amU
Aix Marseille Université

NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 03 février 2025 par

Aurélie COTTEN PHAM THI-CHI

Étude du potentiel neurorégénérateur de la protéine C5a du Complément

Discipline
Sciences du Mouvement Humain

École doctorale
ED 463 : Sciences du Mouvement Humain

Laboratoire/Partenaires de recherche
Institut des Sciences du Mouvement (ISM)
UMR 7287

Composition du jury

Laurence BODINEAU PR, Sorbonne Université	Rapporteuse
Romain DEBRET CR, Université de Lyon 1	Rapporteur
Florence PERRIN PR, Université de Montpellier	Présidente du jury
Imad ABOUT PR, Aix-Marseille Université	Directeur de thèse
Patrick DECHERCHI PR, Aix-Marseille Université	Co-directeur de thèse
Charlotte JEANNEAU MCF, Aix-Marseille Université	Co-encadrante de thèse

INSTITUT DES SCIENCES DU MOUVEMENT ETIENNE JULES MAREY

cnrs

Faculté des Sciences du Sport
Aix*Marseille Université

Affidavit

Je soussignée, Aurélie COTTEN PHAM THI-CHI, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique du Professeur Imad ABOUT, du Professeur Patrick DECHERCHI et du co-encadrement de la Maitresse des conférences Charlotte JEANNEAU, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 15 octobre 2024



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste de publications et participations aux conférences

1) **Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :**

1. Cotten, A., Jeanneau, C., Decherchi, P., About, I. (2024). Complement C5a Implication in Axonal Growth After Injury. Cells, 13(20), Article 20. https://doi.org/10.3390/cells13201729
   Cet artilcle a fait la couverture du journal Cells, volume 13, Issue 20 le 2 Octobre 2024.

2. Roumani, S., Jeanneau, C., Giraud, T., Cotten, A., Laucournet, M., Sohier, J., Pithioux, M., About, I., 2023. Osteogenic Potential of a Polyethylene Glycol Hydrogel Functionalized with Poly-Lysine Dendrigrafts (DGL) for Bone Regeneration. Mater. Basel Switz. 16, 862. https://doi.org/10.3390/ma16020862

2) **Participation aux congrès internationaux :**

1. Cotten, A., Jeanneau, C., Decherchi, P., About, I. Communication orale (EN) « Complement C5a enhances neuroregeneration *in vitro* », ETRS-WHS-SKINTERM Congress, Amersfoorst, Pays-Bas, Septembre 2024.
   1er prix de la catégorie « 2024 ETRS Young investigator Award »

2. Cotten, A., Jeanneau, C., Djoudi, M., Ballester, B., Richard, G., About, I. Communication affichée (EN) « A Collagen scaffold encapsulating Complement C5a enhances pulp cell colonization », CED-IADR Oral Health Research Congress, Rhodes, Grèce, Septembre 2023.
   Bourse de voyage CED-IADR

3. Cotten, A., Roumani, S., Pithioux, M., Jeanneau, C., About, I. Communication affichée (EN) « Angiogenic and Osteogenic potentials of injectable lysine dendrigrafts hydrogel », PER-IADR Oral Health Research Congress, Marseille, France, Septembre 2022.

3) **Participation aux conférences nationales au cours de la période de thèse :**

1. Cotten, A., Jeanneau C., Decherchi, P., About, I. Communication orale (FR) « Libération contrôlée du C5a du Complément et son implication dans la régénérescence nerveuse », 20ème Journée de l'École Doctorale EDSMH 463, Marseille, Mai 2024.
   2nd prix de la catégorie « Communication orale »

2. Cotten, A., Jeanneau C., Decherchi, P., About, I. Communication orale (FR) « Libération contrôlée du C5a du Complément et son implication dans la régénérescence nerveuse », 4ème Journée Recherche de l'École de Médecine Dentaire, Marseille, Mai 2024.

3. Cotten A., Poinsot M., Jeanneau C., Decherchi P., About I. Communication affichée (FR) « Implication de la protéine C5a du Complément dans la croissance d'axones lésés », 19ème Journée de l'École Doctorale EDSMH 463, Montpellier, Mai 2023.
   Prix unique de la catégorie « Recherche verte » et 3ème prix de la catégorie « Communication affichée »

4. Cotten, A., Poinsot, M., Jeanneau C., Decherchi, P., About, I. Communication affichée (FR) « Implication de la protéine C5a du Complément dans la croissance d'axones lésés », 3ème Journée Recherche de l'École de Médecine Dentaire, Marseille, Mai 2023.

Résumé

Les lésions traumatiques du système nerveux central demeurent sans solution thérapeutique efficace pour restaurer les fonctions perdues. En effet, les axones lésés ne sont pas en mesure de repousser spontanément et de se reconnecter à leurs cibles d'origine en raison d'un environnement défavorable. La protéine C5a du Complément, connue pour son rôle inflammatoire, est aussi impliquée la régénérescence tissulaire via son récepteur C5aR. Par ailleurs, associée à une matrice de collagène, elle permet la régénérescence du complexe pulpo-dentaire. Ainsi, ce travail étudie l'efficacité thérapeutique du C5a sur la régénérescence axonale à la suite d'une axotomie in vitro et la survie ainsi que le développement neuronal lorsqu'il est associé à une matrice de collagène.

Des neurones hippocampiques primaires, isolés à partir d'embryons de rats Wistar, ont été mis en culture et caractérisés par immunofluorescence. Après une lésion traumatique, l'expression de l'ARNm du C5a et du C5aR a été évaluée par RT-PCR et la sécrétion de C5a quantifiée par dosage ELISA. L'activation du C5aR a été étudiée par immunofluorescence. L'effet du C5a sur la régénérescence axonale a été évalué dans un dispositif microfluidique. La biocompatibilité de la matrice de collagène avec C5a a été validée par test MTT et la libération du C5a, quantifiée par dosage ELISA. Enfin, l'adhésion et la croissance des neurones ont été visualisées avec le kit Live/Dead et le recrutement cellulaire dans le support a été analysé par immunofluorescence.

Les résultats montrent que les neurones expriment le C5aR et sécrètent du C5a de manière constitutive. L'ajout de C5a stimule la vitesse et la repousse axonale. La matrice de collagène est non toxique et favorise l'adhésion neuronale dans le matériau après 7 jours.

Ces résultats révèlent un nouveau rôle du C5a dans la régénérescence axonale, offrant une perspective prometteuse dans le traitement ses lésions traumatiques du système nerveux central avec perte de substance.

Mots clés : C5a du Complément ; neurones ; axotomie ; régénérescence axonale

Abstract

Central nervous system injury is considered as a degenerative disease with no effective therapy to restore the lost functions. Injured axons are unable to grow and reconnect to their original targets due to an unfavorable environment. In this thesis we investigated the effects of the Complement C5a protein, which plays a significant role in regulating the inflammation and regeneration of numerous tissues upon binding to its receptor, the C5aR. Our laboratory has developed a collagen scaffold combined with C5a and demonstrated its effects on the regulation of dental pulp inflammation and regeneration. The aim of this study is to investigate the effect of C5a on injured axonal growth *in vitro*, neuronal survival and development when he is associated with collagen scaffold.

Primary hippocampal neurons, isolated from embryonic Wistar Rats, were characterized by immunostaining. A traumatic injury was simulated, and C5aR mRNA expression was investigated by RT-PCR, C5a secretion was quantified by ELISA while C5aR localization and phosphorylation were studied by immunostaining. The effect of C5a on axonal growth after axotomy was studied using a microfluidic device. The biocompatibility of collagen scaffold containing C5a was studied by MTT assay while C5a release from the support was quantified by ELISA. Finally, neuronal adhesion and growth length were visualized using the Live/Dead kit, and cell recruitment within the regenerative support was analyzed by immunofluorescence.

The primary cultures contained differentiated neurons expressing C5aR at their membranes. This culture was found to constitutively secrete C5a. Adding C5a led to a phosphorylation of C5aR and an increased axonal length and stimulation of axonal growth speed after axotomy. Finally, the scaffold was not toxic, and cell recruitment and adhesion were observed within the scaffold after 7 days.

Our findings highlight a new role of C5a in regeneration demonstrating an enhancement of axonal growth after axotomy. This may provide a promising therapeutic tool for the treatment of the central nervous system.

Keywords: Complement C5a; neuron injury; axotomy; axon regeneration

Table des matières

Affidavit 2
Liste de publications et participations aux conférences 3
Résumé 5
Abstract 7
Table des matières 9
Table des figures 14
Liste des tableaux 17
Liste des abréviations 18
Avant-propos 22
1. Introduction 24
1.1. Organisation du système nerveux central 24
1.1.1. Anatomie 24
1.1.2. Fonctions 26
1.1.3. Organisation cellulaire 27
1.2. Défaut de neurorégénérescence des lésions du SNC 32
1.2.1. Contexte 32
1.2.2. Classification 33
1.2.3. Prévalence et épidémiologie 34
1.2.4. Régénérescence spontanée limitée 35
1.3. Prises en charge et solutions thérapeutiques 43
1.3.1. Prises en charge actuelle 43
1.3.2. Recherches actives de solutions thérapeutiques 45
1.4. Système du Complément 61
1.4.1. Voies d'activation et de régulation 61
1.4.2. Rôle du système du Complément dans l'inflammation 63
1.4.3. Protéine C5a et le C5aR dans la réparation du SNC 64
1.5. Utilisation du C5a en régénérescence tissulaire 70
1.5.1. Description du support de régénérescence 70
1.5.2. Préparation du biomatériau : matrice de collagène chargée en C5a 73

1.5.3. Preuves de concept en odontologie sur le complexe pulpo-dentinaire 74
2. Problématique 77
3. Matériels et méthodes 79
3.1. Considérations éthiques 79
3.2. Animaux 79
3.3. Réactifs et matériels 79
3.4. Culture de cellules primaires de rat 81
3.4.1. Prélèvements des structures 81
3.4.2. Dissociation enzymatique puis mécanique 84
3.4.3. Mise en culture de neurones primaires 85
3.5. Caractérisation cellulaire 87
3.5.1. Morphologie 87
3.5.2. Caractérisation cellulaire par immunomarquage 87
3.6. Réalisation d'une lésion traumatique 90
3.6.1. Lésion mécanique 90
3.6.2. Effet de la lésion sur la viabilité neuronale 90
3.7. Étude du couple C5a/C5aR sur les neurones primaires lésés 92
3.7.1. Étude de l'expression du gène codant pour le C5 et le C5aR par RT-PCR 93
3.7.2. Quantification du C5a sécrété par dosage ELISA 94
3.7.3. Localisation du C5aR par immunofluorescence 95
3.7.4. Viabilité des neurones selon les concentrations de C5a exogène par test MTT 96
3.7.5. Phosphorylation du C5aR par le C5a 96
3.8. Mesures du potentiel neurorégénératif du C5a 98
3.8.1. Développement du modèle d'étude 98
3.8.2. Modèle : utilisation de puces microfluidiques 101
3.8.3. Création d'un gradient moléculaire 104
3.8.4. Mesure de la repousse axonale 110
3.9. Évaluation de la viabilité neuronale sur une matrice de collagène chargée de C5a 112
3.9.1. Extraits de matériau 112
3.9.2. Test de viabilité indirecte 114
3.9.3. Libération du C5a par le support 114

3.10. Adhésion cellulaire sur le support 115
3.11. Migration cellulaire au sein des matrices 116
3.11.1. Objectif 116
3.11.2. Cahier des charges 116
3.11.3. Description du système de maintien 116
3.11.4. Culture cellulaire 118
3.11.5. Fixation 119
3.11.6. Cryosections 119
3.11.7. Immunomarquages 119
3.12. Analyse histologique de la moelle épinière 120
3.12.1. Prélèvement de moelle épinière de rat 120
3.12.2. Cryosections 123
3.12.3. Coloration Hématoxyline-éosine 124
3.12.4. Immunohistochimie 125
3.13. Analyse statistique 126
4. Résultats 127
4.1. Culture de neurones primaires matures 127
4.2. Lésion des axones 132
4.3. Étude du couple C5a/C5aR sur les cultures primaires lésées 135
4.3.1. Les neurones expriment le gène du C5 135
4.3.2. Les neurones sécrètent du C5a 135
4.3.3. Les neurones expriment le gène du récepteur au C5a 137
4.3.4. Les neurones expriment le C5aR à leur membrane 138
4.3.5. L'ajout de C5a n'affecte par la viabilité neuronale 139
4.3.6. Le C5a induit la phosphorylation du C5aR 140
4.4. Mesures du potentiel neurorégénératif du C5a 142
4.4.1. Modèle lésionnel sur puces microfluidiques 142
4.4.2. Création d'un gradient moléculaire 145
4.4.3. Le C5a stimule la distance de repousse axonale après une lésion 147
4.4.4. Le C5a stimule la vitesse de repousse des axones 149
4.5. La matrice de collagène chargée en C5a permet la survie des neurones 151
4.5.1. Libération du C5a par la matrice 151
4.5.2. Les matrices de collagène n'affectent pas la viabilité neuronale 152

4.5.3. Adhésion des neurones aux matrices 153
4.5.4. Les cellules migrent au sein des matrices 155
4.6. Expression du C5aR par les neurones de la moelle épinière de rat 159
5. Discussion 162
5.1. Développement d'un modèle lésionnel 164
5.1.1. Les cellules isolées de rat présentent des caractéristiques des neurones adultes 164
5.1.2. Les neurones matures survivent et réorganisent leur cytosquelette à la suite d'une lésion mécanique 165
5.2. Le C5a stimule la repousse axonale après une lésion 168
5.2.1. Les concentrations de C5a utilisées ne sont pas toxiques 168
5.2.2. Le C5a active le C5aR neuronal 168
5.2.3. Intérêt de l'utilisation d'une puce microfluidique 170
5.2.4. Le gradient de C5a stimule la repousse axonale après une axotomie 171
5.3. Intérêt de l'utilisation d'une matrice de collagène chargée de microsphères de PLGA encapsulant du C5a pour la neurorégénérescence 174
5.3.1. La matrice de collagène permet une libération prolongée du C5a 174
5.3.2. Biocompatibilité de la matrice de collagène chargée de C5a 176
5.3.3. La matrice de collagène stimule l'adhésion cellulaire et le développement des neurites 177
5.3.4. La matrice de collagène chargée du C5a stimule la migration cellulaire 178
5.4. Expression du C5aR dans la moelle épinière 180
6. Conclusion générale 183
7. Perspectives 184
Importance de l'effet neurorégénérateur du C5a dans un environnement inhibiteur de la repousse axonale 184
7.1. Culture primaire d'astrocytes 186
7.2. Culture primaire d'astrocytes réactifs 189
7.3. Localisation du récepteur NgR sur les cultures de neurones 192
7.4. Activation du NgR par l'interaction avec les CSPGs 194
7.5. Étude du couple C5a/C5aR sur les astrocytes 195
7.6. Mesure des effets du C5a sur la repousse axonale dans un environnement inhibiteur 199
8. Bibliographie 200

9. Annexes 223
11.1. Article 1 223
11.2. Article 2 240

Table des figures

Figure 1. Anatomie du système nerveux central. 25
Figure 2. Composition cellulaire du système nerveux central..... 30
Figure 3. Neurophysiopathologie de la lésion du SNC. 41
Figure 4. Mécanisme entravant la régénérescence spontanée du SNC. 46
Figure 5. Principales stratégies des solutions thérapeutiques. 56
Figure 6. Voies d'activation et rôles du système du Complément. 62
Figure 7. Structures de la protéine du C5a et de ces récepteurs. 66
Figure 8. La triade en ingénierie tissulaire. 71
Figure 9. Matrice de collagène chargée de microsphère de PLGA + C5a encapsulé. 73
Figure 10. Obtention des cellules primaires de neurones de rat. 81
Figure 11. Protocole de prélèvement de l'hippocampe d'embryon de rat. 83
Figure 12. Représentation schématique du plan expérimental pour caractériser les cultures cellulaires hippocampiques. 87
Figure 13. Représentation schématique du plan expérimental pour étudier l'effet d'une lésion mécanique sur le tapis cellulaire neuronal. 90
Figure 14. Représentation schématique du plan expérimental d'étude du couple C5a/C5aR sur les cultures primaires lésées..... 92
Figure 15. Représentation schématique du plan expérimental d'étude de l'effet du C5a sur la repousse axonale. 99
Figure 16. Représentation schématique de la puce microfluidique. 100
Figure 17. Protocole de fabrication des puces microfluidiques..... 102
Figure 18. Conditions expérimentales au sein de la puce microfluidique. 109
Figure 19. Représentation schématique du plan expérimental sur extrait de biomatériau..... 113
Figure 20. Représentation schématique du plan expérimental étudiant l'adhésion cellulaire sur les matrices de régénérescence..... 115

Figure 21. Représentation schématique du plan expérimental étudiant la migration cellulaire au sein des supports de régénérescence. 118
Figure 22. Schéma des expérimentations sur moelle épinière de rat. 120
Figure 23. Protocole de prélèvement de la moelle épinière. 122
Figure 24. Évolution morphologique des cultures de neurones au cours du temps après ensemencement. 128
Figure 25. Proportion des neurones et cellules gliales au sein des cultures hippocampiques. 130
Figure 26. Effet d'une lésion mécanique sur une culture de neurones. 133
Figure 27. Expression du gène de la protéine du Complément C5 par les cultures de neurones. 135
Figure 28. Sécrétion du C5a par les cultures de neurones. 136
Figure 29. Expression du C5aR par les cultures de neurones. 137
Figure 30. Immunomarquage du récepteur au C5a sur les neurones. 138
Figure 31. Viabilité des neurones lésés au contact de différentes concentrations de C5a. 139
Figure 32. Immunomarquage du C5aR phosphorylé par le C5a. 141
Figure 33. Culture neuronale sur puces microfluidiques. 143
Figure 34. Lésion au sein du canal central d'une puce microfluidique. 144
Figure 35. Évolution théorique de la différence de hauteur de milieu (Δh) au sein de la puce microfluidique. 145
Figure 36. Évolution de la quantité de C5a dans une puce microfluidique. 146
Figure 37. Effet du C5a sur la repousse axonale. 148
Figure 38. Effet du C5a sur la vitesse de repousse axonale 150
Figure 39. Quantification du C5a libéré les matrices de collagène, chargées en C5a monophasique et biphasique. 151
Figure 40. Viabilité des cultures de neurones lésées au contact d'extrait des matrices de collagène ± C5a. 152
Figure 41. Viabilité des cultures de neurones DIV 0 adhérées sur les matrices de collagène + C5a. 154
Figure 42. Dispositif de migration cellulaire. 156
Figure 43. Migration cellulaire au sein des matrices de collagène + C5a. 157
Figure 44. Analyse histologique de la moelle épinière de rat. 160

Figure 45. Évolution de la morphologie des cellules corticales avant et après tri cellulaire. 187
Figure 46. Répartition des neurones et cellules gliales dans des cultures d'astrocytes. 188
Figure 47. Sécrétion de CSPGs par les astrocytes. 191
Figure 48. Immunomarquage des récepteurs NgR sur les neurones. 192
Figure 49. Expression du C5 et du C5aR par les cultures d’astrocytes. 196
Figure 50. Sécrétion du C5a par les cultures d’astrocytes. 197
Figure 51. Expression du C5aR sur les astrocytes de la moelle épinière de rat. 198

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des couples d'anticorps primaires et secondaires utilisés pour caractériser les cultures primaires. 89
Tableau 2. Amorces et température d'hybridation utilisées pour l'expression des gènes par RT-PCR. 93
Tableau 3. Liste des anticorps primaires et secondaires associés utilisés pour marquer le C5aR phosphorylé. 97
Tableau 4. Anticorps primaires et secondaires utilisés pour le marquage du C5aR au sein des coupes de moelle épinière. 125

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AMU	Aix-Marseille Université
ARNm	Acide Ribonucléique Messager
ASIA	*American Spinal Injury Association*
Astro 10%	Milieu reconstitué pour astrocytes à 10% de SVF
Astro free	Milieu astrocyte sans suppléments ni SVF
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BMI	BioMécanique/bioIngénierie
BSA	*Bovin Serum Albumin*
C1-7	Section Cervicale 1 à 7
C5	Protéine du Complément 5
C5a	Protéine du Complément 5a
C5aR	Récepteur de la protéine du Complément 5a
CAM	Complexe d'attaque membranaire
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
Crk(S04)2	Chromium (III) Potassium Sulfate Dodecahydrate
CSPGs	Chondroitines Sulfates Proteoglycanes
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
dH2O	Eau distillée
DIV	Day in vitro
DMSO	Dimethyl Sulfoxide

ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EtOH	Éthanol
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate Déshydrogénase
GCS	*Glasgow Coma Scale*
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Hauteur
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl) -1-pipérazine éthane sulfonique
IgG	Immunoglobuline G
IL ─ 1β	Facteur de Nécrose Tumorale et Interleukine ─ 1β
INP	Institut de Neurophysiopathologie
ISNCLME	*International Standard for Neurological Classification of Spinal Cord Injury*
L	Longueur
l	Largeur
L1/2	Section Lombaire 1 à 2
LCS	Liquide Céphalo-Spinal
LME	Lésion de la Moelle Épinière
LN	Laminine
LTC	Lésion cérébrale traumatique
MAG	Myelin-Associated Glycoprotein
MBL	Mannose-Binding Lectin
ME	Moelle Épinière
MEC	Matrice Extracellulaire
MEM	Milieu Essentiel Minimal

MOG	Myelin Oligodendrocytes Glycoprotein
mTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5 diphenyl tetrazolium bromide
NB	Neurobasal
NB/B27	Neurobasal enrichi au B-27
NeuroD2	Neuronal Differentiation 2
NF-L	Neurofilament Light Chain
NGF	Nerve Growth Factor
NT-3	Neurotrophin-3
OCT	Optimal Cutting Temperature
Olig2	Oligodendrocyte Transcription Factor 2
OMgp	Oligodendrocyte-Myelin glycoprotein
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
Pb	Paires de base
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDL	Poly-D-lysine
PEG	Polyethylene glycol
PFA	Paraformaldéhyde
PLA	Poly(lactic acid)
PLGA	Poly(Lactic-co-Glycolic Acid
Q	Débit
$R_{\mu c}$	Résistance Hydraulique Totale
Rcf	Relative Centrifugal Force
R_H	Résistance Hydraulique

r_H	Rayon Hydraulique
RhoA	*Ras Homolog Familiy member A*
ROI	Région d'intérêt
ROS	Reactive Oxygen Species
Rpm	Revolution per minute
R_{totale}	Total des résistances hydrauliques
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction
S5	Section Sacrée 5
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
SVF	Sérum de Veau Fœtal
T1-11	Section Thoracique 1 à 11
Tm	Température d'hybridation
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
tn	Temps n
TNF	Facteur de Nécrose Tumorale
VEGF	Facteur de Croissance Endothéliale Vasculaire
Δh	Différence de hauteur
ΔP	Différence de pression
η_{eau}	Viscosité de l'eau

Avant-propos

Dans le domaine de la neurorégénérescence, recréer des circuits neuronaux à la suite d'une lésion est crucial pour la récupération fonctionnelle. Le défi consiste, d'une part, à arrêter la dégénérescence lésionnelle pour éviter l'expansion des pertes tissulaires et, d'autre part, à faire repousser les axones sur de longues distances et à reconnecter les cellules cibles malgré un environnement physico-chimique non permissif. En dépit des avancées théoriques considérables dans le domaine de la neurorégénérescence, le développement de stratégies thérapeutiques demeure insuffisant pour récupérer de manière satisfaisante l'ensemble des fonctions perdues.

Au cours de mon stage de Master 2 au sein de l'équipe BioMécanique/bio Ingénierie (BMI) à l'Institut des Sciences du Mouvement, j'ai démontré que l'utilisation d'un nouveau biomatériau composé d'une matrice de collagène associée à la protéine du Complément C5a était très prometteuse pour la régénérescence du complexe pulpo-dentinaire. Le C5a est une protéine faisant partie du système du Complément qui, fixé sur son récepteur, le C5aR, initie la réaction inflammatoire. Cependant, le C5a a un double effet, dans l'inflammation mais aussi dans la régénérescence tissulaire. En effet, cette molécule est largement étudiée pour son rôle dans la régénérescence de nombreux tissus tels que le cœur, le foie ou encore les muscles. En parcourant la littérature scientifique, j'ai constaté un nombre très limité d'articles utilisant le C5a comme molécule neuroprotectrice ou neurorégénératrice, guidant et stimulant la repousse axonale après une lésion. Par ailleurs, dans le domaine de la neurorégénérescence, un nombre important de travaux ont tenté d'inhiber l'action du C5a pour diminuer les effets délétères de la neuroinflammation et augmenter les récupérations fonctionnelles, sans succès.

De ces constats ont découlé mes travaux de recherches, qui se sont orientés spécifiquement sur la stimulation de la repousse axonale après une lésion. En considérant le C5a comme une molécule neurorégénératrice, nous avons étudié son potentiel pour stimuler la repousse axonale au sein d'une puce microfluidique

ainsi que la croissance axonale dans une matrice de collagène, avec pour objectif une application à la régénérescence de la moelle épinière après une lésion traumatique.

Dans le chapitre introductif de cette thèse, je présenterais tout d'abord les prérequis indispensables en lien avec les processus régénératifs spontanés du système nerveux central. Puis, après avoir réalisé une revue non exhaustive des prises en charge et des solutions thérapeutiques actuelles, du système du Complément et son implication dans la régénérescence tissulaire, les propriétés du support de régénérescence utilisé seront présentées.

Mes travaux de recherche comportent deux volets distincts. Dans un premier temps, j'ai réalisé un modèle lésionnel de culture de neurones après avoir isolé et obtenu des neurones différenciés de rat. Sur ce dernier, j'ai étudié le couple C5a/C5aR et son effet sur la repousse axonale au sein d'une puce microfluidique. Puis, après avoir vérifié la biocompatibilité et la libération du C5a à partir du support de régénérescence, j'ai dans un second temps étudié *in vitro* son efficacité sur l'adhésion et la migration cellulaire, processus cruciaux dans la neurorégénérescence. L'une des principales difficultés a été d'explorer la régénérescence axonale de manière simple sans dénaturer sa complexité tout en s'appuyant sur de rares articles récents.

Par ce travail, nous avons mis en évidence qu'une concentration de C5a optimale promeut la repousse axonale sur de longues distances et stimule sa vitesse. En explorant les synergies entre les neurosciences, l'ingénierie tissulaire et la régénérescence, j'espère apporter une contribution significative au domaine de la neurorégénérescence. J'espère susciter de nouvelles questions, inspirer et contribuer à l'ouverture de nouvelles voies pour le développement de thérapies innovantes et à l'amélioration de la qualité de vie des personnes souffrant de lésions du système nerveux central.

1. Introduction

1.1. Organisation du système nerveux central

1.1.1. Anatomie

Le système nerveux central (SNC) est l'une des composantes majeures du système nerveux. Il regroupe l'encéphale, localisé dans le crâne et la moelle épinière (ME), contenue dans le canal vertébral au sein de la colonne vertébrale. La ME démarre du bulbe rachidien, localisé au niveau du tronc cérébral, pour s'étendre jusqu'au cône médullaire, situé au niveau des vertèbres lombaires [1] (**Figure 1A**).

Le SNC est protégé par des structures osseuses comme la boîte crânienne et les vertèbres, des structures musculaires tels que les muscles vertébraux et paravertébraux ainsi qu'un ensemble de membranes, les méninges. La couche superficielle des méninges est la plus résistante. Elle est appelée la dure-mère. Cette dernière contient des vaisseaux lymphatiques qui constituent une voie de drainage du liquide cérébro-spinal (LCS) et d'activation de la réponse immunitaire [2]. La couche intermédiaire, l'arachnoïde, contient le LCS qui amortit les chocs et les mouvements. Le LCS assure l'élimination des toxines et le transport des nutriments essentiels aux cellules nerveuses, comme le glucose. À cette action s'ajoute celle de la couche profonde des méninges, appelée la pie-mère. Cette dernière est abondamment vascularisée par les artères carotidiennes internes et les artères vertébrales ce qui garantit un apport suffisant en sang et en oxygène dans le tissu nerveux pour son bon fonctionnement [1] (**Figure 1B et C**).

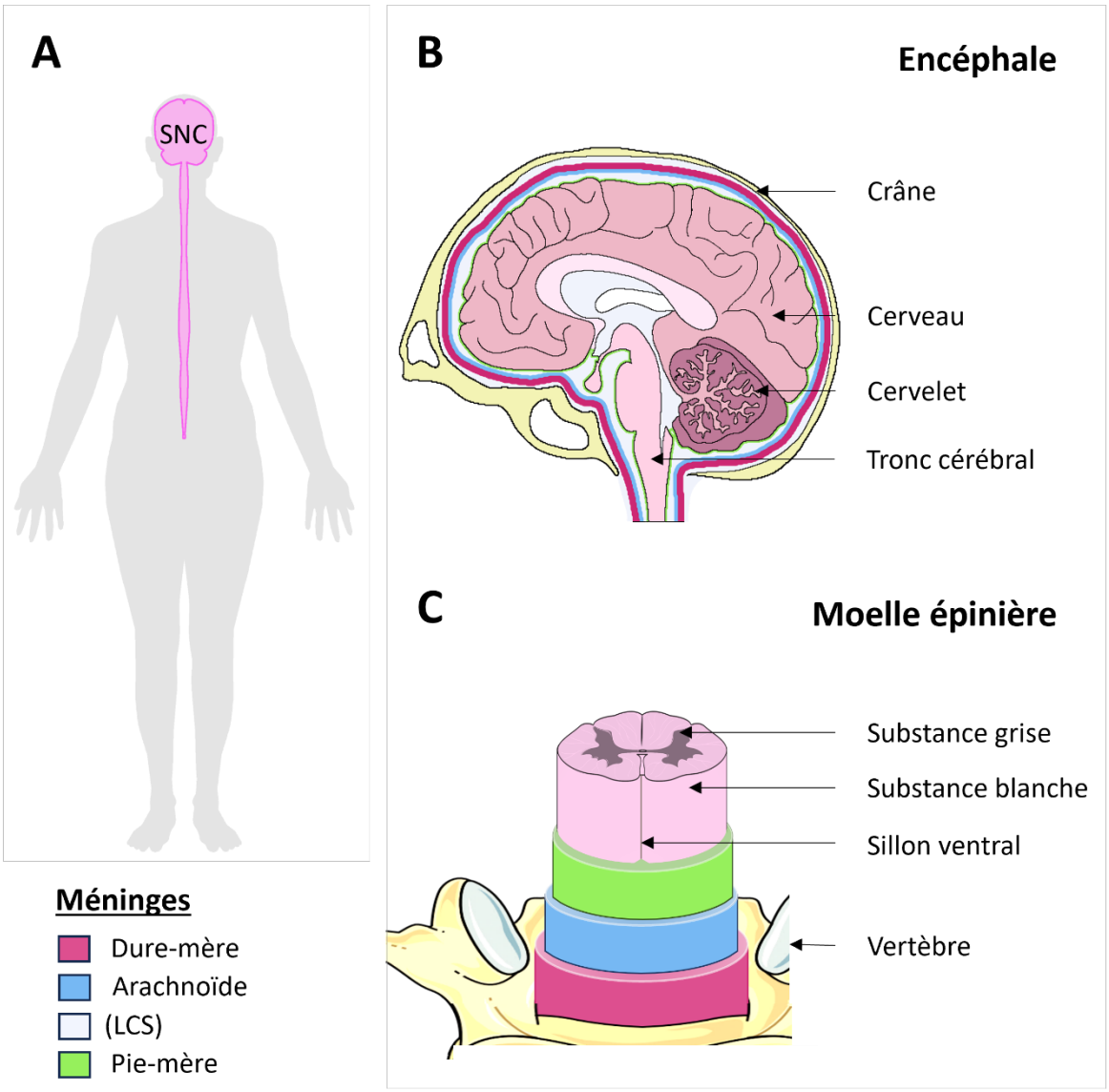


Figure 1. Anatomie du système nerveux central.

(A) Vue frontale. (B) Vue sagittale de l'encéphale. (C) Vue ventrale de la moelle épinière. Adapté de Servier Medical Art, 2025 [3].

1.1.2. Fonctions

Le SNC reçoit et intègre les informations intra- et extrinsèques pour générer une réponse adaptée. L'encéphale regroupe le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral ayant différentes fonctions (**Figure 1B**). Le cerveau est responsable des fonctions cognitives supérieures telles que la mémoire, les émotions, la planification et le langage. Le cervelet est chargé de la coordination motrice, l'équilibre et l'apprentissage moteur. Enfin, le tronc cérébral contrôle les fonctions autonomes vitales telles que la respiration ou encore la fréquence cardiaque. En continuité du tronc cérébral, la ME agit comme un relais en transmettant de manière rapide et bidirectionnelle les signaux nerveux entre l'encéphale et le reste du corps (**Figure 1C**). Elle constitue le centre des réflexes spinaux. Ces derniers correspondent à une réponse à une stimulation mécanique, thermique ou nociceptive qui est rapide, automatique, involontaire et sans l'intervention des structures supra-spinales.

Chaque région segmentaire de la ME correspond à des niveaux distincts du corps. Des nerfs spinaux en émergent pour innerver des régions spécifiques de la peau, des muscles ou encore des organes. Par exemple, la ME cervicale innervera les parties associées au cou, aux épaules, aux bras et aux mains et celle thoracique innervera le tronc alors que les parties lombaire et sacrée innerveront le bas du corps.

Au niveau microscopique, ces fonctions sont assurées par une interaction coordonnée et complexe entre différents types cellulaires [1].

1.1.3. Organisation cellulaire

Le tissu nerveux est composé d'un réseau tridimensionnel de macromolécules extracellulaires qui constitue la matrice extracellulaire (MEC), aussi appelée le parenchyme. Sécrétée par les fibroblastes, elle représente 20 à 30 % du volume tissulaire total et contient des glycoprotéines qui soutiennent l'adhésion et la fonction cellulaire [4,5]. Au sein du SNC, les cellules se répartissent et s'organisent en substance blanche, composée majoritairement des prolongements cellulaires, et en substance grise, composée majoritairement des corps cellulaires (**Figure 1B**).

1.1.3.1. Les neurones

Représentant environ 10 % des cellules du SNC, les neurones sont l'unité fonctionnelle du système nerveux. Ils transmettent des signaux électriques. Cette fonction est assurée par des extensions cellulaires appelés neurites. Ces dernières comprennent les dendrites, qui reçoivent les signaux nerveux, et l'axone qui véhicule ces signaux électriques jusqu'à son extrémité, pouvant se trouver jusqu'à 1,5 m du corps cellulaire du neurone. À la jonction entre l'extrémité axonale et la cible, le signal électrique est converti en signal chimique par la libération de neurotransmetteurs au niveau des synapses. Au sein du système nerveux, différents types de neurones ayant des morphologies ainsi que des fonctions différentes ont été recensés. Leur bon fonctionnement dépend de la présence des cellules de soutien, appelées les cellules gliales [1] (**Figure 2**).

1.1.3.2. Les cellules gliales

Les cellules gliales constituent environ 90 % des cellules du SNC. Elles ont des rôles de soutien et de protection, essentiels dans le fonctionnement médullaire [6]. Parmi elles, nous retrouvons :

1) **Les astrocytes**

Les astrocytes, de forme étoilée, qui sont omniprésents et prédominants. Ils représentent 20 à 40 % de toutes les cellules du SNC. Leur taille diffère selon le type et leur localisation dans le SNC [7]. Ils remplissent diverses fonctions telles que le maintien de l'homéostasie des ions et des lipides et la régulation des concentrations extracellulaires par l'élimination des neurotransmetteurs de la fente synaptique. De plus, les astrocytes régulent la formation, l'élimination ainsi que la modulation des synapses et contribuent au couplage neurovasculaire [1] (**Figure 2**).

2) **Les oligodendrocytes**

Les oligodendrocytes correspondent à 30 % des cellules du SNC. Leur corps cellulaire mesure généralement 10 à 15 µm de diamètre alors que leurs prolongements peuvent s'étendre jusqu'à 1 mm et s'enrouler autour des axones sous forme de gaines de myélines. Ces dernières augmentent la rapidité ainsi que l'efficacité de la conduction des informations nerveuses le long des axones. De plus, les oligodendrocytes fournissent un soutien métabolique pour les neurones en leur apportant des nutriments, en éliminant les déchets métaboliques ainsi qu'en leur assurant un transport efficace des composants du cytosquelette. Les oligodendrocytes soutiennent la survie de plusieurs populations de neurones en leur fournissant un soutien trophique [8].

Dans le SNC sont aussi retrouvés les précurseurs d'oligodendrocytes dans une proportion de 5 à 10 % des cellules gliales. Ces cellules sont localisées principalement dans les zones périventriculaires, dans la substance grise du cerveau ainsi qu'autour du canal central. Elles sont capables de remplacer les cellules myélinisantes endommagées [9] (**Figure 2**).

3) **Les cellules microgliales**

Les cellules microgliales, ou microglies, sont le principal type de cellules immunitaires résidentes du SNC. Elles représentent environ 10 à 15 % de toutes les cellules du SNC et jouent un rôle essentiel dans la régulation du développement du SNC et le maintien de l'équilibre homéostatique [10]. En condition physiologique, les microglies sont de petite taille et ont une morphologie ramifiée. Leurs prolongements scannent dynamiquement le parenchyme à la rechercher de signes d'infection ou de dommages. En plus de leur rôle immunitaire, ces cellules utilisent le système du Complément pour remodeler les synapses et affiner les circuits neuronaux [11], ce qui régule et coordonne l'activité neuronale [12] (**Figure 2**).

4) **Les cellules épendymaires**

Les cellules épendymaires sont des cellules qui tapissent le canal central sous forme d'une fine couche. Bien qu'elles ne représentent qu'une petite fraction des cellules du SNC, elles sont essentielles dans la production et la circulation du liquide céphalo-spinal (LCS). Sur le plan macroscopique, les cellules épendymaires contribuent à former une barrière entre le LCS et le tissu nerveux. Au niveau microscopique, elles possèdent des cils mobiles qui facilitent la circulation du LCS. Leur forme cylindrique assure une couverture continue et uniforme du canal central, facilitant ainsi le transport et l'échange de nutriments et de déchets [13] (**Figure 2**).

1.1.3.3. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales forment une couche monocellulaire continue le long des vaisseaux sanguins. Elles possèdent des jonctions serrées qui limitent la perméabilité vasculaire, constituant ainsi une barrière hémato-encéphalique (BHE) entre le sang et le tissu nerveux. Cette dernière protège le SNC des substances toxiques et des agents pathogènes tout en permettant le passage des nutriments essentiels selon les besoins métaboliques. Cette action régule l'homéostasie du microenvironnement neuronal et maintient l'équilibre ionique [14,15] (**Figure 2**).

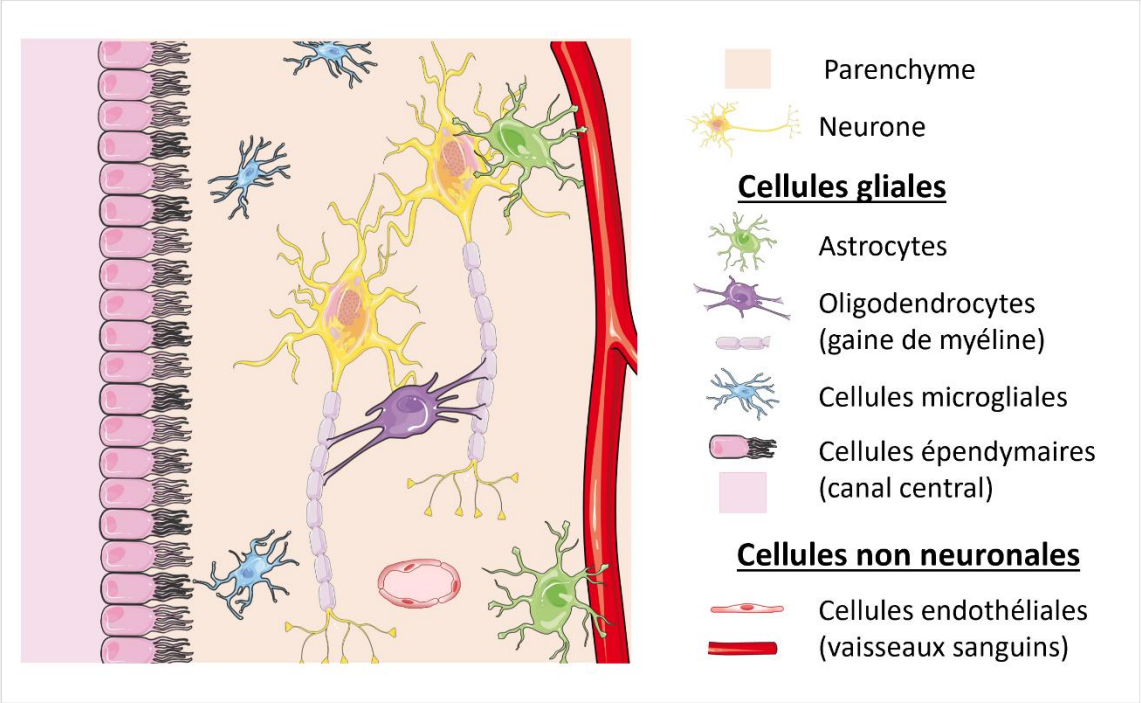


Figure 2. Composition cellulaire du système nerveux central.

Adapté de Servier Medical Art, 2025 [3].

L'intégrité et le bon fonctionnement de la MEC et de ces cellules sont cruciaux pour le maintien des fonctions du SNC. Cependant, le SNC peut être sujet à des lésions qui entrainent une perte tissulaire significative ainsi qu'une dysfonction.

Résumé

Le SNC joue un rôle clé dans l'intégration, le traitement et la transmission bidirectionnelle des informations nerveuses entre l'encéphale, la moelle épinière et le reste du corps. Le SNC coordonne les mouvements volontaires et involontaires, régule les fonctions autonomes et permet les fonctions cognitives supérieures.

Les fonctions sont réalisées par l'interaction entre les neurones, responsables de la transmission nerveuse, les cellules gliales, de soutien, ainsi que les cellules non neuronales.

Le bon fonctionnement de ces cellules est essentiel pour les fonctions nerveuses, cependant, des lésions du SNC peuvent entraîner des dysfonctionnements graves et une perte significative fonctionnelle associée.

1.2. Défaut de neurorégénérescence des lésions du SNC

1.2.1. Contexte

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit les lésions traumatiques du SNC comme des altérations anatomiques et/ou fonctionnelles tels que les lésions traumatiques cérébrales (LTC), affectant l'encéphale ainsi que les lésions médullaires (LME), touchant la moelle épinière [16,17]. Plus précisément, les LTC correspondent à « toute agression mécanique directe ou indirecte responsable ou non d'une fracture du crânien et/ou troubles de la conscience ou de signes traduisant une souffrance encéphalique diffuse ou localisée d'apparition secondaire ou retardée » [17]. La LME, quant à elle, est définie comme une « perte de fonction physique, sensitive ou autonome due à une altération de l'intégrité anatomique de la moelle épinière » [16].

Les lésions du SNC peuvent être divisées en catégories traumatiques et non traumatiques, avec des différences épidémiologiques significatives entre ces deux catégories. Par exemple, la LME traumatique représente 90 % des cas. Les lésions du SNC surviennent à la suite d'accidents routier, d'une chute, d'une blessure sportive ou encore à la suite de violences [16,18]. Leurs conséquences fonctionnelles peuvent être des troubles cognitifs, sensitivo-moteurs ou encore des dysfonctionnements autonomes et peuvent s'accompagner de complications secondaires. Les manifestations cliniques des lésions du SNC sont propres à la nature de l'atteinte ainsi que la localisation de la lésion dans l'encéphale ou la moelle épinière. En effet, une lésion de l'encéphale peut se manifester par des troubles cognitifs, des altérations du comportement, des pertes de mémoire, des troubles de l'équilibre ou des fonctions sensitivo-motrices [19]. Concernant les LME, les atteintes sensitivo-motrices se manifestent par des paralysies, des faiblesses musculaires ou encore des troubles sensitifs [16].

1.2.2. Classification

La gravité des LTC est classifiée en légère, modérée et sévère selon l'échelle de *Glasgow Coma Scale* (GCS). On distingue deux catégories de LTC : les lésions ouvertes et fermées. Le premier type correspond à une fracture ouverte du crâne avec la pénétration de débris dans le tissu cérébral. Les lésions fermées, quant à elles, n'impliquent pas de pénétration. [17]. Les LTC se manifestent par des contusions cérébrales, hémorragies intracrâniennes et des lésions axonales diffuses [20]. Les LTC sévères, ayant un score de 3 – 8 sur l'échelle GCS, ont un ratio de mortalité de 30 – 40 % lors de la prise en charge hospitalière [21].

Les LME ne sont que rarement des transsections complètes de la ME [22], néanmoins, même des lésions partielles peuvent entraîner des conséquences dévastatrices. Leurs conséquences varient selon le niveau et la gravité de la lésion, allant de la perte temporaire à permanente de fonctions sensitivo-motrices en dessous de la lésion, à des troubles autonomes, des douleurs chroniques et des affections secondaires [23,24]. Les lésions cervicales (C1 à C7/T1) représentent environ 60 % des cas, les lésions thoraciques (T1 à T11) et thoraco-lombaires (T11 à L1/2) environ 32 %, et les lésions lombaires et sacrées (L2-S5) les 8 % restants [25]. De plus, le taux de mortalité des patients atteints de LME est supérieur à celui des personnes en bonne santé du même âge. Les estimations de la mortalité au cours de l'hospitalisation varient de 4 à 7 %, puis restent élevés, à 3,8 % à la sortie de l'hôpital et à 1,2 % dans les années suivantes. Le risque de mortalité augmente avec la gravité des blessures, le niveau de lésion ainsi que l'âge croissant des patients [26].

1.2.3. Prévalence et épidémiologie

Selon Steinmetz, en 2021, la prévalence d'un LTC est d'environ 38 millions de personnes par an dans le monde alors que celle d'une LME atteint 15,4 millions de cas. Bien que les LTC soient plus fréquents, les LME ont un impact plus sévère sur la qualité de vie des patients [27].

Les lésions du SNC affectent davantage les hommes (78,3 %) que les femmes, avec un taux d'incidence chez les hommes environ 2 à 3,2 fois supérieur à celui des femmes en raison d'un comportement à risque [18,19,28]. Le profil d'âge des personnes atteintes de lésion du SNC est bimodal. Il existe une prédominance de 38,5 % chez les personnes âgées de 16 à 30 ans et celles de plus de 60 ans. Les accidents de la route ou blessures sportives sont les plus courants chez les personnes de moins de 30 ans tandis que les chutes, surviennent chez les personnes de plus de 60 ans [18,19,28].

Bien qu'il existe une disparité géographique et des contextes régionaux dans l'incidence et la prise en charge des lésions du SNC [18,29,30], l'incidence mondiale des lésions du SNC est considérée comme étant en perpétuelle augmentation, entre autres, pour cause d'urbanisation croissante entrainant une augmentation des traumatismes liés aux accidents routiers, aux chutes et aux violences [18,29].

Ces lésions affectent considérablement la qualité et l'espérance de vie des patients, entrainant également des répercussions psychosociales et émotionnelles importantes ainsi qu'un poids économique considérable pour les familles et les systèmes de santé [31].

1.2.4. Régénérescence spontanée limitée

1.2.4.1. Lésion primaire

Le traumatisme initial, également connu sous le nom de lésion primaire, se produit immédiatement après l'impact mécanique du traumatisme. Il peut correspondre à une compression, une contusion ou encore une section de la ME ou de l'encéphale. Les dommages affectent les axones, les cellules gliales et les vaisseaux sanguins dans la zone lésionnelle. Cette dernière est appelée épicentre de la lésion [23,24,32] (**Figure 3**).

