 1,09 ± 0,02 mm² pour les myotubes non-stimulés contre 0,93 ± 0,07 mm² pour ceux stimulés et sur le taux de fusion, 75 ± 2% pour les myotubes non-stimulé contre.68 ± 3% pour ceux stimulés.

Ainsi, comme pour le protocole d'étirement, le protocole de stimulation doit être optimisé en termes de fréquence, durée de la stimulation, durée du protocole, jour de démarrage. Cela devra faire l'objet d'un autre projet à part entière.

EFFET DE LA TENSION PASSIVE CONTINUE SUR LA PROLIFERATION DES MYOBLASTES PRIMAIRES HUMAINS

Dans la littérature, plusieurs études ont montré l'effet positif d'un étirement statique sur la prolifération des myoblastes animaux (66,198,296,297). Ainsi nous avons émis l'hypothèse que cette tension passive pouvait être optimisée en termes d'efficacité sur cette prolifération, si elle était appliquée de façon homogène sur un support biofonctionnalisé. Nous avons donc ensemencé des myoblastes humains sur des membranes non-microstructurées mais biofonctionnalisées avec les peptides bi-silylés. Après un jour de prolifération, une membrane sur deux a été déposée dans notre système d'étirement et étiré pendant 2 jours de 0,5 mm en continu. Les myoblastes ont été ensuite fixé et marqué à la Desmine, une protéine que l'on retrouve dans toutes les cellules musculaires. De façon tout à fait intéressante, nous avons observé (Figure 98) que dans la condition étirée, les myoblastes étaient en quantité significativement plus importante.

Ce résultat va donc dans le sens des précédentes études mais qui ont été réalisées sur des C2C12 (66,296,297). Nos résultats montrent pour la première fois à notre connaissance l'intérêt d'un protocole d'étirement passif continue sur la prolifération des myoblastes primaires humains. Cependant, les études ont montré qu'une meilleure prolifération induite par l'étirement passif pouvait induire une moins bonne différenciation en myotubes (167,298). Il pourrait donc être intéressant de recommencer ce protocole en laissant ensuite les myotubes se différencier soit sous un étirement passif continu, soit sur des membranes revenues à l'état initial pour vérifier si la différenciation est négativement impactée aussi.