Peu de temps après la lésion primaire, les processus inflammatoires déclenchés sont similaires dans des LTC ou des LME. Puis, débutent les processus de régénérescence spontanée consistant en la formation d'une cicatrice gliale ainsi que la régénérescence cellulaire et tissulaire. Bien que limités, ces processus jouent un rôle crucial dans la stabilisation de la lésion et des récupérations fonctionnelles partielles. Lorsqu'ils sont accompagnés de cascades de pertes cellulaires et tissulaires, on parle de lésion péri-lésionnelle ou encore lésions secondaires. Ces dernières sont classées en phase aiguë (< 48 heures), subaiguë (48 heures à 14 jours), intermédiaire (14 jours à 6 mois) ainsi que chronique (> 6 mois) [23,33] (**Figure 3**). La chronologie varie selon la localisation et l'ampleur des lésions [19].

1.2.4.2. Phase aiguë (< 48 heures) : Réponse inflammatoire

La perte des circuits neuronaux, la démyélinisation axonale et la mort cellulaire dues à la lésion primaire entraînent une perméabilisation cellulaire, rendant les cellules plus exposées aux dommages et entrainant le déversement du cytoplasme dans le liquide interstitiel. Sa concentration ionique va alors augmenter et influencer la conduction des neurones encore intacts [34]. Une libération excessive de glutamate par les neurones et un défaut de recaptage par les

astrocytes défaillants entraînent une suractivation des récepteurs neuronaux intacts et la mort cellulaire par excitotoxicité [35–37].

Les cellules gliales et des neurones morts ou endommagés libèrent des cytokines. Ces signaux activent localement les cellules microgliales en macrophages, stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose tumorale (TNF) et l'interleukine-1β (IL-1β) [38]. L'action des cytokines, combinée à la perte de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) par rupture de la micro-vascularisation, permet une infiltration massive de cellules inflammatoires comme les neutrophiles et macrophages sur le site de la lésion [32,39]. Les cellules immunitaires libèrent à leur tour des cytokines pro-inflammatoires, des radicaux libres et d'autres médiateurs de l'inflammation ainsi que des facteurs de croissance qui favorisent l'angiogenèse. Lorsque l'intégrité de la BHE est altérée, des œdèmes et des ischémies se forment, ce qui contribue à la compression du tissu nerveux [40]. Cette compression supplémentaire accentue les pertes cellulaires [38]. L'inflammation vise à éliminer les débris cellulaires et à limiter les dommages supplémentaires au niveau de la lésion. Cependant, elle peut aussi avoir des effets délétères en augmentant la production de radicaux libres. Ces derniers entrainent des dommages oxydatifs aux cellules environnantes, agrandissant la dégradation aux tissus sains. On parle de neurotoxicité immunitaire [37,41].

En réponse à la lésion, des enzymes protéolytiques telles que des métalloprotéases matricielles sont activées et dégradent les composants de la MEC tels que le collagène ou encore la laminine. La dégradation de la MEC libère des fragments bioactifs qui amplifient la réponse inflammatoire [42,43]. Par ailleurs, l'augmentation de la production de protéines de la MEC telles que les Chondroïtines Sulfates Protéoglycanes (CSPGs) dans les zones lésées a été associée à des effets neuroprotecteurs [44], bien que ces dernières soient principalement connues pour inhiber la régénérescence axonale [45]. De plus, les gènes de guidage axonal de répulsion, essentiels lors du neurodéveloppement tels que Netrin-1, Slit, Ephrin, et Semaphorine, sont réactivés. Ainsi, l'extrémité des axones sectionnés lors de la lésion primaire forment des bulbes de rétractation [46,47] au contact de l'environnement inhibiteur [48].

1.2.4.3. Phase subaiguë (48 heures – 14 jours) : Cicatrisation

L'ischémie et l'excitotoxicité perturbent l'homéostasie ionique intra- et extracellulaire. Le calcium intracellulaire des neurones et des cellules gliales se dérégule, entraînant une dysfonction mitochondriale puis la mort cellulaire [49]. Cette mort cellulaire est exacerbée par un excès de glutamate libéré par les neurones et qui est mal absorbé par le nombre décroissant d'astrocytes survivants. La destruction tissulaire ne cesse d'augmenter en raison des cascades de neurotoxicité. Les destructions cellulaires entrainent des dommages sur les oligodendrocytes et la myéline. La perte de myéline perturbe la conduction des signaux nerveux, entraînant une diminution de la fonction nerveuse [50]. De plus, le contenu intracellulaire des oligodendrocytes tels que les *Nogo*, *Myelin-associated glycoprotein* (MAG) et *Oligodendrocyte-myelin glycoprotein* (OMgp) est libéré dans le milieu extracellulaire, alimentant l'environnement d'inhibiteur de la repousse axonale.

Durant cette période, l'inflammation persiste bien que les cellules immunitaires commencent à se retirer. Les macrophages et microglies continuent d'infiltrer le site de lésion pour éliminer les débris cellulaires tandis que la quantité de neutrophiles diminue, laissant place à un recrutement des lymphocytes [51]. Cette transition marque le commencement de la phase de résolution de l'inflammation, où les lymphocytes jouent un rôle crucial dans la modulation de la réponse inflammatoire vers la cicatrisation [43].

La perte cellulaire ainsi que la désorganisation de la MEC sont remplacées par la formation progressive de cavités cystiques. Ces dernières contiennent du liquide extracellulaire ainsi que des macrophages et ne sont pas propices à l'adhésion cellulaire [42]. L'accumulation de liquide entraîne un œdème, augmentant la pression sur les tissus environnants et aggravant les dommages [37,52]. Les astrocytes ainsi que les cellules immunitaires activées sécrètent des protéines de la MEC telles que les CSPGs, la tenascine et le protéoglygane NG2. Ces protéines contribuent à la cicatrisation en limitant la propagation des dommages. Les modifications de la composition de la MEC telles que

l’augmentation des CSPGs ainsi que la dégradation des composants permissifs, créent un environnement peu propice à la régénérescence axonale ainsi qu’à l’adhésion cellulaire [53,54]. Les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins bordants et les cellules périvasculaires tels que les péricytes répondent aux signaux de croissance angiogéniques, tels que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et d'autres cytokines. Ces facteurs stimulent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, aussi appelé angiogenèse, cruciale pour soutenir la régénérescence tissulaire et limiter l'étendue des dommages. Cependant, les nouveaux vaisseaux qui se développent à partir de la phase subaiguë sont souvent anormaux et dysfonctionnels en raison de l’altération de la MEC ainsi que la formation de la cicatrice gliale lors de la phase intermédiaire, limitant l’apport en nutriments et oxygènes dans la zone lésée [43].

1.2.4.4. Intermédiaire (< 6 mois) : Remodelage tissulaire & régénérescence limitée

La MEC joue un rôle crucial en tant que réservoir de facteurs de croissance [4,5]. Cependant, l’accumulation au cœur de la cicatrice gliale de composants de la MEC, les CSPGs, empêche les axones endommagés de traverser les zones lésées [54,55]. Bien que la MEC constitue un environnement favorable à la synaptogenèse [4], la destruction de la MEC ainsi que la déposition anormale de collagène et d’autres protéines de structure après une lésion rendent la MEC plus rigide, entravant la migration cellulaire, la croissance et la repousse axonale [56].

Les astrocytes réactifs affluent vers l’épicentre pour aider à la réparation tissulaire et rétablir la BHE. Cependant, ces derniers deviennent des astrocytes cicatriciels et se combinent aux cellules microgliales, aux péricytes ainsi qu’aux protéines de la MEC pour former une cicatrice gliale autour des cavités cystiques de la zone lésée [57–59]. Cette cicatrice protectrice a pour but de limiter la propagation des cellules inflammatoires ainsi que des débris toxiques de l’épicentre vers les tissus nerveux intacts [60–63]. Pourtant, elle constitue un obstacle physique et chimique majeur à la régénérescence axonale en créant un environnement non permissif pour la repousse axonales des neurones endommagés [64,65]. La

capacité intrinsèque des neurones adultes à régénérer leur axone est limitée. Cependant, une tentative de repousse axonale est initiée après une LME. Elle est guidée par les cônes de croissance situés à l'extrémité des axones en développement [66]. Les cônes de croissance sont des structures dynamiques qui perçoivent leur environnement grâce à des récepteurs spécifiques localisés sur leur membrane plasmique qui, après interaction avec les molécules de guidage, déclenchent des cascades de signalisation intracellulaire qui orientent la croissance axonale [33,66–69]. Cependant, cette régénérescence axonale est souvent inefficace en raison des barrières physico-chimiques présentes [48,70], entrainant un effondrement ainsi que la dystrophie du cône de croissance [68,71]. En parallèle, la plasticité neuronale permet la réorganisation des réseaux nerveux endommagés dans l'encéphale, permettant une compensation des fonctions perdues, mais reste très limitée au sein de la moelle épinière. Elle permet la formation de nouvelles connexions synaptiques, ce qui peut partiellement compenser les fonctions perdues [33]. Les neurones autour des zones endommagées vont se modifier pour régénérer leur axone et restaurer partiellement les fonctions neurologiques. Cependant, cette réorganisation conduit parfois à la formation de synapses aberrantes avec leurs cellules cibles, perturbant d'avantage la fonctionnalité neuronale [33].

La présence de cellules souches neurales ou progéniteurs neuronaux est limitée dans le système nerveux central adulte. Ces cellules, situées le long des ventricules et du canal central, jouent un rôle dans la régénérescence neuronale. Toutefois, leur capacité à se différencier en neurones et cellules gliales en réponse à la lésion reste souvent limitée et insuffisante pour régénérer l'ensemble des acteurs cellulaires perdus et récupérer l'intégralité des fonctions [72]. De même, d'autres types cellulaires tels que les oligodendrocytes, leurs précurseurs ainsi que les cellules de Schwann prolifèrent et migrent pour tenter de remyéliniser les axones endommagés. Les interactions entre astrocytes et oligodendrocytes sont cruciales lors de ce processus. Les astrocytes activés libèrent des cytokines et des facteurs de croissance qui peuvent soit promouvoir, soit inhiber la remyélinisation des axones lésés [73].

1.2.4.5. Phase chronique (> 6 mois) : Stabilisation des processus de remodelage tissulaire

La phase chronique correspond à la stabilisation des processus de remodelage tissulaire [74]. À ce stade, la cicatrice gliale et les modifications de la MEC se stabilisent et deviennent permanentes, empêchant davantage la régénérescence axonale [62,64]. Les vaisseaux néoformés se stabilisent bien que leur fonctionnalité reste altérée. Les tentatives de restauration des fonctions perdues perdurent. Cependant, les mécanismes de régénérescence neuronale restent inefficaces pour une récupération complète face aux barrières physico-chimiques, expliquant les déficits fonctionnels devenus permanents [61]. Les neurones endommagés continuent de dégénérer progressivement aggravant les déficits fonctionnels.

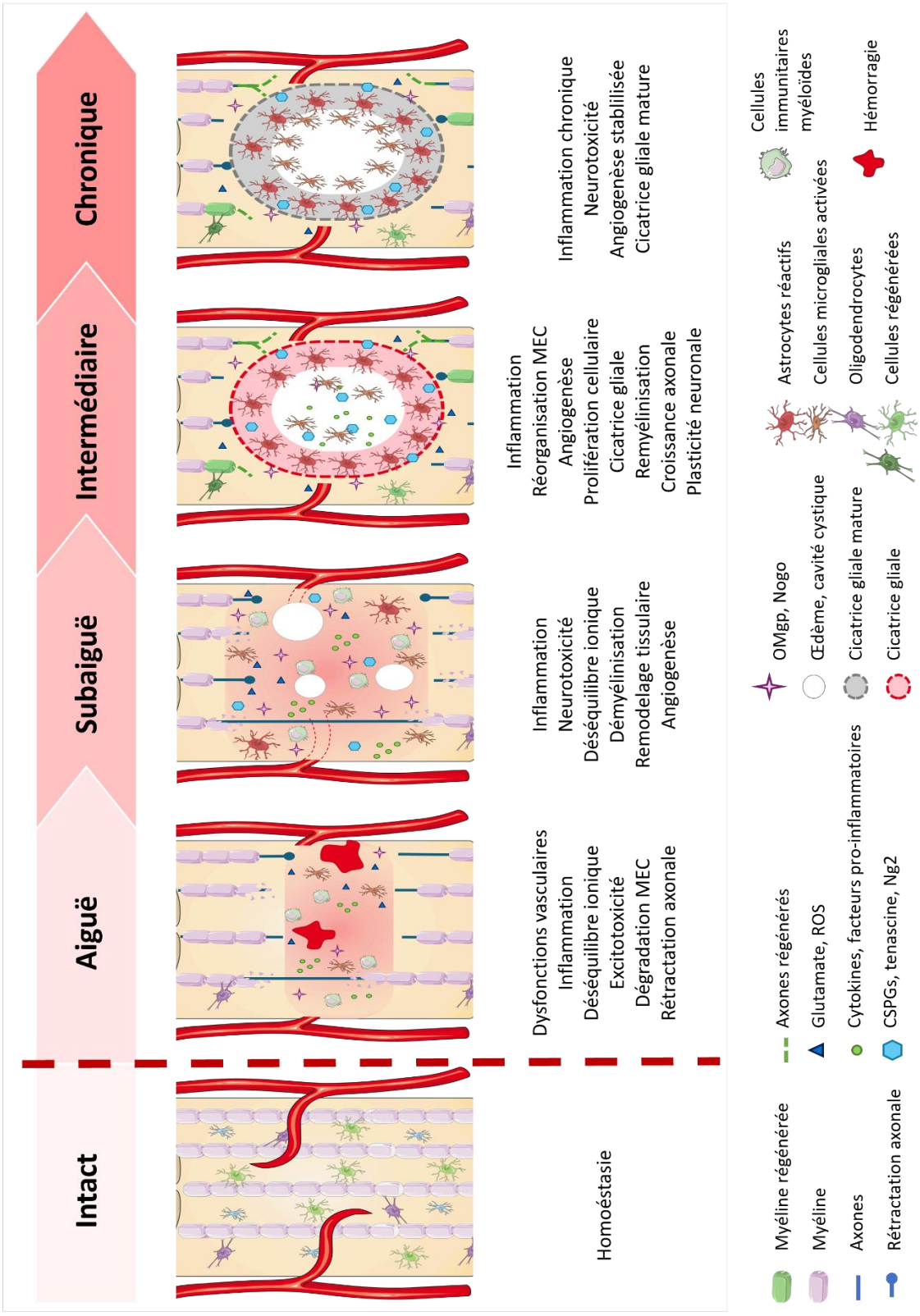


Figure 3. Neurophysiopathologie de la lésion du SNC.

Adaptation de l'article d'Ahuja et al., 2017 [23].

Résumé

Une lésion du SNC, qu'il s'agisse d'une lésion cérébrale ou médullaire, entraîne des déficits fonctionnels par interruption des connexions neuronales entre le cerveau, la moelle épinière et le reste du corps. Cette dégénérescence est évolutive.

Après la lésion immédiate des tissus nerveux, appelée lésion primaire, une cascade d'évènements se met en place sous le terme de lésion secondaire. Au cours de ce processus réparti temporellement en phase aiguë, subaiguë, intermédiaire et chronique, différents processus inflammatoires et de régénérescence se mettent en place. Ils comprennent la réponse inflammatoire initiale, la cicatrisation ainsi que la régénérescence spontanée. Cependant, bien que ces mécanismes de régénérescence contribuent à la récupération de certaines fonctions, ils sont insuffisants pour une récupération fonctionnelle complète et efficace en raison des facteurs environnementaux non permissifs pour la repousse axonale. Parmi eux, la cicatrice gliale constitue une barrière physico-chimique à laquelle s'ajoute l'action des inhibiteurs de la myéline ainsi que l'environnement neurotoxique.

Une compréhension approfondie des interactions entre les cellules du SNC de manière physiologique et en réponse aux lésions est cruciale pour développer des stratégies thérapeutiques efficaces.

1.3. Prises en charge et solutions thérapeutiques

1.3.1. Prises en charge actuelle

Malgré des avancées au cours des dernières décennies, les prises en charge des lésions du SNC restent principalement palliatives. Les pratiques réalisées tout au long de la prise en charge sont déterminées selon la gravité et la progression de la lésion ainsi que l'évolution des récupérations fonctionnelles. Pour cela, plusieurs outils standardisés ont été développés. Parmi eux, l'échelle de Glasgow (GCS) [75], l'*International Standard for Neurological Classification of Spinal Cord Injury* (ISNCLME) et l'*American Spinal Injury Association* (ASIA) sont les plus couramment utilisés et sont mis en place dans les 72 heures après l'apparition de la lésion [76].

1.3.1.1. Phase aiguë

La prise en charge des lésions du SNC est une course contre la montre. Sur le lieu de l'accident, le patient est immédiatement immobilisé ce qui prévient toutes aggravations et pertes fonctionnelles supplémentaires. Arrivé à l'hôpital, un accès rapide à des soins intensifs stabilise les fonctions vitales et prévient les pertes tissulaires supplémentaires [19,77]. Puis, le diagnostic est réalisé par des examens radiographiques tels que la radiologie, l'angioscanner, la tomodensitométrie ou encore l'imagerie par résonance magnétique (IRM), afin d'identifier l'étendue de la lésion et d'éventuelles fractures ou hématomes comprimant les structures nerveuses [23]. Une décompression chirurgicale est effectuée en cas de besoin dans le but de réaligner la colonne vertébrale, rétablir la stabilité médullaire ainsi que de diminuer les compressions appliquées sur la ME [23]. Cette dernière, réalisée 8 à 12 heures après une lésion cervicale, est associée à des résultats neurologiques améliorés chez les patients [78]. Au contraire, appliquée à la pression intracrânienne en raison du volume de l'hématome, cette pratique est associée à des résultats neurologiques défavorables et à des handicaps après des LTC [79].

En complément, des anti-inflammatoires stéroïdiens sont administrés par voie intraveineuse [77] bien que leur efficacité demeure discutée. Par exemple, la méthylprednisolone est un médicament traditionnellement administré pour son effet anti-inflammatoire et neuroprotecteur, cependant, les récupérations fonctionnelles sont faibles alors que les effets indésirables sont considérables tels qu'une immunodépression ainsi que des infections récurrentes [38].

1.3.1.2. Phase subaiguë

Les interventions visent à diminuer l'inflammation en limitant ses effets neurotoxiques et la mise en place de l'œdème. Pour cela, des traitements anti-inflammatoires sont utilisés après des LME tels que les corticoïdes. De plus, une mobilisation précoce est réalisée, maintenant la circulation sanguine et prévenant des contractures musculaires [18,80].

1.3.1.3. Phase intermédiaire

Les réhabilitations intensives ont démontré des résultats significatifs sur le long terme en ce qui concerne la récupération fonctionnelle et la prévention de complications en complément des interventions médicales [23]. Ces réhabilitations incluent la réhabilitation cognitive, la thérapie physique, l'entraînement locomoteur et l'utilisation de dispositifs assistés par la robotique comme les exosquelettes [81]. Ces dispositifs améliorent l'autonomie des patients et les fonctions neuromusculaires en stimulant la neuroplasticité et la réorganisation synaptiques limitées par des barrières physico-chimiques, en augmentant l'expression des facteurs de croissance ainsi qu'en modifiant significativement la signalisation cellulaire [82].

1.3.1.4. Phase chronique

Combinée aux réhabilitations, la contraction des muscles par l'utilisation des stimulations électriques au niveau des nerfs périphériques permettrait aux patients en phase chronique de réaliser certains mouvements fonctionnels tels que la marche assistée ou encore des mouvements du bras. Cette technique augmenterait la neuroplasticité et diminuerait les complications secondaires ce qui améliorerait la qualité de vie des patients [83].

Malheureusement, le bénéfice clinique obtenu avec les approches actuelles est limité. Aucune solution thérapeutique n'est efficace pour réparer les lésions cérébrales et médullaires pour récupérer l'intégralité des fonctions perdues, de sorte que les patients souffrent de dysfonctionnements à long terme accompagnés d'une perte d'autonomie.

1.3.2. Recherches actives de solutions thérapeutiques

Le traitement d'une LME entraine des coûts estimés à environ 2,5 à 5 millions et pour LTC à 25 billions de dollars aux États-Unis pour les patients, leur famille et la société selon la gravité de la blessure [30,84]. La recherche de thérapies reste un enjeu majeur de santé publique car des améliorations fonctionnelles, mêmes minimes, permettraient de diminuer ces coûts en augmentant l'autonomie des patients.

De nombreux obstacles ont été mis en évidence par les recherches actuelles concernant la réparation du SNC et la récupération fonctionnelle. Il est possible de les classer en problèmes intrinsèques et extrinsèques [69,85–87], regroupés dans la **Figure 4**. Afin de remédier à ces divers problèmes, les études actuelles ont deux objectifs. D'une part, elles cherchent à élaborer des stratégies neuroprotectrices pour réduire les dommages cellulaires et tissulaires causés par les lésions secondaires et neurodégénératives. D'autre part, elles visent à manipuler la réponse régénérative pour restaurer des réseaux neuronaux fonctionnels.

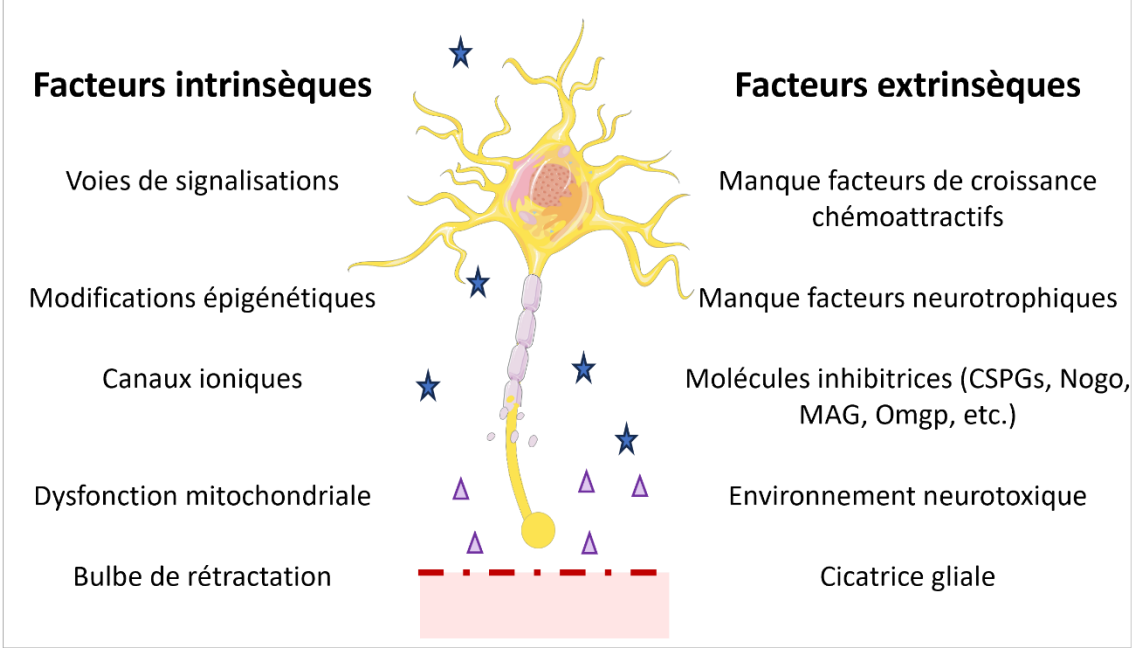


Figure 4. Mécanisme entravant la régénérescence spontanée du SNC.

Les étoiles correspondent à l'environnement neurotoxique, les triangles, aux molécules inhibitrices et les pointillés correspondent à la zone lésionnelle. Adaptation de l'article Tian et al., 2023 [86].

1.3.2.1. Cibler les capacités neurorégénératives intrinsèques des neurones

Les neurones différenciés du SNC ne parviennent pas régénérer leur axone après une lésion. Cet échec est lié à la diminution du potentiel de régénérescence des neurones adultes. Cette réduction est due à l'inactivation des voies responsables de la croissance axonale ; celles-ci sont normalement actives chez les neurones immatures mais deviennent inefficaces à des stades avancés de différenciation neuronale [69,88–90]. Ainsi, des manipulations pharmacologiques, moléculaires ou génétiques dans le SNC adulte pourraient réactiver les programmes de croissance intrinsèques et augmenter la dynamique du cytosquelette. De plus, ces manipulations pourraient inhiber la voie *Ras homolog familiy member A* (RhoA), responsable d'un collapsus des cônes de croissance et de l'échec de la régénérescence [91–93]. Ces interventions induiraient la régénérescence axonale et stimuleraient la neuroplasticité [94].

1) **Stimuler l'activité des voies de signalisation**

Les voies de signalisation comme *mechanistic Target Of Rapamycin* (mTOR), JAK/STAT/SOCS3 et DLK régulent la survie et la croissance neuronale [86]. Dans un modèle murin, l'augmentation de l'activité de mTOR en supprimant son régulateur négatif PTEN, a montré une augmentation du potentiel neurorégénérateur des axones lésés ainsi que le bourgeonnement collatéral d'axones intacts [95,96].

2) **Stimuler la dynamique du cytosquelette**

Le cytosquelette du cône de croissance est composé de microtubules et de filaments d'actine. La modification de son organisation par polymérisation ou dépolymérisation régule la croissance axonale. Après une lésion axonale, l'activation de RhoA entraine un effondrement des cônes de croissance à l'extrémité de l'axone lésé et la formation de bulbe de rétractation induisant l'échec de la régénérescence. Chez le rat, supprimer l'expression de RhoA augmente la

régénérescence axonale et réduit l'apoptose ainsi que la formation de cavité et de la cicatrice gliale [97]. Des études chez le rongeur ont montré que l'utilisation de médicament stabilisant les microtubules comme le Taxol ou encore l'épiothilone B augmente la polymérisation des microtubules pour former des cônes de croissance. De plus, la cicatrice gliale diminue après une contusion, ce qui induit la régénérescence axonale et une amélioration fonctionnelle [98].

3) **Action sur les canaux ioniques**

Les canaux ioniques notamment la sous-unité α2δ2 des canaux calciques voltage-dépendants jouent un rôle crucial dans la régulation de la synaptogenèse tout en limitant la croissance axonale. Son blocage avec des gabapentinoïdes a augmenté la régénérescence axonale des neurones corticospinaux et sensitifs ascendants de souris adulte après une LME par contusion [99,100]. Chez l'humain, une administration précoce de gabapentinoïdes a montré une amélioration des résultats moteurs après une LME [101]. Concernant les LTC, l'utilisation de gabapentinoïdes sur des modèles murins ont montrés une réduction de la mort cellulaire et une récupération des fonctions cognitives [102]. Des essais cliniques sur patients cérébrolésés ont démontré une diminution des douleurs neuropathiques dont l'efficacité est variable d'un patient à un autre, suggérant la mise en place de tests cliniques complémentaires [103].

4) **Modifications génétiques et épigénétiques**

Les facteurs de transcription initient l'activation de la régénérescence après une LME. Un travail réalisé *in vivo* a montré qu'une surexpression de ces derniers comme le Klf6 ou le Klf7 ont favorisé la croissance et la régénérescence des axones corticospinaux chez la souris adulte [104,105]. De plus, des travaux réalisés sur un modèle murin de LTC suggèrent que le Klf7 protègerait les neurones hippocampiques après une LTC via l'activation de la voie de signalisation JAK2/STAT3 [106].

1.3.2.2. Améliorer les capacités extrinsèques du microenvironnement

Parmi les facteurs extrinsèques, l'environnement neurotoxique, la désorganisation de la MEC, l'absence de molécules d'adhésion, de facteurs de guidage et sa saturation en protéines inhibitrices créent un environnement hostile à la croissance axonale et à la restauration des réseaux neuronaux perdus. De plus, un défaut d'angiogenèse et une réaction inflammatoire tardive persistent pendant plusieurs mois après la lésion ce qui entrave la mise en place du tissu régénéré [76]. Par conséquent, l'élimination des molécules inhibitrices, l'augmentation du soutien trophique et la manipulation du support cellulaire [107] contribuent à modifier cet environnement en le rendant plus permissif pour une régénérescence nerveuse et une restauration neurologique après une LME.

1) **Action sur la neuroprotection**

La thérapie pharmacologique repose sur l'utilisation de substances bioactives telles que les neurotransmetteurs, des bloqueurs de canaux, les agents anti-oxydatifs et anti-apoptotiques [108] pour supprimer la propagation des dommages supplémentaires en modulant la réponse inflammatoire. L'utilisation d'agents comme la minocycline, un antibiotique tétracycline capable de pénétrer la BHE, a démontré une inhibition des protéases impliquées dans la dégradation de la MEC [109]. Un effet neuroprotecteur a été observé par inhibition de la neuroinflammation, réduction de l'excitotoxicité et de la neurodégénérescence chez le rongeur. Cet effet empêche l'activation de nombreuses cytokines pro-inflammatoires [110], métalloprotéases et atténue l'excitotoxicité [111]. Dans les modèles murins de LTC, la perfusion systémique de la minocycline a montré une atténuation de la neurodégénérescences et l'amélioration des fonctions motrices [112]. La phase II d'un essai clinique administrant la minocycline ou un placebo pendant 7 jours a montré une tendance à l'amélioration des scores moteurs chez les patients tétraplégiques bien que les résultats ne soient pas uniformes [95,113]. Cependant, des études supplémentaires, y compris des essais de phase III, sont nécessaires pour confirmer ses bénéfices cliniques [33,38].

Le stress oxydatif à la suite d'une lésion du SNC, entraine la libération excessive d'espèce réactives de l'oxygène (ROS) qui sont des agents neurotoxiques. L'administration d'enzymes antioxydantes encapsulées dans des nanoparticules biodégradables a montré une réduction des ROS et de l'apoptose neuronale. De plus, après le traitement, une récupération locomotrice a été observée dans le groupe de rats lésés [114,115].

Malgré de nombreuses avancées, aucune molécule ou médicament testé jusqu'à présent n'a obtenu des résultats cliniques satisfaisants. Les principaux défis sont la gestion de la dose ainsi que la fenêtre thérapeutique.

2) **Éliminer les barrières physiques et chimiques**

Les axones lésés ne peuvent pas régénérer leur axone en raison de la cicatrice gliale. Pourtant, inhiber la formation de la cicatrice gliale ne permet pas une régénérescence nerveuse induite par les facteurs de croissance [60,61,116]. Ainsi, les approches actuelles visent à réduire l'effet de la cicatrice sans pour autant éliminer ses effets bénéfiques [61,64,116].

L'élimination des facteurs inhibiteurs (NogoA, MAG, OMgp, CSPG) par dégradation enzymatique, blocage des récepteurs ou neutralisation par des anticorps a montré un effet positif sur la régénérescence axonale et la récupération fonctionnelle [55]. Des données expérimentales chez le rat adulte avec une LME, ont démontré que la dissociation enzymatique des CSPGs par l'action de la chondroïtinase ABC améliore d'une part la régénérescence des axones sensitifs et d'autre part la récupération fonctionnelle [117]. De plus, le traitement couplé à une stimulation électrique des neurones corticaux a permis de restaurer l'activité post-synaptique chez les rongeurs [117]. Des essais cliniques sur différents modèles, puis de phases d'études cliniques chez l'humain sont nécessaires pour valider ces résultats [118]. En ce qui concerne les inhibiteurs Nogo-A, l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre ces molécules a montré des améliorations dans la récupération locomotrice, une réorganisation ainsi qu'une régénérescence de la ME des rats uniquement avec une administration réalisée dans la phase aiguë [119]. La première étude chez l'humain a été réalisée sur une cohorte de patients atteints de

tétra- et paraplégies en raison d'une LME complète. Dans cette étude, l'administration dans la phase aiguë de l'anticorps ATI355 dirigé contre le Nogo-A a bien été toléré chez 7 patients sur 19, atteints de tétraplégie [120]. Les essais cliniques montrent des résultats prometteurs, cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer l'efficacité des anticorps à long terme.

3) **Augmenter le soutien trophique**

Les facteurs neurotrophiques tels que le Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDGF), Neurotrophin-3 (NT-3), Nerve Growth Factor (NGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) sont des protéines qui régulent la survie des neurones, la fonction synaptique et la croissance axonale dans le SNC adulte [121,122]. Après une lésion du SNC, la diminution du niveau de ces facteurs dans l'environnement local constitue une autre cause d'échec des régénérescences axonales et récupérations neurologiques [95]. L'augmentation du niveau des facteurs neurotrophiques peut être réalisée de manière directe, par injection, ou indirecte, par implantation de cellules souches ou embryonnaires capables de sécréter ces facteurs [123].

Dans le modèle murin ayant reçu une LME par contusion, l'administration d'ARNm de BDNF avec des polymères cationiques a amélioré la récupération motrice [124]. Selon Charsar et al., incorporer un vecteur viral AAV2-BDNF dans la lésion cervicale a favorisé la croissance des axones 5-HT et leurs connexions synaptiques avec les motoneurones phréniques, ce qui a contribué à la récupération fonctionnelle du diaphragme [125]. Sur des modèles murins de LTC, l'augmentation du niveau de BDNF et de NGF a montré une stimulation de la régénérescence des réseaux neuronaux [123].

L’administration de facteurs neurotrophiques présente plusieurs défis comme la distribution contrôlée, locale et durable sans avoir d’effets aspécifiques. De plus, la durée de vie relativement courte de ces facteurs ajoute une contrainte supplémentaire. L’utilisation seule de ces derniers n'est pas suffisante pour contrer l’effet du micro-environnement hostile pour la repousse axonale et un guidage axonal est nécessaire pour rétablir la complexité des connexions neuronales [126].

4) **Action sur le guidage axonale**

Les molécules de guidance axonale jouent un rôle crucial au cours du développement neuronal mais aussi dans la régénérescence axonale après une lésion. Lorsqu’un axone est endommagé, il cherche à rétablir ses connexions fonctionnelles à travers l'environnement complexe du SNC par un processus de guidage. Les cônes de croissance à l’extrémité axonale expriment des récepteurs spécifiques pour ces molécules puis, après leur interaction, la signalisation intracellulaires déclenchée détermine la trajectoire des cônes de croissance [48]. La croissance axonale est dirigée en fonction du gradient des molécules comme les netrines, les sémaphorines, les ephrines ou encore les slits. Par exemple, les netrines agissent principalement comme des attracteurs, tandis que les slits sont généralement répulsifs [48]. Les molécules de guidance peuvent aussi être des molécules d’adhésions comme les cadhérines, intégrines et immunoglobulines qui, en plus d’ancrer les axones dans leur environnement, participent activement aux processus de signalisation qui influencent la vitesse et la direction de la croissance axonale [48,127].

1.3.2.3. Thérapie cellulaire

L'objectif de la thérapie cellulaire est de remplacer les cellules mortes, de promouvoir la régénérescence axonale par la production de facteurs trophiques ainsi que de réguler l'environnement inflammatoire. Pour cela, plusieurs types de cellules peuvent être transplantées comme des cellules souches, des cellules neuronales ou encore des cellules immunitaires [128]. Les essais cliniques, précliniques et une métanalyse ont montré une efficacité prometteuse des transplantations de cellules souches [129,130]. Pourtant, de nombreux essais cliniques ont rapporté des risques de développement tumoraux, une immunogénicité et des effets non désirables, pouvant entraîner des conséquences graves. De plus, l'origine des cellules ainsi que la quantité et le moment de transplantation des cellules souches soulèvent encore des défis majeurs [38].

Afin de remédier aux difficultés de rejet des cellules transplantées, la reprogrammation cellulaire semble être une solution appropriée. Cette stratégie vise à convertir les cellules non neuronales telles que les cellules gliales ou fibroblastes en neurones fonctionnels. Afin de remplacer les neurones qui ont été perdus, cette stratégie repose sur l'utilisation de facteurs de transcription tels que Ascl1, Brn2 et Myt1l [131]. De plus, la reprogrammation cellulaire modifie également les régulations épigénétiques. Ces dernières, comme le changement dans la méthylation de l'ADN ou encore les modifications des histones, peuvent influencer la plasticité des cellules et leur différenciation en neurones [132]. Bien que prometteuse, cette stratégie montre des résultats variables et une difficulté des cellules reprogrammées à s'intégrer dans les réseaux neuronaux existants. De plus, des questions éthiques concernant l'utilisation et la collecte des cellules humaines ainsi que des réglementations strictes conduisent à un faible nombre d'études *in vivo* [133].

En parallèle de ces avancées en thérapie cellulaire et en reprogrammation, d'autres stratégies émergent pour pallier les limitations liées à la transplantation de cellules. Parmi elles, une approche en ingénierie tissulaire exploite la capacité des cellules de l'organisme à migrer vers les zones lésées en réponse à des signaux spécifiques, permettant la régénérescence tissulaire sans recourir à une greffe cellulaire.

1.3.2.4. Neuromodulation

Les techniques de stimulations électrique, magnétique, ultrasonique ou encore la photostimulation (ou photobimodulation) ont montré des améliorations dans la réorganisation des circuits neuronaux et le contrôle de l'activité des membres paralysés [134]. On parle de neuromodulation. Les méthodes non invasives telles que la stimulation magnétique transcrânienne et la photostimulation sont de plus en plus utilisées lors de la réhabilitation en raison de leur adaptabilité au contexte clinique. Cette adaptabilité permet de réduire les risques de complications après les interventions et d'améliorer les chances de récupérations fonctionnelles [94,135,136]. Par exemple, la photobimodulation est particulièrement efficace pour réduire la neuroinflammation en modifiant les réponses des cellules gliales, réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires et créant ainsi un environnement favorable à la régénérescence neuronale [74]. Toutefois, en plus d'avoir une efficacité variable selon le patient et au cours du temps, leur application superficielle pose des défis en termes de précision dans la détection des tissus d'intérêt. Au contraire, les stimulations optogénétiques, qui reposent sur la stimulation d'une protéine photosensible, ont montré une précision dans le ciblage de l'activation et de la régénérescence neuronale [137,138].

1.3.2.5. Stratégies combinées

Bien que des stratégies comme la thérapie cellulaire et pharmaceutique aient montré leur efficacité dans des essais précliniques, aucune n'est suffisante pour traiter de manière complète et optimale la complexité des lésions du SNC et des troubles liés. Ainsi, combiner les différentes thérapies peut produire des effets synergiques, combler les limitations des approches individuelles et améliorer drastiquement les résultats en ciblant divers aspects de la pathologie (**Figure 5**). Par exemple, les traitements actuels comprennent la décompression chirurgicale, l'administration de médicaments vasoconstricteurs pour maintenir la perfusion du tissu nerveux et l'administration de corticoïdes pour réduire le stress oxydatif et l'inflammation. Cependant, les approches ne permettent pas une régénérescence axonale et leur efficacité reste insatisfaite en raison de leur toxicité [38]. En comparaison, l'injection locale de facteurs de croissance peuvent favoriser la reconstitution des réseaux neuronaux perdus. Pourtant, leur libération incontrôlée et massive constitue une limite car cela peut provoquer des proliférations cellulaires incontrôlées et un excès de facteurs de croissance aggravant la réponse inflammatoire.

Pour résoudre ces problèmes, l'ingénierie tissulaire joue un rôle essentiel dans les approches combinatoires. Les supports et matrice de régénérescence, aussi appelés échafaudages et *Scaffold* en anglais, peuvent être naturels, synthétiques ou composites. Dans tous les cas, ils doivent être biocompatibles, c'est-à-dire qu'ils entrainent une réponse appropriée à la suite de leur utilisation, en étant notamment non toxiques et non immunogènes. Ces matrices peuvent être utilisées pour restaurer la continuité du site lésé en remplissant les cavités cystiques et assurer un environnement adéquat pour la réparation tissulaire, la régénérescence axonale et la vascularisation [139].

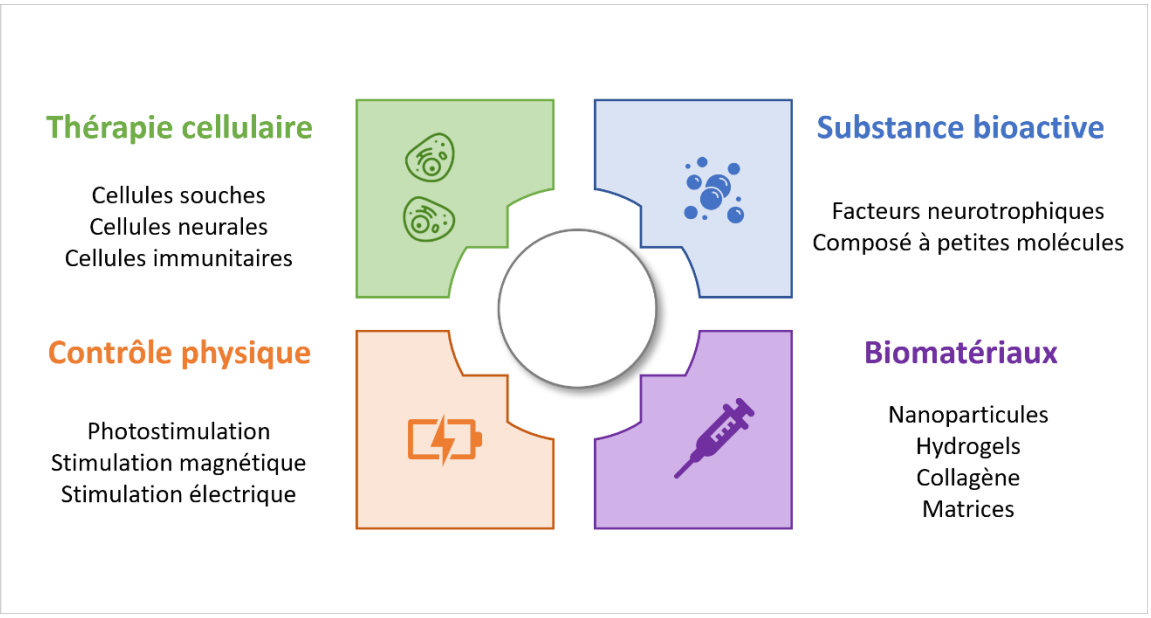


Figure 5. Principales stratégies des solutions thérapeutiques.

Adaptation de l'article d'Hu et al., 2023 [128]

1) Formes

Les supports de régénérescence peuvent prendre différentes formes, offrant des avantages spécifiques selon les besoins thérapeutiques :

1. Les hydrogels : structures tridimensionnelles capables d'absorber une grande quantité d'eau et pouvant être injectées pour se gélifier *in situ* [139]. Certains hydrogels présentent des caractéristiques similaires aux éponges.

2. Les éponges : structures tridimensionnelles poreuses permettant une efficacité dans l'infiltration cellulaire, la diffusion de nutriments et la vascularisation [140].

3. Les fibres, nanofibres, tubes ou conduits : fabriqués par élctrospining, offrent un support physique favorisant une régénérescence axonale directionnelle [141] .

4. Les microsphères ou nanoparticules : incorporées dans d'autres types d'échafaudages sont utilisées pour une libération contrôlée de médicaments ou facteurs de croissance [142,143].

2) **Origines et propriétés**

L'utilisation de polymères dans la conception des échafaudages a attiré une attention particulière en raison de leurs propriétés mécaniques appropriées, polyvalence de fabrication, capacité à être fonctionnalisés de diverses façons.

Les polymères utilisés peuvent être naturels comme le chitosan, l'alginate, la gélatine ou le collagène ainsi que synthétiques comme le poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), le Poly(lactic acid) (PLA), le Polyethylene glycol (PEG). Ils peuvent être utilisés seuls ou en association (composites) [144,145]. À ce jour, les polymères naturels offrent de meilleures perspectives pour la régénérescence nerveuse en raison de leur biocompatibilité élevée ainsi que de leur capacité à mimer le tissu nerveux, favorisant ainsi l'adhésion cellulaire. Les polymères synthétiques, quant à eux, ont une biocompatibilité variable et certains produits de dégradation sont toxiques. Pourtant, leur utilisation reste attractive en raison de leurs propriétés mécaniques et physico-chimiques adaptables aux exigences du site lésé et la fonctionnalisation facilitée [146]. Par exemple, Bonnet et al. ont utilisé un hydrogel injectable composé de (poly(N-isopropylacrylamide)-greffé-polyéthylène glycol, injecté dans l'hémisection médullaire de rat. Cet hydrogel, grâce à ses propriétés thermosensibles, était sous forme liquide lors de l'injection à température ambiante et se gélifiait à température corporelle, remplissant les cavités lésionnelles [147].

Ainsi, l'utilisation de polymères composites combinant les avantages des deux catégories semble une solution prometteuse pour répondre à des besoins spécifiques comme la libération contrôlée et prolongée de médicament ou molécules actives par fonctionnalisation.

3) **Fonctionnalisation**

Les échafaudages peuvent être fonctionnalisés afin de leur conférer des propriétés supplémentaires, ce qui améliore leurs interactions avec les cellules. Les fonctionnalisations possibles incluent l'incorporation de facteurs de croissance, de molécules actives au sein de nanoparticules, la modification chimique des surfaces ou encore leur association avec des cellules [145,148–152].

De nombreux produits pharmaceutiques sont au stade des essais cliniques. Leur stratégie d'administration consiste à injecter le médicament en bolus puis en perfusion continue. Cependant, cette approche nécessite une dose plus élevée de médicament pour garantir une concentration thérapeutique sur le site de la lésion. Ainsi, l'utilisation d'un échafaudage hybride vise à être mini-invasif. De plus, il reproduit la spécificité des administrations médicamenteuses tout en réduisant la concentration administrée et en ciblant la zone lésionnelle sur le long terme pour un effet ciblé [153].

La libération locale et combinée de la NT-3 et d'un anticorps anti-NogoA a été étudiée par Donaghue et al., pour stimuler la régénérescence axonale et améliorer la récupération fonctionnelle chez la souris après une compression thoracique. Les nanoparticules de PLGA ont été incorporées au sein d'un hydrogel à base d'hyaluronane et de méthylcellulose, assurant une libération prolongée des molécules. Ces effets étaient visibles *in vivo* par une augmentation de la densité axonale autour du site lésionnel. Ces résultats s'accompagnent d'une amélioration modeste de la fonction motrice chez les rats comparée aux conditions sans combinaison thérapeutique [154]. Cependant, bien que prometteuse, cette stratégie ne suffit pas à restaurer la complexité des connexions neuronales, soulignant la nécessité d'un guidage axonal.

Récemment, des biomatériaux combinant aussi bien des signaux biologiques qu'électriques ont été développés. Ils reposent sur l'utilisation d'un conduit de guidage nerveux composé de polymère biocompatibles, comme la polycaprolactone et le PLGA, associés à des neurotrophines. Ce conduit contient également des nanoparticules d'or, lui conférant une conductivité électrique. Les enregistrements électrophysiologiques, combinés aux études comportementales, ont montré une augmentation de la vitesse et de la qualité de la récupération fonctionnelle chez les rats. Ces résultats sont visibles grâce à la présence des nanoparticules d'or dont l'action est renforcée par celle des neurotrophines [155].

Ces exemples soutiennent l'idée d'une combinaison des stratégies thérapeutiques pour maximiser leurs avantages tout en compensant leurs limites.

Résumé

La prise en charge actuelle des lésions du SNC est majoritairement palliative. Dans la phase aiguë, l'immobilisation et la stabilisation de la lésion est primordiale pour limiter l'aggravation des dommages. Puis, la limitation des effets neurotoxiques ainsi que la mobilisation précoce est réalisée dans la phase subaiguë. Dans la phase suivante, la réhabilitation est intensive pour maximiser la récupération fonctionnelle. Pourtant, le bénéfice de la prise en charge actuelle sur la restauration neurologique est limité.

Les recherches actuelles tentent de répondre à plusieurs critères :

- Limiter l'environnement toxique en contrôlant l'inflammation
- Stimuler la repousse axonale, rapide, sur de longue distance et que les axones se reconnectent avec les « bonnes » cellules cibles
- Récupérer les cellules perdues
- Stimuler la vascularisation

Cependant, les stratégies développées telles que la thérapie cellulaire, pharmaceutique ou la neuromodulation présentent des limites individuelles face à la complexité des processus lésionnels qui pourront être comblées par leur combinaison.

Pour cela, l'utilisation de biomatériau notamment d'échafaudages/matrices joue un rôle crucial dans la combinaison des stratégies. Les échafaudages, d'origine naturelle, synthétique ou composite, peuvent prendre plusieurs formes et être fonctionnalisés en conséquence selon leur application.

1.4. Système du Complément

Le système du Complément joue un rôle crucial dans l'immunité innée, en protégeant l'organisme contre les infections ou en éliminant les débris cellulaires. Ce système est constitué d'environ trente-cinq protéines produites par le foie. Ces protéines circulent dans le sang à l'état inactif. Elles s'activent en cascade pour renforcer la réponse immunitaire.

1.4.1. Voies d'activation et de régulation

Le système du Complément possède trois modes d'activation : (1) la voie classique, (2) la voie alterne ainsi que (3) la voie des lectines (**Figure 6**). Ces dernières convergent toutes vers l'activation par clivage de la protéine C3 en deux fragments actifs, le C3b et le C3a [156].

1.4.1.1. La voie classique

La formation d'un complexe antigène/anticorps révèle un site de fixation du C1 sur la partie constante des anticorps sur lequel la sous-unité C1q se lie, ce qui initie la cascade. La liaison de C1q active C1r et C1s, ce qui entraîne le clivage de C4 et C2 en fragments C4b et C2a. Ces fragments forment le complexe C4b2a, une C3 convertase qui clive la protéine C3 en C3a et C3b.

1.4.1.2. La voie des lectines

Elle est activée par la liaison de la *Mannose-Binding Lectin* (MBL) et/ou des ficolines à des carbohydrates présents à la surface des pathogènes, activant les *MBL-associated serine proteases*. Ces protéases sont des homologues de C1r ainsi que C1s et clivent le C4 et C2 pour former la C3 convertase C4b2a tout comme la voie classique.

1.4.1.3. La voie alterne

L'activation de la voie alterne du Complément peut se déclencher de deux façons : par l'hydrolyse spontanée du C3 ou par reconnaissance de surfaces étrangères comme celles de microbes ou des biomatériaux. Ces activations stabilisent les fragments activés de C3 et facilitent la formation du complexe C3 convertase. Cette enzyme va alors cliver davantage de C3 en C3a et C3b, ce qui amplifie la réponse immunitaire.

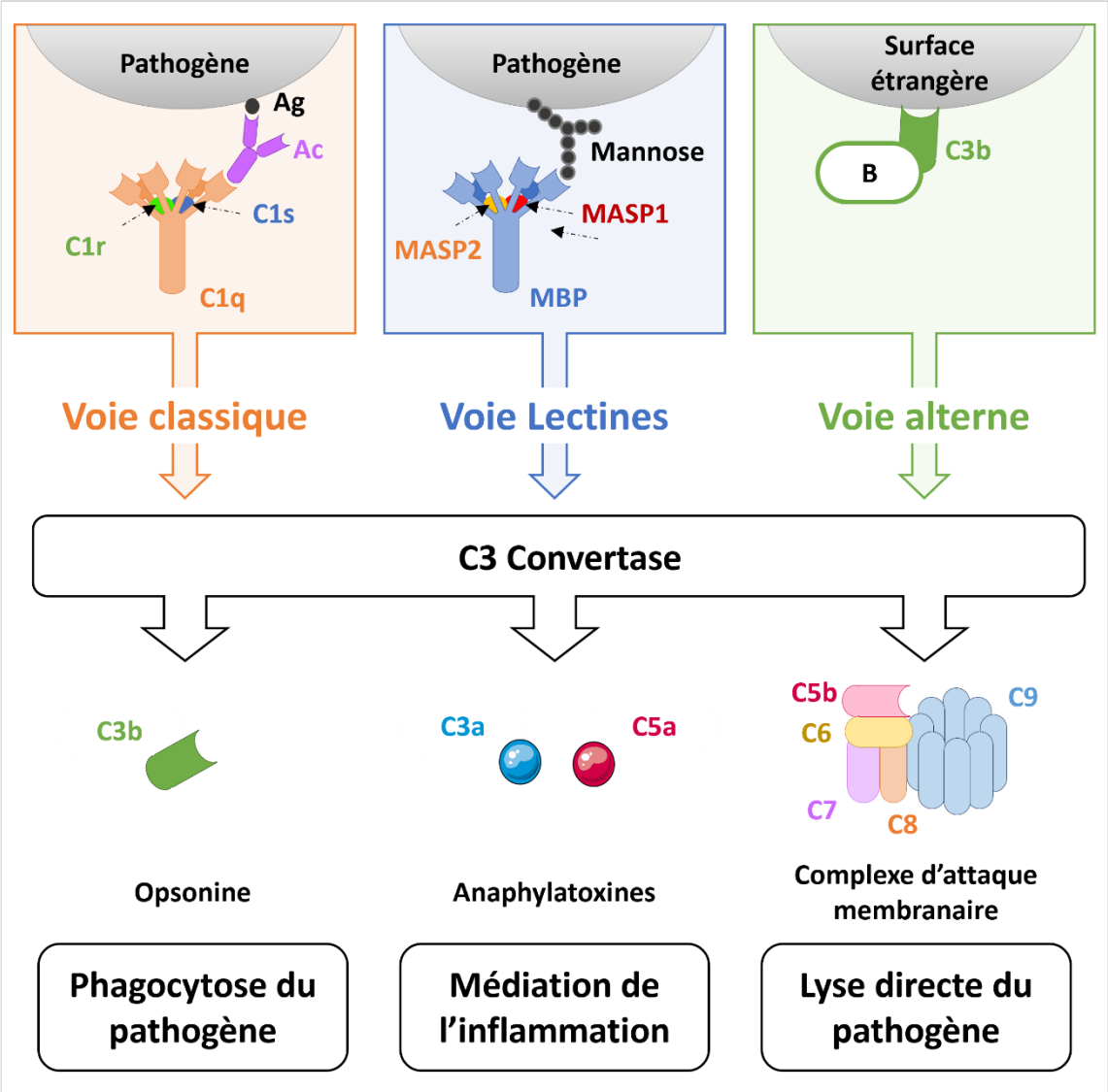


Figure 6. Voies d'activation et rôles du système du Complément.

Adaptation de Bergmann et al., 2020 [157].

1.4.2. Rôle du système du Complément dans l'inflammation

Toutes les voies d'activation du système du Complément aboutissent à la formation de la C3 convertase, une enzyme qui clive la protéine C3 en deux fragments : C3a et C3b. Ces fragments jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire. Le C3b contribue à l'opsonisation en marquant les pathogènes pour qu'ils soient plus facilement phagocytés par les cellules immunitaires. Le C3a, quant à lui, il agit comme une anaphylatoxine, une protéine messagère qui recrute et active les cellules immunitaires sur le site de l'infection. Puis, la cascade du Complément se poursuit avec la formation de la C5 convertase, une autre enzyme qui clive la protéine C5 en C5a et C5b [157,158]. Les anaphylatoxines C3a, C4a et C5a jouent plusieurs rôles essentiels dans la réponse inflammatoire alors que le C5b va intervenir dans la lyse des pathogènes :

1. **Médiation de l'inflammation** : Le C3a, le C4a ainsi que le C5a interagissent avec leurs récepteurs respectifs pour induire localement l'inflammation en augmentant la perméabilité vasculaire ainsi qu'en attirant et activant les cellules immunitaires sur le site de l'infection.

2. **Induction de la phagocytose des pathogènes** : Le C3b se fixe à la surface des pathogènes, facilitant leur reconnaissance et leur destruction par les cellules phagocytaires activées telles que les macrophages et les neutrophiles.

3. **Lyse directe du pathogène** : L'association des protéines C5b, C6, C7, C8, et C9 forme le complexe d'attaque membranaire (CAM). Le CAM forme des pores dans la membrane des pathogènes entrainant leur lyse par choc osmotique.

1.4.3. Protéine C5a et le C5aR dans la réparation du SNC

1.4.3.1. Structure du C5a

La protéine C5a est un fragment actif dérivé du clivage du C5 par le C5-convertase. Le C5a est un peptide composé de 74 acides aminés formant une structure tridimensionnelle complexe. Cette dernière est composée, d'une part, de 4 hélices alpha antiparallèles liées entre elles par des boucles peptidiques et stabilisées par des ponts disulfures, et d'autre part, d'une courte hélice au niveau du C-terminal (**Figure 7A**).

Le temps de demi-vie du C5a dans le corps humain est relativement court, de l'ordre de quelques minutes, en raison de sa dégradation en C5a-des-Arg par la C5a peptidase. En perdant son arginine 74 C-terminal, le C5a-des-Arg est moins susceptible d'être hydrolysé ce qui rend sa demi-vie plus longue que celle du C5a mais diminue son affinité avec ses récepteurs ainsi que son effet pro-inflammatoire (**Figure 7B**).

1.4.3.2. Récepteurs du C5a

Le C5a exerce ses effets biologiques en se liant et phosphorylant deux récepteurs distincts : le C5aR, aussi appelé CD88 et le C5aL2 (ou C5L2).

Le C5aR est un récepteur couplé aux protéines G localisé sur la membrane des cellules immunitaires telles que les cellules microgliales au sein du SNC [159]. Après interaction et phosphorylation, le C5aR est le principal responsable des effets pro-inflammatoires du C5a. Toutefois, en raison de sa puissante action pro-inflammatoire, un excès de C5a est associé à plusieurs maladies neuroinflammatoires et auto-immunes. Ces dernières sont l'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique et d'autres types de sclérose [156]. C'est pourquoi, de nombreuses études tendent de réduire la neuroinflammation après une lésion du SNC en inhibant l'effet du C5a ou en réduisant son affinité avec son récepteur [160]

(**Figure 7C**). Le blocage du C5aR dans des modèles de LME chez les souris ont démontré une diminution du niveau de cytokine et de cellules immunitaires circulantes dans la phase inflammatoire aiguë après la lésion médullaire. Cependant, un blocage du C5aR persistant après la phase aiguë a des effets délétères sur les récupérations fonctionnelles, suggérant des actions neuroprotectrices et réparatrices du C5aR [161].

Le C5L2 est un récepteur à sept domaines transmembranaires, tout comme le C5aR (**Figure 7D**). Il a été montré que le C5a-des-Arg avait une plus forte affinité avec le C5L2 que le C5aR [162]. L'interaction du C5L2 avec le C5a et le C5a-des-Arg n'induit pas de transduction du signal ni d'internalisation du récepteur, suggérant une régulation des effets pro-inflammatoires du C5a en limitant le niveau de C5a disponible [163]. Ce récepteur atypique a des fonctions encore largement débattues [164]. Certaines études montrent que l'absence du C5L2 peut exacerber les processus inflammatoires dans certains modèles animaux, cependant d'autres études montrent l'inverse [162,165,166].

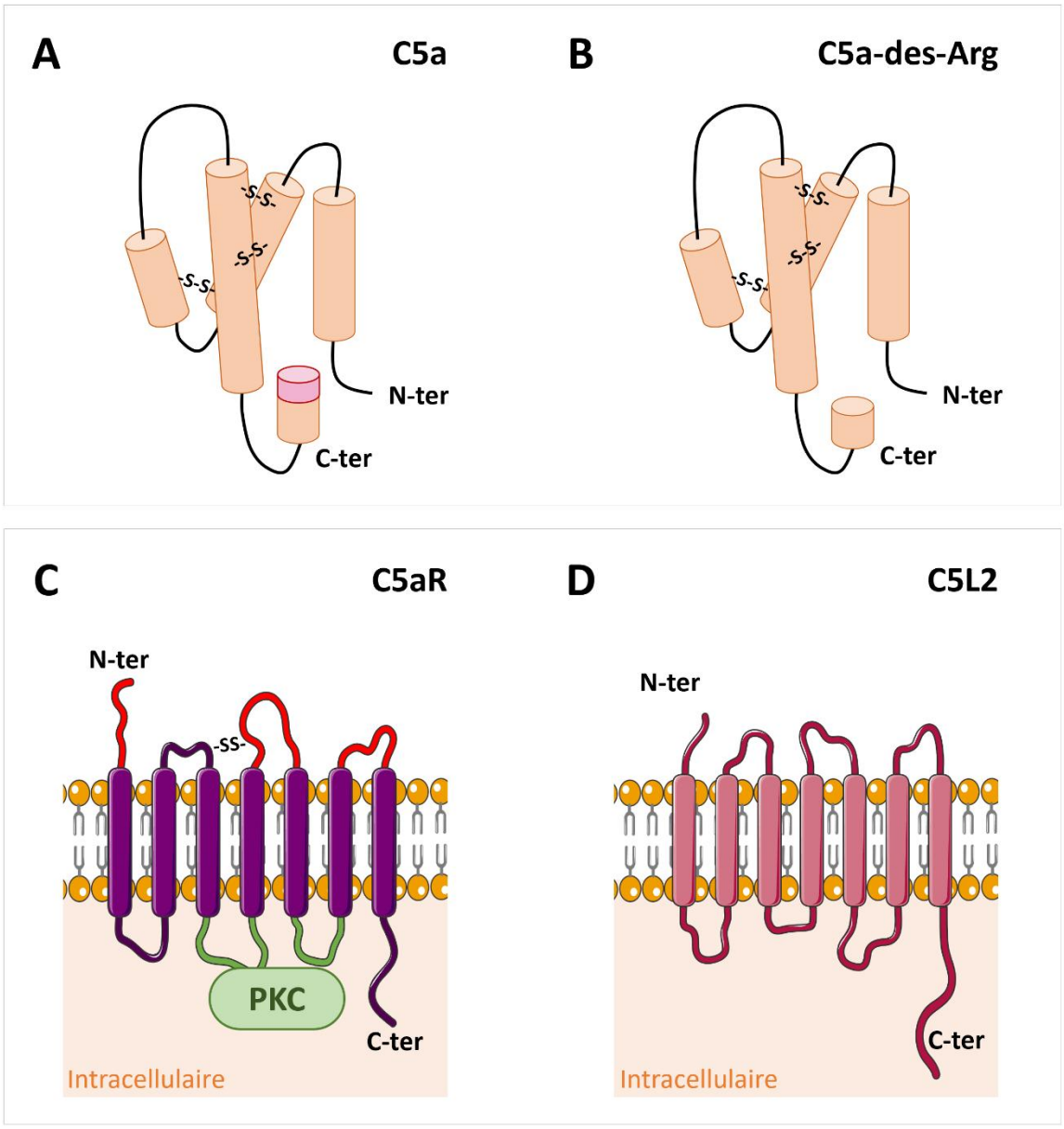


Figure 7. Structures de la protéine du C5a et de ces récepteurs.

__(A)__ Le C5 est clivé pour former le C5a. __(B)__ Rapidement, le C5a se transforme en C5a-des-Arg, plus stable mais ayant moins d'affinité avec son récepteur __(C)__ C5aR ou CD88. __(D)__ Un second type de récepteur au C5a, C5L2 ou C5R2 mais reste peu étudié par rapport au C5aR.

1.4.3.3. Implication du C5a dans d'autres fonctions que l'inflammation

Le C5a est une anaphylatoxine bien connue pour son rôle dans le recrutement des cellules immunitaires comme les macrophages et les cellules microgliales. De plus, elle est connue pour son rôle dans l'initiation et la modulation de la réponse inflammatoire. Le C5aR a été retrouvé dans le SNC lors du développement [167]. Cette protéine exerce un rôle dans la prolifération des progéniteurs ainsi que la migration neuronale [168,169]. Sa présence sur des cellules non-myéloïdes à l'âge adulte [170], suggère une implication dans d'autres phénomènes que les processus inflammatoires et une stimulation thérapeutique lors de la neurorégénérescence [171].

De manière surprenante, le C5a agit comme un facteur de croissance lors de la régénérescence hépatocytaire chez le rat [172]. Son absence ou le blocage du C5aR, a montré une déficience dans la régénérescence du foie tandis que l'ajout de C5a a stimulé ce processus [173]. Bien que le potentiel régénérateur du C5a a été montré dans la peau, le muscle, la pulpe-dentaire, l'os, l'intestin, le cœur ou encore les nerfs périphériques [157,174], son étude dans le SNC après une LME se focalise majoritairement sur son rôle dans la neuroinflammation et peu sur son rôle neuroprotecteur ou neurorégénérateur.

Une étude a montré son effet neuroprotecteur en inhibant l'activité de la capsase 3, une enzyme dont le niveau élevé d'activité est un indicateur de l'apoptose. L'ajout de C5a sur des cultures neuronales exposées à un environnement neurotoxique par la présence en excès de glutamate a révélé une diminution significative de l'apoptose par une inhibition de la capsase 3 [175]. Dans cette continuité, O'Barr a montré une augmentation de la viabilité des cellules en fonction de l'augmentation de la concentration du C5a ajouté [176]. Cependant, ces deux études se concentrent uniquement sur l'effet neuroprotecteur de la protéine du C5a dans un environnement neurotoxique simplifié et ne s'intéressent pas à l'impact de ces résultats sur la récupération fonctionnelle et la neurorégénérescence. En plus d'un effet neuroprotecteur, Guo et al., ont montré un effet du C5a sur la croissance des neurites intacts ainsi qu'une amélioration

significative de la récupération fonctionnelle motrice après une injection intrapéritonéale de C5a chez la souris adulte atteinte d'une LME [177]. Ces résultats sont intéressants car l'injection de C5a est associée à une augmentation de la récupération fonctionnelle. Cependant, les processus inflammatoires et neurorégénératifs observés chez la souris ne reflètent pas la complexité des mécanismes présents dans le système nerveux humain. Par ailleurs, l'injection ponctuelle et systémique de C5a ne permet ni de déterminer la quantité de C5a perçue par cellules neuronales ni de cibler spécifiquement la zone lésée. Enfin, cette étude ne s'attarde pas sur les mécanismes sous-jacents à l'amélioration fonctionnelle induite par le C5a.

À ce jour, aucune étude n'a exploré en profondeur les mécanismes sous-jacents de l'effet neurorégénérateur du C5a pour une application après une lésion du SNC, ni utilisé le C5a comme molécule neuroprotectrice ou neurorégénérative dans le cadre du développement de solutions thérapeutiques.

Résumé

Le système du Complément est un ensemble de protéines agissant en cascade enzymatique, essentielle à l'immunité innée lors de la défense de l'organisme. Ce système s'active en cascade après une interaction avec des bactéries, des virus, des cellules apoptotiques, nécrotiques ou encore des biomatériaux pour amplifier la réponse immunitaire.

Les voies trois voies d'activation (classique, des lectines et alterne) convergent vers l'activation de la protéine C3 en C3a et C3b puis du C5 en C5a et C5b, générant un ensemble de molécules actives participant à la médiation des processus inflammatoires (anaphylatoxines), la phagocytose des pathogènes (opsonines) ainsi qu'en la lyse des pathogènes (CAM/C5b-9). Le C5a exerce des effets pro-inflammatoires puissants en interagissant avec une forte affinité avec son récepteur, le C5aR, localisé sur les cellules immunitaires telles que les cellules microgliales. Ainsi, l'une des régulations possibles de l'effet du C5a est son clivage en C5a-des-Arg, ayant une affinité plus faible avec le C5aR. Le rôle d'un second récepteur au C5a, le C5L2, reste mal compris.

Bien que le C5a soit associé à des maladies neuroinflammatoires lorsqu'il est en excès, la récente découverte du C5aR sur des cellules non immunitaires suggère l'implication du C5a dans des processus de régénérescence tissulaire. En effet, en plus de jouer un rôle notamment dans les régénérescences hépatiques, cardiaque et osseuse, il a été montré comme jouant un rôle dans la neuroprotection. Son double effet suggère un potentiel thérapeutique pour favoriser la neuroprotection ainsi que la croissance des neurites. Cependant, son utilisation comme molécule thérapeutique à effet régénérateur n'a été que peu exploré dans le SNC.

1.5. Utilisation du C5a en régénérescence tissulaire

1.5.1. Description du support de régénérescence

Un échafaudage de régénérescence a été développé par notre équipe. Il a été breveté en 2021 sous le numéro WO/2021/019096 pour une application dans la régénérescence pulpo-dentinaire, des tissus parodontaux et gingivaux, osseux ainsi que d'autres tissus. Le développement de ce support repose sur le principe de la triade de l'ingénierie tissulaire, mettant en jeu une structure tridimensionnelle soutenant l'activité cellulaire pour régénérer le tissu sous l'effet de signaux inducteurs tels que des facteurs de croissance. L'échafaudage est composé (1) d'une matrice 3D de collagène, (2) chargée en microsphères de PLGA, (3) contenant du C5a (**Figure 8**), conçu pour recruter les acteurs cellulaires nécessaires directement au niveau du site d'implantation [178].

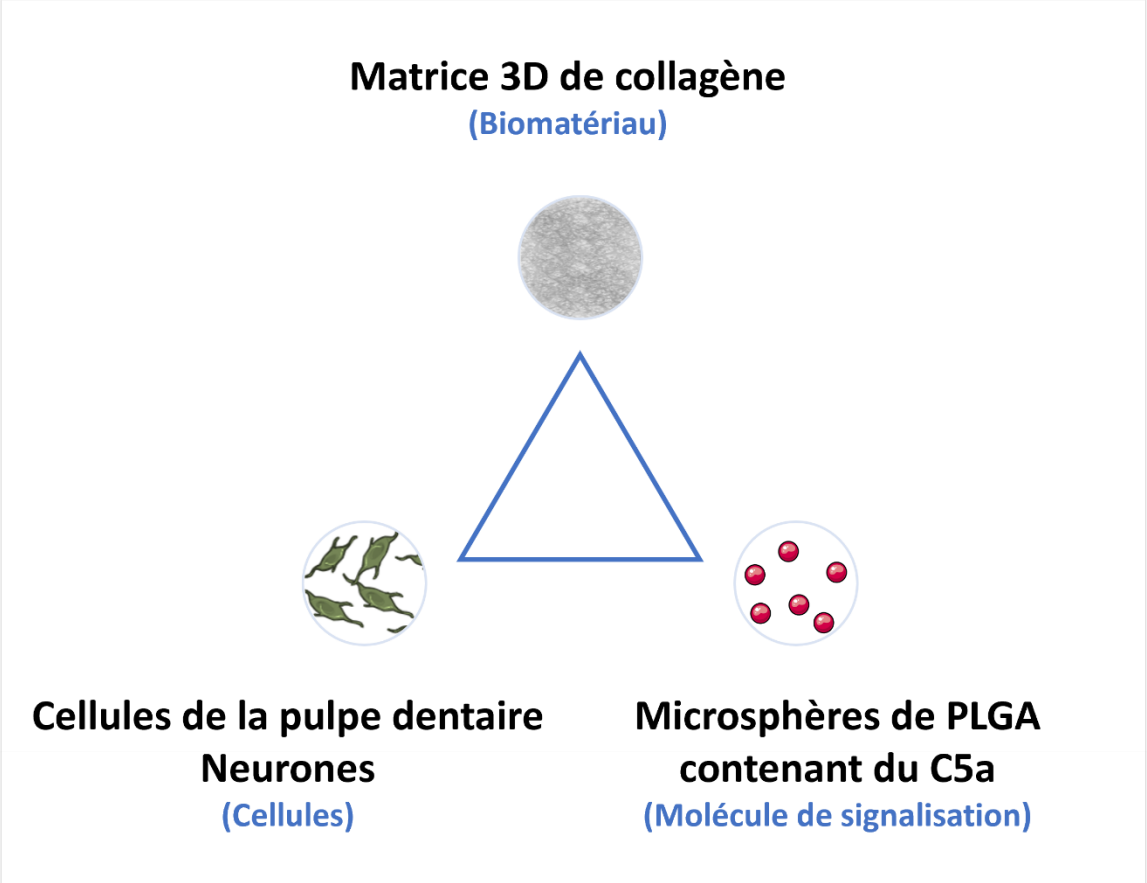


Figure 8. La triade en ingénierie tissulaire.

Adaptation du Brevet WO/2021/019096 [178].

1.5.1.1. Matrice 3D de collagène sous forme d'éponge

Le collagène est un polymère naturel abondant, largement utilisé en ingénierie tissulaire et en médecine régénérative. Le collagène de type 1, est le composant majeur des matrices extracellulaires, représentant jusqu'à 30 % de la masse totale des protéines. En raison de sa compatibilité élevée avec les structures biologiques et ses propriétés structurelles, le collagène favorise la prolifération, migration et différenciation cellulaire [179–181]. De plus, ses propriétés de résorption sont essentielles au remplacement de la matrice par le tissu nouvellement formé.

La matrice 3D de collagène était utilisée sous forme d'éponge poreuse. Cette forme lui confère une porosité et une absorption des fluides par capillarité, favorisant l'infiltration cellulaire et facilitant sa manipulation.

1.5.1.2. Microsphères d'acide poly-lactique co-glycolique (PLGA)

Le PLGA est un copolymère synthétique fabriqué à partir d'acide lactique et d'acide glycolique. Il est largement utilisé en médecine régénérative, en pharmacie et en ingénierie tissulaire sous forme de matrice tridimensionnelle et pour ses propriétés de libération contrôlée de molécule active [182]. Le PLGA est apprécié pour sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et pour la diversité des formes et structures qu'il peut prendre selon les méthodes de fabrication [183]. Le PLGA est inerte, c'est pourquoi il est utilisé en combinaison avec d'autres biomatériaux pour améliorer ses propriétés fonctionnelles. Dans notre cas, il est utilisé pour encapsuler le C5a et le libérer de manière contrôlée et prolongée pour un effet maximal [184].

1.5.1.3. Signal de régénérescence : le C5a

Le signal de régénérescence, souvent appelé facteurs bioactifs, est un ensemble de protéines ou molécules actives qui joue un rôle essentiel tout au long de la régénérescence des tissus endommagés. L'activité du C5a est liée à la stabilité de sa conformation protéique, c'est pourquoi il est crucial de protéger cette conformation avant l'implantation et ce jusqu'à la libération du C5a par le support de régénérescence pour pallier son temps de demi-vie court. Dans le cas des matrices de collagène, le C5a agit comme un signal de migration des cellules souches et de prolifération des fibroblastes pulpaires.

1.5.2. Préparation du biomatériau : matrice de collagène chargée en C5a

Dans un premier temps, le C5a est encapsulé dans des microsphères de PLGA à l'aide d'une technique de double émulsion eau-huile-eau. Par évaporation du solvant et plusieurs lavages, les microsphères sont solidifiées. Dans un second temps, ces dernières ont été intégrées à un hydrogel de collagène à 1,5 % avant d'être moulées sous forme de structure tridimensionnelle cylindrique mesurant 7 ± 0,1 mm de haut et 5 ± 0,1 mm de diamètre. À ce stade, les microsphères ont été réparties dans l'hydrogel de collagène de manière homogène, appelé support monophasique, ou de manière hétérogène créant un support biphasique comportant les microsphères dans la partie supérieure de l'hydrogel (**Figure 9A**). Puis, la lyophilisation constitue une étape importante dans la création d'un réseau poreux au sein d'un support réticulé (**Figure 9B**). Enfin, ce dernier est stérilisé par irradiation de rayon bêta puis stocké à - 20 °C. À la fin de la fabrication, la matrice de collagène chargée de C5a est appelée support mono ou biphasique [178].

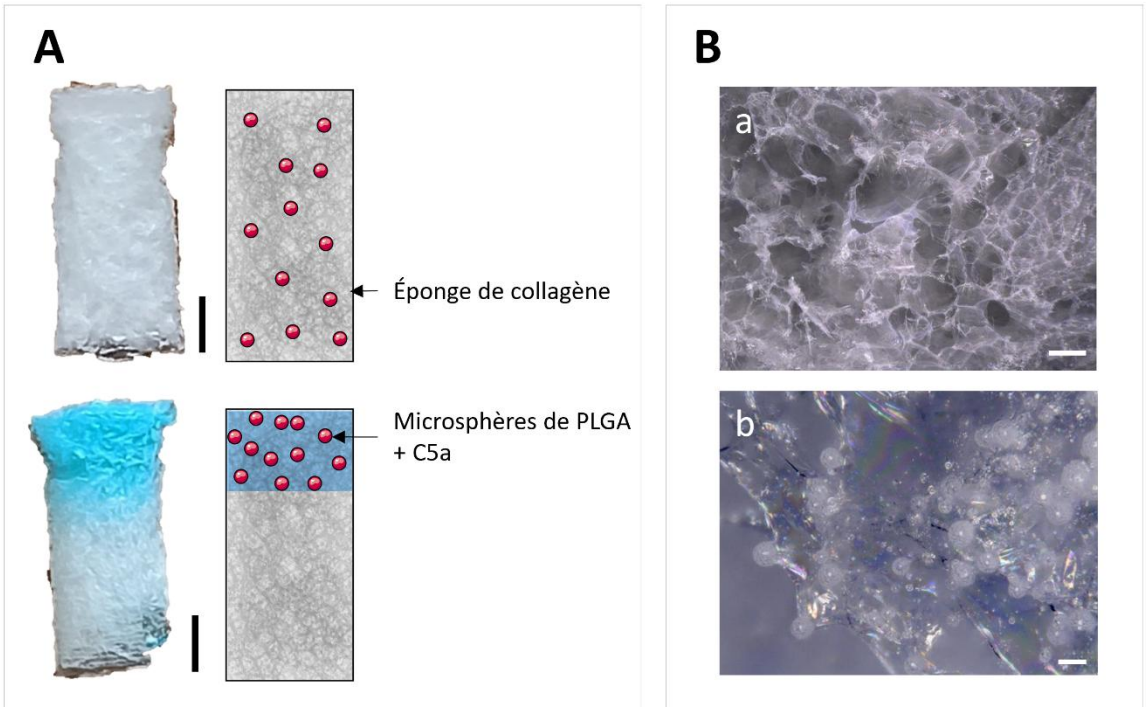


Figure 9. Matrice de collagène chargée de microsphère de PLGA + C5a encapsulé.

***(A)** Clichés et schéma des supports de régénérescence mono et biphasique. Clichés de la matrice poreuse de collagène (a) et microsphères de PLGA chargées de C5a (b) [178]. Barres d'échelle : 2 mm **(B)**, 500 µm (a) et 20 µm (b). Photos provenant de About et al., 2021 [178].*

1.5.3. Preuves de concept en odontologie sur le complexe pulpo-dentinaire

Les preuves de concept ont été réalisées dans le cadre d'une régénérescence en odontologie, plus précisément du complexe pulpo-dentinaire. La pulpe dentaire est un tissu riche en cellules, hautement vascularisé et innervé. Elle assure la vitalité de la dent. La pulpe dentaire est protégée par la dentine sus-jacente, formant le complexe pulpo-dentinaire en raison de leurs relations anatomique et fonctionnelle. Lors de lésions étendues d'origine carieuse ou traumatique, les thérapeutiques conventionnelles retirent le tissu carié avec une perte très étendue du volume pulpaire. L'utilisation des matrices de collagène combinées au C5a a pour but de régénérer le tissu atteint sans perte de volume pulpaire, conservant ainsi les capacités défensives et de régénérescence du complexe pulpo-dentaire lors d'agressions futures [178].

Au moment du dépôt du brevet, trois critères ont été observés tels qu'une porosité interconnectée, un facteur d'absorption élevé ainsi qu'une durée de dégradation de la matrice de collagène adaptée à la mise en place de la régénérescence pulpo-dentinaire. La structure tridimensionnelle de la matrice de collagène observée par microscopie électrique à balayage a indiqué la présence d'une porosité interconnectée, homogène et mesurant de 100 ─ 300 µm, correspondant à une taille optimale pour l'infiltration cellulaire ainsi que la vascularisation dans la régénérescence tissulaire [185]. La porosité est un facteur clé dans la régénérescence tissulaire. Puis, les tests d'absorption ont démontré que ces biomatériaux étaient capables de retenir jusqu'à 10 fois leur poids en liquide avec leur structure poreuse. Cette capacité facilite la diffusion des nutriments, facteurs de croissance et déchets, créant ainsi un environnement propice à la survie, la prolifération et la migration cellulaire [186]. Enfin, l'étude de la dégradation des matrices a révélé la dégradation lente des biomatériaux ainsi qu'une

conservation de leur intégrité pendant 31 jours, au cours desquels la matrice de collagène libère le C5a de manière prolongée [178].

La bioactivité de la matrice de collagène chargée de C5a a été évaluée. Les tests de viabilité cellulaire effectués sur les fibroblastes pulpaires n'ont démontré aucune toxicité des composants des biomatériaux ainsi que des processus de fabrication. Puis, les tests de migration au sein de chambre de Boyden ont démontré une migration des cellules de la pulpe en direction du C5a libéré par la matrice de collagène, cellules indispensables à la régénérescence pulpo-dentinaire [178].

Résumé

Le support de régénérescence développé par notre équipe et breveté en 2021 sous le numéro WO/2021/019096 était destiné à la régénérescence de divers tissus dentaires y compris les tissus mous et des tissus osseux. Ce support repose sur la triade de l'ingénierie tissulaire. Il est composé d'une matrice de collagène avec des microsphères de PLGA, libérant de manière contrôlée le C5a. Ces propriétés lui confèrent une bioactivité par l'intermédiaire du recrutement des cellules pulpaires.

Les preuves de concept ont démontré la présence d'une porosité interconnectée idéale, une forte capacitée d'absorption ainsi qu'une dégradation lente et adaptée à la régénérescence tissulaire. Les études *in vitro* sur les cellules pulpaires ont démontré une absence de toxicité, la prolifération des fibroblastes pulpaires ainsi qu'un recrutement des cellules pulpaires au sein des biomatériaux.

2. Problématique

La réparation du SNC est limitée par une désorganisation de la MEC, la présence d'une cicatrice gliale ainsi que d'inhibiteurs de la repousse axonale, créant un environnement non permissif pour la survie cellulaire, l'adhésion cellulaire et la repousse axonale [61]. Bien que les études actuelles soient prometteuses, aucune ne permet une régénérescence axonale sur de longues distances ainsi qu'une reconnexion avec des cellules cibles [38,61,86,128].

Les matrices de collagène chargées de C5a développées pour des applications dentaires par notre laboratoire peuvent être utilisées dans la régénérescence d'autres tissus [178]. Dans le cas d'une application nerveuse post-lésionnelle, ce biomatériau doit répondre à plusieurs critères cruciaux pour assurer la sécurité ainsi que l'efficacité dans la régénérescence. En plus d'être biocompatible, biodégradable et de se résorber au rythme de la régénérescence du nouveau tissu, le biomatériau doit être bioactif et permettre la repousse axonale sur de longues distances et reconnecter les cellules cibles [139,187]. Pour cela, trois mécanismes sont essentiels : la capacité intrinsèque de pousse des neurones, un support soutenant la repousse ainsi qu'une molécule de guidage [126]. En ce qui concerne la molécule de guidage, le C5a a montré un rôle aussi bien de chémoattractant pour les cellules immunitaires que les cellules souches neuronales lors du développement [168,169]. De plus, cette protéine du Complément a un rôle neuroprotecteur [175,176] et s'avère être stimulant pour la croissance des neurites intacts [177].

Bien que le double effet du C5a soit connu dans plusieurs type de tissu, peu d'études l'utilisent comme molécule thérapeutique potentielle pour la repousse axonale et la reconnexion des cellules cibles. Découlant de ce constat et de ce manque de connaissance, ce travail de thèse avait 4 objectifs :

1) Dans un premier temps, nous avons simplifié l'étude sur le SNC en utilisant un modèle cellulaire, largement utilisé et documenté, composé de neurones hippocampiques différenciés pour simuler une lésion traumatique. Sur ce modèle, nous avons étudié le couple C5a/C5aR.

2) Puis, en faisant interagir le C5a avec son récepteur, nous avons évalué son potentiel neurorégénérateur sur la repousse axonale après une lésion au sein de puces microfluidiques.

3) Nous avons évalué le potentiel neurorégénérateur de la matrice de collagène contenant des microsphères de PLGA encapsulant du C5a sur des cultures de neurones hippocampiques.

4) Enfin, pour une application *in vivo*, nous avons choisi de vérifier l'expression du C5aR sur des coupes histologiques de ME de rat adulte.

3. Matériels et méthodes

3.1. Considérations éthiques

Toutes les procédures ont été menées après avoir reçu l'approbation des comités de protection des animaux d'Aix-Marseille Université et du Centre National de la Recherche Scientifique. Le numéro d'autorisation accordé par le Ministère français de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI) a été APAFIS#20242-2019041114431531 v2. Toutes les personnes impliquées dans les expériences détenaient les licences nécessaires pour mener des expériences sur des animaux vivants, et toutes les installations expérimentales disposaient d'une autorisation nationale pour l'hébergement des animaux (licence G130555). Les expériences ont également été réalisées conformément aux recommandations du *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health), ainsi qu'aux directives 86/609/CEE et 2010/63/EU du Parlement européen et du Conseil de l'Europe, datées respectivement du 24 novembre 1986 et du 22 septembre 2010.

3.2. Animaux

Des rates WISTAR gestantes de 18,5 jours (E18,5) ont été obtenues auprès du Centre d'élevage JANVIER® (Le Genest-Saint-Isle, France). Chaque animal a été utilisé par trois laboratoires différents afin de réduire le nombre d'animaux sacrifiés et de respecter la règle des 3 R des directives 86/609/CEE et 2010/63/EU.

3.3. Réactifs et matériels

Les milieux de culture cellulaire, suppléments, la laminine, l'OCT ainsi que le milieu de montage pour immunohistochimie appelé ProLong Glass^{TM} proviennent de Thermo Fisher Scientific Inc (Illkirch-Graffenstaden, France) tandis que les

matrices et consommables de culture cellulaire ont été obtenus auprès de Dominique Dutscher (Bernolsheim, France). Les anticorps ont été achetés auprès d'Euromedex (Souffelweyersheim, France), CliniSciences (Nanterre, France), Thermo Fisher Scientific, Merck Millipore (Darmstadt, Allemagne), Cohension Biosciences (Londres, Angleterre) et Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Allemagne). Les réactifs d'histologie, la coloration hématoxyline-éosine, la poly-D-lysine ainsi que le montage DPX ont été achetés à Sigma Aldrich (St Louis, MO, État-Unis). Les autres produits chimiques ont été obtenus auprès de Carlo Erba (Val-de-Reuil, France).

3.4. Culture de cellules primaires de rat

Le protocole de culture de neurones est une adaptation de celui de l'équipe NeuroCyto de l'Institut de Neurophysiopathologie (INP, CNRS-Aix Marseille Université UMR 7051) dirigée respectivement par Dr Christophe Leterrier et le Dr Michel Khrestchatisky (**Figure 10**).

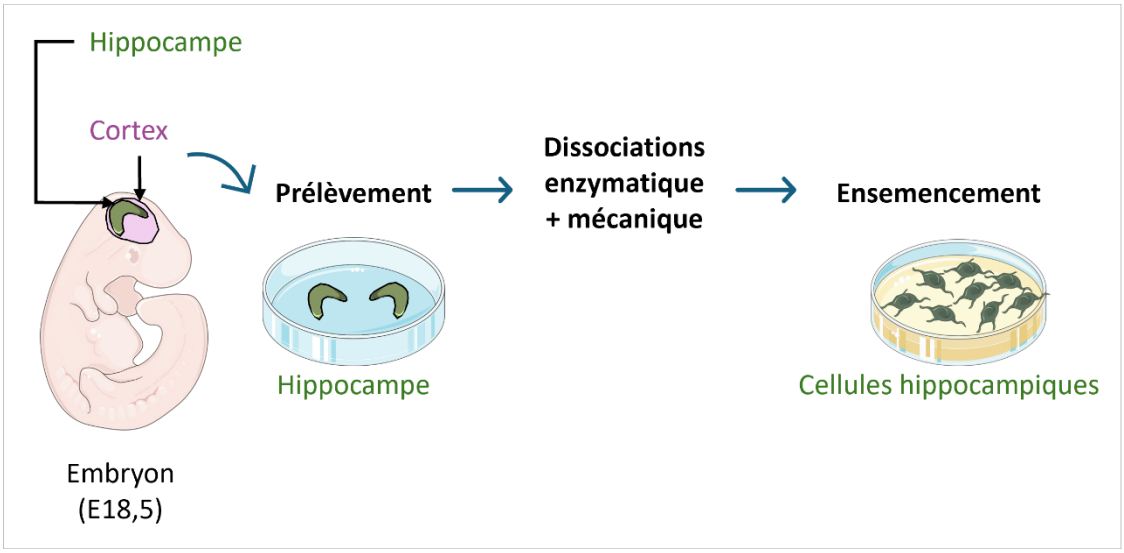


Figure 10. Obtention des cellules primaires de neurones de rat.

Représentation schématique du plan expérimental d'obtention et de mise en culture des cellules primaires hippocampiques de rat.

3.4.1. Prélèvements des structures

Les animaux ont été sacrifiés à la guillotine par le vétérinaire sans injection de substances, pouvant nuire aux cultures cellulaires. L'abdomen a été désinfecté avec d'EtOH à 70° avant d'être incisé avec une première paire de ciseaux chirurgicaux. Les tissus mous ont été incisés avec un nouveau jeu d'instruments chirurgicaux et le chapelet embryonnaire a été prélevé puis récupéré dans un tube contenant 50 ml de solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) avec 10 mM de tampon d'acide 4-(2-hydroxyéthyl) -1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) filtré (HBSS/HEPES) à 4 °C.

Les cerveaux embryonnaires ont été isolés de l'enveloppe crânienne avant de séparer les deux hémisphères (**Figure 11A**) pour en retirer le cervelet, le bulbe olfactif ainsi que les méninges à l'aide de pinces à échardes (**Figure 11B**). Les hippocampes (**Figure 11C**) ont été prélevés puis déposés dans un tube contenant du HBSS avec 10 mM d'HEPES à 4 °C.

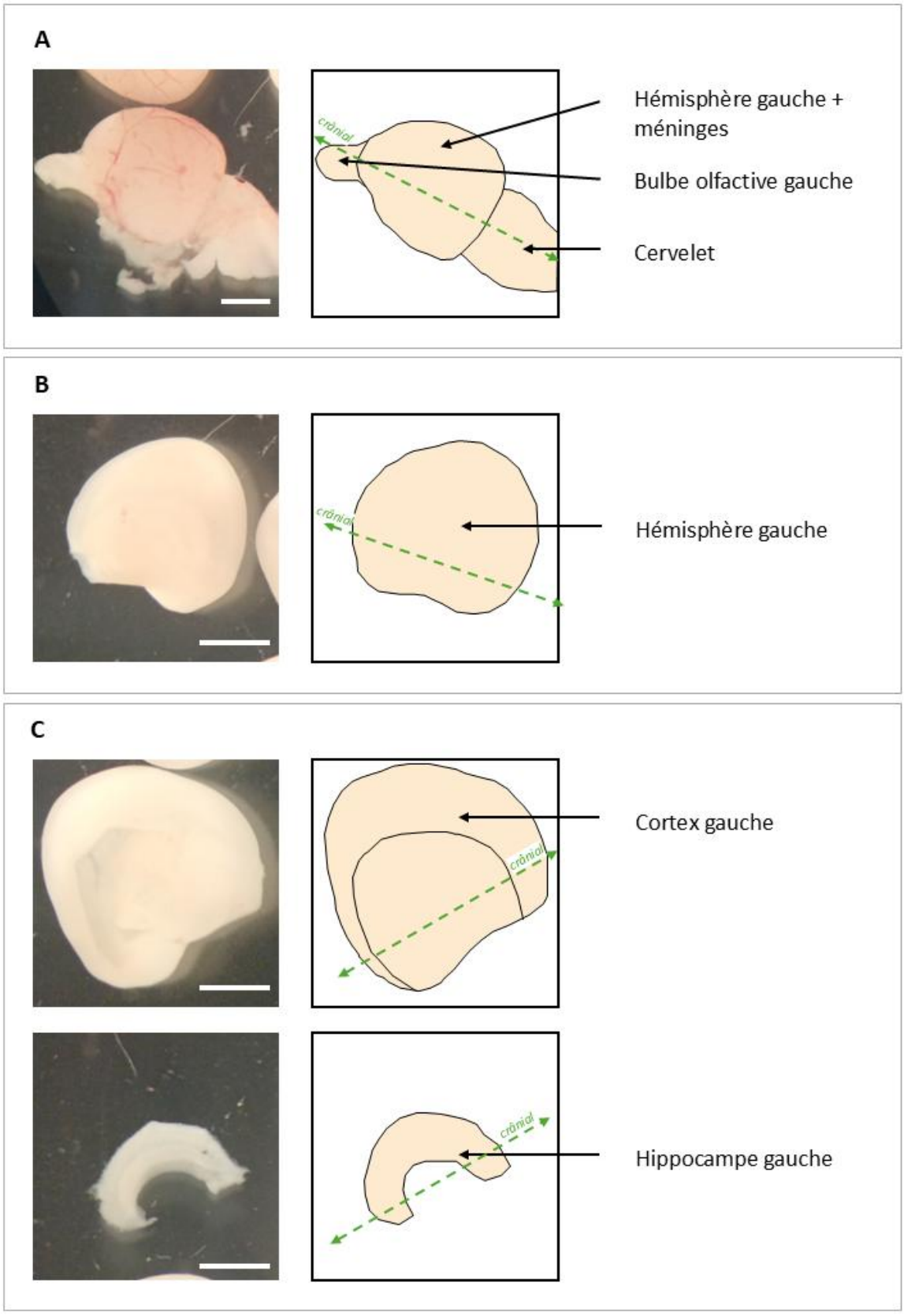


Figure 11. Protocole de prélèvement de l'hippocampe d'embryon de rat.

(A) Séparation des hémisphères cérébraux gauche et droit à l'aide d'une pince. (B) Résection du cervelet, bulbe olfactive ainsi que des méninges. (C) Prélèvement de l'hippocampe. Pointillé = axe crânio-caudal. Barres d'échelle : 1 mm.

3.4.2. Dissociation enzymatique puis mécanique

3.4.2.1. Dissociation enzymatique

Les hippocampes prélevés ont chacun été lavés 3 fois avec 4 ml de solution d'HBSS/HEPES à 4 °C. Pour réaliser la dissociation enzymatique, chacune des structures prélevées a été incubée avec 10 ml d'HBSS/HEPES avec 0,25 % de trypsine, enzyme protéolytique qui clive spécifiquement les liaisons peptidiques facilitant la libération et l'isolement des cellules de leur matrice extracellulaire, pendant 15 min au bain-marie à 37 °C avec une agitation manuelle faible toutes les 5 min. Après sédimentation, le surnageant a été aspiré, puis les échantillons contenus dans le culot ont été lavés avec 4 ml de solution d'HBSS/HEPES.

3.4.2.2. Dissociation mécanique

La dissociation mécanique a été réalisée avec deux pipettes Pasteur polies à la flamme jusqu'à un diamètre intérieur d'environ 3 et 1,5 mm. Elles ont été lubrifiées à l'aide de Sérum de Veau Fœtal (SVF). Les hippocampes dissociés enzymatiquement ont été aspirés 10 fois avec la pipette Pasteur ayant le plus gros diamètre puis 5 fois avec la pipette de diamètre inférieur. Lors de cette étape, il était important de casser le flux éjecté contre la paroi, limitant ainsi la formation de bulles qui pourrait léser les cellules par leur éclatement.

3.4.3. Mise en culture de neurones primaires

3.4.3.1. Traitement de la surface de culture

Pour faciliter l'adhérence des cellules neuronales aux surfaces de cultures et garantir la viabilité ainsi que les caractéristiques de croissance et de maturation des neurites, toutes les surfaces de culture ont été traitées avec un peptide synthétique appelé Poly-D-lysine (PDL). Le support a été traité toute la nuit à 4 °C par une solution de 0,1 mg/ml de PDL filtrée (Ø = 0,45 µm) et 0,01 % de laminine (PDL/LN) à 1 ng/ml (Thermo Fisher Scientific Inc.). Pour éviter toute toxicité, la surface de culture a été lavée au moins 3 fois dans un grand volume d'eau stérile filtrée puis du Neurobasal™ (Thermo Fisher Scientific Inc.) avant d'être utilisée.