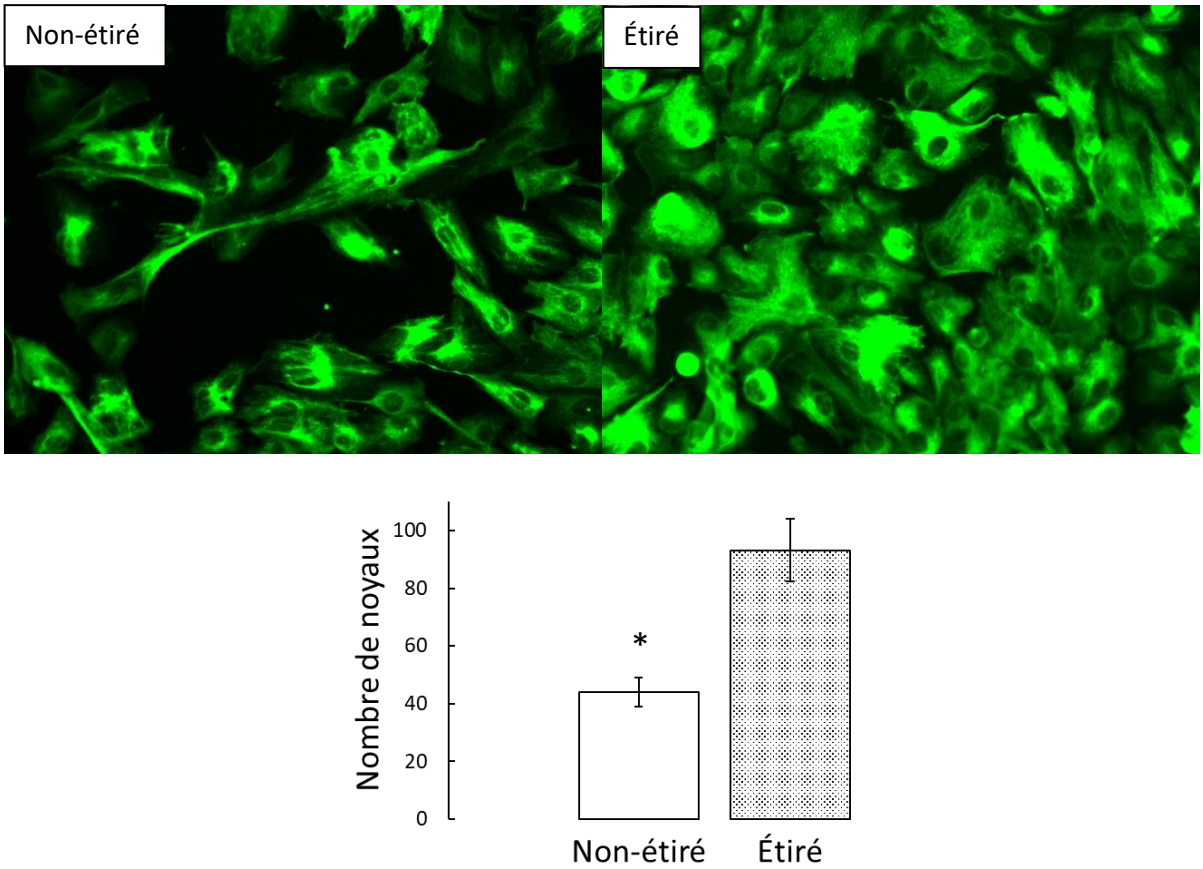

Figure 98: Effet de l'étirement statique sur la prolifération des myoblastes.

EFFET DE LA RIGIDITE DU SUPPORT SUR LA PROLIFERATION DES MYOBLASTES PRIMAIRES HUMAINS

La rigidité du support est aussi un paramètre qui peut avoir un impact sur la prolifération et la différenciation des myoblastes (32,102,103). Pour évaluer cela, des membranes en PDMS de différentes rigidités ont été produites en faisant varier le ratio agent durcissant/base.

Dans un premier temps, les différentes membranes ont été caractérisées par nanoindentation pour déterminer leur rigidité (299,300). Le principe de la nanoindentation est de mesurer l'élasticité d'un matériaux en appliquant une pression sur un point précis et en mesurant son retour à l'était initial. Puisque l'on connait les propriétés géométriques et physique de la pointe, on peut déterminer celui du matériau testé en mesurant la force appliquée et la profondeur de pénétration. On obtient ainsi une courbe de la force en fonction de la profondeur et un logiciel de calcul mathématiques permet d'en déduire le module élastique du matériau en déterminant le coefficient directeur de la tangente à la courbe en son point le plus haut. Les mesures sont effectuées sur un appareil Step 700 équipé d'un ultrananoindenteur UNHT^3 (Anton Paar, Autriche).

Pour chaque variation de ratio, plusieurs mesures de rigidité ont été effectuées (Figure 99 et Tableau 15), pour finalement obtenir une courbe qui relie de manière quasi-linéaire la rigidité de la membrane avec le ratio agent durcissant/base (Figure 99).

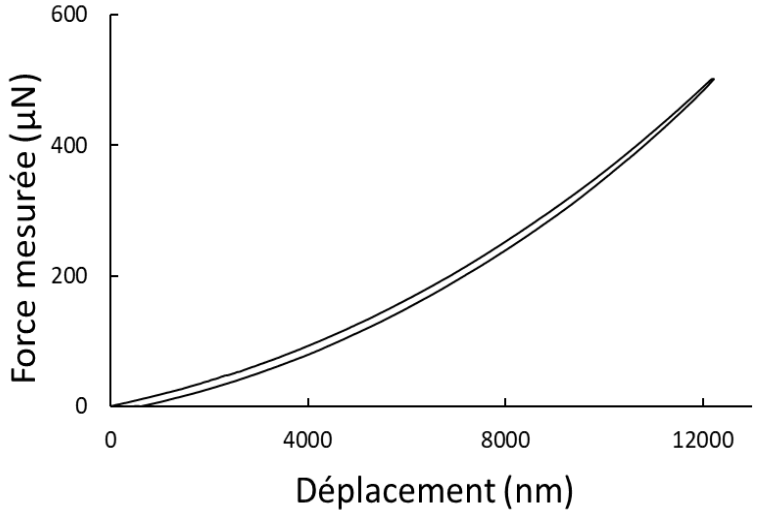

Figure 99: Courbe obtenue après nano-indentation permettant de déterminer la rigidité de l'échantillon (ici le ratio de 1:10)