3.4.3.2. Milieu de culture

Le traitement de surface a été couplé à l'utilisation d'un milieu de culture chauffé enrichi, appelé NB/B27, composé de :

- Neurobasal™ (NB) : milieu artificiel contenant tous les éléments nécessaires au maintien et la maturation à long terme des neurones embryonnaires
- 2 % B-27 : cocktail complexe d'enzymes antioxydantes, protéines, vitamines et acides gras favorisant la survie des neurones et permettant de réaliser des cultures de neurones sans couche nourricière d'astrocytes [188,189]
- 1 % L-Glutamine : supplément d'acide aminé nécessaire à la croissance cellulaire et la synthèse protéique
- 100 UI/ml de Pénicilline-Streptomycine : antibiotiques

Le milieu NB/B27 a toujours été chauffé à 37 °C au bain marie avant utilisation puis conservé au maximum 2 semaines à 4 °C.

3.4.3.3. Ensemencement

Le surnageant résultant de la dissociation d'hippocampes a été récupéré et les cellules vivantes ont été dénombrées au sein de la chambre de Bürker avant d'être ensemencées. Les cellules neuronales obtenues étant post-mitotiques, donc ne proliférant pas, ont été ensemencées directement sur les supports de culture utilisés lors des expérimentations et à la concentration souhaitée après centrifugation à 0,1 rcf (*Relative Centrifugal Force*) pendant 5 min. Le culot cellulaire a été suspendu dans du milieu NB/B27 chauffé à 37 °C avant que les cellules soient ensemencées. Les neurones vont adhérer, croitre et devenir matures grâce au tandem support de culture prétraité à la PDL/LN et au milieu enrichi NB/B27. Plus les cellules vont se différencier et devenir des neurones différenciés, plus elles vont être fragiles face aux changements de température et d'environnement ainsi, le taux de CO_2 (5 %), d'humidité (95 %), la température (37 °C), le flux de milieu faible tout comme le mouvement du support de culture ont été surveillés avec beaucoup de vigilance. À partir de l'ensemencement, les jours de culture ont été appelés *Day in vitro* (DIV), suivis du jour de culture.

3.5. Caractérisation cellulaire

3.5.1. Morphologie

Les cellules du SNC ont chacune des caractéristiques morphologiques qui se distinguent par la forme de leur membrane et de leurs prolongements. C'est pourquoi, après ensemencement et 14 jours de culture des neurones (DIV 14), nous avons réalisé des clichés des cultures cellulaires à l'aide du microscope optique Axio Observer A1, connecté à la caméra AxioCam MRC et commandé par le logiciel ZEN (Blue édition, version 3.4.91.00000) (**Figure 12**).

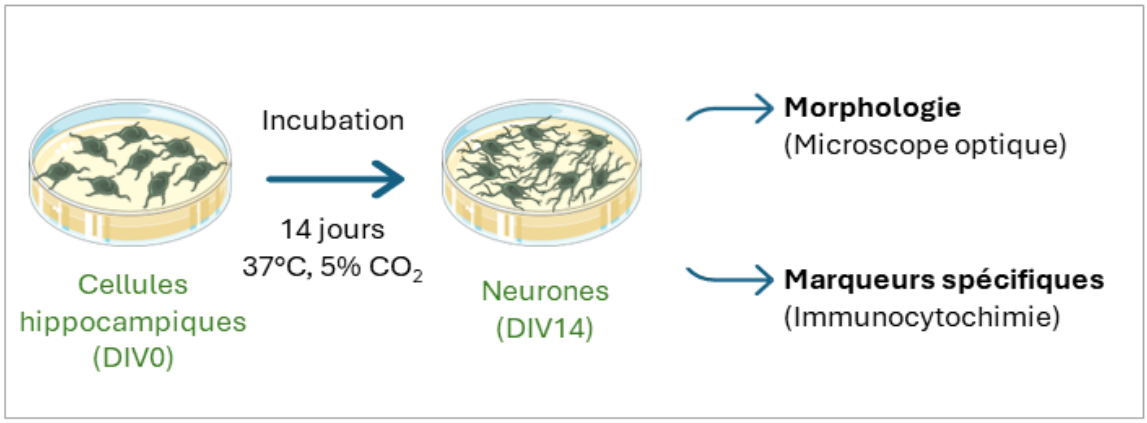


Figure 12. Représentation schématique du plan expérimental pour caractériser les cultures cellulaires hippocampiques.

Les cellules hippocampiques ont été mis en culture sur de la PDL/LN et dans du NB/B27 pendant 14 jours (DIV 14). Les cultures obtenues ont été caractérisées après observation au microscope optique et marquage immunocytochimique.

3.5.2. Caractérisation cellulaire par immunomarquage

L'observation morphologique a été combinée au marquage de protéines spécifiques des différents types cellulaires du SNC (**Figure 12**). Ces marqueurs de surface et intracellulaires sont les suivants :

- NeuroD2 : Facteur de transcription du développement neuronal
- NF-L : Neurofilament léger spécifique du cytosquelette des neurones
- Olig2 : Facteur de transcription nécessaire au développement des oligodendrocytes
- GFAP : Filament intermédiaire du cytosquelette des astrocytes

Afin de caractériser les cultures de cellules primaires obtenues, 15000 cellules/cm² ont été mises en culture sur des lamelles de verre préalablement lavées sous agitation dans 1 N d'acide nitrique, 2 bains d'eau distillée (dH2O) et de l'EtOH absolu pendant 12 h avant d'être séchées puis stérilisées à l'autoclave (B134 Prion, Euronda E9 Inspection, Garons, France). Les supports de culture destinés aux neurones ont été traitées au PDL/LN puis les cellules ont été cultivées pendant 14 jours. Les cellules ont été fixées après le remplacement du milieu de culture par du de paraformaldéhyde (PFA) 4 % sucrose 4 % pendant 20 min avant d'être rincées 2 fois à la solution de sel tamponné au phosphate (PBS) contenant du calcium et du magnésium (PBS +/+). La fixation et la perméabilisation ont été réalisées avec une solution de PBS +/+ 0,1 M (pH 7,4), 0,22 % de gélatine et 0,1 % de Triton X-100 pendant 2 h à température ambiante. Cette solution a été utilisée pour tous les lavages et dilution d'anticorps. Les cellules ont été incubées avec les anticorps primaires toute la nuit et à 4 °C dans une chambre humide. Les contrôles correspondent à une omission d'un ou de plusieurs anticorps primaires. Après 3 lavages de 10 min, les cellules ont été incubées avec des anticorps secondaires et du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) à une concentration de 1 µg/ml (***Tableau 1***) pendant 1 h à température ambiante en chambre humide et à l'abri de la lumière. Les cellules ont été rincées 3 fois pendant 10 min avant d'être montées avec du ProLong Glass™ qui polymérise à température ambiante. Les immunomarquages ont pu être observés et capturés à l'aide d'un microscope optique Axio Observer A1 100 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Marly-Le-Roi, France) couplé à une lampe à fluorescence Zeiss HBO 100 (Carl Zeiss) et des filtres d'une longueur d'onde d'excitation de 488 (vert), 594 (rouge) et 360 nm (bleu).

Les images ont été obtenues au microscope à épifluorescence (Carl Zeiss Microscopy). Les cellules ayant le même type de marqueur dans trois champs ont été dénombrées puis exprimées en pourcentage du nombre total de cellules dans les mêmes champs. Un histogramme du nombre de cellules en fonction du type de marquage (NF-L, NeuroD2, Oligo2 ou encore GFAP) a été représenté.

Antigènes	Anticorps primaires	Anticorps secondaires associés
NF-L	Lapin IgG anti-rat NF-L 7,9 µg/ml	Alexa Fluor 594 de chèvre IgG anti-Lapin 1 µg/ml
NeuroD2	Souris IgG anti-rat NeuroD2 0,4 µg/ml	Alexa Fluor 594 de singe anti-souris IgG 1 µg/ml
Oligo2	Souris IgG anti-rat Olig2 0,4 µg/ml	Alexa Fluor 594 de singe anti-souris IgG 1 µg/ml
GFAP	Lapin IgG anti-rat GFAP 0,4 µg/ml	Alexa Fluor 594 de chèvre IgG anti-Lapin 1 µg/ml

Tableau 1. Liste des couples d'anticorps primaires et secondaires utilisés pour caractériser les cultures primaires.

Ig correspond à immunoglobuline.

3.6. Réalisation d'une lésion traumatique

3.6.1. Lésion mécanique

La lésion mécanique a été réalisée à l'aide d'une lame de scalpel stérile pour des cultures en plaques 6 et 24 puits et à l'aide d'une aiguille d'une dimension de 0,5 X 25 mm pour les plaques 96 puits. Des lésions horizontales et verticales formant un motif « # » ont été réalisées. Elles sont au nombre de 5 par 5 pour les lésions faites au scalpel et de 3 par 3 pour celles réalisées avec l'aiguille. Des clichés microscopiques (grossissement 20X) ont été réalisés avant la lésion et après 2 h, 24 h et 48 h pour étudier l'effet de la lésion sur le comportement du tapis cellulaire (75000 cellules/puit) dans les plaques 96 puits (**Figure 13**).

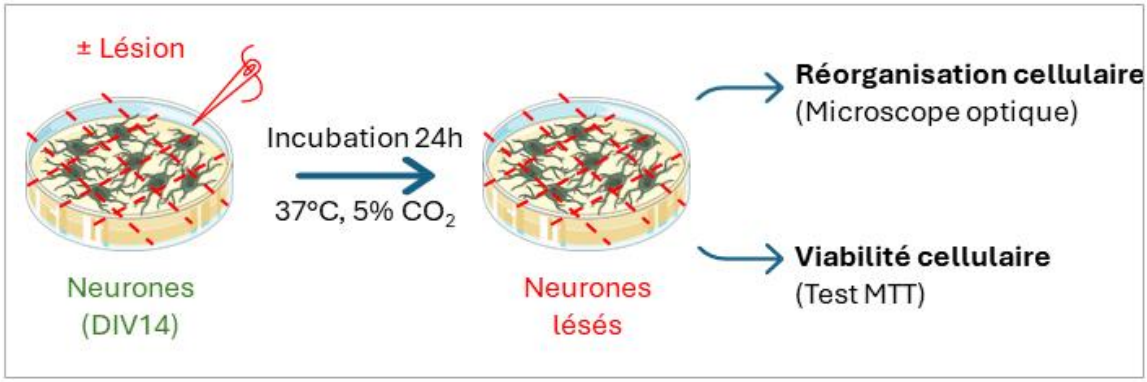


Figure 13. Représentation schématique du plan expérimental pour étudier l'effet d'une lésion mécanique sur le tapis cellulaire neuronal.

Le tapis de neurones (DIV 14) a été lésé mécaniquement par une aiguille avant d'être incubé 24 h. Puis, la réorganisation cellulaire a été observée par microscope optique et la viabilité cellulaire a été étudiée par test MTT avant lésion puis 2 h, 24 h et 48 h après la lésion.

3.6.2. Effet de la lésion sur la viabilité neuronale

L'effet de la lésion mécanique sur la viabilité des neurones a été observé à l'aide du test au MTT. Ce dernier est une technique colorimétrique permettant d'évaluer qualitativement la viabilité cellulaire à partir de l'activité métabolique

mitochondriale. Après la lésion mécanique, 0,5 µg/ml de MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium bromide) a été ajouté 2 h, 24 h ou 48 h après la lésion, puis incubé 2 h à 37 °C. Au cours de cette période, l'anneau de tétrazium que le MTT contient est réduit par la succinate déshydrogénase, une enzyme mitochondriale des cellules vivantes, pour former des précipités violets de formazan. La quantité de précipités formés est proportionnelle à celle des cellules vivantes. Le surnageant a été retiré puis les précipités ont été solubilisés avec 100 µl/puits de diméthylsulfoxyde (DMSO). L'absorbance à 550 nm a été lue à l'aide d'un spectrophotomètre (Σ960, Metertech, Taipei, Taiwan). Les valeurs ont été normalisées en pourcentage du contrôle (milieu seul à 2 h) puis représentées sous forme d'histogramme de la viabilité cellulaire (% du contrôle) au cours du temps (2 h, 24 h et 48 h après la lésion mécanique).

3.7. Étude du couple C5a/C5aR sur les neurones primaires lésés

Le couple C5a et son récepteur C5aR a été étudié au sein des cultures de neurones après une lésion selon le plan expérimental décrit dans la **Figure 14**.

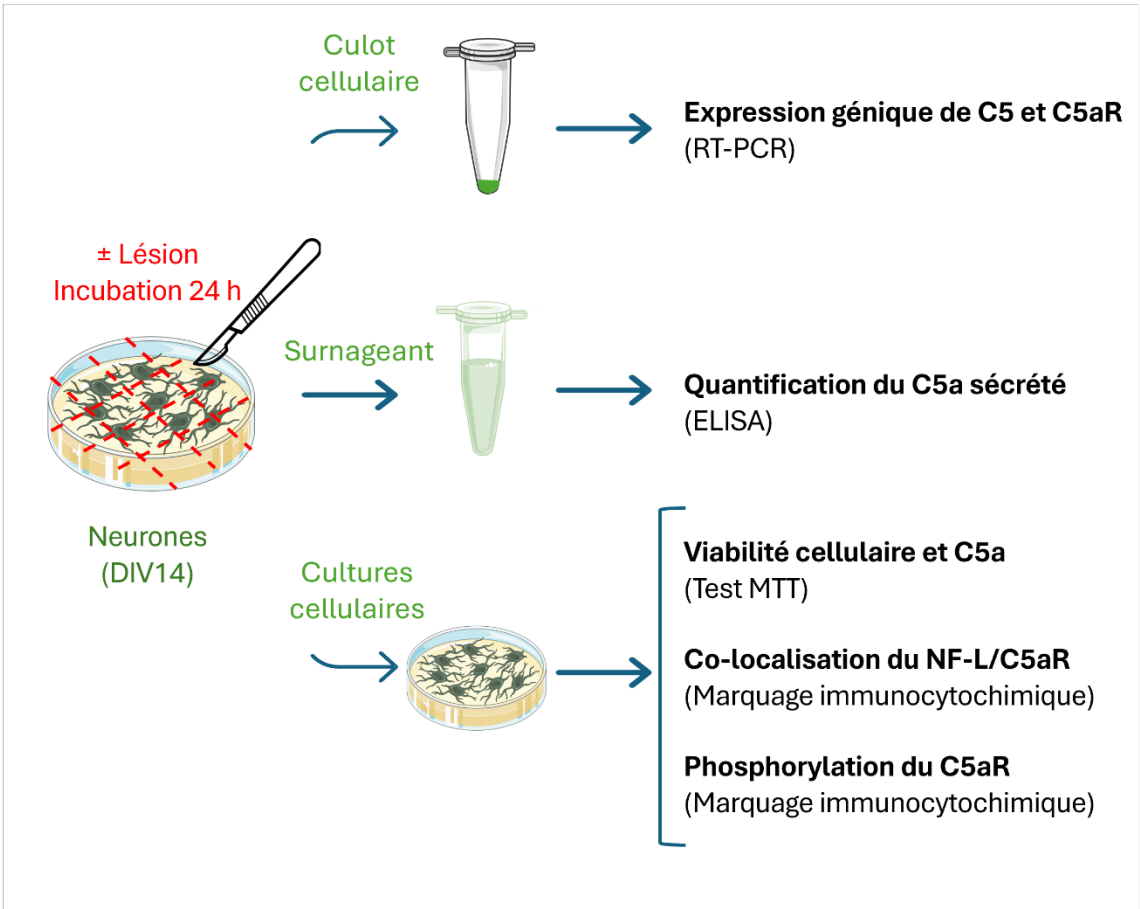


Figure 14. Représentation schématique du plan expérimental d'étude du couple C5a/C5aR sur les cultures primaires lésées.

Le culot cellulaire de neurones DIV 14 lésés est utilisé pour étudier l'expression génique du C5 et du C5aR. Le C5a a été dosé par ELISA dans le surnageant. Les cultures lésées sont incubées avec des concentrations croissantes de C5a pour en étudier la viabilité par test MTT et sont fixées pour marquer par immunofluorescence le NF-L/C5aR et la phosphorylation du C5aR.

3.7.1. Étude de l'expression du gène codant pour le C5 et le C5aR par RT-PCR

La RT-PCR pour *Real-Time Polymerase Chain Reaction* est une technique mettant en évidence la présence et l'expression de gènes d'intérêt dans un type cellulaire donné en recherchant l'ARN exprimé. Nous avons cherché la présence du gène codant pour le C5 et C5aR dans les neurones, 24 h après avoir subis ou non une lésion mécanique. Sur des culots de 2,5 × 10^6 cellules, l'ARN a été extrait et purifié à l'aide du mini kit PureLink RNA (Life technologies, Oslo, Norvège) puis rétro-transcrits à l'aide d'un système de transcription inverse AMV (Promega, Madison, WI, État-Unis). L'ADN Complémentaire obtenu a été amplifié avec des amorces à des températures d'hybridation (Tm) spécifiques qui ont été recensées dans le tableau ci-contre (**Tableau** **Tableau** 2) avant de migrer sur un gel d'agarose 1 % pendant 30 min et d'être visualisé à l'aide du système E-Gel™ Imager Blue-Light Base et du logiciel GelCapture (version 4.25, ThermoFischer). La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été utilisée comme contrôle interne.

Amorces	Séquences nucléotidiques (5' — 3')		Tm
C5	TTCGTTCTATTGTGTCAGCC	TAAAAGCCGCCTCCATACC	46 °C
C5aR	ACCATTCCGTCCTTCGT	CACCACTTTGAGCGTCTT	50 °C
GAPDH	GCAAGTTCAACGGCACAG	CGCCAGTAGACTCCACGAC	50 °C

Tableau 2. Amorces et température d'hybridation utilisées pour l'expression des gènes par RT-PCR.

Les amorces ont été créés sur la base de la bibliothèque NCBI.

3.7.2. Quantification du C5a sécrété par dosage ELISA

Des neurones (DIV 14) ont été cultivés à une densité cellulaire de 2,5 × 10^6 cellules par puits dans une plaque 6 puits. Les cultures ayant été lésées ou non ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. Les surnageants ont ensuite été prélevés pour en quantifier le C5a sécrété par la technique *Enzyme-Linked Immuno Assay* (ELISA).

Pour l'analyse ELISA, nous avons utilisé le kit *DuoSet ELISA Development System* (R&D Systems, Lille, France) selon les recommandations du fabricant. Ce kit contient des anticorps spécifiques pour le C5a qui sont utilisés pour former un "sandwich" d'ELISA. Ce complexe est ensuite détecté par un complexe enzymatique qui convertit un chromogène ajouté en un produit coloré bleu. La quantification du C5a dans les échantillons biologiques a été réalisée en mesurant les densités optiques à 650 nm, comparées à une gamme de référence de concentrations de C5a connue.

Le protocole d'ELISA implique l'incubation de 1 µg/ml d'anticorps de capture anti-C5a dans les puits d'une plaque 96 puits (Nunc Maxisorp) durant la nuit à température ambiante. Les sites non spécifiques ont été bloqués par une solution de PBS à 4 % de lait pendant 1 h. Les échantillons prélevés ont été décongelés, puis incubés pendant 2 h. Puis, 2 µg/ml d'anticorps de détection anti-C5a a été incubé pendant 2 h. Une solution de streptavidine-HRP a été ajoutée et incubée pendant 20 min, suivie de l'addition de TMB (Thermo Scientific, Rockford, IL, État-Unis) pour la révélation du signal colorimétrique à 650 nm avec un lecteur de microplaques (Σ 960, Metertech, Taipei, Taiwan). Entre chaque étape, les puits ont été lavés 3 fois avec une solution de PBS contenant 0,05 % de Tween20 pour éliminer les réactifs non liés.

3.7.3. Localisation du C5aR par immunofluorescence

Les cellules primaires ont été cultivées et immunomarquées selon les conditions décrites dans la partie 0 et 3.5.2. Puis, les cellules ont été ou non lésées mécaniquement. Après 24 h d'incubation à 37 °C avec 5 % de CO_2, les neurones ont été fixés puis perméabilisés et saturés. Un double marquage immunocytochimique a été réalisé pour marquer les NF-L et le C5aR. Les anticorps primaires et secondaires sont incubés avec les neurones à des moment distinct, en chambre humide et selon les étapes suivantes :

1) Incubation de l'anticorps primaire de lapin IgG anti-rat NF-L (7,9 µg/ml), toute la nuit à 4 °C

2) Incubation de l'anticorps secondaire Alexa Fluor 594 de chèvre IgG anti-lapin (1 µg/ml), 45 min à température ambiante

3) Incubation de l'anticorps primaire de lapin IgG anti-rat C5aR (6,7 µg/ml), toute la nuit à 4 °C

4) Incubation de l'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 de chèvre IgG anti-lapin (1 µg/ml), 45 min à température ambiante

Cette séquence est nécessaire car les anticorps primaires proviennent d'une même espèce hôte. Les conditions contrôles correspondaient à des omissions d'anticorps primaires. Des clichés des marquages ont été réalisés au microscope à épifluorescence (Carl Zeiss) à un grossissement 40 ×.

3.7.4. Viabilité des neurones selon les concentrations de C5a exogène par test MTT

Le test de MTT a été réalisé après 2 h, 24 h et 48 h après la stimulation au C5a pour évaluer la toxicité du C5a sur des cultures de neurones, qui sont très sensibles et fragiles. Les neurones embryonnaires d'une densité de 75×10^3 cellules/puit ont été cultivés sur des plaques 96 puits pendant 14 jours. Après maturation, les cellules ont été lésées mécaniquement puis ont été mis en contact après 24 h avec 50, 200 ou 1000 ng/ml de C5a. Le protocole ainsi que le traitement des données ont été réalisés selon les indications de la partie 3.6.2.

3.7.5. Phosphorylation du C5aR par le C5a

L'interaction du C5a avec son récepteur à la surface membranaire a été étudiée par marquage immunocytochimique du récepteur au C5a phosphorylé, appelé C5aR-P. Les neurones (5000 /cm²) ont été cultivés pendant 14 jours dans des chambres 8 puits (Labtek®, 15453PK, Thermo Fischer Scientific) traitées au préalable avec du PDL/LN et contenant 500 µl par puit de NB/B27. Les conditions formées étaient les suivantes :

- ─ C5a (Contrôle)
- ─ C5a + PMX53
- + C5a
- + C5a + PMX53

Après 14 jours, l'antagoniste de l'activité du C5aR, appelé PMX53, (R&D Systems, Lille, France), dilué à 500 ng/ml, a été incubé au préalable avec les cellules des conditions ± C5a + PMX53 pendant 1 h et à 37 °C. Cette étape préliminaire assurait la fixation du PMX53 sur l'ensemble des récepteurs du C5a pour garantir la saturation des C5aR avec l'antagoniste, ce dernier ayant été incubé avec le NB/27. Ensuite, la protéine du C5a, diluée à 50 ng/ml dans du NB/B27 ± PMX53, a été incubée à 37 °C pendant 5 min avec les cellules. Lors des stimulations

avec du PMX53 ou du C5a, un volume identique de milieu sans les protéines stimulantes a été incubé dans les autres conditions. Par la suite, les cellules ont été fixées pendant 20 min avec 4 % de PFA 4 % de saccharose préchauffé au bain-marie à 37 °C puis rincées 2 fois au PBS +/+. Elles ont été bloquées avec du PBS 4 % d'Albumine de sérum bovin (BSA) pendant 1 h et perméabilisées avec du PBS 0,1 % Triton X-100 pendant 2 h à température ambiante. Enfin, un double marquage immunocytochimie du C5aR-P a été réalisé en utilisant les anticorps primaires et secondaires, cités dans le **Tableau**

Tableau 3.

Antigènes	Anticorps primaires	Anticorps secondaires associés
NF-L	Lapin IgG anti-rat NF-L 7,9 µg/ml	Alexa Fluor 488 chèvre IgG anti-lapin 1 µg/ml
C5aR-P	Lapin IgG anti-rat C5aR-P 3,34 µg/ml	Alexa Fluor 594 chèvre IgG anti-lapin 1 µg/ml

Tableau 3. Liste des anticorps primaires et secondaires associés utilisés pour marquer le C5aR phosphorylé.

L'anticorps de lapin IgG anti-rat C5aR-P (référence : AY-AF8362-100UL) a été fourni par Affinity Biosciences (Cincinnati, OH, États-Unis).

3.8. Mesures du potentiel neurorégénératif du C5a

3.8.1. Développement du modèle d'étude

3.8.1.1. Besoins fonctionnels

Le développement du protocole pour étudier les effets du C5a sur la régénérescence axonale *in vitro* a été guidé par plusieurs besoins fonctionnels. Le premier besoin était de trouver un support permettant la culture des neurones pendant 18 jours au minimum. Les besoins suivants étaient d'appliquer un gradient de C5a sur 48 h, de pouvoir léser spécifiquement les axones ainsi que de suivre et mesurer la régénérescence axonale. C'est pourquoi notre choix s'était porté sur les puces microfluidiques. Ces dernières offrent une approche traditionnelle des cultures cellulaires tout en reproduisant de manière plus précise les conditions *in vivo* dans lesquelles les axones se développent et migrent. En effet, des microenvironnements complexes avec des motifs spatiaux de facteurs de croissance tels que des gradients moléculaires de C5a, peuvent être crées en leur sein. Les puces microfluidiques utilisées ont été basées sur le modèle de Taylor et al. [190]. Ce modèle a été fréquemment utilisées dans le laboratoire de l'Institut de Neurosciences de la Timone (INT, Marseille, France) [191]. Les puces microfluidiques sont transparentes pour un suivi par imagerie microscopique en temps réel. Leur taille réduit le volume et la quantité de produits utilisés en garantissant la reproductibilité. Les expérimentations de croissance axonale ont été réalisées dans les locaux de l'INT et selon le plan expérimental ci-contre (**Figure 15**).

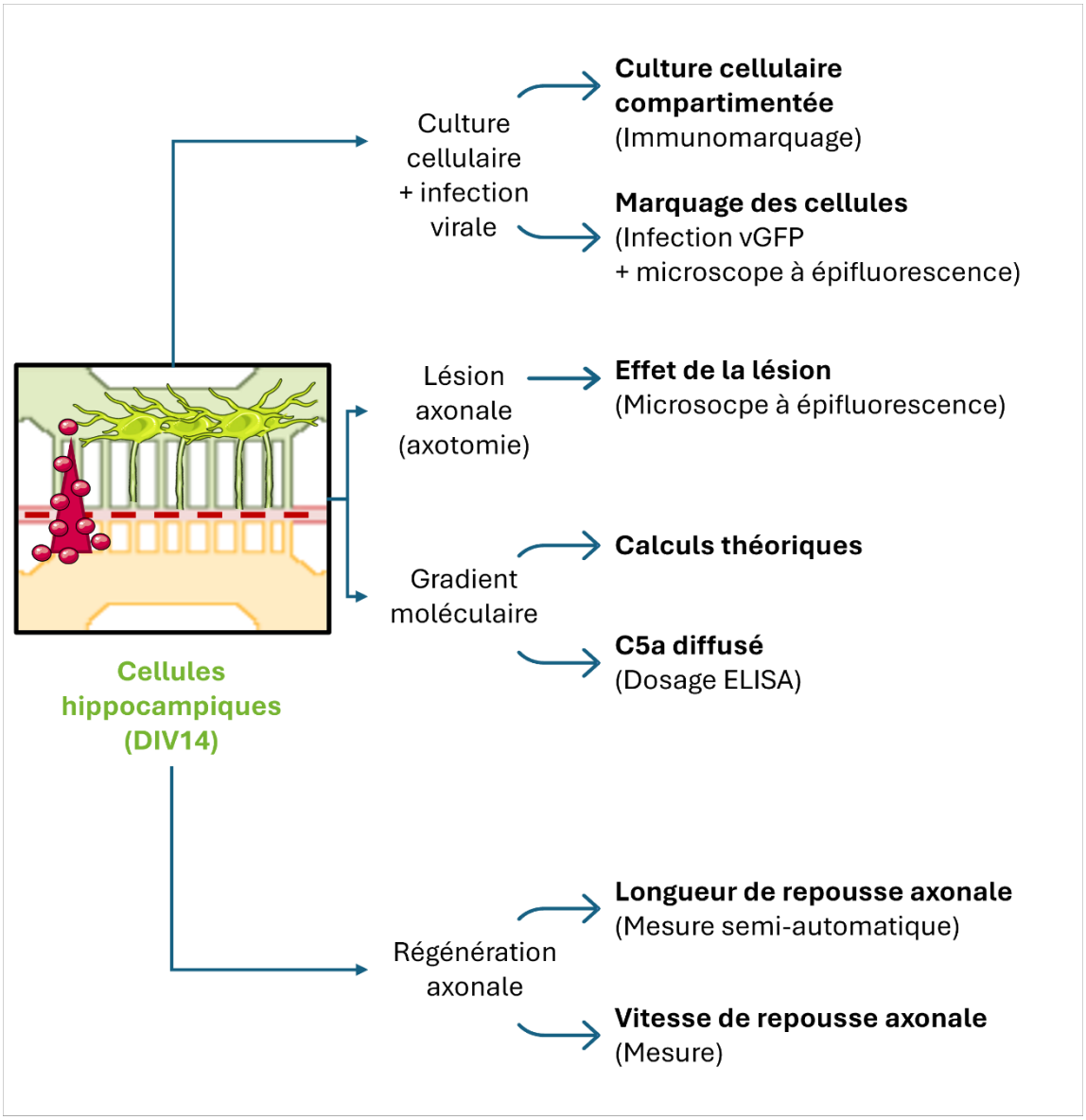


Figure 15. Représentation schématique du plan expérimental d'étude de l'effet du C5a sur la repousse axonale.

Les cellules hippocampiques ensemencées dans la chambre supérieure ont été infectées à la vGFP puis cultivées pendant 14 jours. Après la croissance axonale, les prolongements ont été lésés puis observé au microscope optique. En parallèle, le gradient moléculaire de C5a a été calculé puis vérifié par dosage ELISA. Enfin, la longueur de repousse axonale et leur vitesse ont été mesurés après une axotomie et l'application d'un gradient de C5a pendant 48h.

3.8.1.2. Description de la puce microfluidique

La puce microfluidique était constituée d'une chambre supérieure et une chambre inférieure, toutes deux interconnectées à un canal central par des micro-canaux (**Figure 16A**). Les chambres mesuraient 100 µm de hauteur pour 900 µm de largeur et étaient poinçonnées aux deux extrémités, donnant un accès de 300 µm de diamètre pour les changements de milieu de culture (**Figure 16A**). Les 130 micro-canaux reliant la chambre supérieure au canal central étaient de forme rectangulaire. Ils mesuraient chacun 500 µm de long pour 3 µm de large. Le canal central, mesurant 100 µm de large, était lui aussi poinçonné aux extrémités donnant un accès de 200 µm de diamètre. Des micro-canaux similaires, mesurant 75 µm de long, reliaient le canal central à la chambre inférieure de manière similaire à la chambre supérieure (**Figure 16B**).

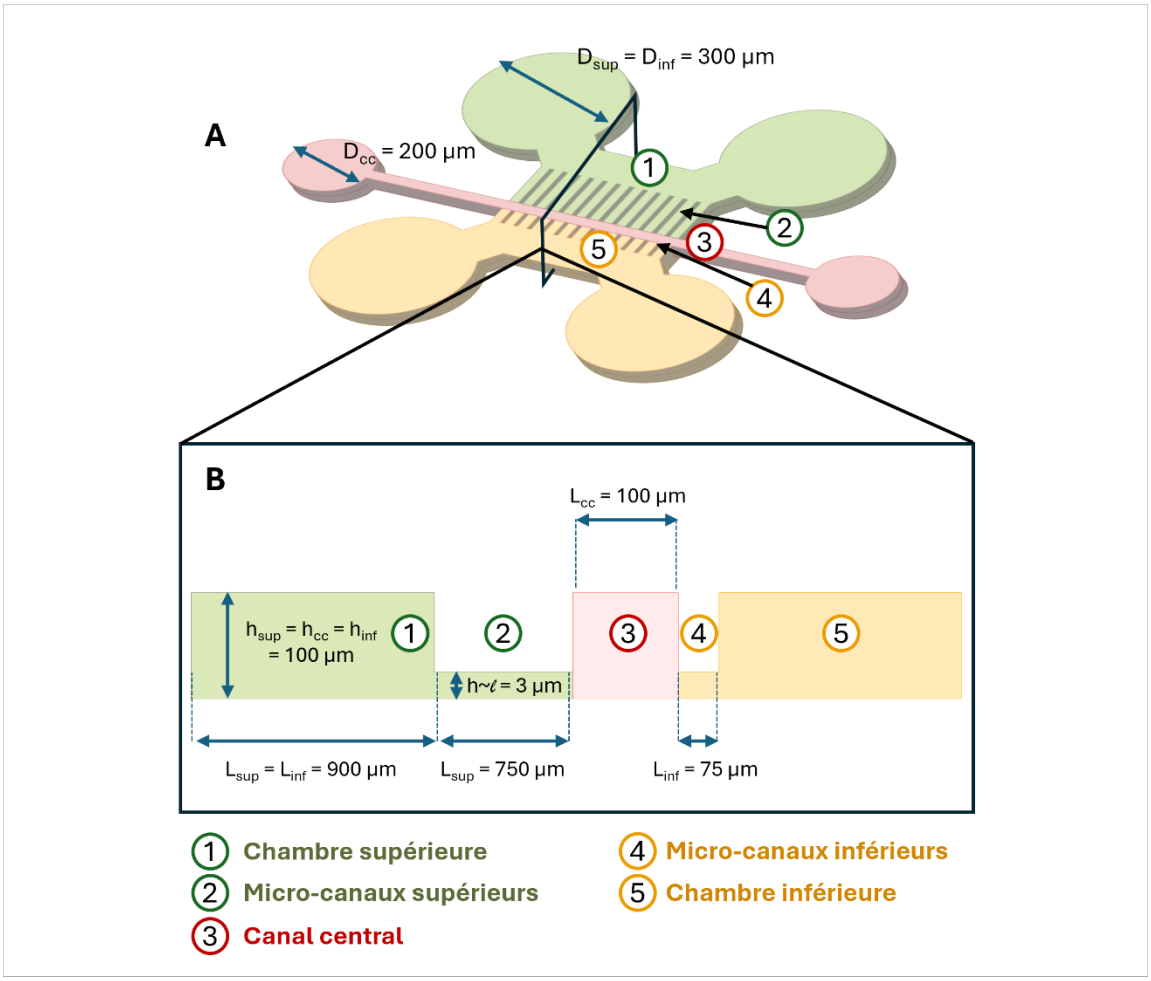


Figure 16. Représentation schématique de la puce microfluidique.

(A) *Vue supérieure de la puce microfluidique. Elle est composée d'une chambre supérieure (1, vert) reliée à 130 micro-canaux supérieurs (2, vert) et à un canal central (3, rouge). Ce dernier est interconnecté à 130 micro-canaux inférieurs (4, orange), lesquels connectent la chambre inférieure (5, orange). Les chambres supérieure et inférieure ont leurs extrémités poinçonnées par une ouverture de 300 µm de diamètre et de 200 µm de diamètre pour le canal central.* ***(B)*** *Vue de profil d'une section transversale de la puce. Les chambres ont une dimension de 900 µm de largueur pour 100 µm de hauteur (1, vert et 5, orange). Les micro-canaux supérieurs (2, vert) mesurent 750 µm de long et ceux inférieurs (4, orange), 75 µm. Leur section est carrée de hauteur et de largeur mesurant 3 µm. Le canal central (3, rouge) mesure 100 µm de largeur et de hauteur.*

3.8.2. Modèle : utilisation de puces microfluidiques

3.8.2.1. Fabrication

La conception des puces microfluidiques en PolyDiMethylSiloxane (PDMS) a été réalisée à partir des travaux de Virlogeux et al. (2018). Cet élastomère a été utilisé pour ses propriétés de transparence et sa biocompatibilité.

Un moule maître ayant les motifs des chambres ainsi que des micro-canaux en relief a été fabriqué en résine polymérisée époxy SU-8 45 % durcisseur (type R123, Soloplast, Vosschemie, France) (**Figure 17A**). Le PDMS 1 % durcisseur (SYLGARDTM 184 Silicone Elastomer kit, Dow Silicones, Allemagne) a été coulé et polymérisé à 70 °C pendant 1 h 30. Par lithographie douce, le moule maître laisse des empreintes sur le PDMS polymérisé. Puis, les puces en PDMS ont été démoulées et détourées au scalpel avant de poinçonner les accès aux chambres (**Figure 17B**). Ces dernières ont ensuite été désinfectées et nettoyées par ultrason au sonificateur dans de l'EtOH 70° pendant 1 min à 40 kHz (Nettoyeur à ultrasons, BPAC, Vern-sur-Seiche, France) pour être séchées à l'air comprimé. Pour coller les puces de PDMS sur la surface de culture en verre, une liaison oxygène a été créée sur les deux surfaces à coller en utilisant un Nettoyeur à Plasma pendant 1 min (Diener Electronic, Ebhausen, Allemagne). Après avoir collé par liaison covalente la puce de PDMS sur la surface de culture, l'ensemble a été chauffé au four pendant 15 min à 70 °C puis traité au plasma pendant 10 secs pour que les liaisons entre les surfaces soient irréversibles (**Figure 17C**).

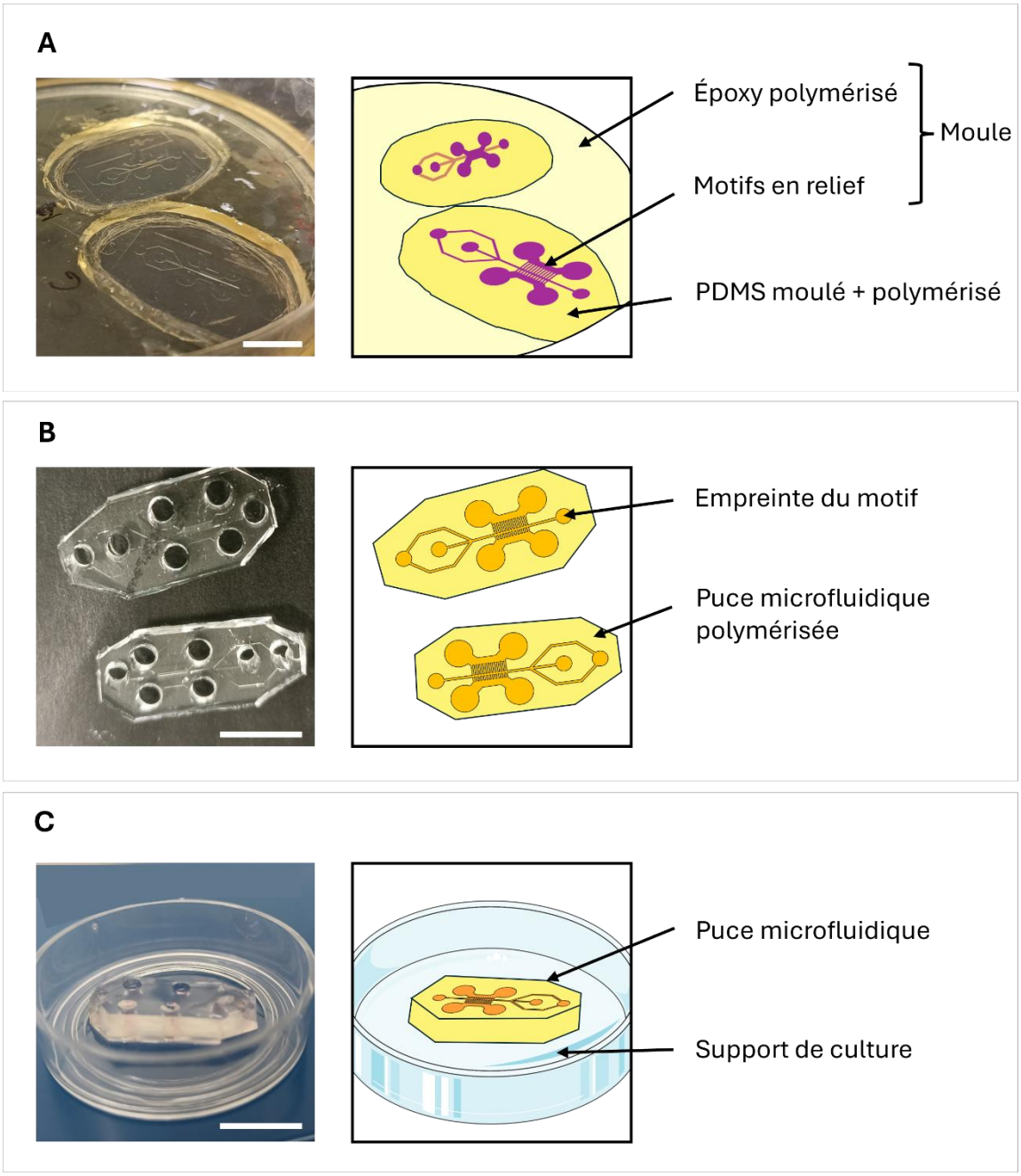


Figure 17. Protocole de fabrication des puces microfluidiques.

(A) *Polymérisation du PDMS dans les moules en époxy contenant les motifs des compartiments en relief.* ***(B)*** *Démoulage et coupes des puces microfluidiques. Lavages, désinfection et traitements de surface au plasma puis collage sur un support de culture avec un fond en verre.* ***(C)*** *Traitement plasmatique des surfaces de la puce microfluidique et du support de culture et collage entre elles. Barres d'échelle = 1 cm.*

3.8.2.2. Culture cellulaire et ensemencement

Les puces microfluidiques ont été stérilisées par irradiation ultraviolette (UV) pendant 20 min avant d'être traitées à la PDL/LN toute la nuit à 4 °C. Pour évier l'évaporation des faibles volumes au sein des puces microfluidiques, ces dernières ont été contenues au sein d'une boite de Pétri stérile et humide durant toutes les procédures expérimentales. Ces dernières ont été rincées 5 fois avec du NB puis une fois du NB/B27 à 37 °C suivi par une incubation avec 20 µl/chambre de NB/B27. Les cellules fraîchement dissociées ont été centrifugées. Le culot cellulaire a été resuspendu dans du NB/B27 (5×10^6 cellules dans 80 µl) pour être ensemencé dans la chambre supérieure à une concentration finale de 70 cellules/cm². Les cellules ont été incubées 3 h à 37 °C puis l'adhésion cellulaire a été vérifiée au microscope optique. Puis, 30 µl de NB/B27 au total ont été rajoutés, par incréments de 5 µl, dans chacun des accès de la chambre supérieure, évitant le flux de milieu important qui arracherait les cellules. Au sein de la chambre inférieure, le volume de milieu ajouté était de 20 µl. Ainsi, la différence de volume de NB/B27 entre la chambre du haut et cellules du bas créée un flux de milieu favorable pour la croissance axonale vers le canal central et la chambre inférieure. Enfin, 5 µl ont été rajoutés tous les 2 jours pour pallier l'évaporation du milieu. Dans le but de visualiser la présence des noyaux ainsi que des prolongements dans les différents compartiments, un marquage immunocytochimique a été réalisé sur les noyaux ainsi que les neurofilaments NF-L.

3.8.2.3. Marquage cellulaire par transfection virale

Dans le but de visualiser les axones et leur progression au sein des micro-canaux ainsi que des chambres, les neurones ont été infectés avec 0,25 µl de lentivirus dans la chambre supérieure pendant 24 h entre DIV 0 et DIV 2. La fabrication des lentivirus a été réalisée par une équipe de l'INP. Le protocole utilise le plasmide pRRL.GFP (#12252 d'Addgene) comme vecteur pour l'expression de la *Green Fluorescent Protein* (GFP). L'expression de la GFP au sein des cellules a été visualisée par microscope à épifluorescence) au grossissement 20 ×.

3.8.2.4. Lésion mécanique

Après 14 jours de culture, les axones ont poussé dans la chambre inférieure en passant par le canal central. Une lésion a été réalisée par l'aspiration du milieu et d'une bulle d'air dans le canal central et la chambre inférieure. Cette étape a été réalisée à l'aide d'une pompe et d'un cône stérile 5 fois pour léser les axones et en retirer les débris cellulaires. La présence de la lésion a été vérifiée au microscope optique. De plus, l'effet de la lésion sur le marquage à la GFP a été observé par microscope à épifluorescence avant, immédiatement après la lésion et après 2 h, 24 h et 48 h.

3.8.3. Création d'un gradient moléculaire

Le gradient moléculaire correspond à la variation progressive de la concentration d'une molécule. Afin d'appliquer un gradient de C5a avec une concentration plus élevée dans la chambre inférieure que dans la chambre supérieure, nous avons utilisés des puces microfluidiques qui permettent de simuler un gradient moléculaire reproductible selon la distance. En effet, cette répartition moléculaire inégale entre les différentes chambres de la puce est possible par la présence de micro-canaux. Le gradient ainsi formé va nous fournir des informations sur la direction de repousse axonales et le délai de la réponse après la stimulation.

Ainsi, nous avions eu besoin de former un gradient de C5a stable de la chambre inférieure à celle supérieure sur une période de 48 h.

3.8.3.1. Diffusion moléculaire théorique

Notre objectif principal était de calculer les volumes de milieu à ajouter dans chacune des chambres afin de générer et maintenir un échange de milieu créant un gradient de C5a sur 48 h. Pour ce faire, nous avons pris en compte la résistance hydraulique des micro-canaux et du canal central, c'est-à-dire la résistance que rencontre un liquide lors de son écoulement, ainsi que la capacité maximale des chambres à contenir le milieu. De plus, nous avons évalué le moment optimal pour débuter les acquisitions d'images des cellules stimulées par ce gradient. Les calculs ont été réalisés en collaboration avec Maxime Poinsot, doctorant au sein de l'Équipe Sonic de l'INT.

1) **Analogie des circuits électriques**

Nous avons utilisé l'analogie des circuits électriques, telle que décrite par Oh et al. pour modéliser les réseaux microfluidiques [192]. Dans cette analogie :

- La pression est équivalente à la tension électrique
- Le débit de fluide correspond au courant électrique
- Les micro-canaux sont représentés comme des résistances hydrauliques

2) **Calcul de la résistance hydraulique**

La résistance hydraulique (**R_H**) d'un canal microfluidique a été calculée à l'aide de la loi de Hagen-Poiseuille :

$$R_H = \frac{8\,\eta_{eau}\,L}{\pi\,r_H^4}$$

Où :

- **η_{eau}** est la viscosité de l'eau
- **L** est la longueur du canal
- **r_H** est le rayon hydraulique du canal

  Le rayon hydraulique est donné par :

$$r_H = \frac{2h}{2h + 2l}$$

Où h et l sont respectivement la hauteur et la largeur du canal

3) **Résistance totale des micro-canaux**

Pour l'ensemble des 130 micro-canaux supérieurs et inférieurs, la résistance hydraulique totale (**$R_{\mu c}$**) est calculée par :

$$R_{\mu c} = \frac{\text{résistance d'un canal}}{\text{nombre canaux}}$$

La résistance totale de la puce microfluidique **R_{total}** est alors donnée par :

$$R_{total} = R_{\mu c,sup} + R_{cc} + R_{\mu c,inf}$$

4) **Calcul de l’évolution des volumes échangés**

Chaque chambre peut contenir jusqu'à 60 µl de milieu, tandis que le canal central peut en contenir jusqu'à 20 µl. Pour simplifier les échanges de milieu, nous avons considéré deux ensembles de compartiment :

- Partie 1 : chambre inférieure, micro-canaux inférieurs et canal central
- Partie 2 : chambre supérieure et micro-canaux supérieurs

La différence de hauteur entre les deux compartiments **Δh** est donnée par

$$\Delta P = \Delta h = h_1 - h_2$$

Avec :

$$h = \frac{1}{2}\frac{4V}{\pi D^2}$$

Le débit **Q** est calculé par :

$$Q = \frac{\Delta P}{R_H}$$

Où **ΔP** est la différence de pression entre les deux compartiments

En calculant l’évolution de la différence de hauteur du milieu entre les deux ensembles de compartiments, nous avons pu déterminer le temps nécessaire pour établir le gradient de C5a ainsi que sa durée sur un diagramme en nuage de point.

3.8.3.2. Vérification de la diffusion moléculaire par ELISA

Dans le but de vérifier la diffusion moléculaire du C5a de la chambre inférieure vers la supérieure ainsi que la concentration de C5a échangée au cours du temps entre les deux chambres, 40 µl de solutions ont été ajoutés dans la chambre inférieure et 20 µl dans la chambre supérieure et le canal central pour constituer les conditions représentées dans la **Figure 18A**. Les surnageants des chambres supérieure et inférieure ont été collectés après 2 h, 24 h et 48 h pour mesurer la concentration de C5a par ELISA. L'évolution de la concentration de C5a échangé entre les deux chambres au cours du temps a été représentée sur un diagramme en barre.

Après 30 min d'incubation suivant l'axotomie, du milieu NB/B27 ± l'antagoniste PMX53 (500 ng/ml) a été incubé pendant 1 h dans tous les compartiments de la puce pour les conditions où le PMX53 est présent. Cette étape permet d'être certain de saturer et bloquer tous les sites de fixation du C5a. Les autres puces (sans PMX53) ont été incubées pour la même période dans du milieu NB/B27. Puis, les compartiments sont vidés avant d'ajouter 40 µl de milieu avec du PMX53 (500 ng/ml), du C5a (50 ng/ml) ou du PMX53 + C5a dans la chambre inférieure et 20 µl de milieu avec ± l'antagoniste PMX53 dans la chambre supérieure selon les conditions de la **Figure 18B**. Les puces microfluidiques ont été par la suite incubées pendant 2 h à 37 °C avant d'acquérir les premières images correspondant à 0 h.

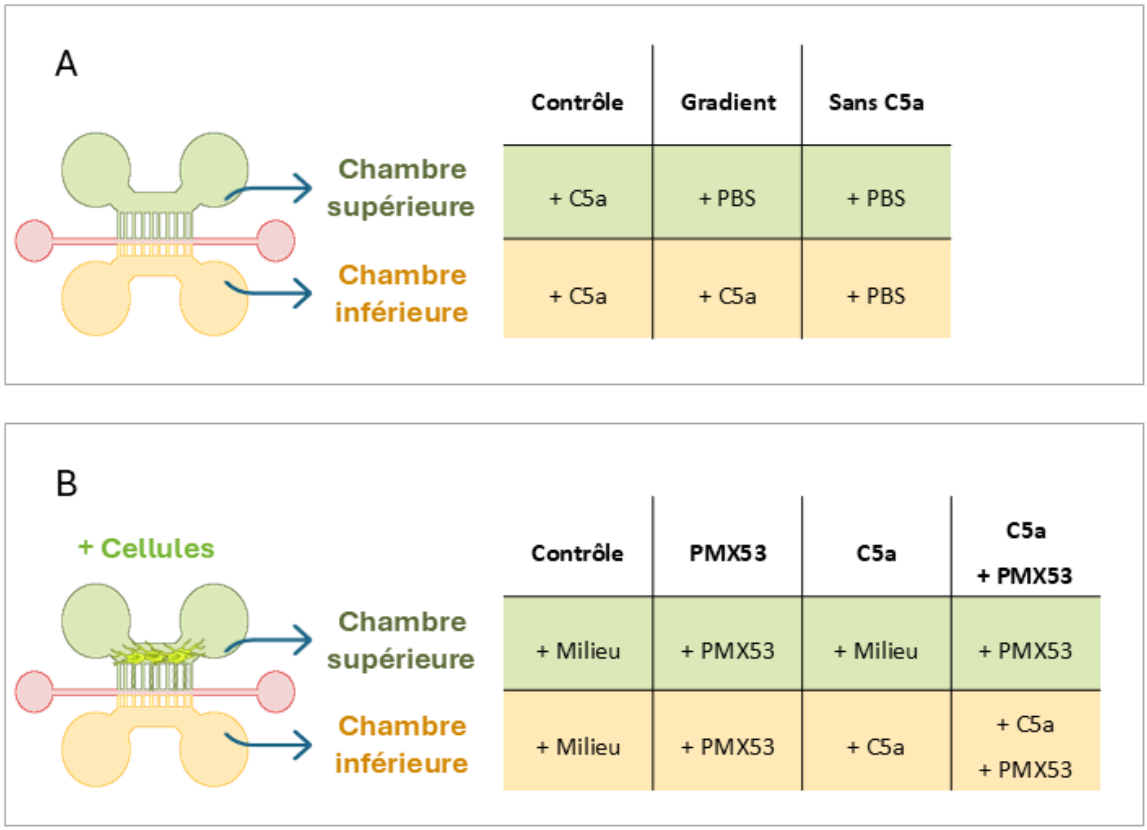


Figure 18. Conditions expérimentales au sein de la puce microfluidique.

*Représentation schématique de la puce simplifiée. **(A)** Conditions réalisées lors de la vérification du gradient. **(B)** Conditions réalisées lors des expérimentations mesurant la repousse axonale. Un volume de 40 µl est ajouté dans la chambre inférieure alors que 20 µl sont ajoutés dans celle supérieure.*

3.8.4. Mesure de la repousse axonale

3.8.4.1. Time laps

Dans le but de suivre la repousse axonale au cours du temps, nous avons dû définir une région d'intérêt (Region Of Interest , ROI) identique pour toutes les acquisitions d'images. Celle-ci, correspondait à la longueur du canal central, sa hauteur (100 µm) ainsi que la hauteur des micro-canaux inférieurs (75 µm) et de la chambre inférieure (900 µm). L'intégralité de la ROI a été prise en photo avec 20 × 3 images pour chaque puce à l'aide d'un microscope et d'un filtre de fluorescence à 450 ─ 490 nm (GFP 38HE Zeiss, 40 ×/1.3 Oil DICII, Optovar 1×, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Marly-Le-Roi, France) connecté à une caméra utilisant le logiciel MetaMorph (7.10.2.240 64-bit, Molecular Devices, San Jose, CA, État-Unis). L'acquisition a été réalisée manuellement 0, 24 et 48 h après la mise en place du gradient moléculaire.

3.8.4.2. Traitement des images : MosaicJ

Pour chacune des puces microfluidiques, chaque ROI a été reconstruite en créant une mosaïque de toutes les images acquises à l'aide du plugin MosaicJ du logiciel ImageJ 1.53k (Java 1.8.0_172 64-bit, National Institutes of Health, Bethesda, MD, État-Unis).

3.8.4.3. Mesures de la repousse axonale

La longueur cumulée de la repousse axonale (n = 100 axones/conditions) au cours du temps de la partie supérieure du canal central jusqu'à l'extrémité repoussée de l'axone a été mesurée à l'aide du plugin NeuronJ 1.4.3 [193]. Les longueurs des axones, les temps d'acquisition ainsi que les conditions ont été collectés dans un fichier Excel (version 2409, Microsoft Ireland Operations Ltd., Dublin, Irlande).

3.8.4.4. Traitement des données

1) **Longueur**

Dans le but d'obtenir des longueurs en µm, nous avons mis en relation la largeur du canal central mesurée en pixel sur ImageJ et la largeur réelle de 100 µm puis nous avons convertis en µm toutes les valeurs mesurées en pixel.

Après la conversion des longueurs en µm, la médiane a remplacé les valeurs aberrantes, c'est-à-dire les valeurs en dehors de l'intervalle interquartile. Puis, les valeurs mesurées à 24 h et 48 h ont été normalisées selon le contrôle à 0 h et la formule ci-contre avant d'être représentées en µm en fonction des conditions et du temps (24 et 48 h) sur un diagramme en moustache. Cette représentation graphique permet de visualiser la distribution des données et les valeurs extrêmes, ainsi que les quartiles 1, 2 et 3.

$$\text{Longueur normalisée } (\mu\text{m}) = \text{longueur} - \text{moyenne longueur à 0 h}$$

2) **Vitesse**

La vitesse de repousse axonale (µm/h) a été calculée à partir des longueurs de repousse axonale mesurées dans la partie 0 sur des intervalles temporels de 24 h, appelé t_n, soit de 0 à 24 h et de 24 à 48 h. Ensuite, les données ont été normalisées selon le contrôle (à 0 h). Enfin, les valeurs obtenues pour chaque condition ont été représentées en µm/h en fonction du temps (0 ─ 24 h et 24 ─ 48 h) sur un diagramme en moustache.

$$\text{Vitesse normalisée (µm/h) à } t_n = \frac{\text{longueur normalisée à } t_n - \text{longueur normalisée à } t_{n-1}}{t_n}$$

3.9. Évaluation de la viabilité neuronale sur une matrice de collagène chargée de C5a

3.9.1. Extraits de matériau

Dans le but de tester la viabilité neuronale en présence des matériaux de régénérescence, des extraits de matrice de collagène chargée ou non de C5a ont été réalisés à partir des matériaux fabriqués par le laboratoire ISM en partenariat avec Septodont (Saint-Maur-des-Fossés, France) et stockés à ─ 20 °C. Pour se faire, une matrice de collagène ± C5a a été incubée dans 1 ml de NB/B27 pendant 24 h. Puis, le surnageant a été récolté puis mis au contact de culture de neurones (DIV 14) lésés mécaniquement la veille (**Figure 19**). Les conditions testées étaient les suivantes :

- Milieu (Contrôle)
- Surnageant d'une matrice de collagène
- Surnageant d'une matrice de collagène chargée de C5a (mono ou biphasique)

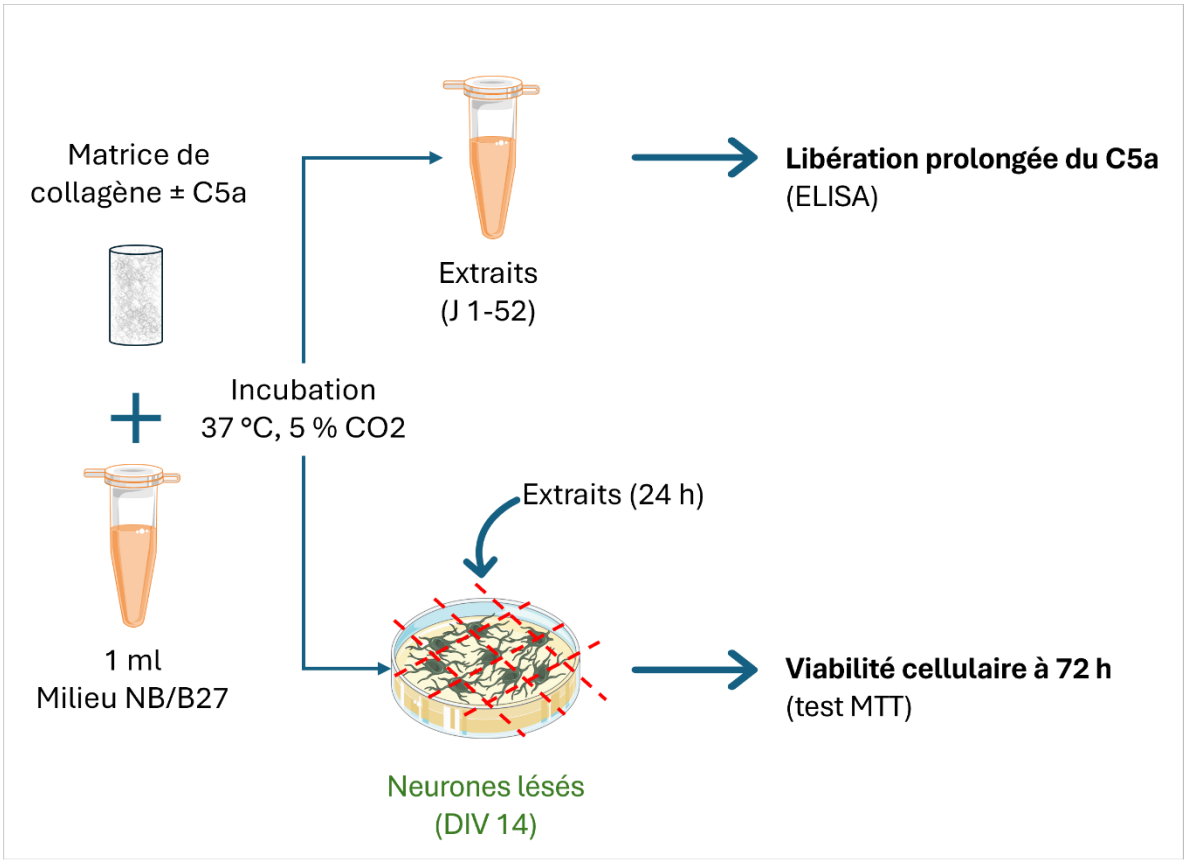


Figure 19. Représentation schématique du plan expérimental sur extrait de biomatériau.

Du milieu NB a été incubé 24 h en présence de biomatériaux de collagène ± C5a mono ou biphasique. Le C5a libéré par les matrices sur 52 jours a été dosé par ELISA. Les extraits ont été prélevés après 24 h et mis en contact avec les cultures hippocampiques lésées puis un test de viabilité cellulaire a été réalisé à 72 h.

3.9.2. Test de viabilité indirecte

Les tests de viabilité étaient des tests de MTT réalisés sur les cellules hippocampiques lésées (DIV14) après 72 h de culture avec les extraits issus des biomatériaux testés.

3.9.3. Libération du C5a par le support

Des extraits ont été réalisés comme décrit dans la partie 3.9.1 puis récoltés après 1, 7, 14, 21, 31, 38, 45 et 52 jours d'incubation. Le profil de libération du C5a des extraits de matériaux a été réalisé à partir des dosages ELISA sur 52 jours.

3.10. Adhésion cellulaire sur le support

La capacité du support à induire une adhésion neuronale a été vérifiée. Pour cela, les neurones embryonnaires (DIV 0) ont été ensemencés directement sur les supports de régénérescence (supports monophasiques de collagènes ± C5a) dans des plaques 96 puits avant d'être incubés 1 et 3 semaines à 37 °C, 5 % CO_2. Puis, la viabilité des cellules a été étudiée par un test de Live/Dead®. Le test de toxicité a été réalisé avec le kit d'imagerie Live/Dead® et selon les recommandations du fabricant (ThermoFischer). Il a été basé sur l'utilisation de la Calcéine, de l'AM et du colorant indiquant les cellules vivantes en vert et de l'iodure BOBO-3 colorant les cellules mortes en rouge. Le surnageant a été remplacé par un rinçage au PBS +/+. Puis, les cellules ont été incubées avec 150 µl/puit d'une solution PBS contenant 1 µM de Calcéine et 4 µM d'Etidium homodimer-1 D pendant 30 min à température ambiante. Après 2 rinçages au PBS, les cellules ont été observées au microscope à épifluorescence avec deux filtres de longueur d'onde d'excitation de 488 et 570 nm et d'émission à 515 et 602 nm à un grossissement 20 × (**Figure 20**).

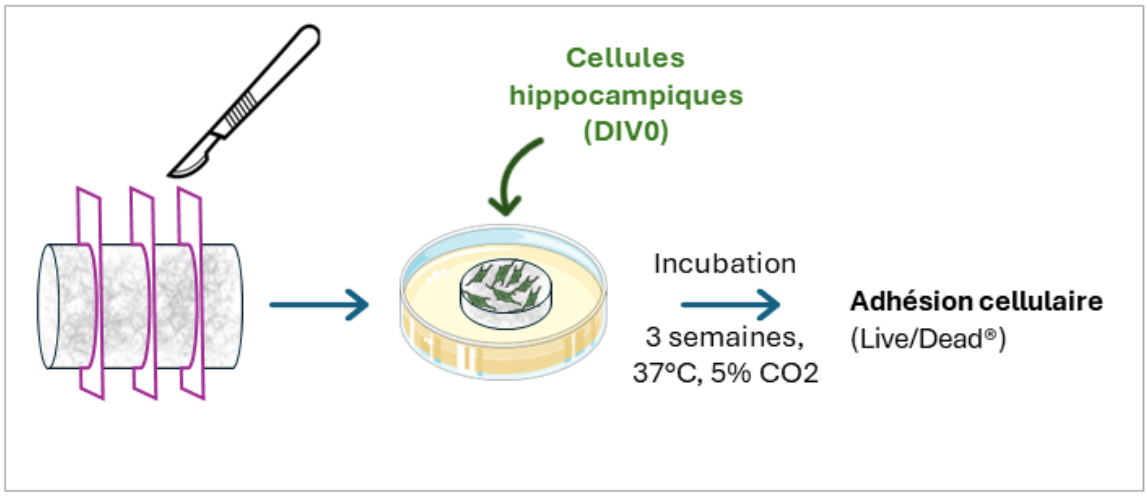


Figure 20. Représentation schématique du plan expérimental étudiant l'adhésion cellulaire sur les matrices de régénérescence.

Les matrices de collagène ± C5a monophasique ont été coupées au scalpel en 4 parties transversales. Ces dernières ont été réhydratées dans du NB/B27. Puis, les cellules hippocampiques DIV 0 ont été cultivées pendant 3 semaines au contact des sections de matrice avant de marquer les cellules vivantes en vert et les cellules mortes en rouge à l'aide du kit Live/Dead®.

3.11. Migration cellulaire au sein des matrices

3.11.1. Objectif

L'objectif de cette expérience a été d'induire la migration des cellules au sein des supports de régénérescence maintenus verticalement au contact des cellules pendant 14 jours. Afin de mettre en place ce protocole de migration, plusieurs exigences doivent être respectées.

3.11.2. Cahier des charges

Les neurones étaient des cellules adhérentes formant un tapis cellulaire au fond des puits. Elles ont été cultivées en conditions aérobies dans un milieu de culture leur apportant les nutriments qui leur ont été essentiels. Les supports de régénérescence doivent être maintenues verticalement et de manière stable au cours du temps malgré les changements de milieu, tout en étant en contact avec les cellules adhérées. En effet, les mouvements des supports de régénérescence posées sur les cellules peuvent induire un décollement et une mort cellulaire. À la fin des tests de migration, les biomatériaux ont été récupérés, traités histologiquement, coupés puis immunomarqués. Ainsi, il y a donc un réel besoin de développer un système de maintien stérile adéquat, dispositif jusqu'à présent inexistant sur le marché avec de telles caractéristiques.

3.11.3. Description du système de maintien

Un système de maintien a été développé avec l'aide du Dr Benoit BALLESTER (Faculté des Sciences Médicales et Paramédicales École de médecine dentaire, Marseille, France) pour répondre aux besoins du cahier des charges. Ce dernier a été composé de deux parties :

- Une armature imprimée en 3D réutilisable et donnant accès au milieu de culture et permettre son renouvellement.
- Des cônes de micropipette jetables (Dominique Dutscher), maintenant les supports de régénérescence orientés et au contact des tapis cellulaires.

3.11.3.1. Fabrication du système de maintien cellulaire : Impression en 3D de l'armature et coupe des cônes

Le design de l'armature a été modélisé sur le logiciel Fusion 360 (Autodesk, Californie, États-Unis) selon les dimensions d'une plaque de culture 24 puits. Puis, cette dernière a été imprimée par stéréolithographie avec l'imprimante 3D Form 3L (Formlabs, Nalepastr, Berlin, Allemagne) en White Resin (Formlabs) avant d'être lavée avec 2 bains d'isopropanol. Les cônes de pipettes P200 ont été coupés à l'aide d'une lame de rasoir aux dimensions suivantes : $\ell = 2,6 \pm 0,03$ cm.

3.11.3.2. Stérilisation et désinfection

L'armature imprimée en 3D et les cônes coupés ont été désinfectés à l'EtOH 70° pendant 10 min avant d'être séchés dans un milieu sans poussière pendant 24 h. Les deux structures du système de maintien ont perçu des méthodes différentes de stérilisation. En effet, dues aux modifications des dimensions et des propriétés physiques de l'armature dans les conditions de l'autoclave, chacune des faces de l'armature ont été stérilisées sous rayons Ultra-violet (Vilber Lourmat, France) pendant 15 min. Les cônes coupés ont été autoclavés (B134 Prion, Euronda E9 Inspection, Garons, France) à 134 °C et 2,1 bars.

3.11.4. Culture cellulaire

Les neurones ont été ensemencés dans une plaques 24 puits et ont été lésés après 14 jours d'incubation. Puis, 24 h après la lésion, l'armature imprimée en 3D stérile a été mise en place et les cônes coupés stériles ont été insérés dans les orifices prévus à cet effet. Les matrices de collagène ± C5a encapsulé ont été ajoutées à l'intérieur des cônes coupés à l'aide d'une pince stérile jusqu'à ce qu'ils soient au contact du tapis cellulaire. L'ensemble a été incubé à 37 °C, 5 % CO_2 pendant 14 jours sans mouvement (**Figure 21**).

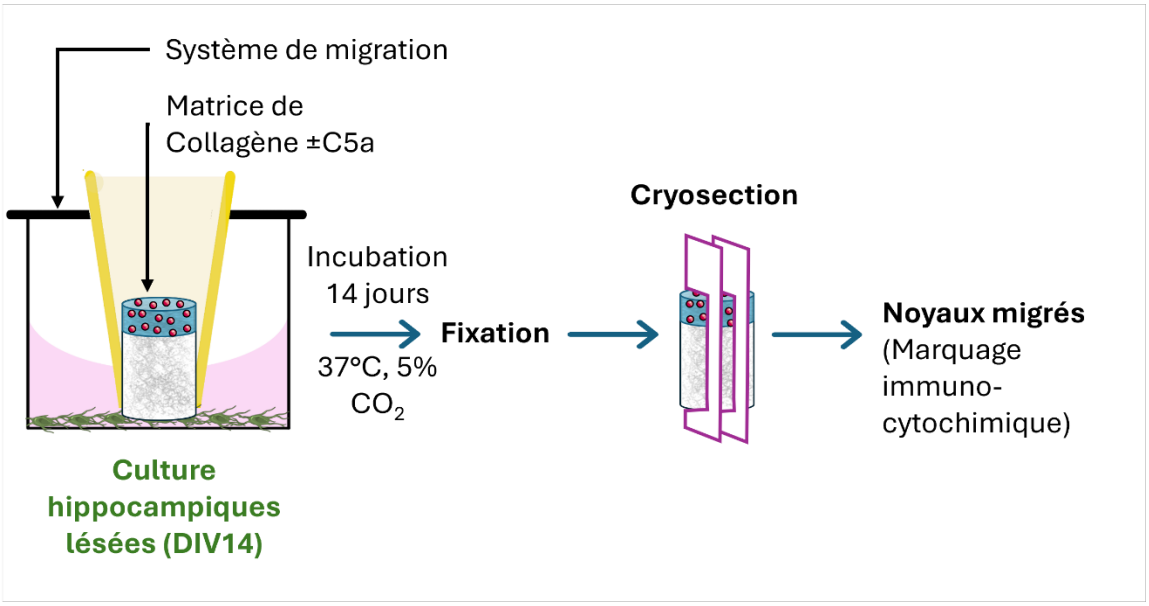


Figure 21. Représentation schématique du plan expérimental étudiant la migration cellulaire au sein des supports de régénérescence.

Le système de maintien stérile a été développé à partir d'un socle imprimé en 3D compatible avec des plaques de culture 24 puits et de cônes coupés qui y sont imbriqués. Il maintient le biomatériau de manière orientée et au contact d'un tapis de cellules hippocampiques lésées pendant 14 jours. Puis, les supports fixes et coupés longitudinalement ont été immunomarqués au DAPI. Les noyaux marqués ont été observés au microscope à épifluorescence.

3.11.5. Fixation

Après 14 jours, les supports de régénérescence ont été récupérés avant d'être fixés pendant 20 min à température ambiante avec une solution de 4 % PFA 4 % sucrose préchauffée à 37 °C.

3.11.6. Cryosections

Les supports de régénérescence ont été cryoprotégés puis congelés et coupés longitudinalement selon les étapes de la partie 3.12.2 (**Figure 21**).

3.11.7. Immunomarquages

Dans le but de suivre la présence de migration cellulaire au sein du support, les cryocoupes ont été marquées au DAPI selon les étapes décrites en partie 0 sans agitation avant d'être observées au microscope à épifluorescence à un grossissement 20 × (**Figure 21**).

3.12. Analyse histologique de la moelle épinière

Pour une application *in vivo*, une analyse histologique de la moelle épinière de rate adulte a été réalisée (**Figure 22**).

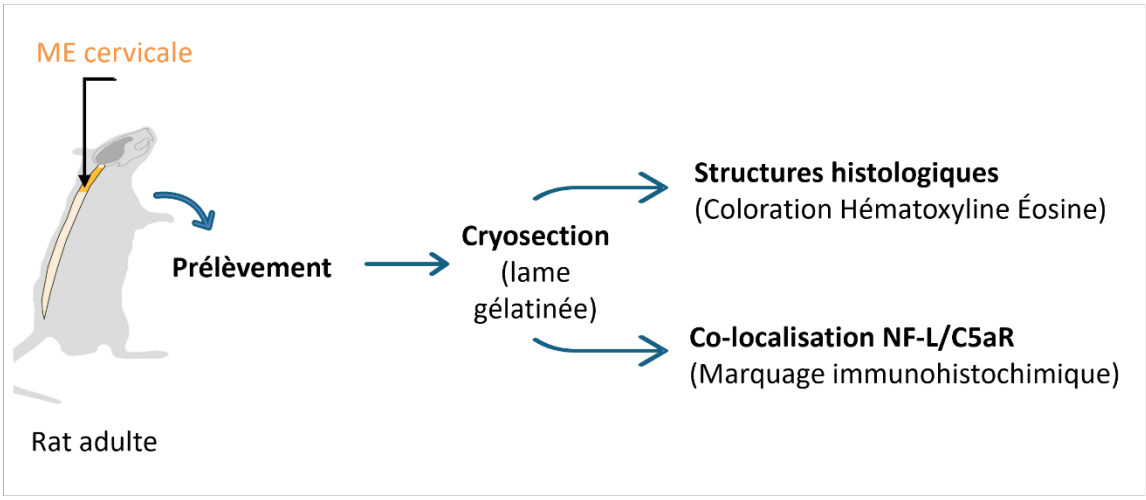


Figure 22. Schéma des expérimentations sur moelle épinière de rat.

3.12.1. Prélèvement de moelle épinière de rat

3.12.1.1. Extraction de la moelle épinière

Immédiatement après le sacrifice de l'animal, la moelle épinière cervicale et thoracique haute ont été prélevées. Pour ce faire, la peau dorsale ainsi que les muscles vertébraux et paravertébraux ont été réséqués (**Figure 23A**). La colonne vertébrale a été dégagée des tissus mous restants puis les vertèbres ont été brisées de part et d'autre de l'épine dorsale à l'aide d'un davier avant d'être retirées (**Figure 23B**). À ce stade, nous observons la ME au sein du canal vertébral. Tous les nerfs périphériques ont été sectionnés à la paire de ciseaux chirurgicaux puis l'ensemble de la ME au sein des méninges de la section cervicale C2 à la thoracique T12 a été extrait à l'aide d'un dissecteur de Robb Ogive (**Figure 23C**).

3.12.1.2. Fixation chimique et stockage

Après prélèvement, les segments de moelles épinières ont reçu plusieurs traitements afin de préserver leur structure. Le tissu prélevé a été rincé avec une solution à 1 M PBS +/+ puis épinglé droit sur un support en polystyrène (**Figure 23D**) avant d'être fixé pendant 24 h à température ambiante dans 45 ml PFA à 4 %. La solution a ensuite été renouvelée afin de conserver les prélèvements pendant 1 semaine à 4 °C.

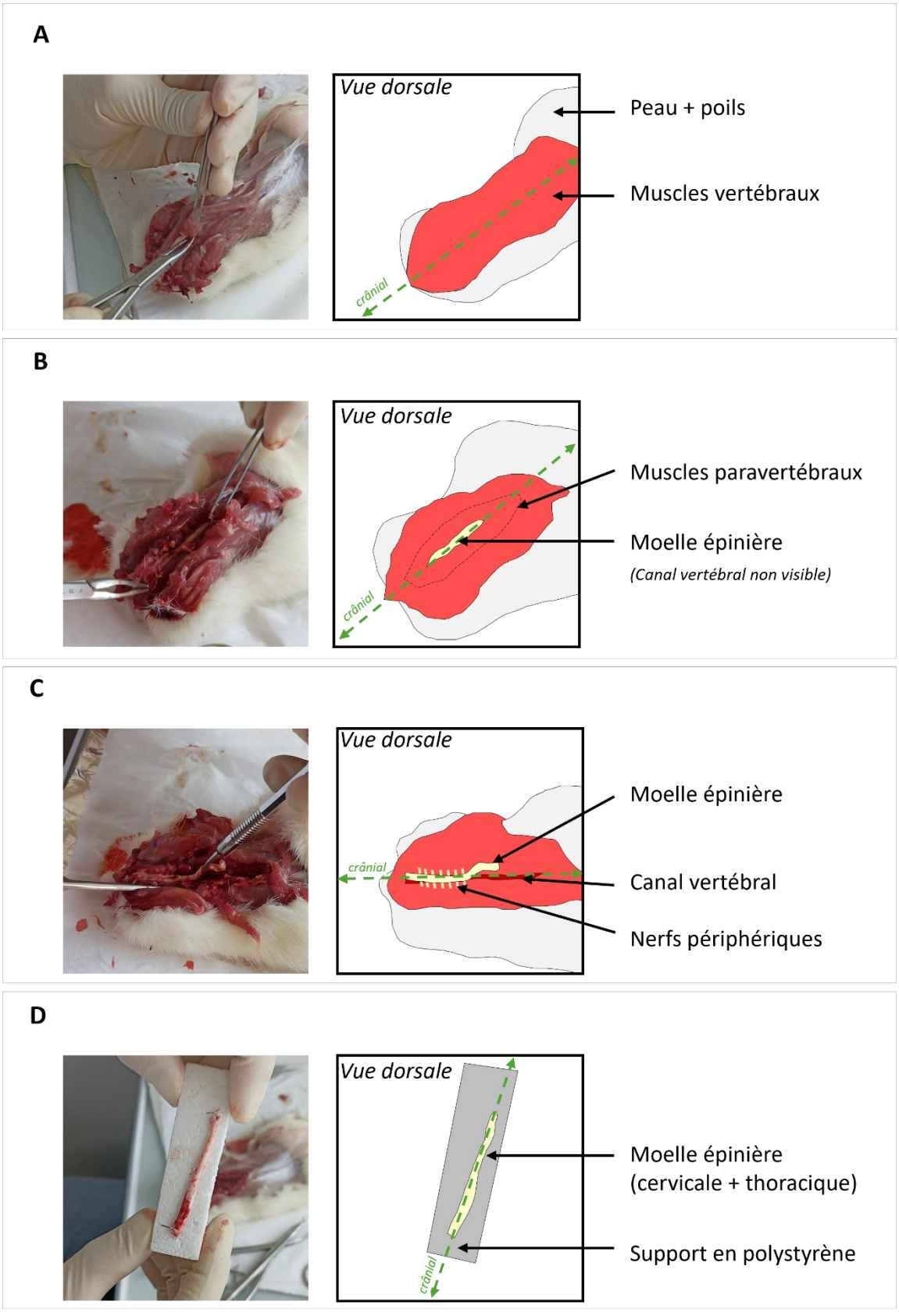


Figure 23. Protocole de prélèvement de la moelle épinière.

(A) *Résection des muscles vertébraux et paravertébraux après ouverture dorsale de la peau.* ***(B)*** *Résection des vertèbres.* ***(C)*** *Section des nerfs spinaux de part et d'autre de la moelle épinière.* ***(D)*** *Fixation droite de la moelle épinière avec les méninges sur un support en polystyrène. Les épingles traversent la moelle épinière dans les parties non étudiées.*

3.12.2. Cryosections

3.12.2.1. Traitement des lames

Dans le but d'améliorer la tenue des coupes d'échantillon sur les lames, ces dernières ont été traitées avec une solution à base de gélatine. Les lames Superfrost™ Plus (Epredia, Braunschweig, Allemagne) ont été lavées à l'eau chaude et au savon pendant 15 min avant d'être rincées à l'eau courante puis avec 3 bains successifs de dH_2O. Ensuite, après un bain d'EtOH à 70° pendant 5 min, les lames ont été séchées sous une feuille d'aluminium pendant 24 h. Ces dernières ont par la suite été plongées dans deux bains successifs d'une solution de gélatine porcine 0,5 % et de sulfate de chrome (III) de potassium dodécahydrate ($CrK(SO_4)_2$) 0,05 % (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, État-Unis) pendant 10 secs avant d'être séchées sous une feuille aluminium pendant 24 h.

3.12.2.2. Cryopréservation

Les moelles épinières fixées ont été préservées des déchirures lors de la cryocoupe par un bain d'une solution de PBS +/+ à 15 % de saccharose pendant 6 h suivi d'un bain de PBS +/+ 30% de saccharose sur la nuit à 4 °C. Les méninges ont ensuite été retirées à l'aide de précelles et des sections transversales d'une longueur de 1 cm ont été réalisées au scalpel avant d'être congelées sur une platine supraconductrice en aluminium à ─ 80 °C pendant 24 h.

3.12.2.3. Coupes des échantillons

Le cryostat (CM3050S, Leica Biosystems, Deer Park, États-Unis) a été réglé sur les paramètres suivants :

- Température de l'objet : ─ 20 °C
- Température de la chambre : ─ 24 °C
- Angle : 5

Les échantillons ont été fixés au porte-objet à ─ 20 °C à l'aide d'une solution d'OCT (Optimal Cutting Temperature) et leur surface a été préparée par élagage successif de 10 µm puis de 7 µm d'épaisseur. Des coupes de 5 µm ont été récupérées sur les lames préalablement gélatinées. Ces dernières ont été conservées à ─ 20 °C jusqu'à la coloration histologique et le marquage immunohistochimique.

3.12.3. Coloration Hématoxyline-éosine

La coloration à l'Hématoxyline-éosine met en évidence les différentes parties cellulaires en colorant les noyaux en violet et le cytoplasme en rose. Les coupes d'échantillon ont été décongelées puis rincées par un bain de dH_2O pendant 5 min. Entre chaque étape de la coloration, comprenant un bain d'hématoxyline puis d'éosine de 1 minute chacun, une étape de rinçage au dH_2O pendant 5 min a été réalisée. Puis, les échantillons ont été déshydratés par des bains successifs d'EtOH de concentrations croissantes (70°, 96° puis 100°) et de deux bains de xylène pendant 10 sec. Enfin, les lames ont été montées avec un milieu de montage DPX.

3.12.4. Immunohistochimie

Le double marquage immunohistologique a été réalisé pour localiser le C5aR et NF-L. Les sections de moelle épinière ont été perméabilisées et les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués à l'aide d'une incubation dans du PBS +/+ à 0,1 M (pH 7,4), 0,22 % de gélatine et 0,1 % de Triton X-100 sur la nuit à 4 °C. Cette solution a été utilisée pour tous les lavages et dilution d'anticorps. Les coupes ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires IgG de lapin anti-rat NF-L et de lapin IgG anti-rat C5aR pendant 48 h à 4 °C dans une chambre humide. Les conditions « contrôle » correspondent à une omission d'un ou de plusieurs anticorps primaires. Après 3 lavages de 2 h à 30 rpm (*Revolution per minute*), les coupes ont été incubées pendant 1 h à température ambiante en chambre humide et à l'abris de la lumière avec des anticorps secondaires Alexa Fluor 488 IgG de chèvre anti-lapin (vert), 594 IgG de chèvre anti-lapin (rouge) ainsi qu'au DAPI. Les concentrations des différents anticorps sont détaillées dans le **Tableau** 4. Les coupes, rincées 3 fois, ont été montées à l'aide d'un milieu de montage hydrophile appelé ProLong Glass™.

Anticorps	Noms	Concentrations	Références Fabriquants
Primaire	Lapin IgG anti-rat NF-L	0,2 µg/ml	PA587394 ThermoFischer
	Lapin IgG anti-rat C5aR	6,7 µg/ml	CPA4586 Cohesion Biosciences
Secondaire	Alexa Fluor™ 594 chèvre anti-lapin IgG	0,25 µg/ml	A11012 ThermoFischer
	Alexa Fluor™ 488 chèvre anti-lapin IgG	0,25 µg/ml	A11034 ThermoFischer

Tableau 4. Anticorps primaires et secondaires utilisés pour le marquage du C5aR au sein des coupes de moelle épinière.

3.13. Analyse statistique

Toutes les expériences ont été réalisées au moins en triplicata. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide de RStudio® (Rasband, W.S., National Institutes of Health des États-Unis, Bethesda, MD, États-Unis) version 1.4.1106. Le test de Shapiro a été réalisé dans un premier temps pour évaluer la distribution normale de données. Puis, des tests non-paramétriques ont été réalisés tels que le test de Friedman sur données appariées pour évaluer les changements temporels ainsi que le test de Kruskal-Wallis sur données non appariées pour comparer les conditions entre elles. Les deux tests ont été réalisés après correction de Bonferroni pour diminuer les erreurs lors des comparaisons multiples. Puis, les tests post hoc de Wilcoxon ont été réalisés pour examiner les différences spécifiques entre les conditions. Les données ont été exprimées en médiane ± intervalle interquartile et considérées comme significatives pour une valeur $p < 0,05$.

4. Résultats

4.1. Culture de neurones primaires matures

Les cellules neuronales ont été obtenues par dissociation enzymatique puis mécanique de l'hippocampe embryonnaire (E18,5) de rat (*n* = 30). Après 3 h de culture sur une surface traitée au PDL/LN et dans du milieu enrichi NB/B27, les cellules observées commencent à adhérer de manière aléatoire à la surface de culture et présentent une morphologie majoritairement ronde de 13,67 ± 2,08 µm de diamètre (**Figure 24A**). À ce stade, quelques cellules émettent de courts prolongements de 22,33 ± 3,21 µm (**Figure 24B**). Après 7 jours de culture, les neurites, plus longs et plus nombreux, forment des réseaux interconnectés entre les cellules (**Figure 24C**). Les cellules présentent une polarité apparente par la présence d'un plus long prolongement. Après 14 jours, les neurites forment un réseau dense et complexe (**Figure 24D**).

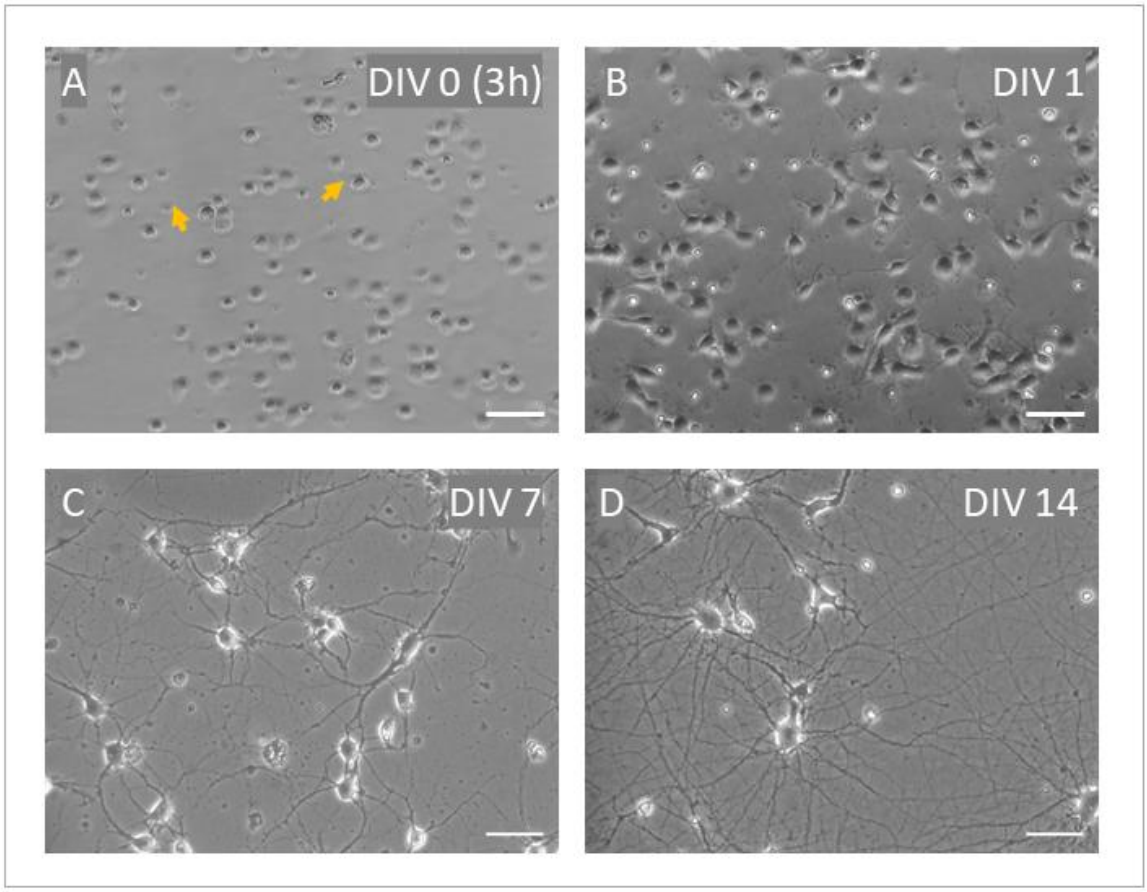


Figure 24. Évolution morphologique des cultures de neurones au cours du temps après ensemencement.

(A) *L'observation au cours du temps de cellules hippocampiques embryonnaires de rat à E18,5 (n = 30), obtenues après dissociation enzymatique et mécanique et mises en culture sur une surface prétraitée en PDL/LN et dans du milieu NB/B27, montre un corps cellulaire sphérique 3 h après l'ensemencement (DIV 0). Ces dernières présentent quelques rares prolongements qui sont courts et peu développés (flèches).* ***(B)*** *Au stade DIV 1, les cellules commencent à étendre leurs prolongements.* ***(C)*** *À DIV 7, les prolongements cellulaires sont longs et forment des réseaux.* ***(D)*** *Ces derniers sont complexes et de plus en plus denses à DIV 14. Barres d'échelle : A ─ D = 50 µm.*

Un immunomarquage a été réalisé pour caractériser les types cellulaires présents dans les cultures neuronales hippocampiques après 14 jours. Le marqueur NF-L a été utilisé pour identifier les neurones différenciés, NeuroD2 pour les neurones indifférenciés, Olig2 pour les oligodendrocytes, et GFAP pour les astrocytes. Les résultats montrent que les cellules cultivées expriment le NF-L (**Figure 25Ab**) mais n'expriment pas NeuroD2 (**Figure 25Aa**). En outre, l'analyse des données indique une absence d'expression d'Olig2 (**Figure 25Ac**) mais une expression du marqueur GFAP (**Figure 25Ad**). Aucune fluorescence n'est observée chez les témoins (**Figure 25Ae**).

L'analyse quantitative des populations cellulaires obtenues indique que les cultures hippocampiques contiennent en majorité 93 ± 5 % de cellules exprimant le NF-L (*, $p < 0,05$) et 7 ± 5 % exprimant le GFAP ($, $p < 0,05$), tandis qu'aucune cellule n'exprime NeuroD2 ou Olig2 (**Figure 25B**). Les tests de Kruskal-Wallis ($H = 47,086$, $df = 3$, $p = 3,33 \times 10^{-10}$) et post hoc de Wilcoxon indiquent que les cellules hippocampiques cultivées dans nos conditions sont majoritairement des neurones différenciés.

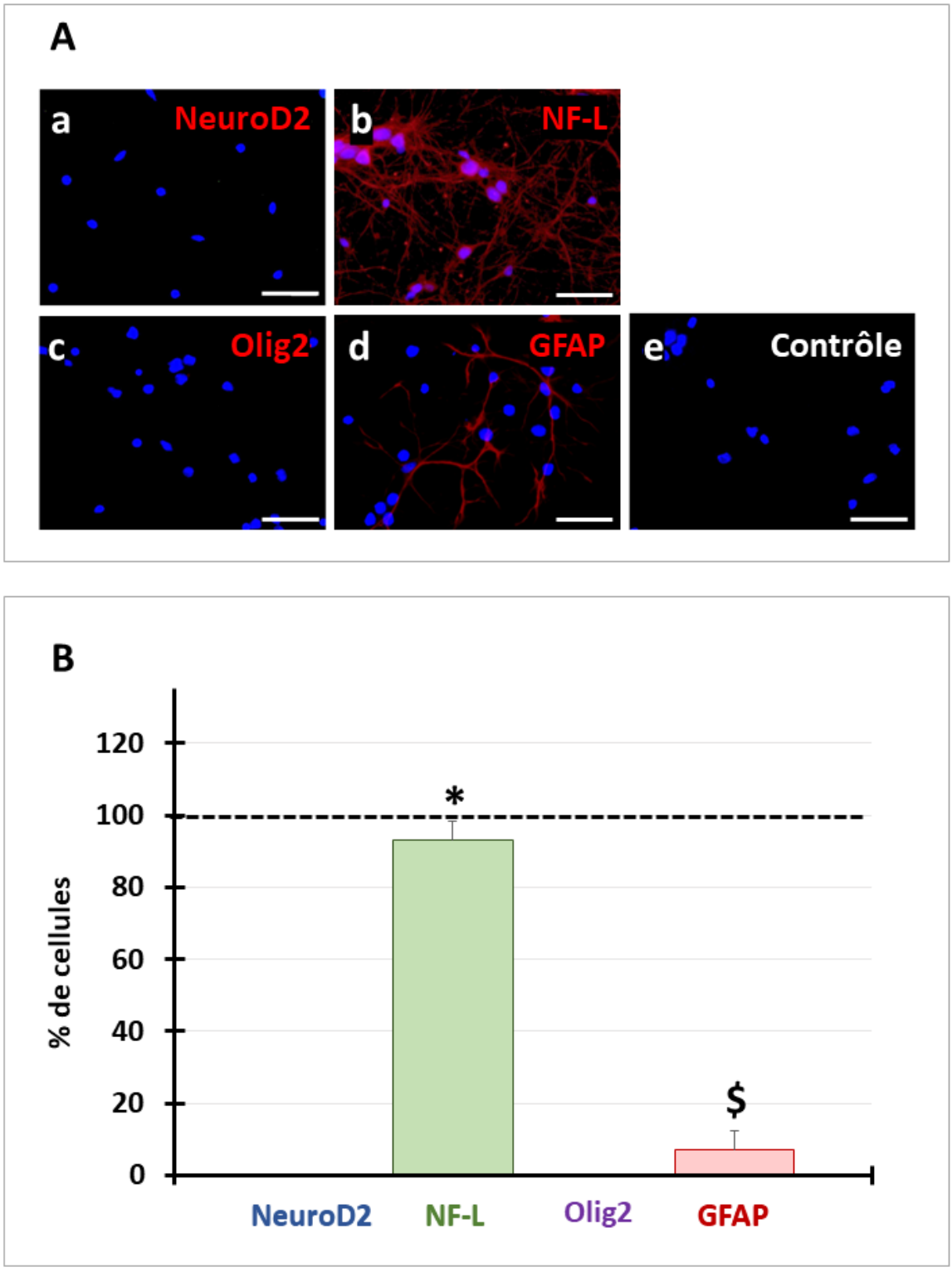


Figure 25. Proportion des neurones et cellules gliales au sein des cultures hippocampiques.

(A) *Sur des cultures de neurones fixées, le marquage par épifluorescence indique l'expression du NF-L, marqueur des neurofilaments intermédiaires des neurones différenciés (b) ainsi que du GFAP, marqueur des astrocytes (d). Aucune expression du NeuroD2, facteur des neurones indifférenciés (a) ni d'Olig2, marqueur des oligodendrocytes (c) n'est relevée. Aucun marquage n'est observé dans le contrôle (e). Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). Barres d'échelle : a — e = 50 µm.* ***(B)*** *Les résultats du dénombrement des cellules selon les différents marquages indiquent que les cultures hippocampiques contiennent en majorité 93 ± 5 % de cellules exprimant le NF-L (*, p < 0,05, test de Kruskal-Wallis sur données non appariées et correction de Bonferroni) et 7 ± 5 % exprimant le GFAP ($, p < 0,05, tests identiques), tandis qu'aucune cellule n'exprime NeuroD2 ou Olig2.*

4.2. Lésion des axones

Une lésion mécanique de 107 ± 7,2 µm de large a été appliquée sur une culture de neurones (DIV 14) (n = 3). Avant la lésion, les cellules avaient formé un tapis cellulaire dense (**Figure 26Aa**). Deux heures après la lésion mécanique (*, pointillés blanc), les images prises au microscope indiquent une disparition des prolongements et des corps cellulaires sur une distance de 99,67 ± 16,01 µm, de part et d'autre de la lésion (pointillés jaunes, **Figure 26Ab**). À partir de 24h, on observe un recouvrement de ces régions par des prolongements cellulaires de 98,83 ± 21,14 µm, indiquant un processus de régénérescence axonale de manière centripète vers la lésion (flèche, **Figure 26Ac**). Puis, à 48h, les prolongements sont plus longs et nombreux (flèche, **Figure 26Ad**).