Tableau 15: Variation de la rigidité de la membrane en fonction du ratio agent durcissant/base

Ratio base/agent durcissant	1:5	1:10	1:25	1:30
Rigidité 1 (MPa)	2,1331	1,8572	0,75553	0,36854
Rigidité 2 (MPa)	2,0263	1,8958	0,7702	0,36905
Rigidité 3 (MPa)	2,1781	1,9116	0,78559	0,36747
Rigidité (MPa)	**2,11 ± 0,08**	**1,89 ± 0,03**	**0,77 ± 0,02**	**0,368 ± 0,001**

La méthode de nano-indentation ne permet cependant pas de mesurer des rigidité plus basses car la grande élasticité du PDMS induit un biais dans les mesures. Plusieurs études (236,301) ont évalué la relation entre ce ratio et la rigidité et ont convenu d'une formule rapide pour la déterminer : $E = \frac{20\ MPa}{n}$ avec n le ratio agent durcissant/base. C'est cette courbe que l'on retrouve en pointillé et on

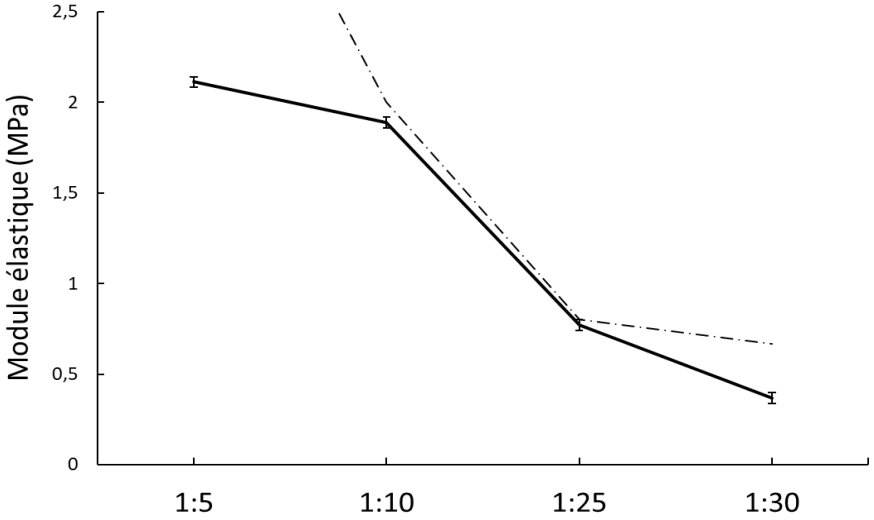

Figure 100 : Evolution de la rigidité des membranes en diminuant la quantité d'agent durcissant. En pointillés, la courbe y=20/n avec n le ratio agent durcissant/base

remarque que pour les valeurs intermédiaires, la corrélation est juste mais lorsque l'on mesure des rigidités plus importante (>2MPa) ou plus faibles (<0,5MPa), la courbe expérimentale s'éloigne de celle théorique, des résultats aussi observés par d'autres équipes (Figure 100)(236,301). Néanmoins, les valeurs obtenues ici, même pour la quantité d'agent durcissant la plus faible, sont loin des 12 kPa considérée comme la rigidité idéale pour la prolifération des myoblastes.

En ce qui concerne l'effet de la rigidité du PDMS, des myoblastes primaires humains ont été ensemencés sur des membranes en PDMS avec un ratio de 30 : 1, 40 : 1 et 50 : 1 les trois supports les moins rigides. En guise de contrôle, les myoblastes ont aussi été ensemencés dans une boite de Petri commerciale contenant un hydrogel de collagène, des conditions de routine pour la culture de myoblastes. Le nombre de cellules obtenues après 2 et 5 jours de prolifération sont résumés dans le Tableau 16.

Tableau 16: Effet de la rigidité du support sur la prolifération des myoblastes primaires humains

Nombre de cellules		Contrôle collagène	30 : 1	40 : 1	50 : 1
2j de prolifération		501 ± 84	441 ± 64	624 ± 98	517 ± 42
5j de prolifération	Myoblastes seuls	1357 ± 224	976 ± 134	1139 ± 311	829 ± 198
	Myotubes	69 ± 5	23 ± 6	43 ± 5	20 ± 4

Ces résultats montrent qu'un retard de prolifération est présent pour les myoblastes cultivés sur le PDMS par rapport à ceux dans la boite coatée collagène. Si au bout de deux jours, ce retard n'est pas significatif, il est très clair au bout du cinquième puisque dans les trois conditions, le nombre de myoblastes et de myotubes et plus faible. De plus, lorsque l'on regarde la morphologie des myoblastes (Figure 101), ils paraissent plus petits et plus arrondis sur le PDMS tandis qu'ils sont plus allongés dans la boite coatée collagène ce qui est caractéristique d'une meilleure adhésion et qui explique ensuite le nombre de cellules retrouvées.

Il est à noter qu'après 5 jours de prolifération, les myoblastes ensemencés dans la boite coatée collagène sont bien allongés et ont commencé à se différencier et à fusionner, ce qui est plus rare dans

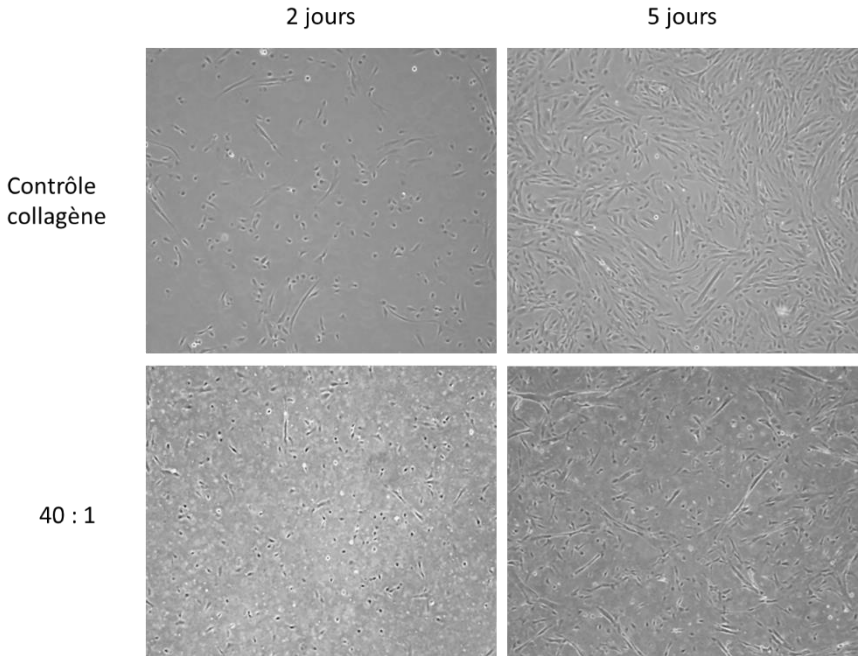

Figure 101: Effet de la rigidité du PDMS sur la prolifération des myoblastes primaires humains

les 3 autres conditions. Cette observation montre d'autant plus le retard de prolifération induit par le PDMS, même lorsque sa rigidité est plus basse. Ces résultats mettent en avant la nécessite d'une

biofonctionnalisation du PDMS pour assurer une bonne prolifération des myoblastes primaires humains.

PREPARATION ET CARACTERISATION DE MEMBRANES EN PDMS

Des membranes en PDMS sont préparées en utilisant un kit à deux composant de chez Dow Chemicals. La base (Sylgard-184A) et l'agent durcissant (Sylgard-184B) sont mélangés dans différents ratios en fonction de l'élasticité désirée (5:1 ; 10:1 ; 25:1 ; 30 :1 ; 40 :1 ; 50:1 en masse). Le produit est mélangé vigoureusement puis dégazé en appliquant une pression réduite. Le mélange est alors déposé sur un substrat en aluminium en s'assurant que l'épaisseur ne dépasse pas 0,5 mm et chauffés à 90°C pendant 4h. La mélange à 10:1 peut aussi être déposé sur un support en polystyrène et mis en rotation à 1000 tours/min pendant 30 secondes au spin coating pour obtenir des films d'environ 100µm. Les films de PDMS sont chauffés à 90°C pendant 4h.