Un test de MTT à 2 h, 24 h et 48 h a été réalisé pour évaluer l'effet de la lésion mécanique sur la viabilité neuronale (n = 3). Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle, c'est-à-dire de la condition non lésée à 2 h. Les tests de Kruskal-Wallis (H = 53,776, df = 1, p = 2,247 × 10^{-13}) et post hoc de Wilcoxon indiquent qu'après une lésion, la viabilité des neurones diminue significativement de 50 ± 5 % comparée au contrôle (*, p < 0,05). Cette diminution est présente au cours du temps comparée au contrôle du même point temporel (Intact VS Lésé 2 h : *, 24 h : +, 48 h : #, p < 0,05) mais reste stable au cours du temps dans les cultures lésées. Les cultures intactes ne montrent pas de variation de viabilité au cours du temps (**Figure 26B**).

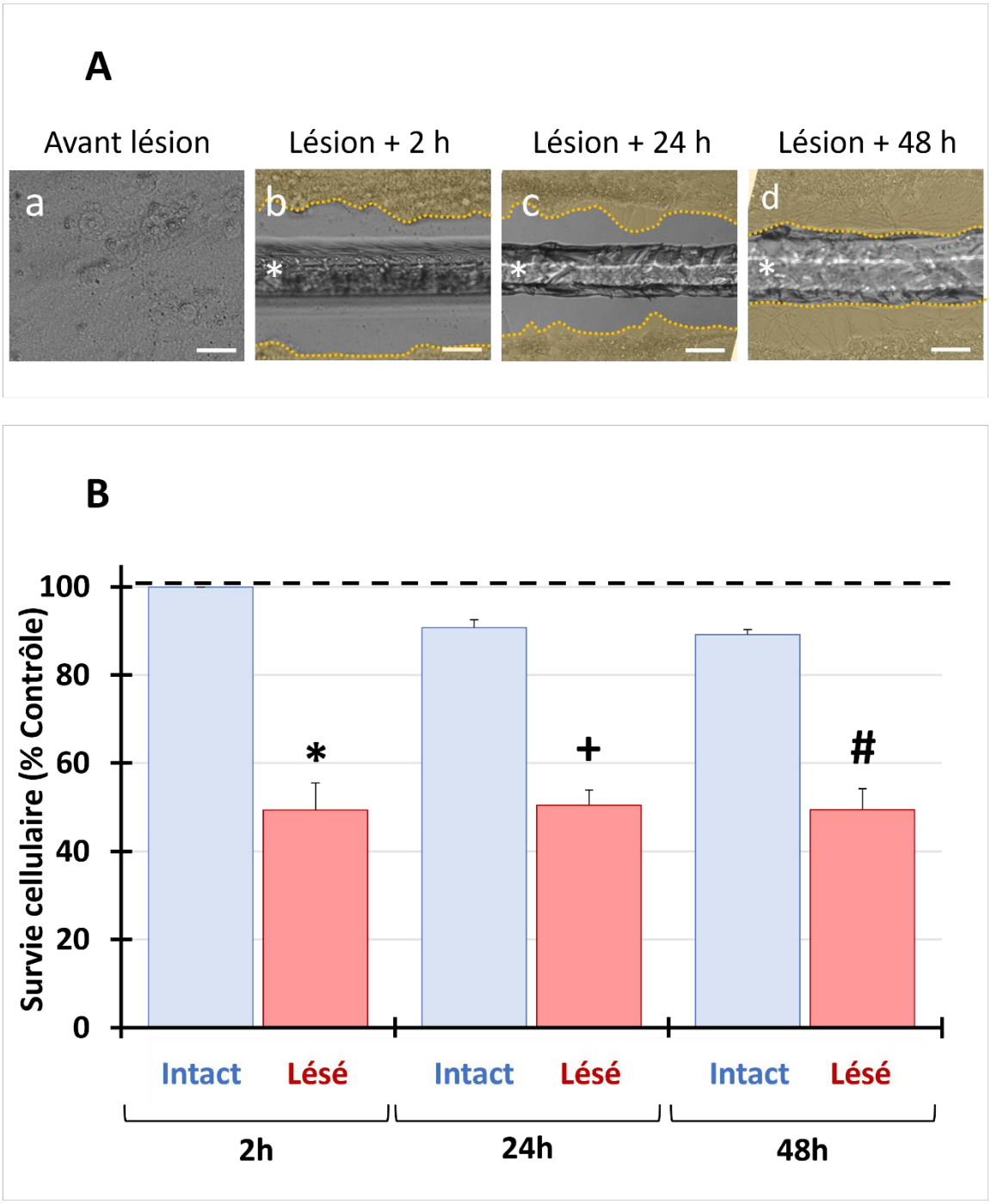


Figure 26. Effet d'une lésion mécanique sur une culture de neurones.

(A) *L'observation microscopique après une lésion mécanique (*, pointillés blancs) sur des cultures de neurones DIV 14 intactes (a) montre qu'après 2 h, une zone sans corps cellulaire ni prolongement se forme ainsi qu'un front cellulaire (b, pointillés jaunes). Après 24 h, la croissance de prolongements courts et peu nombreux fait avancer le front cellulaire (pointillés jaunes) dans la zone de mort ou de rétractation cellulaire (c). Puis, après 48 h, le front cellulaire recouvre entièrement cette zone jusqu'à la lésion (d).* ***(B)*** *Les tests de MTT réalisés à 2 h, 24 h et 48 h après la lésion des neurones indiquent une mort significative de 50 % des cellules lésées après 2 h, 24 h et 48 h (respectivement *, + et #, $p < 0,05$, test de Kruskal-Wallis sur données non appariées et correction de Bonferroni) comparée à chacune des conditions sans lésion. Au cours du temps, la survie cellulaire est stable aussi bien pour les cultures intactes que celles lésées (tests identiques). Les pointillés correspondent à 100 % de survie cellulaire dans le contrôle à 2 h.*

4.3. Étude du couple C5a/C5aR sur les cultures primaires lésées

4.3.1. Les neurones expriment le gène du C5

La technique de la RT-PCR montre l'expression du gène qui code pour le C5 par les neurones que ce soient des cultures lésées ou intactes (*n* = 3) (**Figure 27**). Aucun signal n'est détecté dans le contrôle (sans ADNc). L'expression du gène qui code pour la GAPDH, utilisée comme contrôle interne confirme la qualité et l'intégrité de l'ARN extrait ainsi que l'efficacité de la technique RT-PCR (**Figure 27**). Des variations dans l'intensité des bandes sont observées entre les conditions suggérant des différences dans le niveau d'expression. Cependant, la RT-PCR, étant une technique qualitative, ces variations ne peuvent pas être interprétées de manière précise en termes de quantité d'ARNm.

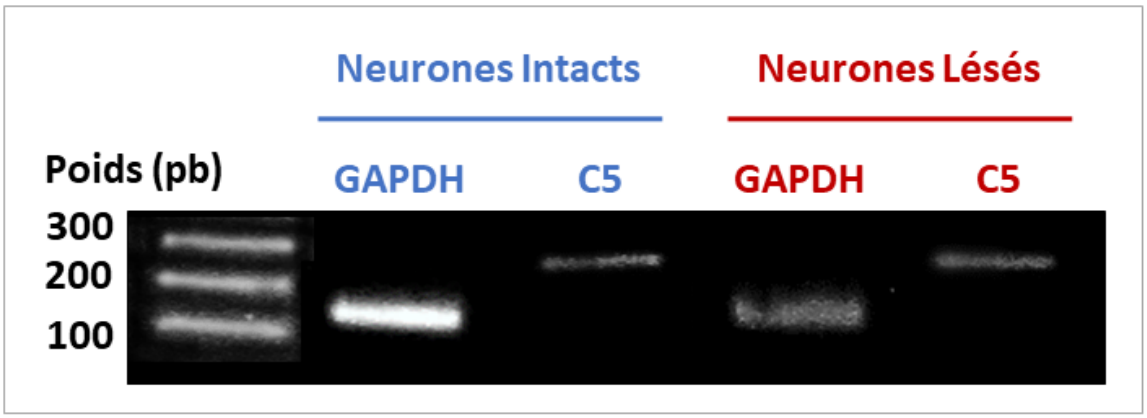


Figure 27. Expression du gène de la protéine du Complément C5 par les cultures de neurones.

L'analyse par RT-PCR montre qu'aussi bien les neurones DIV 14 intacts ou lésés expriment l'ARNm du C5 (241 pb) (n = 3). L'ARNm de la GAPDH est utilisé comme contrôle interne (141 pb).

4.3.2. Les neurones sécrètent du C5a

La sécrétion du C5a au sein des surnageants des neurones matures à DIV 14 a été quantifiée 24 h après la lésion mécanique par dosage ELISA (*n* = 3). La

concentration du C5a dans les surnageants des neurones intacts est de 63,2 ± 0,1 pg/ml et après lésion, elle est de 66,5 ± 1,1 pg/ml (**Figure 28**). Aucune différence significative n'est relevée entre la quantité de C5a sécrétée dans les populations lésées et intactes. (**Figure 28**).

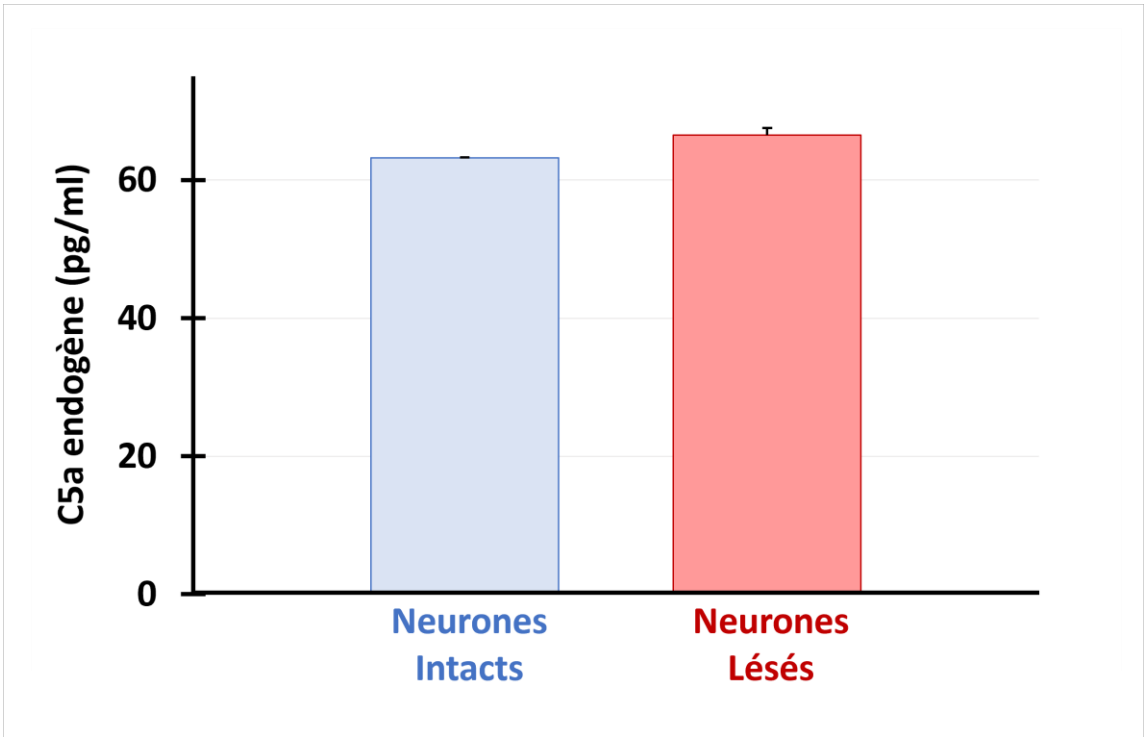


Figure 28. Sécrétion du C5a par les cultures de neurones.

Le C5a présent dans les surnageants de cultures de neurones de DIV 14 après une lésion mécanique (n = 3) est quantifié par dosage immuno-enzymatique. Le contrôle correspond au milieu NB/B27. Les résultats n'indiquent pas de différence statistiquement significative de la sécrétion entre les cellules intactes et lésées.

4.3.3. Les neurones expriment le gène du récepteur au C5a

L'expression du gène qui code pour le récepteur au C5a a été évaluée par RT-PCR sur des cultures de neurones matures DIV 14 intacts et lésés (*n* = 3). Une bande correspondant à l'expression du gène du C5aR indique une expression basale du récepteur dans les neurones intacts et lésés (**Figure 29**). L'expression du gène qui code pour la GAPDH, utilisée comme contrôle interne confirme la qualité et l'intégrité de l'ARN extrait ainsi que l'efficacité de la technique RT-PCR.

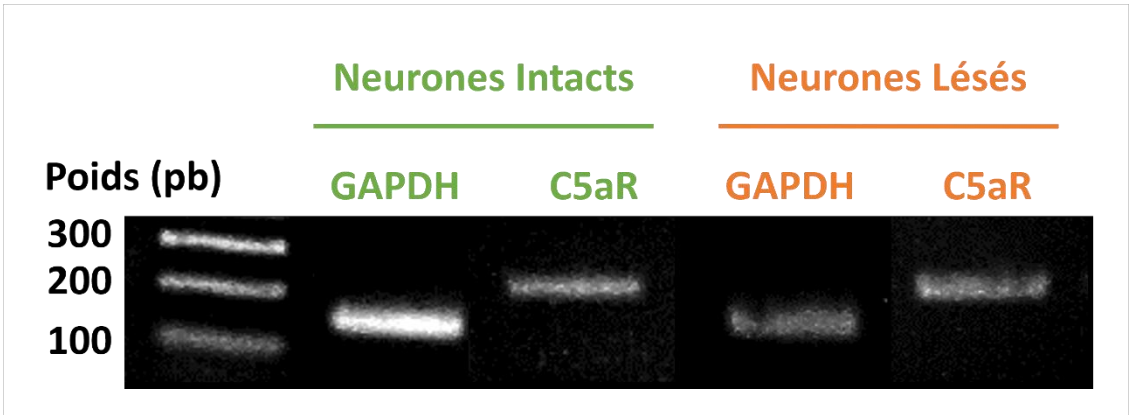


Figure 29. Expression du C5aR par les cultures de neurones.

Le poids moléculaire est exprimé en paires de bases (pb). L'analyse par RT-PCR montre qu'aussi bien les neurones DIV 14 intacts ou lésés expriment l'ARNm du C5aR (241 pb) (n = 3). L'ARNm de la GAPDH est utilisé comme contrôle interne (141 pb).

4.3.4. Les neurones expriment le C5aR à leur membrane

Le double immunomarquage des marqueurs de neurofilament NF-L ainsi que du C5aR sur les cultures de neurones intacts (**Figure 30a ─ d**) et lésés (**Figure 30e ─ h**) montre l'expression intracellulaire du NF-L autour des noyaux cellulaires (marqués au DAPI, bleu) et au sein des prolongements (**Figure 30a et e**) ainsi que l'expression membranaire du C5aR à ces mêmes localisations (**Figure 30b et f**), visibles sur les images superposées (**Figure 30c et g**). Aucun marquage n'est observé dans les contrôles (**Figure 30d et h**) et au sein de la lésion (* et pointillés blancs) (**Figure 30**).

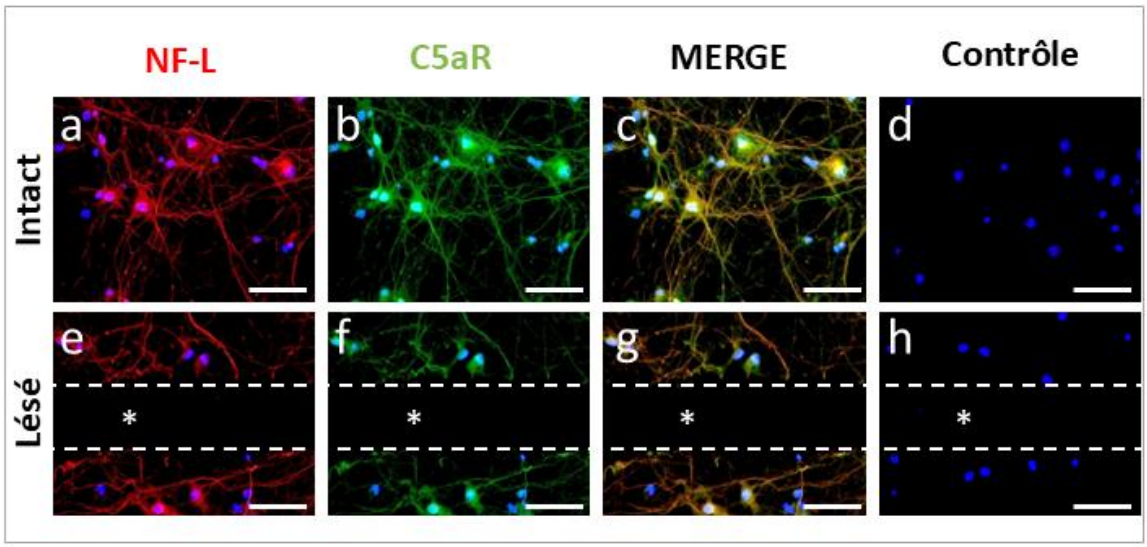


Figure 30. Immunomarquage du récepteur au C5a sur les neurones.

*Images d'immunofluorescence obtenues avec les marqueurs NF-L et C5aR sur des neurones intacts (a ─ d) et lésés (e ─ h). Les neurones expriment de manière intracellulaire le NF-L (a, e) autour des noyaux et dans les prolongements. Il en est de même pour l'expression membranaire du C5aR (b, f). L'expression localisée de ces deux marqueurs est visible en jaune sur les images superposées (c, g). Aucun marquage n'est observé au sein de la lésion (e ─ g, *, pointillés blancs) et dans les contrôles (d, h). Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). Barres d'échelle : a ─ h = 50 µm.*

4.3.5. L'ajout de C5a n'affecte par la viabilité neuronale

L'effet du C5a sur la viabilité cellulaire a été testé en cultivant les neurones lésés avec trois concentrations de C5a : 50, 200 et 1000 ng/ml. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle (à 24 h et sans C5a). Au cours du temps, aucune différence significative n'est observée quelques soit la concentration de C5a utilisée (**Figure 31**).

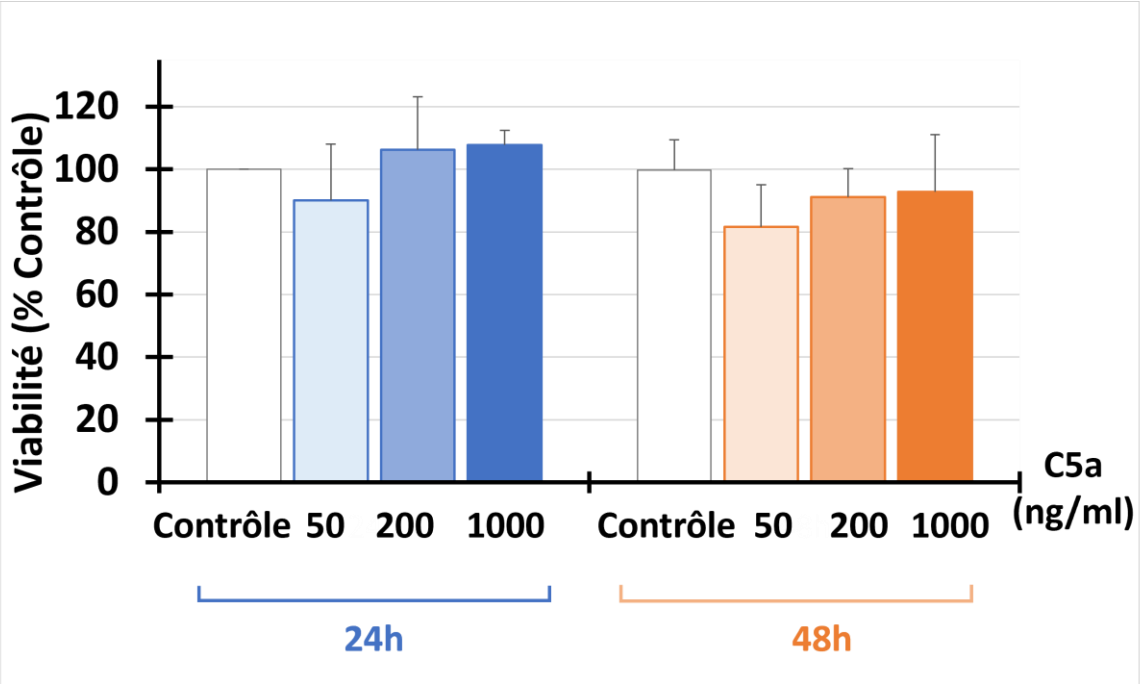


Figure 31. Viabilité des neurones lésés au contact de différentes concentrations de C5a.

L'incubation pendant 24 h et 48 h du milieu (contrôle) ou du C5a à 50, 200 et 1000 ng/ml sur des cultures de neurones DIV 14 lésés n'a pas entrainé de différence significative de viabilité (test de Friedman + test de Kruskal-Wallis). Les pointillés indiquent le contrôle à 24 h, correspondant au 100 % de viabilité.

4.3.6. Le C5a induit la phosphorylation du C5aR

L'interaction du C5a avec son récepteur à la surface membranaire a été étudié par double marquage immunocytochimique du C5aR phosphorylé (C5aR-P) ainsi que des filaments intermédiaires spécifiques des neurones matures (NF-L) (*n* = 3). Dans la condition contenant uniquement du milieu (sans C5a ajouté), le marquage du C5aR-P est observé à la membrane des corps cellulaires ainsi que des prolongements. Ce dernier est colocalisé avec celui du NF-L, observé au sein des cellules, autour des noyaux et dans les prolongements (**Figure 32a**). Après ajout d'antagoniste du C5aR, le PMX53, seul le marquage du NF-L est observé et aucun marquage du C5aR-P n'est observé (**Figure 32b**). Après ajout de 50 ng/ml de C5a, le marquage fluorescent du C5aR-P est observé (**Figure 32c**). Ce marquage semble visuellement plus important que la condition contenant uniquement du milieu (**Figure 32a**) et n'est plus visible en présence du PMX53 (**Figure 32d**). Aucun marquage n'est observé dans le contrôle (**Figure 32e**).

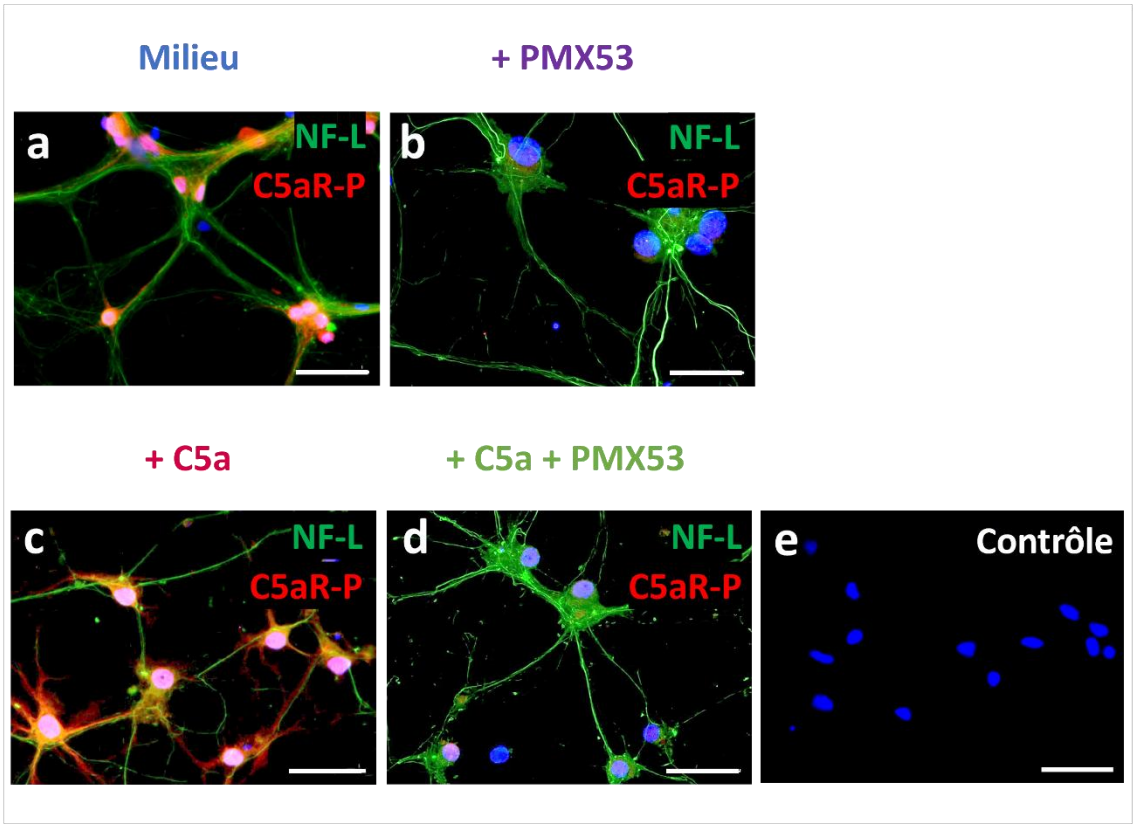


Figure 32. Immunomarquage du C5aR phosphorylé par le C5a.

Les doubles marquages du NF-L intracellulaire ainsi que du C5aR-P membranaire indiquent une phosphorylation du C5aR avec du milieu (a) qui n'est plus visible après ajout de l'antagoniste du C5aR, le PMX53 (b). En ajoutant du C5a à 50 ng/ml, la phosphorylation du C5aR semble plus importante (c) et elle est inhibée par la présence du PMX53 (d). Le contrôle ne présentait aucun marquage (e). Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). Barres d'échelle : a ─ e = 50 µm.

4.4. Mesures du potentiel neurorégénératif du C5a

4.4.1. Modèle lésionnel sur puces microfluidiques

4.4.1.1. Les cultures neuronales infectées au lentivirus expriment une protéine fluorescente verte

L'utilisation d'une puce microfluidique a permis une culture compartimentée des corps cellulaires, facilitant l'étude précise de la croissance et de la régénérescence axonale en réponse à une lésion ou une stimulation (n = 12). La vue schématique des différents compartiments de la puce microfluidique est présentée dans la **Figure 33A**. Dans le but de visualiser et de suivre la progression de l'extension axonale, les cellules ont été infectées avec un lentivirus induisant l'expression de la protéine fluorescente verte (GFP) après 2 jours d'ensemencement. Au microscope optique à épifluorescence, nous observons l'expression du marqueur vert dans les cellules au niveau des corps cellulaires et des prolongements dès 7 jours après l'infection (**Figure 33Ba et b**).

4.4.1.2. Seuls les prolongements neuronaux sont localisés dans le canal central et la chambre inférieure

Après 14 jours, les marquages immunochimiques du NF-L (rouge) ainsi que des noyaux (DAPI, bleu) indiquent la présence de noyaux et de prolongements dans la chambre supérieure (**Figure 33Cc**) alors que seuls les prolongements poussent vers le canal central et la chambre inférieure (**Figure 33Cd**).

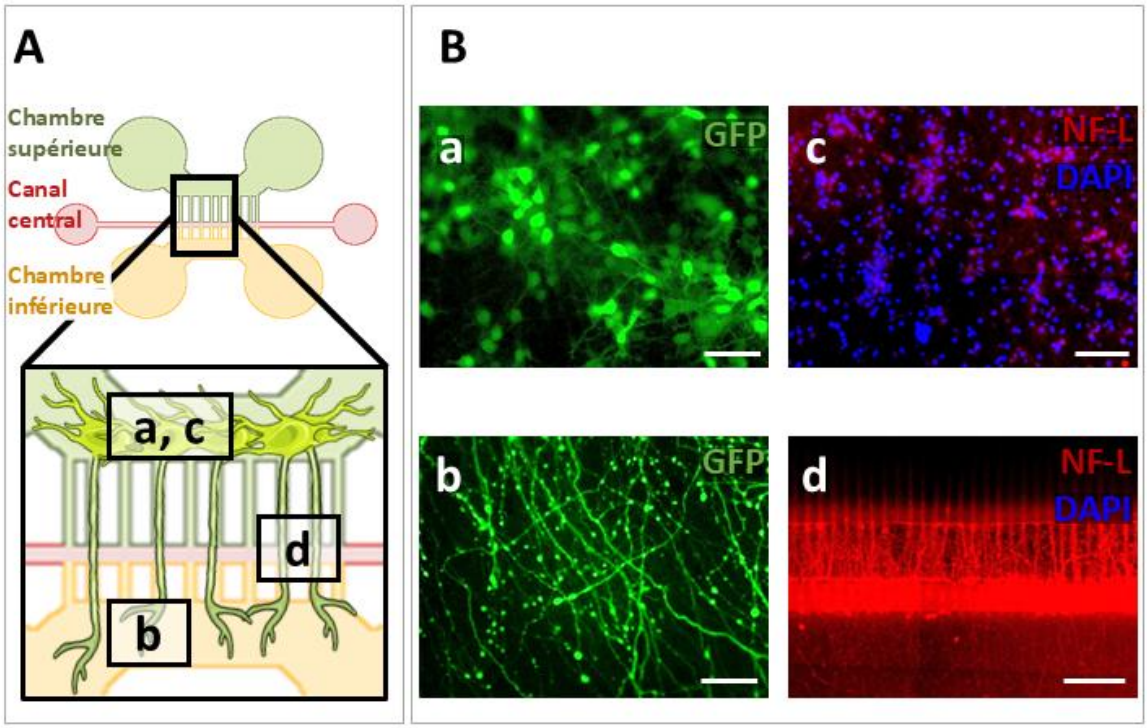


Figure 33. Culture neuronale sur puces microfluidiques.

(A) *Vue schématique des différents compartiments de la puce microfluidique, les zones encadrées a, b, c et d correspondent aux zones d'intérêts visualisables dans la partie B de la figure.* ***(B)*** *L'expression de la GFP après infection virale est présente dès 7 jours de culture aussi bien dans les corps cellulaires sphériques et les prolongements de la chambre supérieure (a) que dans les prolongements au sein de la chambre inférieure (b). Les marquages immunochimiques du NF-L et des noyaux (DAPI) sur des cellules fixées à DIV 14 indiquent la présence de noyaux et de prolongements dans la chambre supérieure (c) alors que seuls les prolongements sont visibles dans le canal central et la chambre inférieure (d). Barres d'échelle :* ***(B)*** *a, b = 50 µm ; c, d = 100 µm.*

4.4.1.3. Lésion spécifique des axones au sein du canal central

Les résultats montrent la présence de prolongements cellulaires spécifiquement dans le canal central exprimant la GFP (**Figure 34A**). La lésion mécanique sectionne les prolongements au sein du canal central, au niveau de la base des micro-canaux supérieurs dans la partie supérieure du canal central jusqu'à la partie supérieure des micro-canaux inférieurs, située dans la partie inférieure du canal central (**Figure 34A**). De plus, après une lésion mécanique, le marquage à la GFP reste toujours visible dans les prolongements immédiatement après la lésion ainsi qu'après 2 h, 24 h et 48 h (**Figure 34Bb ─ e**).

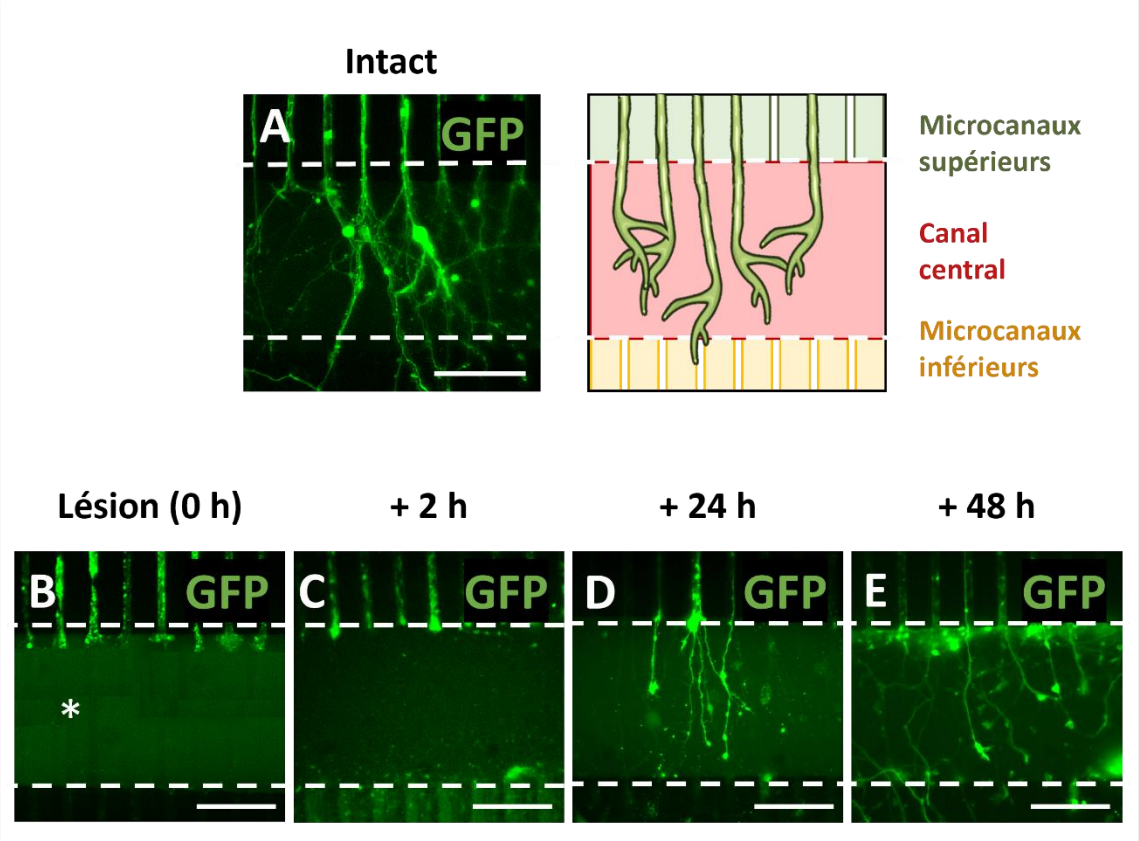


Figure 34. Lésion au sein du canal central d'une puce microfluidique.

***(B)** La lésion des prolongements dans le canal central (*, pointillés blancs) n'affecte pas l'expression et la visibilité de la GFP immédiatement après la lésion (b) et après 2 (c), 24 (d) et 48 h (e) en comparaison de celle des prolongements intacts **(A)**. Barres d'échelle : **A ─ B** = 50 µm.*

4.4.2. Création d'un gradient moléculaire

4.4.2.1. Le milieu diffuse du compartiment le plus rempli vers celui le moins rempli

D'après les calculs réalisés, lorsque 60 µl de milieu ont été ajoutés à la chambre inférieure, 10 µl dans le canal central et 40 µl à celle supérieure, le milieu diffuse du compartiment le plus rempli vers celui le moins rempli pendant au moins 72 h. L'échange de milieu est représenté par Δh correspondant à la différence de hauteur entre les deux volumes au cours du temps. Nous observons que Δh diminue de manière logarithmique au cours du temps. La diminution est rapide dans les premières 24 h suivants l'ajout des différents volumes dans les chambres puis, elle est plus progressive jusqu'à 72 h pour tendre vers l'équilibre (**Figure 35**).

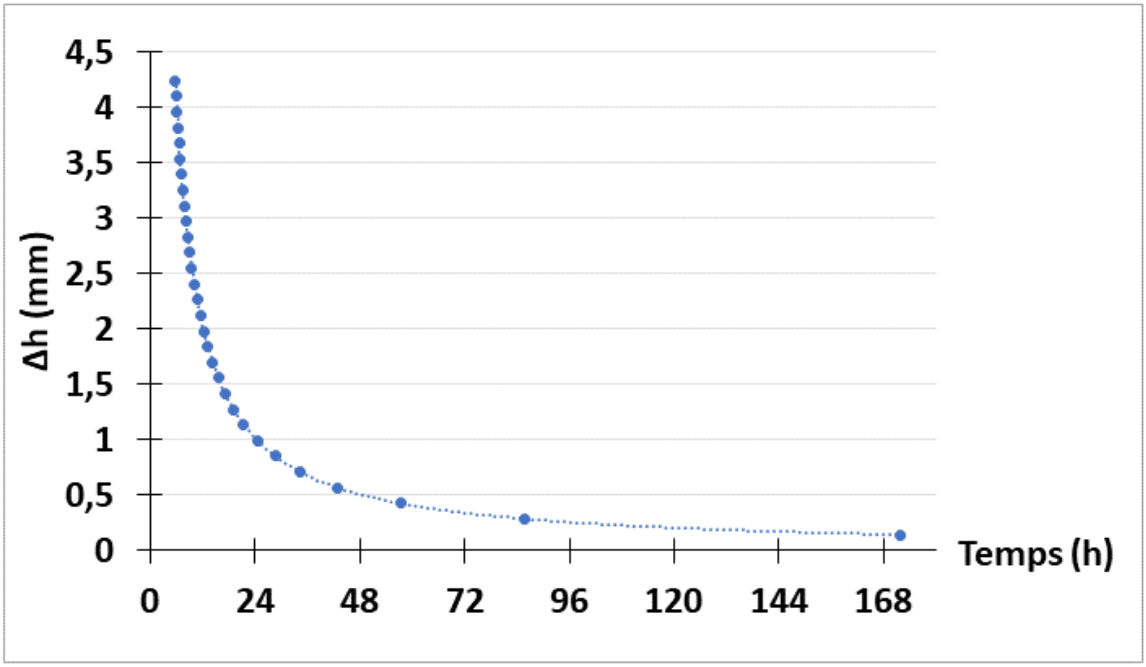


Figure 35. Évolution théorique de la différence de hauteur de milieu (Δh) au sein de la puce microfluidique.

La différence de volumes entre la chambre inférieure et celle supérieure de même dimension, induit une différence de hauteur entre les milieux ajoutés, appelé Δh. Les volumes tendent vers l'équilibre au cours du temps en créant un flux de milieu jusqu'à ce que Δh soit nul.

4.4.2.2. Le gradient de C5a existe pendant 48 h au sein de la puce microfluidique

Le dosage ELISA du C5a a permis de confirmer la diffusion du C5a de la chambre inférieure à la chambre supérieure sur une période de 48 h avec une diminution logarithmique de sa quantité au cours du temps. Au début de l'expérimentation, du C5a dilué à 50 ng/ml a été ajouté uniquement dans la chambre inférieure, tandis qu'il était absent de la chambre supérieure. Dans les premières heures suivant l'ajout du C5a, une concentration élevée est observée dans la chambre inférieure ainsi qu'une faible concentration dans la chambre supérieure, indiquant un phénomène de diffusion dans la puce microfluidique. Puis, les niveaux de C5a mesurés ont diminué de manière continue jusqu'à 48 h dans les deux chambres, suggérant une diffusion progressive et une dilution du C5a (**Figure 36**).

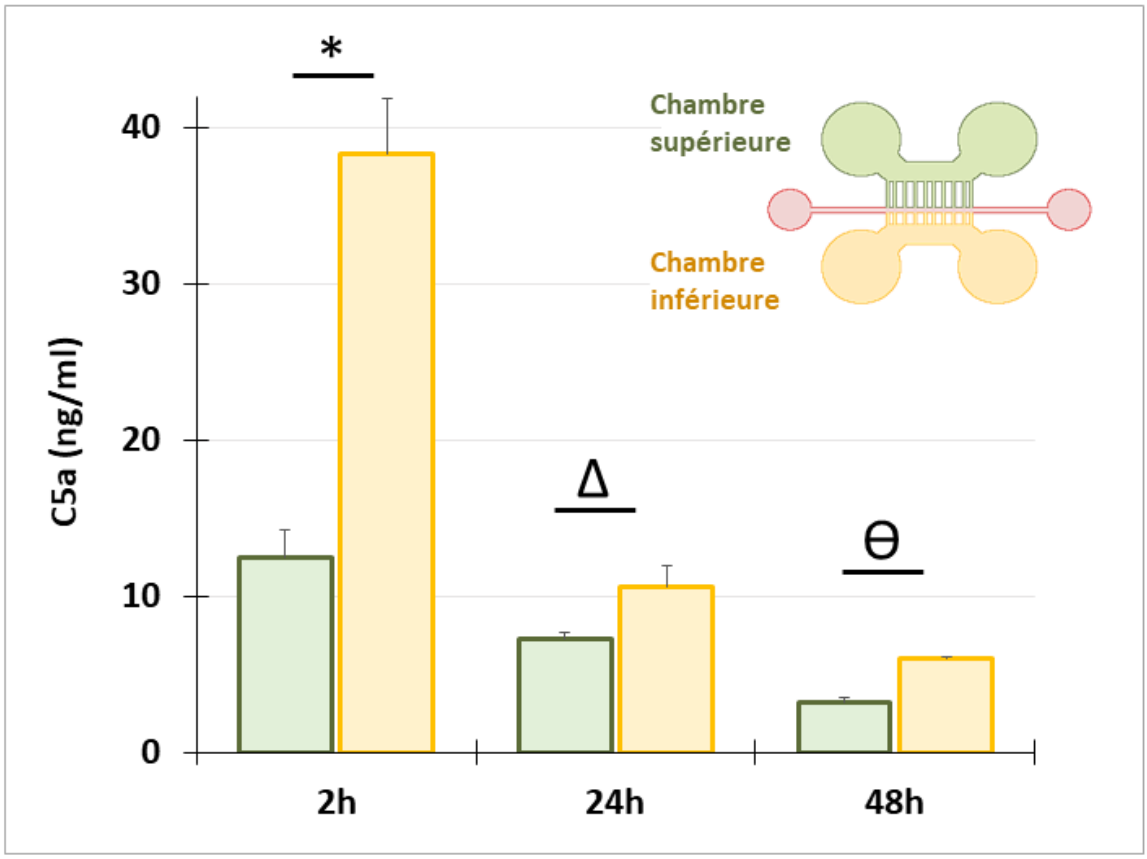


Figure 36. Évolution de la quantité de C5a dans une puce microfluidique.

*Au début de l'expérimentation, le C5a est ajouté uniquement dans la chambre inférieure, tandis que la chambre supérieure n'en contenait pas. Le C5a diffuse vers la chambre supérieure 2 h après son ajout jusqu'à au moins 48h. L'évolution de la quantité de C5a diffusé au cours du temps entre les deux chambres diminue sur 48 h, cependant il n'existe pas de différence significative au cours du temps (test de Friedman sur données appariées). La quantité de C5a dans la chambre inférieure au cours de l'expérimentation reste plus élevée que celle retrouvée dans la chambre supérieure (Chambre supérieure VS inférieure à 2 h : * ; 24 h : Δ ; 48 h : Θ ; p < 0,05, test de Kruskal-Wallis + correction de Bonferroni).*

4.4.3. Le C5a stimule la distance de repousse axonale après une lésion

La distance de la repousse axonale après lésion et au cours du temps a été mesurée sur des cultures de neurones DIV 14 ayant reçu une stimulation par un gradient de milieu (contrôle), + PMX53, + C5a et C5a + PMX53 (**Figure 37A**). Les tests de Kruskal-Wallis indiquent une augmentation significative, dans toutes les conditions, de la repousse axonale à 24 h ($H = 102,04$, $df = 2$, $p < 2,2 \times 10^{-16}$) et davantage à 48 h (#, $H = 134,02$, $df = 2$, $p < 2,2 \times 10^{-16}$). Après ajout de l'antagoniste PMX53, la repousse axonale diminue significativement à 24 h comparée au contrôle (Δ, $p < 0,05$) alors qu'aucune différence significative n'est relevée à 48 h. L'ajout de C5a augmente la repousse axonale à 24 h et 48 h. Cet effet est supprimé après l'ajout de l'antagoniste PMX53 pour être comparable au contrôle ($p < 0,05$) (**Figure 37B**).

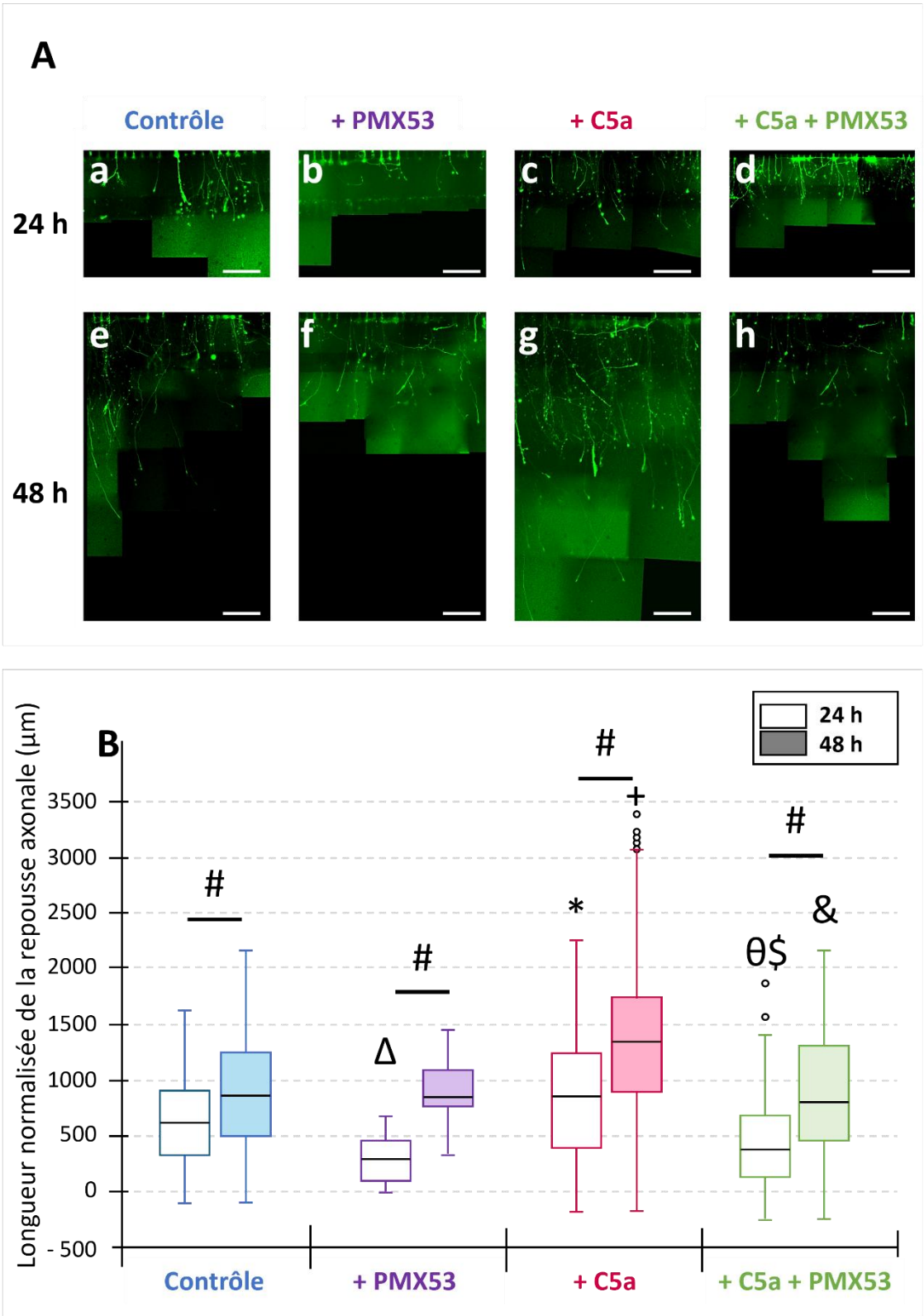


Figure 37. Effet du C5a sur la repousse axonale.

(A) *Les cellules ont été stimulées avec du Milieu (a, e), + PMX53 (b, f), + C5a (50 ng/ml) (c, g) ou + C5a + PMX53 (d, h). La fluorescence verte indiquait les axones. Barres d'échelle : 100 µm.* ***(B)*** *La distance totale de la repousse axonale a augmenté entre 24 h et 48 h dans toutes les conditions (#, p < 0,05, test de Friedman et post hoc Wilcoxon sur données appariées + correction de Bonferroni). Les données indiquent qu'après ajout de PMX53, la repousse axonale diminuait significativement à 24 h comparée au contrôle (Δ, p < 0,05, tests identiques sur données non appariées + correction de Bonferroni), mais était identique à 48 h. L'ajout de C5a a augmenté la distance de la repousse axonale à 24 h et 48 h comparé au contrôle pour les mêmes périodes (24 h : * et 48 h : +, p < 0,05, tests de Kruskal-Wallis sur données non appariées + correction de Bonferroni). Cet effet est supprimé après l'ajout de l'antagoniste PMX53 du C5aR (24 h : $ et 48 h : &, p < 0,05, tests identiques) pour être similaire au contrôle à 48 h, mais inférieur à 24 h (θ, p < 0,05, tests identiques). Boxplots représentant les médianes au centre, les 25ᵉ et 75ᵉ percentiles aux extrémités de la boîte, ainsi que les valeurs minimales et maximales des repousses axonales normalisées par rapport au contrôle à 0 h (n = 12).*

4.4.4. Le C5a stimule la vitesse de repousse des axones

La vitesse de repousse axonale, sur les périodes de 0 ─ 24 h et de 24 ─ 48 h, a été mesurée sur des cultures de neurones DIV 14 ayant subi une axotomie et mis en contact avec un gradient de milieu (contrôle), + PMX53, + C5a et + C5a + PMX53. Les résultats montrent une diminution significative de la vitesse de repousse axonale sur la période de 24 ─ 48 h comparée à celle de 0 ─ 24 h dans toutes les conditions (#, $p < 0,05$) hormis celle avec l'antagoniste PMX53. Le test de Kruskal-Wallis révèle des différences significatives entre les conditions sur les périodes de 0 – 24 h ($H = 147,38$, $df = 2$, $p < 2,2 \times 10^{-16}$) et de 24 – 48 h ($H = 121,46$, $df = 2$, $p < 2,2 \times 10^{-16}$). Cette diminution au cours du temps n'est pas observée dans les conditions en présence de l'antagoniste PMX53. L'ajout de C5a augmente significativement la vitesse de repousse axonale de 0 ─ 24 h et de 24 ─ 48 h par rapport à celle du contrôle ($p < 0,05$). L'ajout de PMX53 annule cet effet et a diminué significativement la vitesse de repousse axonale de 0 ─ 24 h et de 24 ─ 48 h comparée au contrôle ($p < 0,05$) (**Figure 38**).

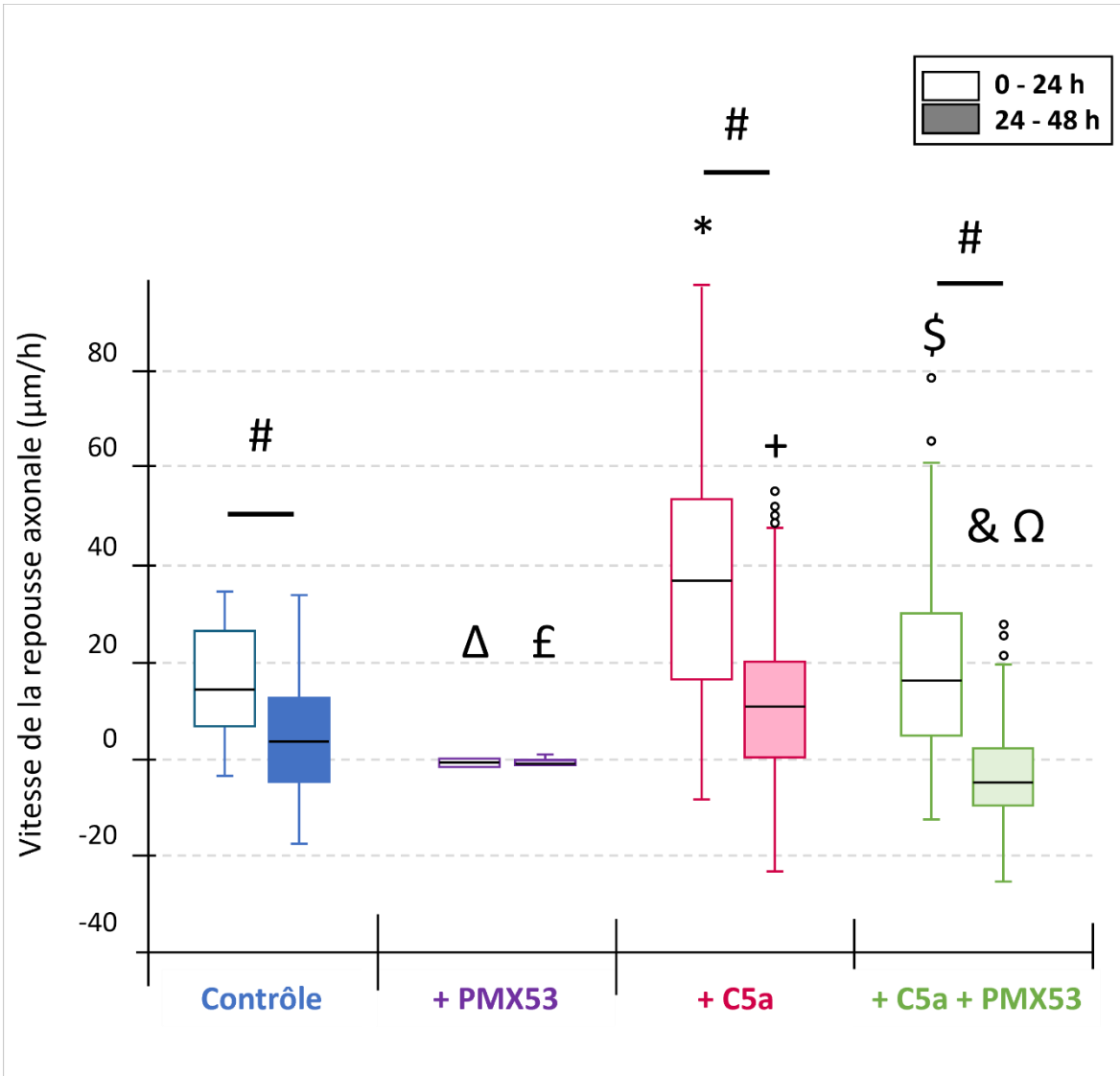


Figure 38. Effet du C5a sur la vitesse de repousse axonale

*Boxplots représentant les médianes au centre, les 25ème et 75ème percentiles aux extrémités de la boîte, ainsi que les valeurs minimales et maximales des vitesses de repousse axonale normalisées par rapport au contrôle à 0 h (n = 12). Les données de la vitesse moyenne de la repousse axonale sur des périodes de 0 – 24 h et 24 – 48 h, selon un gradient de milieu Neurobasal supplémenté en B-27 (contrôle), + PMX53, + C5a (50 ng/ml), et + C5a + PMX53 (500 ng/ml), montrent une diminution significative de la vitesse de repousse entre les temps 0 – 24 h et 24 – 48 h dans toutes les conditions (#, p < 0,05, test sur données appariées), hormis celle + PMX53 (test identique). L'ajout de PMX53 diminue significativement la vitesse de repousse axonale sur les deux périodes comparées au contrôle (24 h : Δ et 48 h : £, p < 0,05, test sur données non appariées). L'ajout de C5a augmente significativement la vitesse de repousse axonale sur 0 – 24 h et 24 – 48 h par rapport au contrôle ainsi qu'en présence du PMX53 (de 0 – 24 h : * pour Contrôle VS + C5a, $ pour + C5a VS + C5a + PMX53 ; de 24 – 48 h : + pour Contrôle VS + C5a, Ω pour + C5a VS + C5a + PMX53 et & pour Contrôle VS + C5a + PMX53, p < 0,05, test sur données non appariées).Les tests statistiques sur données appariées correspondent aux tests de Friedman et post hoc de Wilcoxon avec correction de Bonferroni alors que les tests statistiques sur données non appariées sont les tests test de Kruskal-Wallis et post hoc de Wilcoxon avec correction de Bonferroni.*

4.5. La matrice de collagène chargée en C5a permet la survie des neurones

4.5.1. Libération du C5a par la matrice

Dans le cadre d'une application future dans un modèle de lésion médullaire, la fabrication d'un support de régénérescence à base de collagène a été réalisée de façon à libérer progressivement le C5a au cours du temps. La libération a été quantifiée par dosage immuno-enzymatique (ELISA) sur une période de 52 jours, à partir d'extraits de support incubés dans le milieu de culture pendant 24 h. Les résultats indiquent une libération massive du C5a au 1er jour, suivie d'une libération plus progressive de 2 à 52 jours, pourtant, aucune différence significative n'est observée au cours du temps ($p > 0,05$, test de Friedman) et le C5a n'est pas détecté dans le contrôle (**Figure 39**).

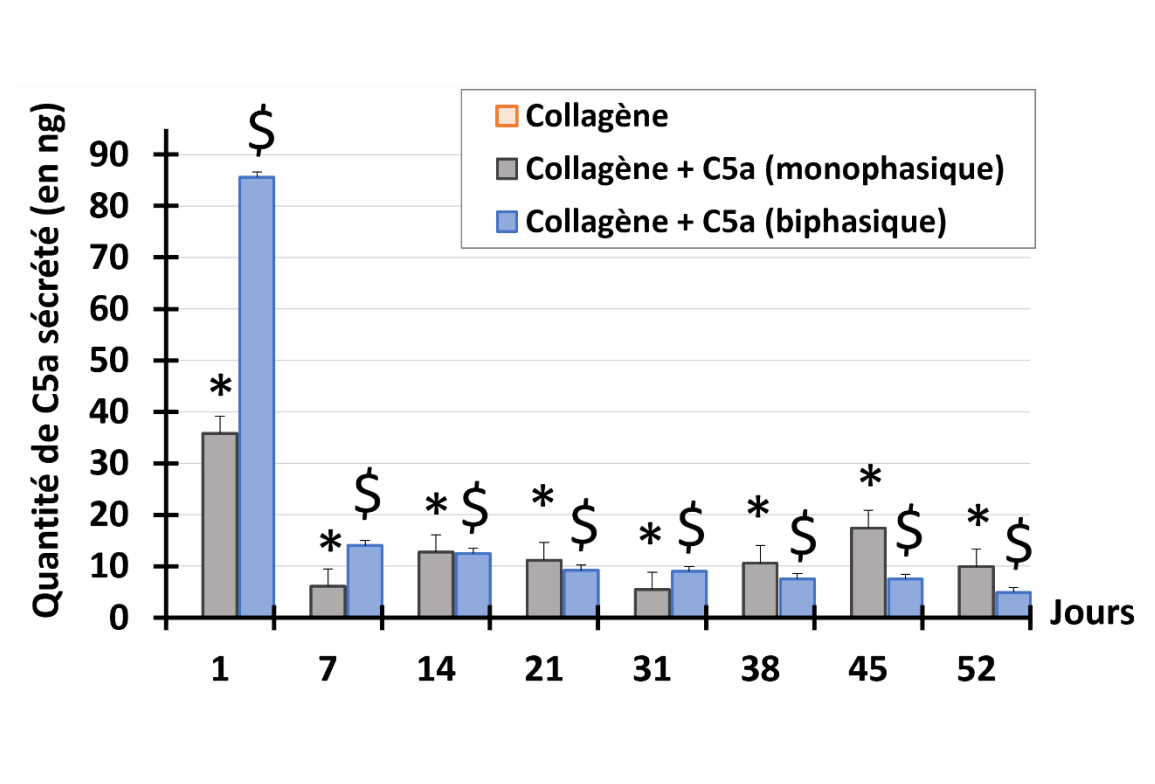


Figure 39. Quantification du C5a libéré les matrices de collagène, chargées en C5a monophasique et biphasique.

Les barres représentent les médianes ± intervalle interquartile de la quantité du C5a (ng) libérée dans 1 ml des extraits de matrice de collagène seul, + C5a monophasique (gris) et biphasique (bleu) dosés aux jours 1, 7, 14, 21, 32, 38, 45 et 52. Le C5a n'a pas été détecté pour la matrice de collagène seule (orange). Une libération rapide est observée dès le 1er jour pour les deux matériaux suivis d'une libération soutenue sur 52 jours. Aucune différence significative n'est observée entre les deux matrices chargées au cours du temps (test de Friedman sur données appariées et Kruskal-Wallis sur données non appariées avec correction de Bonferroni). En revanche, la quantité de C5a libérée des biomatériaux est significativement supérieure comparée à celle du contrôle (et $, p < 0,05, test de Kruskal-Wallis avec des paramètres identiques).*

4.5.2. Les matrices de collagène n'affectent pas la viabilité neuronale

La viabilité des neurones lésés au contact des extraits les matrices de collagène ± C5a (mono ou biphasiques) pendant 72 h a été évaluée par test MTT (*n* = 3). Les résultats indiquent que la viabilité des neurones n'est pas affectée par les extraits des matrices de collagènes ± C5a que ce soit pour les matrices mono ou biphasiques (**Figure 40**).

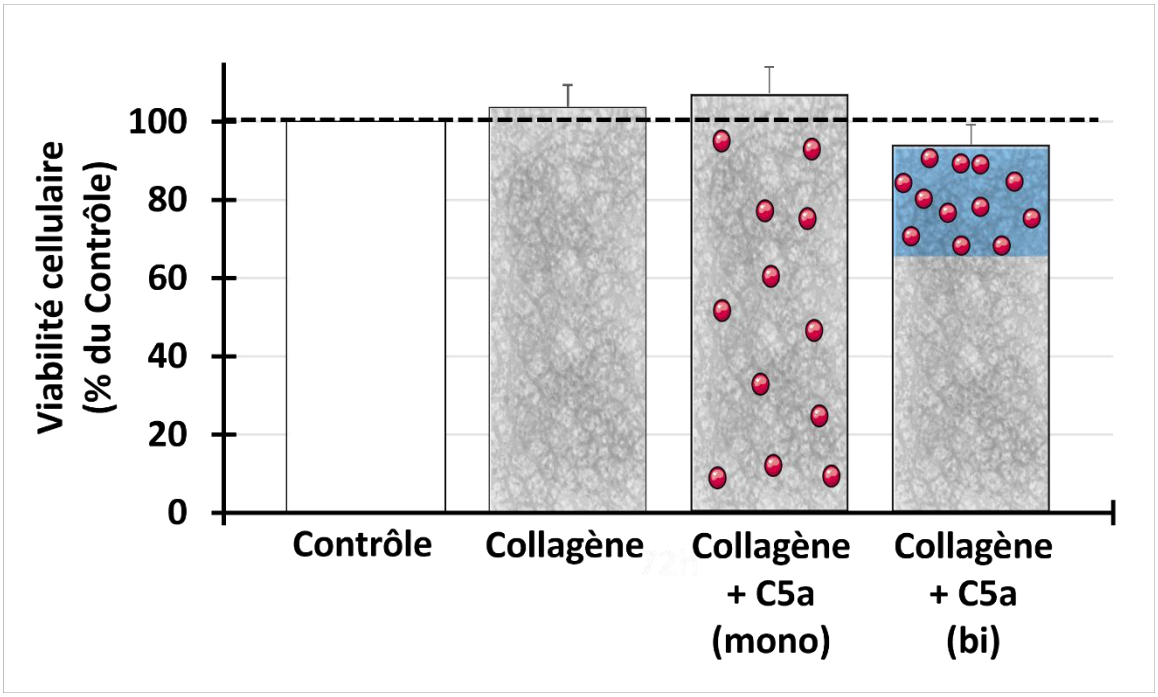


Figure 40. Viabilité des cultures de neurones lésées au contact d'extrait des matrices de collagène ± C5a

Les barres représentent les médianes ± intervalle interquartile du pourcentage de viabilité cellulaire par rapport au contrôle (milieu sans matériau, pointillé à 100 % de viabilité) après une incubation de 24h, 48h, et 72h. Les résultats de viabilité après une incubation de 72 h des cultures de neurones DIV 14 lésées avec les matrices de collagène ± C5a mono- et biphasiques non dilués n'ont pas montré de différence significative comparé au contrôle. Les analyses statistiques n'ont révélé aucune différence significative entre les conditions (test de Kruskal-Wallis sur données non appariées et correction de Bonferroni).

4.5.3. Adhésion des neurones aux matrices

L'adhésion, la viabilité et le développement des prolongements neuronaux ont été étudiées après incubation les cellules DIV 0 avec les matrices de collagène ± C5a (monophasique) pendant 3 semaines. Les images au microscope optique des coupes transversales sphériques des matrices sans C5a montrent une structure interne (**Figure 41Aa**) plus opaque que celle des matrices contenant le C5a (**Figure 41Ab**). Les images en fluorescence issues des essais Live/Dead des cellules vivantes (vert) et mortes (rouge) cultivées sur les matrices de collagène ± C5a indiquent la présence de cellules vivantes jusqu'à 3 semaines, réparties de manière hétérogène et en amas sur les matrices (**Figure 41Ba et b**).

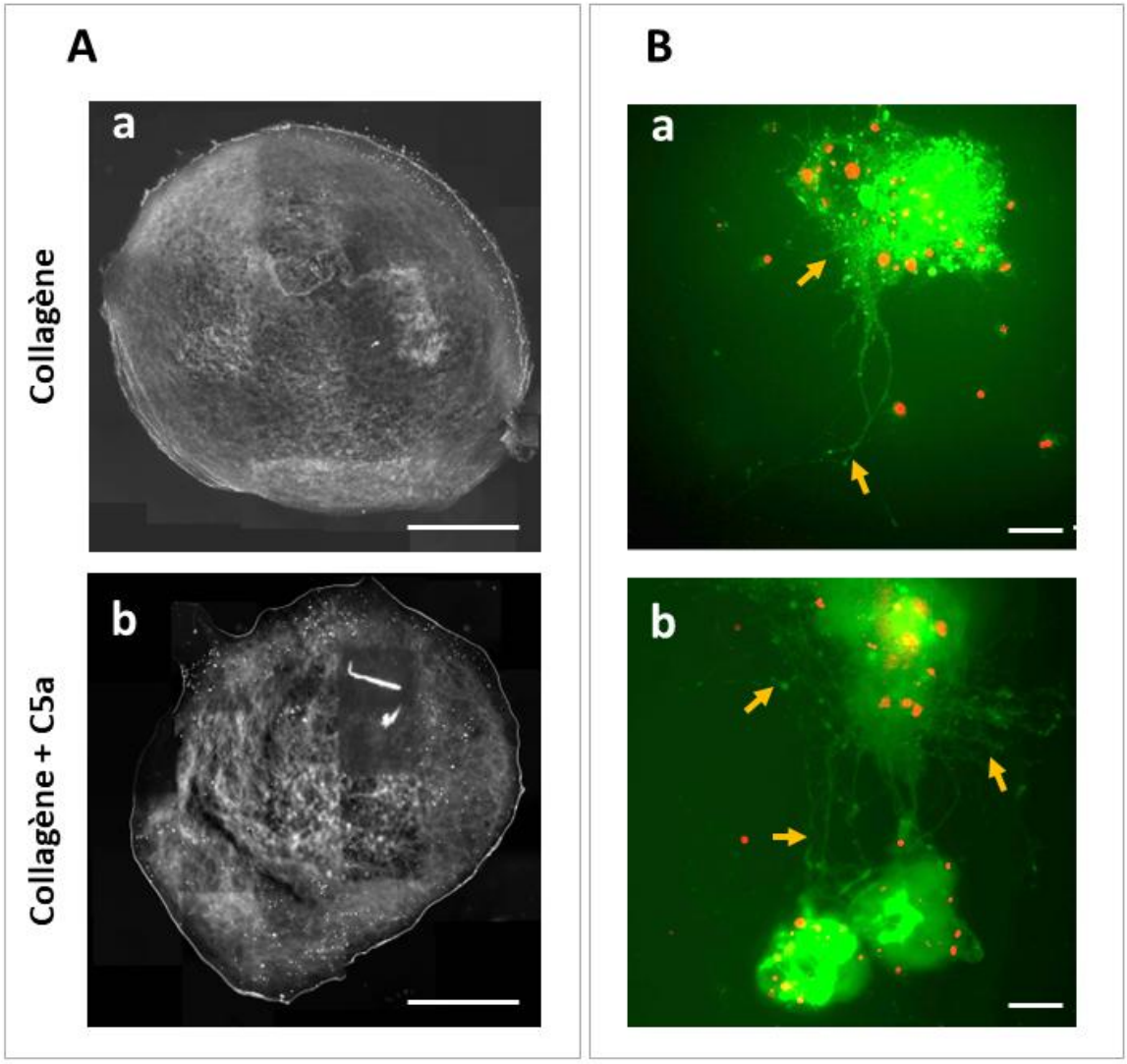


Figure 41. Viabilité des cultures de neurones DIV 0 adhérées sur les matrices de collagène + C5a.

(A). *Les images au microscope optique indiquent une forme sphérique des coupes transversales des matrices de collagène (a) + C5a (b). La matrice de collagène (a) semble avoir une structure interne plus opaque que celle contenant du C5a (b).* ***(B).*** *Les images en fluorescence des cellules vivantes (vert) et mortes (rouge) cultivées sur les matrices de collagène ± C5a indiquent la présence de cellules vivantes jusqu'à 3 semaines, réparties de manière hétérogène et en amas sur les matrices (a et b). Barres d'échelle :* ***(A)*** *a, b = 800 µm ;* ***(B)*** *a — b = 50 µm.*

4.5.4. Les cellules migrent au sein des matrices

4.5.4.1. Le système de maintien cellulaire stérile maintient les supports de régénérescence au contact des cellules pendant 2 semaines

Dans le but de répondre à des besoins spécifiques et en raison de l'absence de ce type de système sur le marché, un système de maintien imprimé en 3D a été développé au sein du laboratoire. En plus d'être stérilisable par UV sans altérer ses propriétés physiques, il a permis de maintenir le support de régénérescence en contact avec des cultures de neurones lésées durant 14 jours, sans mouvement ni entrave au changement de milieu de culture (**Figure 42**). Ce dispositif a permis une interaction optimale entre les matrices de régénérescence et les cellules, favorisant potentiellement l'adhésion et la migration cellulaires.

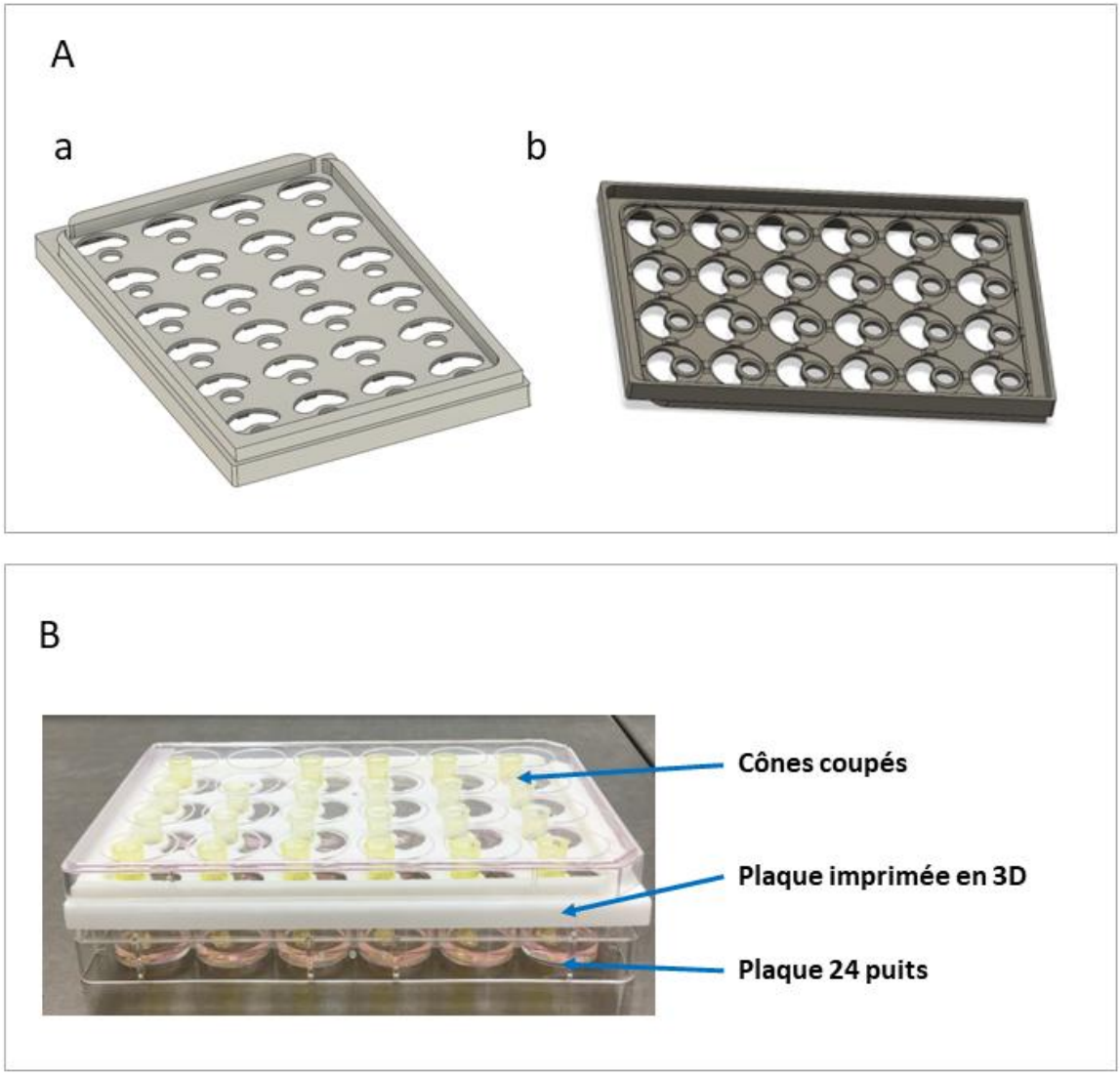


Figure 42. Dispositif de migration cellulaire.

(A) *Vue supérieure (a) et inférieure (b) de la modélisation 3D de la plaque.* ***(B)*** *Dispositif de migration composé de cônes coupés (jaune) imbriqués dans la plaque imprimée en 3D (blanche) positionné sur une plaque de culture à 24 puits.*

4.5.4.2. Des cellules migrent au sein des matrices de collagène avec du C5a

Un marquage au DAPI des noyaux de cellules ayant migré au sein des matrices de collagène a été réalisé sur des coupes de matrice (**Figure 43a, e**). D'après les images par fluorescence, dont la localisation est schématisée (**Figure 43b, f**) des noyaux sont visibles au sein des matrices de collagène ± C5a quel que soit le niveau d'observation dans la matrice (**Figure 43c, d, g, h**).

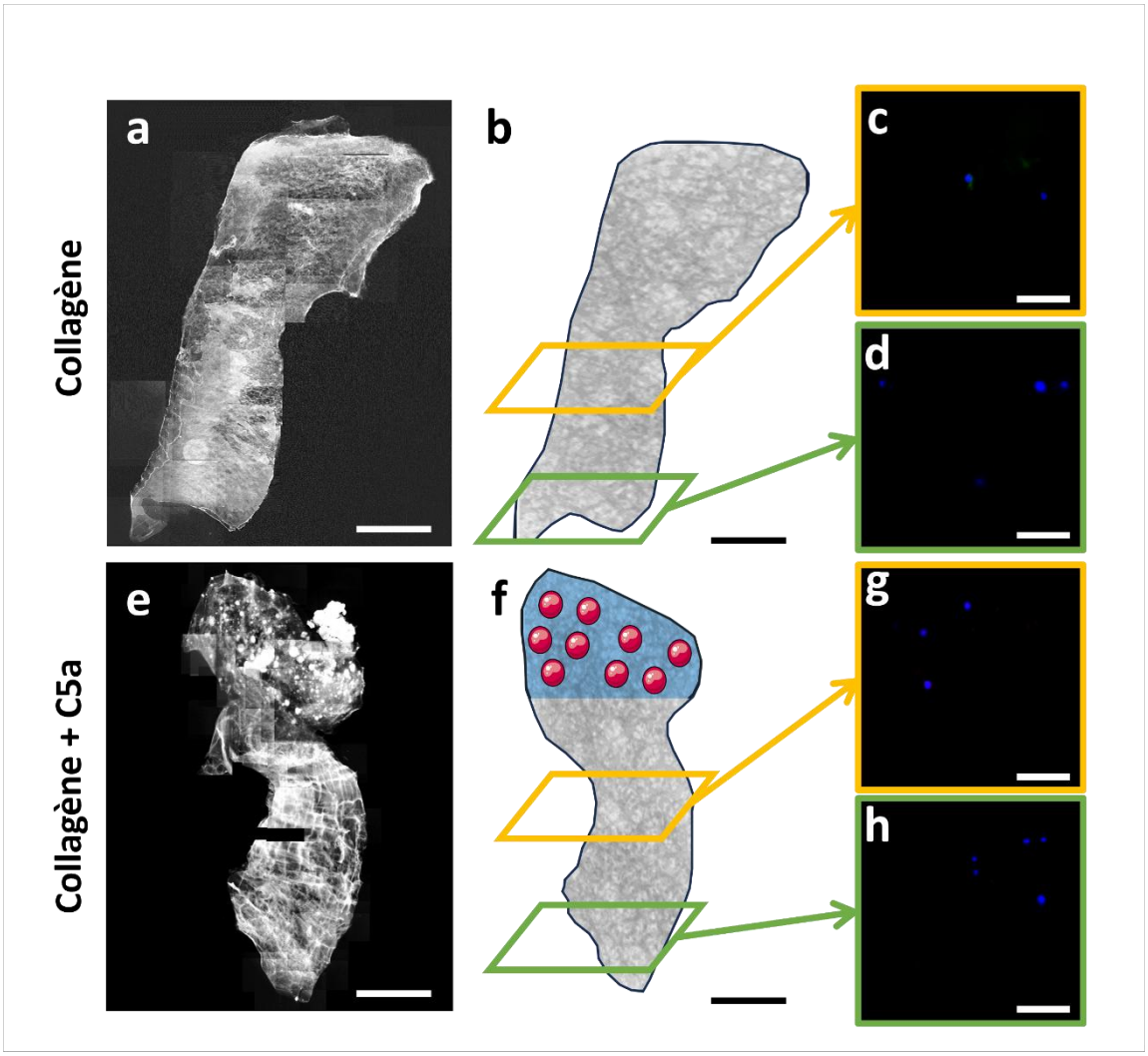


Figure 43. Migration cellulaire au sein des matrices de collagène + C5a.

Les images au microscope optique des coupes longitudinales des matrices montrent une forme allongée (a et e ; représentation schématique en b et f). La matrice de collagène + C5a biphasique (e) présente des structures sphériques chargées de C5a dans la partie supérieure par rapport à la partie inférieure et à la matrice sans C5a (a). Les structures nucléaires marquées au DAPI (bleu) visibles dans les différents niveaux de coupe des matrices témoignent de la présence de cellules (c — h). Barres d'échelle : a, b et e, f = 2 mm ; c, d et g, h = 50 µm.

4.6. Expression du C5aR par les neurones de la moelle épinière de rat

L'observation des cryosections de moelle épinière cervicale de rat (*n* = 3, coloration à l'hématoxyline-éosine), montre que la substance grise, contenant des corps cellulaires et des extensions cellulaires, forme une structure en forme de papillon au sein de la substance blanche, composée principalement d'extensions cellulaires et de moins nombreux corps cellulaires (**Figure 44Aa et d**).

Le marquage immunohistochimique a étudié la distribution de l'expression du C5aR et du filament intermédiaire de neurones, le NF-L, *in vivo* dans la cryosection de la moelle épinière cervicale de rats (*n* = 3). Au sein de la substance grise, la fluorescence révèle une expression intracellulaire autour des noyaux de NF-L ainsi que dans les prolongements membranaires. De même, l'expression du C5aR est localisée sur la membrane cellulaire au niveau des corps cellulaires et des prolongements membranaires (**Figure 44Ba et b**). Dans les images fusionnées, les deux marqueurs sont coexprimés, bien qu'il y ait des régions où seul le C5aR est exprimé (**Figure 44Bc**). Dans la substance blanche, NF-L et C5aR sont coexprimés sur les extensions cellulaires (**Figure 44Be ─ g**). Aucune coloration n'est observée dans les contrôles correspondants (**Figure 44Bd et h**).

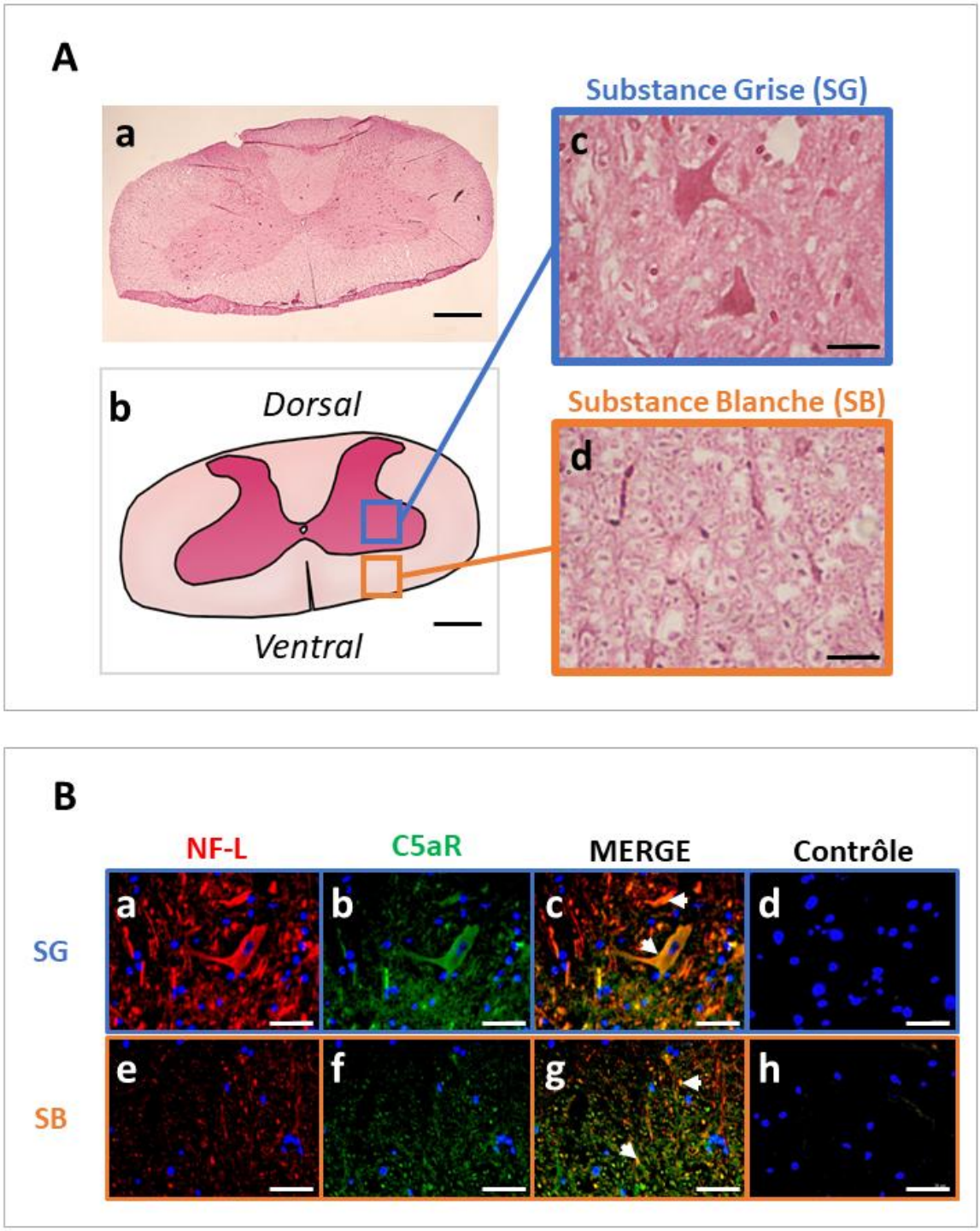


Figure 44. Analyse histologique de la moelle épinière de rat.

(A) Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine sur cryocoupes de moelle épinière cervicale (n = 3). (a) Sur la vue d'ensemble, la substance grise (SG) forme une structure en forme de papillon au sein de la substance blanche (SB). (b) Représentation schématique de la coupe de moelle épinière. Dans la SG (c) et la SB (d), la coloration Hématoxyline-Eosine révèle des noyaux cellulaires en violet et le cytoplasme en rose. (B) Double immunomarquage sur cryosections de SG (a — d) et SB (e — h) pour localiser le NF-L en rouge (a, e) et le C5aR en vert (b, f). Un contrôle est effectué en omettant les anticorps primaires (d, h) et les noyaux ont été contre-colorés en bleu à l'aide de DAPI. Les images révèlent que le C5aR est coexprimé avec NF-L (flèches) dans la substance grise et la substance blanche (c, g). Barres d'échelle : (A) a, b = 500 µm ; c, d = 50 µm ; (B) a — h = 50 µm.

5. Discussion

Ce travail de thèse a permis de relier la molécule du Complément C5a à un nouveau au processus de régénérescence axonale, tout en apportant de nouvelles approches technologiques au sein du laboratoire.

1) Nous avons établi un modèle cellulaire lésionnel *in vitro* après avoir isolé des cultures de neurones issues d'hippocampes embryonnaires pures à 93 %. Ces cellules, une fois matures, ont présenté des caractéristiques similaires à celles des cellules adultes telles que la morphologie, l'absence de prolifération ainsi que l'expression de marqueurs spécifiques révélée par immunocytochimie. Puis, une lésion mécanique standardisée a été réalisée sur les cellules matures, mettant en évidence une perte de 50 % de cellules dès 2 h après la lésion, puis un réarrangement cellulaire. Sur ce modèle cellulaire, nous avons démontré l'absence d'effet toxique du C5a utilisé. Nous avons aussi montré que le C5a est sécrété de manière constitutive et interagit avec le C5aR exprimé à la surface membranaire.

2) Puis, en utilisant des puces microfluidiques, nous avons établi une corrélation entre l'ajout d'un gradient de C5a et la distance ainsi que la vitesse de la repousse axonale après une axotomie.

3) Après avoir démontré l'absence de toxicité du biomatériau et la libération contrôlée du C5a encapsulé dans les microsphères de PLGA de la matrice de collagène, nous avons mis en évidence son potentiel neurorégénérateur *in vitro* sur les cultures matures et lésées. Les résultats préliminaires obtenus ont démontré une adhésion cellulaire ainsi que le développement des prolongements neuronaux. De plus, à l'aide d'un système de maintien développé et imprimé en 3D au laboratoire, nous avons démontré la colonisation du support par les cellules.

4) Enfin, nous avons démontré au sein de la moelle épinière adulte de rat, l'expression *in vivo* du récepteur du C5a par les neurones ainsi que par d'autres types cellulaires.

Alors que le potentiel régénérateur de la protéine du C5a a été démontré dans de nombreux tissus, peu de travaux ont étudié son effet neurorégénérateur après une lésion nerveuse. Ainsi, nos résultats apportent un nouvel axe de travail pour comprendre la régénérescence nerveuse en associant une libération contrôlée du C5a et la repousse axonale après axotomie.

5.1. Développement d'un modèle lésionnel

5.1.1. Les cellules isolées de rat présentent des caractéristiques des neurones adultes

Bien qu'il soit possible de cultiver des neurones à partir d'animaux adultes ou d'autres régions du système nerveux, les cultures de neurones hippocampiques embryonnaires sont préférentiellement utilisées en raison de la population définie de cellules pyramidales et de la densité faible de cellules gliales [194].

Les caractéristiques des cellules isolées de l'hippocampe ont été évaluées par observation microscopique combinée à un marquage immunocytochimique. Nos résultats ont montré l'adhésion de cellules présentant une polarité dans le développement des prolongements cellulaires, caractéristique des neurones hippocampiques [188,194,195]. Ces prolongements s'allongent et forment un réseau dense après 14 jours de culture. À ce stade, l'immunocytochimie a révélé la présence de 93 % de neurones différenciés post-mitotiques, présentant un réseau de neurites, et de 7 % d'astrocytes riches en prolongements, ce qui est cohérent avec la littérature. La proportion relative des cellules gliales au sein des cultures de neurones hippocampiques embryonnaires a été reportée comme étant inférieure à 10 % [196,197], cependant, notre travail pourrait être compléter par un marquage supplémentaire des cellules microgliales.

Dans la littérature, les neurones hippocampiques de rat vivants, cultivés dans des conditions identiques aux nôtres, ont montré une morphologie neuronale saine, c'est-à-dire polarisée et sans signe d'apoptose, et des caractéristiques électrophysiologiques normales et proches des neurones adultes [188]. L'étude de la maturité des neurones embryonnaires cultivés a indiqué la présence de caractéristiques des neurones adultes dès 7 jours de culture telles qu'une augmentation du niveau des protéines synaptiques et des facteurs de croissance, mesurée par immunocytochimie et Western blot. Après 14 jours, la diminution du transport vésiculaire observée par microscopie à fluorescence a indiqué la maturation des cellules aussi bien sur des supports de culture standard [194] qu'au

sein de puces microfluidiques [191]. Ainsi, la maturation des cellules dépend de leur environnement, tel que le support et le milieu de culture. Tout comme dans le système nerveux, les neurones cultivés sont post-mitotiques [198] et dépendent du soutien trophique des cellules gliales, qui génèrent plusieurs facteurs de survie cellulaire, de prolifération et de différenciation, soutenant les fonctions physiologiques neuronales au stade adulte [1]. En culture, ce soutien est partiellement assuré par le milieu nutritif [188,189], ce qui permet de diminuer la quantité d'astrocytes proliférant en culture par l'utilisation d'antimitotiques [195] tout en obtenant des neurones matures [191].

Après s'être assuré de la maturation adéquate de notre modèle cellulaire, nous avons intégré l'aspect lésionnel pour évaluer la robustesse des neurones face à des perturbations mécaniques, situations fréquemment rencontrées *in vivo* dans des lésions du SNC.

5.1.2. Les neurones matures survivent et réorganisent leur cytosquelette à la suite d'une lésion mécanique

L'étude de l'effet des lésions mécaniques sur des cultures de neurones matures est cruciale pour comprendre les mécanismes de réponse et de réparation neuronale dans des simulations de blessure. Dans notre cas, les lésions appliquées à l'ensemble de la culture de neurones et celles appliquées uniquement aux axones isolés au sein des puces font partie des modèles les plus simples.

Dans ce contexte, 50 % des neurones adultes ont survécu à la lésion mécanique. Ce résultat n'est pas surprenant, car par immunohistochimie, il a été montré sur culture neuronale et modèles animaux que la probabilité de survie neuronale est inversement proportionnelle à la proximité du site de la lésion [199,200]. Les neurones survivent selon leur capacité à réorganiser leur cytosquelette au niveau lésionnel, limitant les fuites du contenu intracellulaire [201]. En effet, nos résultats ont démontré la persistance intracellulaire de la protéine fluorescente GFP à l'extrémité des axones lésés des neurones survivants au sein

des puces microfluidiques. Ce phénomène est accompagné d'une rétractation de l'extrémité des axones lésés, visible après 2 h. Cette dégénérescence axonale rétrograde, due à la déstabilisation du cytosquelette et à une dépolymérisation des microtubules des axones, se met en place dans l'heure suivant la lésion [202,203]. Après 24 h, une repousse axonale a été observée, résultat cohérent avec la littérature [177,202] et indiquant la présence de mécanismes de régénérescence spontanée au sein des neurones adultes dans un milieu de culture enrichi [203].

Notre étude qualitative de la réponse neuronale après une lésion peut être complétée par des études temporelles et quantitatives de l'expression des filaments d'actine présents à l'extrémité des axones lésés ainsi que des mécanismes sous-jacents induisant un réarrangement spontané. La réorganisation du cytosquelette après une lésion mécanique représente un prérequis pour la régénérescence nerveuse, notamment la repousse axonale [66,203]. Dans ce travail, la repousse axonale a été étudiée au sein d'une puce microfluidique et selon différents environnements contenant le C5a.

Conclusion : Partie 1

Après 14 jours de culture, nos résultats ont montré la présence de neurones et d'une minorité d'astrocytes au sein des cultures hippocampiques, toutes deux matures et de caractéristiques identiques aux cellules adultes en termes de morphologie et d'activités cellulaires. La pureté des cultures de neurones était proche de celle retrouvée dans la littérature.

La réorganisation du tapis cellulaire à la suite d'une lésion mécanique ainsi que de l'extrémité axonale lésée au sein d'une puce microfluidique montrent une rétraction axonale dans les premières heures suivant la lésion, suivie d'une réorganisation du cytosquelette à l'extrémité lésée, ce qui constitue un prérequis pour la régénérescence axonale.

En conclusion, ces résultats permettent d'établir un modèle lésionnel *in vitro* simple et fidèle à la physiologie des neurones adultes.

5.2. Le C5a stimule la repousse axonale après une lésion

5.2.1. Les concentrations de C5a utilisées ne sont pas toxiques

Contrairement à ce qui se passe dans l'organisme, en culture, les mécanismes de dégradation du C5a sont moindres et son temps de demi-vie est supérieur, c'est pourquoi les neurones peuvent être plus sensibles face à la quantité de C5a mise à leur contact. Les concentrations de C5a testées n'ont pas démontré de cytotoxicité sur les cultures de cellules hippocampiques matures ayant reçu une lésion mécanique. Ces résultats sont en accord avec la littérature. En effet, aucune toxicité du C5a n'a été rapportée pour des concentrations de 50 à 100 nM, mis en contact avec des neurones lésés [177]. Au contraire, la concentration croissante allant de 10 à 1000 nM de C5a aurait un effet neuroprotecteur dans un milieu neurotoxique, induit par un excès de glutamate [176].

5.2.2. Le C5a active le C5aR neuronal

Au sein de nos cultures matures, les cellules expriment le gène codant pour le C5. Le C5 est la forme stable et inactive du C5a. En condition de stress ou pathologique, le C5 se clive en deux fragments : le C5a et le C5b [157,160]. Dans la littérature, il est connu que les neurones ainsi que les astrocytes sont capables de sécréter localement du C5 [204] en réponse à des signaux de stress de cytokines pro-inflammatoires [205], en condition pathologique [206] ou encore de manière constitutive [207,208]. Cependant, aucun article n'a réussi à quantifier le C5a constitutif en raison de sa faible quantité par rapport à la sensibilité des tests ELISA. Or, nos résultats quantifient 63 ± 3 ng/ml de C5a à un état basal ainsi qu'en présence d'une lésion mécanique, suggérant une activation du C5 par des voies non inflammatoires. Il est normal de constater une certaine mortalité cellulaire dans les cultures neuronales, relative à une combinaison de stress propre à la culture

cellulaire et à l'adaptation des neurones à un environnement artificiel [189]. Cette mortalité peut avoir des effets en cascade, y compris la libération de cytokines pro-inflammatoires et d'autres signaux qui peuvent affecter les cellules restantes et potentiellement leur production de C5a.

Le C5a est connu comme étant le seul ligand naturel du C5aR. Le gène qui code pour le C5aR est exprimé au sein des cultures hippocampiques matures et la protéine du C5aR est exprimée à la surface des neurones intacts et lésés. Tout comme dans les études sur la sécrétion du C5a, la découverte de son récepteur sur les neurones a déjà été démontrée sur les neurones hippocampiques [209] ainsi que sur les astrocytes matures [210] en culture. La nouveauté de ce travail réside dans l'étude de la phosphorylation du C5aR à la membrane des neurones après son interaction avec le C5a. Nos résultats montrent une phosphorylation du C5aR par le C5a quantifié dans le surnageant sur des cultures DIV14 et directement après ajout d'une quantité de C5a plus importante. La phosphorylation est absente avec l'ajout de l'antagoniste PMX53. Avec un Kd de 1,4 nM, l'interaction du C5a avec son récepteur est considérée comme forte [160]. Cette faible valeur signifie que le C5a se lie très efficacement à son récepteur même à de très faibles concentrations pour réaliser un effet biologique au travers plusieurs voies d'activation [160].

Après une LME, l'expression du C5aR augmente [211], c'est pourquoi, quantifier l'expression génique du C5a ainsi que la présence protéique de son récepteur au sein de nos cultures nous fournirait des informations complémentaires sur la quantité de récepteur disponible pour une application thérapeutique à visée neurorégénérative.

5.2.3. Intérêt de l’utilisation d’une puce microfluidique

L’étude de la stimulation de la régénérescence axonale par le C5a a été réalisée en utilisant une puce microfluidique, modèle de régénérescence axonale *in vitro* décrit précédemment par Taylor et al. [190]. Ce modèle nous a permis d’obtenir des cultures de neurones matures [191] en ensemençant les corps cellulaires dans la chambre supérieure de la puce. Les axones ont pu être isolés en poussant au sein de compartiments séparés et ainsi lésés. Cela constitue un avantage significatif par rapport aux méthodes traditionnelles, où l’interaction entre le corps cellulaire et l’axone rend difficile l’étude spécifique de la dynamique de repousse axonale [177]. De plus, la configuration de la puce nous a permis de manipuler l'environnement chimique.

En effet, dans cette étude, la conception des micro-canaux dans la puce a permis de manipuler l’environnement chimique autour des différentes parties des cellules en appliquant un gradient stable de C5a grâce à un contrôle de la diffusion protéique à travers les microstructures, exposant progressivement les axones à des concentrations croissantes de C5a.

Nos résultats montrent que du C5a a été perçu par le corps cellulaire des neurones au sein de la chambre supérieure dès 2 h après l’application du gradient et ce sur 48 h. L’utilisation d’un gradient moléculaire est utile pour étudier les réponses cellulaires selon les variations spécifiques des concentrations de C5a qui sont aussi présentes lors du neurodéveloppement ainsi que de la régénérescence tissulaire [157].

5.2.4. Le gradient de C5a stimule la repousse axonale après une axotomie

Au sein de la puce microfluidique, la régénérescence axonale est stimulée afin que la repousse se réalise en direction des zones de plus grande concentration en C5a. De plus, l'ajout de l'antagoniste du C5aR, le PMX53, a inhibé la phosphorylation du C5aR dans la culture cellulaire et a considérablement inhibé la repousse axonale. Cela montre que la repousse axonale est dépendante du C5a et de son interaction avec le C5aR. De manière surprenante, l'ajout de milieu a également augmenté la phosphorylation du C5aR et, dans une moindre mesure, la repousse axonale à 24 h. Ce résultat peut être expliqué par la sécrétion de C5a par les neurones de manière constitutive dans le milieu de culture comme indiqué précédemment. De plus, ce résultat a démontré un effet dose-dépendant de la concentration de C5a sur la repousse axonale. Cet effet a aussi été rapporté dans l'article de Guo et al. où 50 nM de C5a favoriseraient une repousse ainsi qu'une meilleure récupération fonctionnelle que des concentrations plus élevées [177].

Nous pourrions approfondir ces recherches en quantifiant les récepteurs phosphorylés ainsi que leur localisation après l'application du gradient. Cela pourrait nous fournir des informations supplémentaires sur les mécanismes de signalisation intracellulaire sous-jacents à la phosphorylation du C5aR, l'internalisation et la désensibilisation des récepteurs ainsi que les interactions intercellulaires après stimulation au C5a. Comprendre ces mécanismes pourrait expliquer la diminution des effets à 48 h après une application prolongée du gradient.

D'après la littérature, la phosphorylation du C5aR pourrait entrainer une cascade de signalisations intracellulaires impliquant des facteurs de croissance neuronale, comme la PI3K/Akt, connue pour favoriser la régénérescence axonale [91]. Un effet indirect pourrait aussi être mis en jeu. Il a été rapporté que l'interaction du C5a avec son récepteur, à la membrane des fibroblastes de la pulpe dentaire, stimulait la croissance neuronale par l'augmentation de la libération de facteurs neurotrophiques [174]. Or, au sein de nos cultures de neurones, 7 % d'astrocytes étaient présents et exprimaient le C5aR. De nombreux articles indiquant la sécrétion

de facteurs neurotrophiques par les astrocytes et leur rôle dans la récupération fonctionnelle sont recensés [60,212,213]. Ainsi, quantifier la variation de concentration des facteurs neurotrophiques tels que BDNF, NGF ou encore GDNF pourrait nous donner des indices sur les voies de signalisation activées après la stimulation au C5a.

Nos travaux démontrent aussi un effet du C5a sur l'augmentation significative de la vitesse de repousse axonale après une lésion mécanique. En effet, alors que la vitesse moyenne de repousse axonale du contrôle était de 24 µm par heure, nos résultats révèlent que l'ajout de C5a a augmenté la vitesse de repousse axonale à 32 µm par heure. Cela est particulièrement intéressant, car les neurones adulte présentent une capacité de repousse axonale lente, avec des vitesses rapportées allant d'environ 2 à 10,7 µm par heure [214,215]. Les différences dans les modèles expérimentaux pourraient expliquer la disparité entre nos résultats et les données précédemment rapportées. Néanmoins, cela souligne l'importance du rôle modulateur du C5a sur la repousse des prolongements après une axotomie, ce qui est crucial en cas de lésion du SNC.

La repousse axonale sur de grandes distances n'est pas le seul défi rencontré lors de la régénérescence des circuits nerveux. En effet, la reconnexion aux cellules cibles par des synapses fonctionnelles au sein d'un environnement inhibiteur est un point à ne pas négliger. Ainsi, placer des cellules cibles dans la puce microfluidique au regard des axones lésés et en étudier la communication intercellulaire au sein d'un milieu inhibiteur permettrait de compléter ces résultats.

Conclusion : Partie 2

Les concentrations de C5a utilisées au cours de nos travaux ne sont pas toxiques pour les cultures de neurones différenciées. Ces résultats sont cohérents avec la littérature, où les concentrations croissantes de C5a dans un milieu neurotoxique induit par un excès de glutamate n'ont pas montré de toxicité, mais plutôt une augmentation de la neuroprotection.

L'utilisation des puces microfluidiques a permis d'étudier la régénérescence axonale isolée dans un environnement contrôlé par l'application d'un gradient de C5a.

Nos travaux ont démontré que la phosphorylation du C5aR par le C5a stimule la longueur et la vitesse de repousse axonale. Bien que d'autres défis comme la reconnexion fonctionnelle au sein d'un environnement inhibiteur doivent être surmontés, l'ajout d'un gradient de C5a d'une concentration optimale a favorisé une meilleure repousse axonale en comparaison d'une concentration constitutive ou trop importante. Ce résultat souligne l'importance du C5a dans la repousse axonale dirigée.

Ces résultats contribuent à une meilleure compréhension des processus cellulaires impliqués dans la régénérescence nerveuse et pourraient avoir des implications importantes pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à promouvoir la repousse axonale après des lésions du système nerveux.

5.3. Intérêt de l’utilisation d’une matrice de collagène chargée de microsphères de PLGA encapsulant du C5a pour la neurorégénérescence

La régénérescence tissulaire implique la notion de bioactivité. Cette dernière suggère la capacité du biomatériau non seulement à ne pas être toxique pour les tissus environnants mais également à promouvoir une réponse biologique spécifique dans une application donnée. Dans notre cas, le biomatériau est un substitut de la matrice extracellulaire qui fournit un soutien à l’adhésion et cellulaire et permet de restaurer les réseaux neuronaux endommagés.

5.3.1. La matrice de collagène permet une libération prolongée du C5a

L’étude de la cinétique de libération du C5a a été réalisée pour les matrices contenant du C5a chargées de manière homogène (monophasique) ou hétérogène (biphasique). Les résultats ont montré une libération de la totalité du C5a encapsulé dans l'environnement après 52 jours, représentant 0,13 ± 0,01 µg (Bergmann, 2021). Selon l'analyse de la cinétique de libération du C5a, il a été observé une libération significative le premier jour, appelée « burst release ». Ce phénomène se caractérise par un relargage massif de la majorité du facteur encapsulé dès le premier jour après l’immersion des microsphères dans le liquide [216] suivi d’une libération contrôlée sur 52 jours. Pourtant, aucune différence significative de libération du C5a entre le jour 1 et le jour 52, ni entre les matrices monophasique ou biphasique n'a été observée.

Selon Kalaji et al., la libération d'un facteur encapsulé dans des microsphères de PLGA varie en fonction de la taille des microsphères et de la densité de la matrice dans laquelle les particules sont encapsulées [184]. En effet, plus les microsphères sont petites (1 à 50 µm), plus leur libération est grande en raison d’une plus grande surface de contact avec l’environnement par unité de volume [184]. D’après les

travaux relatifs à ce biomatériau, la taille des microsphères encapsulées était de 25,51 ± 9,83 µm, c'est-à-dire relativement petites [217].

Pour comprendre et contrôler la cinétique de libération, il est essentiel d'étudier la cinétique de dégradation de la structure de collagène associée aux microsphères de PLGA. En effet, la libération d'un facteur dépend de sa répartition au sein des microsphères, de sa diffusion à travers la matrice de collagène et du processus combiné d'érosion et de diffusion de cette dernière [218]. En moyenne, 10 ng de C5a étaient libérés chaque jour. Nos résultats indiquent que moins de 50 ng/ml de C5a étaient suffisants pour stimuler la repousse axonale. Cependant, d'après la littérature, l'administration de 50 nM de C5a *in vivo* après une période de latence post-lésionnelle module la réaction immunitaire *in vivo* et stimule la repousse axonale ainsi que la récupération fonctionnelle chez le rat [177].

L'activation aiguë de C5aR par le phénomène de « Burst release » peut désensibiliser les récepteurs au C5a ou encore stimuler l'inflammation, tandis qu'une activation prolongée ou à faible niveau pourrait soutenir les processus régénérateurs. Cette dépendance contextuelle est évidente dans des études où l'inhibition retardée de C5aR, plutôt que le blocage immédiat, a entraîné des résultats aggravés après une lésion de la moelle épinière, suggérant une fenêtre thérapeutique temporelle sensible [219]. Cette question a aussi été explorée en administrant du C5a par voie intrapéritonéale avant ou après une LME. Lorsque le C5a a été injecté 24 heures avant ou immédiatement après la lésion, la fonction locomotrice, évaluée pendant 9 semaines après la lésion de la moelle épinière, a été altérée de manière significative. Cependant, lorsque le traitement au C5a a été administré 24 heures après la lésion, la fonction locomotrice s'est significativement améliorée. Ces résultats suggèrent que l'administration différée de C5a après une lésion favorise la régénérescence axonale et la récupération fonctionnelle chez la souris [177]. C'est pourquoi, il est nécessaire de revoir la cinétique de libération du C5a encapsulé pour une libération retardée. Ainsi, la moduler en augmentant la taille des microsphères au sein d'une matrice de collagène pourrait modifier la cinétique de libération du C5a et donc possiblement la repousse axonale.

5.3.2. Biocompatibilité de la matrice de collagène chargée de C5a

La biocompatibilité est une propriété cruciale lors de la sélection du biomatériau. Cette dernière s'assure que le biomatériau n'engendre pas de réactions immunitaires ou de toxicité cellulaire lorsqu'il est introduit dans l'organisme et que la réponse à son utilisation dans l'application donnée sera appropriée. Les résultats ont montré une absence de toxicité des matrices de collagène contenant ou non du C5a au contact des cultures composées essentiellement de neurones. Ces résultats concordent avec ceux observés dans la littérature. En effet, les composants de collagène, les microsphères de PLGA ainsi que C5a ont été démontrés de nombreuses fois comme étant non toxiques pour différentes cellules et organismes [182,216,217]. De plus, les processus de fabrication ne sont pas toxiques, comme démontré sur les fibroblastes et les cellules souches de la pulpe dentaire lors du dépôt du brevet. Ainsi, le biomatériau n'est pas toxique à court terme pour les cellules neuronales, ce qui permet d'en étudier les effets directs sur les cellules environnantes et évaluer sa bioactivité.

5.3.3. La matrice de collagène stimule l'adhésion cellulaire et le développement des neurites

Le collagène est utilisé pour ses propriétés favorisant l'adhésion cellulaire par l'intermédiaire des récepteurs aux intégrines [141,220]. Nos résultats aux essais Live/Dead™ montrent que les cellules embryonnaires hippocampiques adhérent dès l'ensemencement et développent de longs prolongements sur la matrice de collagène chargé de manière homogène en C5a au cours des trois semaines de culture. Le marquage au Live/Dead™ a démontré la présence en faible quantité de cellules mortes adhérées à la matrice de collagène. Lors de l'encensement de neurones en culture, certaines cellules peuvent effectivement mourir. En effet, avec le même type de test de viabilité, il a été montré que 80 % des neurones corticaux embryonnaires de rats survivaient après ensemencement et cette proportion diminuait à 50 % après 14 jours au sein d'un gel de collagène [221]. Nos résultats montrent que les cellules adhérées ont des prolongements mesurant jusqu'à 500 ─ 600 µm, ce qui concorde avec la littérature [221,222]. L'architecture tridimensionnelle et poreuse de la matrice de collagène constituent un environnement naturel pour la croissance des prolongements neuronaux et la survie des neurones et des cellules gliales [141,223,224]. De plus, un lien entre concentration du collagène, rigidité de la matrice ainsi que stimulation de la croissance des neurites a été mis en évidence par microscopie confocale et test de traction cellulaire [225,226]. Cette interaction pourrait expliquer la variabilité de la survie neuronale ainsi que de la croissance des neurites selon les différentes formulations du support de régénérescence [227]. Ces résultats convergeront vers l'optimisation des propriétés mécaniques des matrices de collagènes pour maximiser la régénérescence neuronale [228–230].

5.3.4. La matrice de collagène chargée du C5a stimule la migration cellulaire

La migration cellulaire sur culture hippocampique a été réalisée à l'aide du support de migration spécifiquement développé et utilisé dans ce travail. Ce dernier a permis de maintenir la matrice de collagène chargée en C5a au contact du tapis cellulaire mature et lésé pendant 7 jours sans blesser les cellules ni entraver ses propriétés d'hydratation. Ce résultat met en évidence la migration et la colonisation de la matrice par la présence de marqueurs nucléiques des cellules hippocampiques au sein des supports de régénérescence, mais le type cellulaire n'est pas précisé. Ainsi, il sera nécessaire de réaliser des immunomarquages du neurofilament (NF-L) pour marquer spécifiquement les neurones ainsi que du *Glial Fibrially Astrocyte Protein* (GFAP) pour les astrocytes. Des travaux antérieurs peuvent nous orienter, car ils ont montré que les astrocytes répondent à un gradient de C5a au sein d'une matrice de collagène [222] par une migration de l'ensemble de la cellule après 7 jours, ce qui suggère dans notre cas plutôt une migration astrocytaire au sein de la matrice.

En ce qui concerne la croissance axonale au sein de la matrice, les résultats de l'adhésion cellulaire ainsi que de la stimulation sur puce microfluidique suggèrent une croissance des prolongements neuronaux au sein des matrices en direction du C5a encapsulé et non des corps cellulaires. Après les prétests d'immunomarquage réalisés sur cryocoupes, l'observation des marquages au microscope à épifluorescence a montré un bruit de fond important en raison de l'absorption des marqueurs par la matrice de collagène, ce qui suggère la mise en place d'un autre type de protocole. Ce dernier reposerait sur l'infection virale ainsi que l'observation tridimensionnelle des marquages sur cellules vivantes au microscope.

Conclusion : Partie 3

La matrice de collagène de collagène contenant des microsphères de PLGA encapsulant le C5a a été utilisée dans l'objectif d'une application dans la régénérescence nerveuse. Les résultats montrent que le biomatériau n'est pas toxique pour les cultures de neurones. De plus, l'ajout des cellules au stade embryonnaire sur les matrices de collagène a montré un développement des prolongements au cours du temps ainsi qu'un faible taux de mortalité cellulaire, ce qui est cohérent avec les propriétés de biocompatibilité, d'adhésion et de croissance des neurites des matrices de collagène.

Nous avons également montré une stimulation du recrutement cellulaire au sein des matrices, mais l'identification précise des types cellulaires ayant migrés nécessite des marquages spécifiques. Toutefois, des études antérieures suggèrent une migration des astrocytes en réponse au C5a.

La cinétique de libération du C5a évaluée sur 52 jours a indiqué une libération initiale rapide et massive le premier jour, suivie d'une libération contrôlée. Cette dernière est influencée aussi bien par la taille des microsphères de PLGA et par la densité de la matrice de collagène. La modulation de la libération du C5a pourrait améliorer la régénérescence axonale en optimisant la fenêtre thérapeutique décrite comme cruciale dans de nombreux travaux.

Ces résultats ouvrent la voie à de nouvelles approches thérapeutiques en utilisant le C5a en faible quantité et à libération contrôlée au sein d'une matrice de collagène comme facteur neurorégénérateur.

5.4. Expression du C5aR dans la moelle épinière

Le système du Complément est essentiel dans l'immunité innée, jouant un rôle actif dans la défense de l'organisme [160]. Son activation est étroitement liée au processus inflammatoire, notamment par l'activation de la molécule C5 en C5a, molécule chimiotactique et activatrice des cellules myéloïdes via le récepteur du C5a (C5aR) [231]. Ce mécanisme a été démontré dans le SNC après une lésion [205]. De nombreuses études ont tenté de contrôler la neurotoxicité inflammatoire en inhibant l'effet du C5a par la suppression ou la mise en silence des gènes codant pour le C5aR et l'utilisation d'inhibiteurs du C5a [160,231]. Cependant, cette approche n'a pas montré d'effet récupérateur sur les fonctions perdues sur le long terme [171]. En effet, l'inflammation a été démontrée comme étant étroitement liée à la mise en place des processus de régénérescence [157]. Plus précisément, la neuroinflammation active les astrocytes, met en place de la cicatrice gliale limitant l'expansion lésionnelle et stimulant la récupération fonctionnelle [171]. L'effet du C5a dans la régénérescence médullaire chez le rat [177] ainsi que dans la croissance axonale de culture de neurones [174,177] fournissent davantage d'indices sur la dualité du rôle du C5a dans le SNC [177,232].

Nos résultats montrent l'expression du récepteur du C5a par les cellules de la moelle épinière adulte de rat, y compris par les neurones. Ces résultats sont cohérents et connus dans la littérature. En effet, l'expression du récepteur au C5a a été rapportée dans la moelle épinière sur les cellules gliales telles que les astrocytes [205], les oligodendrocytes [233] et les cellules microgliales [205]. L'expression du récepteur au C5a augmenterait lors de la neuroinflammation après une lésion médullaire (Dong Q, 2015) ainsi que lors des maladies neurodégénératives [234]. Nos résultats montrent également que les neurones médullaires expriment le C5aR, suggérant une implication dans des fonctions non inflammatoires.

Par hybridation *in situ* combinée à l'immunomarquage, l'expression constitutive du récepteur au C5a a été démontrée au sein du SNC sur divers sous-ensembles de neurones de l'hippocampe ainsi que du cortex, induisant une augmentation calcique intracellulaire après son interaction avec le C5a [176]. Cet article souligne également la variation de l'expression du C5aR au cours du temps et selon certaines conditions. Par exemple, l'expression accrue du récepteur au C5a au cours du neurodéveloppement est impliquée dans la migration des précurseurs neuronaux ainsi que la formation des réseaux neuronaux [235], avec une diminution mais une persistance à l'âge adulte [167,176].

La diversité des sous-populations de neurones au sein de la ME, leur hétérogénéité ainsi que leur réponse spécifique face à la lésion [236–238] et aux traitements thérapeutiques tendent à la complexification de notre modèle cellulaire afin d'étudier le potentiel neurorégénérateur du C5a *in vitro* sur un réseau neuronal et dans un milieu inhibiteur.

Conclusion : Partie 4

Nos résultats ont montré l'expression constitutive du C5aR dans la ME sur les neurones et les cellules gliales. Ces observations suggèrent l'implication du C5a dans des fonctions autres que celles liées à l'initiation de l'inflammation et sur des cellules non circulantes.

La présence de C5aR sur les neurones en condition basale et sa variation après une lésion indiquent que ces résultats pourraient être exploités pour développer des interventions thérapeutiques.

Bien que ces résultats ouvrent la voie à de nouvelles applications thérapeutiques, il est nécessaire de clarifier les interactions entre les cellules après l'ajout de C5a, ainsi que l'effet de ce dernier sur les processus neurorégénératifs.

En conclusion, ces résultats préliminaires sont essentiels pour établir un modèle adapté à l'étude de la régénérescence médullaire.

6. Conclusion générale

Dans la littérature, de nombreux travaux ont démontré le rôle de la protéine du Complément C5a dans la régénérescence tissulaire. Pourtant, son utilisation potentielle comme molécule neurorégénératrice est peu étudiée. Dans le cadre de ce travail, nous avons exploré le rôle du C5a dans la régénérescence neuronale après une lésion physique/mécanique. Nos résultats montrent que le C5a constitutif interagit avec son récepteur, le C5aR, pour avoir un effet sur la repousse axonale. L'ajout d'un gradient de C5a stimule la vitesse et l'augmentation de la longueur des axones régénérés, soulignant son potentiel thérapeutique. L'encapsulation du C5a au sein d'une matrice de collagène a permis sa libération progressive ainsi que l'adhésion et le recrutement cellulaire au sein du support. Plusieurs types cellulaires expriment le C5aR dans la moelle épinière, suggérant une interaction avec le C5a.

Ces résultats apportent une nouvelle perspective sur les mécanismes de repousse neuronale en positionnant le C5a comme molécule neurorégénératrice et ouvrent de nouveaux axes de développements thérapeutiques visant à récupérer les fonctions médullaires et plus généralement du système nerveux central après une lésion.

7. Perspectives

Importance de l'effet neurorégénérateur du C5a dans un environnement inhibiteur de la repousse axonale

Dans cette thèse, nous avons évalué l'effet *in vitro* du C5a sur la repousse axonale après une lésion en utilisant deux approches. La première consistait à créer un gradient moléculaire de C5a dans une puce microfluidique et la seconde consistait à incorporer le C5a au sein d'une matrice de collagène à libération contrôlée. Nos résultats ont montré que le C5a stimule significativement la repousse axonale, le recrutement cellulaire ainsi que l'adhésion des neurones et la croissance des neurites au sein d'une matrice de collagène. Alors que le C5a est bien connu pour son rôle dans la modulation de l'inflammation ainsi que la survie neuronale, l'innovation de ce travail réside dans l'utilisation du C5a comme molécule neurorégénératrice, favorisant une repousse dirigée des axones sur de longues distances. Cependant, pour approfondir notre compréhension des mécanismes impliqués, il est essentiel de considérer la complexité du SNC par la présence d'autres types cellulaires au sein de la moelle épinière avec lesquels les neurones interagissent [239,240].

Les astrocytes sont des cellules impliquées dans le guidage axonal, par la sécrétion de facteurs neurotrophiques comme le BDNF ou encore le NGF [241], la synaptogenèse et la maturation des synapses [1]. Cependant, après une lésion médullaire et sous l'effet des cytokines inflammatoires comme l'IL-1β, le TNF-α et le TGF-β, les astrocytes deviennent réactifs [242]. Ils participent alors à la formation de la cicatrice gliale et à la surproduction des molécules de la MEC comme les CSPGs, qui représentent un obstacle majeur à la régénérescence nerveuse [59,243].

Les CSPGs sont une classe de chaîne de glycosaminoglycanes sulfatés qui constituent les inhibiteurs les plus abondants de la régénérescence nerveuse, pouvant persister jusqu'à plusieurs mois après une lésion [54,244,245]. Les CSPGs interagissent avec les récepteurs neuronaux comme les *Protein Tyrosine Phosphatase σ* (PTPσ), les *Leukocyte common Antigen-Related* (LAR) ainsi que les *Nogo Receptor* (NgR) pour activer des voies de signalisation intracellulaire comme RhoA/ROCK ce qui provoque la rétractation des axones et empêche la repousse des axones endommagés à travers la zone lésée [246–248]. Ces inhibitions entravent la régénérescence de la moelle épinière [118] ainsi que la repousse axonale dans des modèles de cultures neuronales [249–251].

De ce fait, évaluer l'efficacité thérapeutique d'une matrice de collagène combinée au C5a dans un environnement inhibiteur par les CSPGs permettrait de compléter notre compréhension sur les mécanismes de régénérescence axonale et les interactions intercellulaires. Ces données obtenues dans des conditions plus complexes seraient d'avantages représentatives de celles obtenues en clinique. Des expérimentations *in vitro* et *in vivo* sont actuellement menées dans notre laboratoire avec des cultures neuronales exposées à des CSPGs sécrétées par les astrocytes réactifs.

7.1. Culture primaire d'astrocytes

Le protocole utilisé a été mis au point par l'équipe INP (Marseille, France). Des cultures primaires d'astrocytes ont été obtenues à partir des cortex d'embryons de rats Wistar à E18,5 par dissociation enzymatique et mécanique (*n* = 30). Le surnageant résultant de cette dissociation a été filtré puis centrifugé pendant 10 min à 700 rpm à température ambiante. Le culot a ensuite été suspendu dans 2 ml de milieu Astro 10 %, composé de MEM, enrichi avec 10 % de SVF, 0,6 % de D-glucose, 2 mM de L-glutamine, 0,1 mg/ml de sodium de pyruvate, 100 UI/ml de pénicilline-streptomycine et 2,5 µg/ml de Fungizone. Puis, 40000 cellules/cm² ont été ensemencées dans des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre avant d'être incubées dans un environnement humide à 37 °C et avec 5 % de CO2. Le milieu cellulaire Astro 10 % a été renouvelé 3 fois par semaine.

À confluence, les cellules ont été triées pour éliminer les cellules non astrocytaires selon une adaptation du protocole proposé par Ferrer-Acosta et al. ainsi que Yu et al. [242,252] (**Figure 45A**). Le milieu de culture est remplacé par deux rinçages successifs au PBS. Les cellules non astrocytaires présentes au sein des cultures ont été retirées mécaniquement par des frappes manuelles et dans les deux plans de l'espace pendant 5 min dans du PBS puis toutes les 15 min pendant 1 h dans du milieu Astro 10 %. Les cellules non astrocytaires flottantes ont été éliminées par le renouvellement du milieu avec 7 ml de milieu Astro 10 %. Après le tri, les astrocytes obtenus présentent une morphologie homogène avec un corps cellulaire étalé et des courts prolongements (**Figure 45B**).

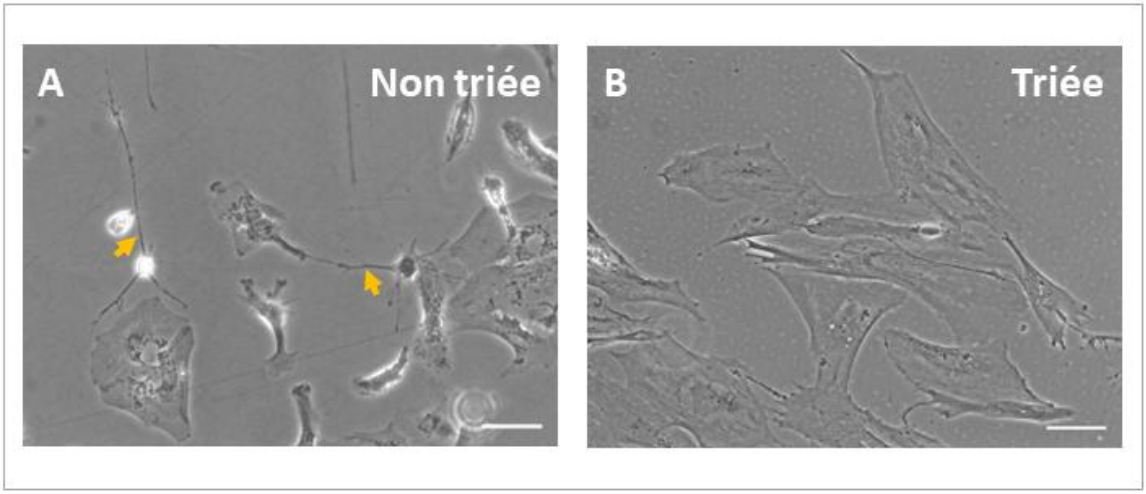


Figure 45. Évolution de la morphologie des cellules corticales avant et après tri cellulaire.

(A) *L'observation des cellules obtenues à partir du cortex embryonnaire de rat à E 18,5, cultivées dans du milieu Astro 10 % pendant 1 semaine (n = 30) montre des morphologies hétérogènes. Certaines cellules ont un corps cellulaire distinct avec des longs prolongements fins (flèches) tandis que d'autres ont un corps cellulaire étalé et des prolongements courts et peu abondants.* ***(B)*** *Après tri mécanique sur des cultures confluentes, la morphologie cellulaire est plus homogène avec des corps cellulaires étalés et de courts prolongements. Barres d'échelle : 50 µm.*

Une caractérisation par immunomarquage (n = 3) a montré que 99 ± 0,8 % des cellules corticales après le tri expriment le marqueur GFAP (*, $, p < 0,05) (**Figure 46Ad et B**), spécifique des astrocytes, tandis que 1 ± 0,8 % expriment le NF-L, un marqueur des neurones différenciés. Aucune expression de NeuroD2 (**Figure 46Aa et B**), marqueur des neurones indifférenciés, ni d'Olig2 (**Figure 46Ac et B**), marqueur des oligodendrocytes, n'a été observée. Aucun marquage n'a été observé dans le contrôle (**Figure 46Ae**).

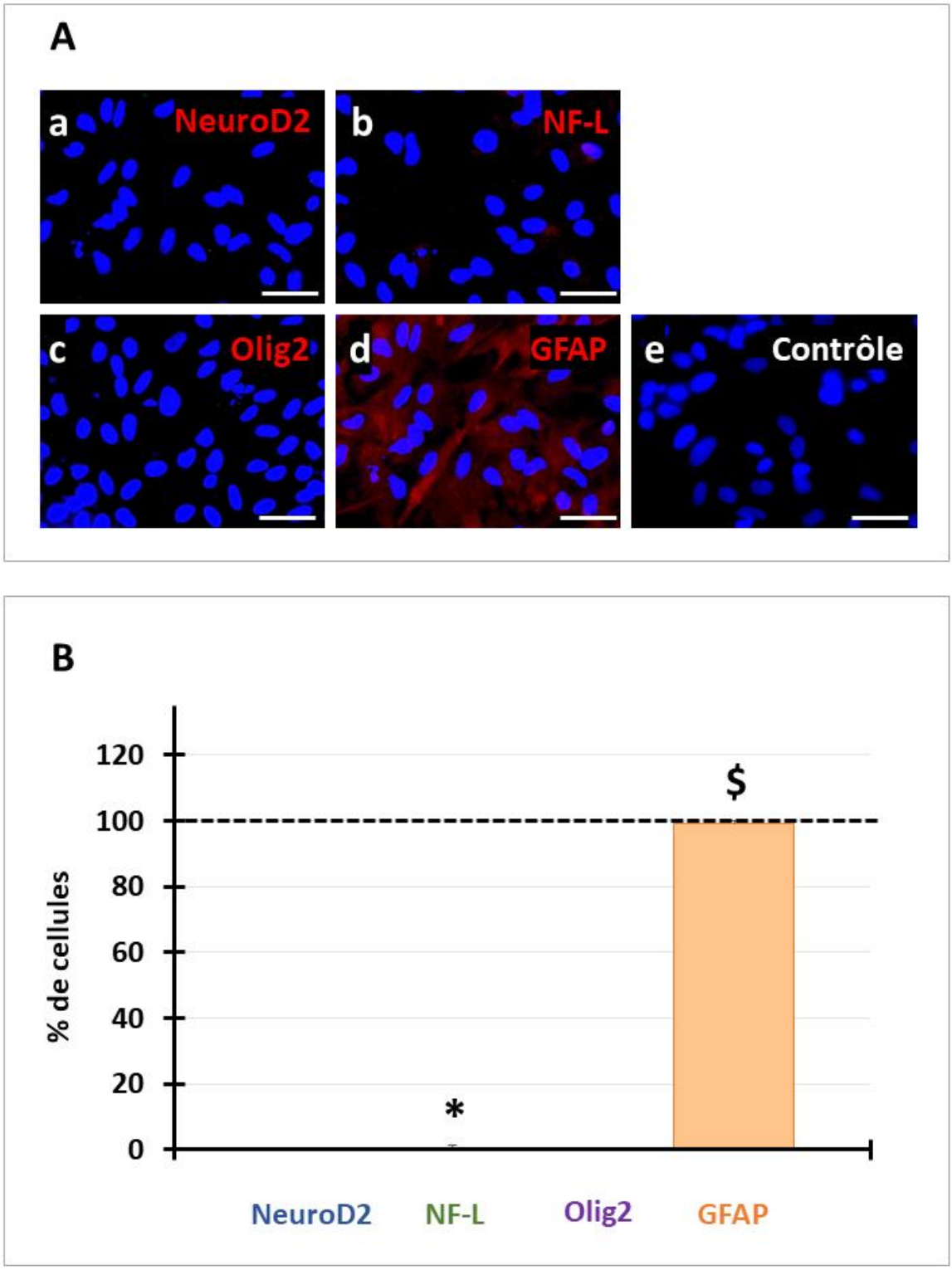


Figure 46. Répartition des neurones et cellules gliales dans des cultures d'astrocytes.

***(A)** Sur des astrocytes triés et fixés à confluence, l'immunomarquage indique la présence de l'expression du NF-L, marqueur des neurofilaments intermédiaires des neurones différenciés (b) ainsi que celle du GFAP, marqueur des astrocytes (d). Les marqueurs NeuroD2, indicateur des neurones indifférenciés (a) ainsi que d'Olig2, marqueur des oligodendrocytes (c) ne sont pas exprimés. Aucun marquage n'a été observé dans le contrôle. Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). Barres d'échelle : a ─ e = 50 µm. **(B)** La quantification en pourcentage du nombre de cellules marquées montre que les cultures d'astrocytes sont composées de 99 ± 0,8 % de cellules exprimant le GFAP ($, p < 0,05, test de Kruskal-Wallis sur données non appariées et correction de Bonferroni) et de 1 ± 0,8 % de cellules exprimant le NF-L (*, p < 0,05, test identique) et aucune cellule n'exprime le marqueur de NeuroD2 ni d'Olig2.*

7.2. Culture primaire d'astrocytes réactifs

Nous avons cherché à obtenir des astrocytes réactifs avec une augmentation de la sécrétion de CSPGs. Le TGF-β1, principale cytokine induisant la formation de la cicatrice gliale, a été utilisé pour stimuler la production des CSPGs via la voie Smad2/Smad3 *in vivo* chez le rat [253,254] et sur des cultures d'astrocytes corticaux [242,253]. Selon le protocole de Zou et al., le TGF-β1 (T7039, Merck Millipore) a été reconstitué à 1 µg/ml dans une solution de 4 mM de HCl contenant 1 mg/ml de BSA. Ensuite, les astrocytes triés ont été cultivés à 2×10^5 cellules par puits dans une plaque 6 puits avec du milieu Astro 10 %. À confluence, les tapis cellulaires ont été incubés avec 2 ml de milieu Astro sans sérum pendant 24 h. Puis, les astrocytes ont été stimulés avec 20 µl par puits de TGF-β1 à 1 µg/ml pendant 5 jours [242] ou avec une lésion mécanique pendant 24 h. Dans les conditions sans TGF-β1, un volume identique de solution de dilution a été ajouté. Puis, les CSPGs ont été quantifiés par dosage ELISA dans les surnageants suivants :

- Intacts ± TGF-β1
- Lésé ± TGF-β1

Le test ELISA développé au sein du laboratoire incubait les puits d'une plaque 96 puits traitée (Nunc Maxisorp), durant toute la nuit à 4 °C, avec 30 µl de surnageants purs ou une gamme de CSPGs (CC117, Merck Millipore) dilué en HBSS, avec des concentrations allant de 300 ng/ml à 0 ng/ml. Le lendemain, les sites non spécifiques ont par la suite été bloqués avec 300 µl par puits de PBS + 2 % de caséine pendant 30 min à température ambiante. Puis, les puits ont été incubés avec 50 µl d'anticorps IgM CS-56 anti-souris CSPGs (C8035, Sigma-Aldrich) dilué au 1 : 500 pendant 2 h à température ambiante. Après une incubation avec 50 µl par puits d'anticorps de chèvre anti─ souris IgG et IgM conjugué HRP (AP130P, Merck Millipore) dilué à 80 ng/ml pendant 45 min à température ambiante, chaque puit a été incubé 20 min avec 100 µl par puits de TMB. Entre chaque étape, les puits ont été vidés et rincés 3 fois avec 300 µl par puits de PBS avec 0,5 % de caséine 0,1 % de Tween-20. Cette solution a été utilisée pour la dilution des anticorps. La densité optique de chaque puit a été déterminée avec spectrophotomètre à 650 nm. Les données obtenues ont été exprimées en concentration (ng/ml) selon la courbe densité optique en fonction de la concentration de la gamme. Par la suite, les concentrations ont été analysées statistiquement par les tests de Shapiro-Wilk, de Kruskal-Wallis puis le test post hoc de Dunn.

Nos résultats ont montré une augmentation significative des CSPGs après une lésion mécanique et en l'absence de stimulation au TGF-β1, suggérant que cette méthode est suffisante pour induire une production accrue de CSPGs (**Figure 47)**. Cependant, contrairement aux résultats de Yu et al., nous n'avons pas observé d'augmentation des CSPGs en réponse au TGF-β1 seul [242]. Un ajustement des conditions expérimentales, comme le prétraitement des surfaces de cultures, pourrait améliorer la stimulation des sécrétion de CSPGs [253]. De plus, afin de caractériser la réactivité des astrocytes face aux différents stimuli il faudrait quantifier l'expression du CPSGs par western blot [253], quantifier l'immunomarquage du GFAP sur cellules vivantes [242] et quantifier les facteurs neurotrophiques sécrétés.

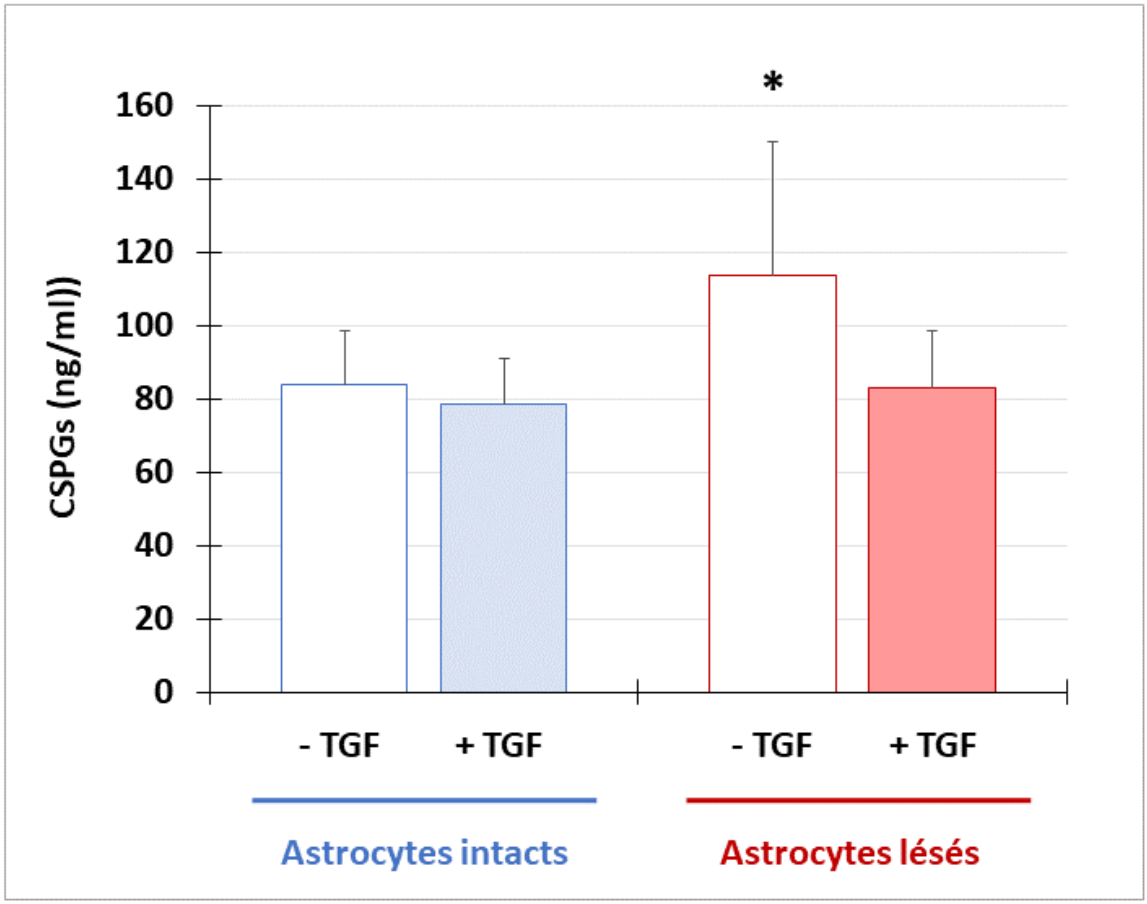


Figure 47. Sécrétion de CSPGs par les astrocytes.

Une lésion mécanique et une stimulation au TGF-β1 ont été réalisées sur des cultures d'astrocytes triées. Les astrocytes lésés et sans stimulation au TGF-β1 sécrètent plus de CSPGs comparés aux autres conditions (, $p < 0,05$, test de Kruskal-Wallis + post hoc de Dunn + correction de Bonferroni). Aucune différence significative n'a été rapportée dans les autres conditions (tests identiques).*

7.3. Localisation du récepteur NgR sur les cultures de neurones

L'interaction des CSPGs avec leur récepteur NgR est cruciale pour inhiber la régénérescence axonale. Nous avons localisé le NgR sur des neurones hippocampiques DIV 14 par immunocytochimie, à l'aide des anticorps IgG de lapin anti-NgR (AB15138, Merck Millipore) dilué à 0,5 µg/ml, Alexa Fluor 488 anti-lapin IgG dilué à 1 µg/ml ainsi que 1 µg/ml de DAPI.

Les résultats préliminaires montrent l'expression du NgR autour des noyaux et à distance des noyaux, ce qui suggère la présence du NgR sur les prolongements. Cependant, cette hypothèse doit être vérifiée par un double marquage avec les neurofilaments-L, spécifiques des neurones. Aucun marquage n'a été observé dans le contrôle.

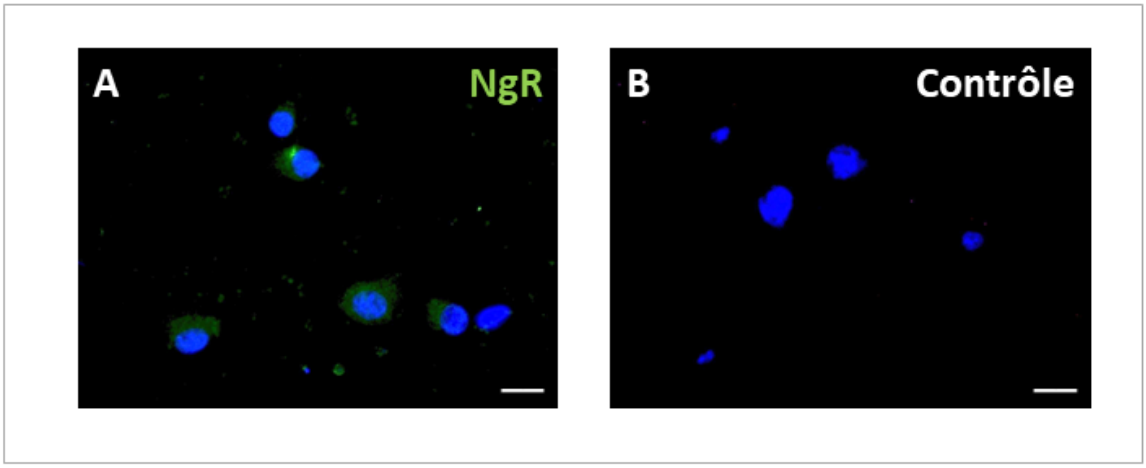


Figure 48. Immunomarquage des récepteurs NgR sur les neurones.

Sur des neurones différenciés (DIV 14) et fixés, l'immunomarquage indique la présence des NgR autour des noyaux cellulaires et sur les prolongements. Aucun marquage n'a été détecté dans le contrôle. Les noyaux sont marqués en bleu au DAPI. Barres d'échelle : A et B = 20 µm.

L’expérimentation devra être réalisée sur des cultures de neurones lésés. Les résultats attendus seraient une expression du NgR sur les prolongements neuronaux même après une lésion. En effet, des travaux antérieurs ont mis en lumière la présence du NgR sur les prolongements de neurones des ganglions de la racine dorsale [250], des neurones corticaux [255] et hippocampique [256]. Ils ont aussi mis en évidence une augmentation de l’expression du récepteur après une lésion médullaire sur modèle de rat. De plus, pour transférer ces données *in vivo*, il sera nécessaire de marquer aussi bien le NgR que le NF-L sur les coupes de moelle épinière. Les résultats attendus sont une colocalisation des deux marquages en se basant sur les travaux de Wu et al. ainsi que Hunt et al. [255,257].

7.4. Activation du NgR par l'interaction avec les CSPGs

Le NgR est un récepteur ancré à la membrane par un glycosylphosphatidylinositol (GPI), ce qui signifie qu'il n'a pas de domaine intracellulaire pour transmettre directement les signaux. L'évaluation de l'activité du NgR après interaction avec les CSPGs nécessite un marquage immunocytochimique des protéines phosphorylées de la voie RhoA/ROCK telles que la RhoA ou ROCK. En se basant sur les protocoles réalisés ultérieurement, les conditions expérimentales seraient les suivantes :

- Milieu (contrôle)
- + CSPGs
- + CSPGs + antagoniste du CPSGs (N7161-MG, Sigma-Aldrich)

Sur la base de la bibliographie et des expérimentations réalisées, les résultats attendus seraient la présence de marquages du NgR activé en condition contrôle, en raison de l'interaction avec les CSPGs sécrétés, ainsi qu'en condition avec ajout des surnageants contenant les CSPGs. De plus, nous attendons aucun marquage dans la condition où l'inhibiteur sera présent.

7.5. Étude du couple C5a/C5aR sur les astrocytes

Dans le but d'évaluer l'interaction du C5a sur les astrocytes lors de la stimulation de la repousse axonale, le couple C5a/C5aR a été évalué sur les cultures d'astrocytes et au sein de cryocoupes de moelle épinière.

Dans un premier temps, les astrocytes ont été cultivés à une densité de 2,5 × 10^6 cellules par puits dans une plaque 6 puits. Après une lésion, les cellules ont été incubées pendant 24 h avant de quantifier le C5a dans le surnageant par dosage ELISA et d'étudier l'expression des gènes du C5 et du C5aR sur le culot cellulaire par RT-PCR.

La RT-PCR a été réalisée et les résultats ont montré l'expression du gène qui code pour le C5 et pour le C5aR par les astrocytes que ce soit sur des cultures intactes ou lésées. Aucun signal n'a été détecté dans le contrôle sans ADNc. L'expression du gène qui code pour la GAPDH, qui sert de contrôle interne, confirme la qualité et l'intégrité de l'ARN extrait.

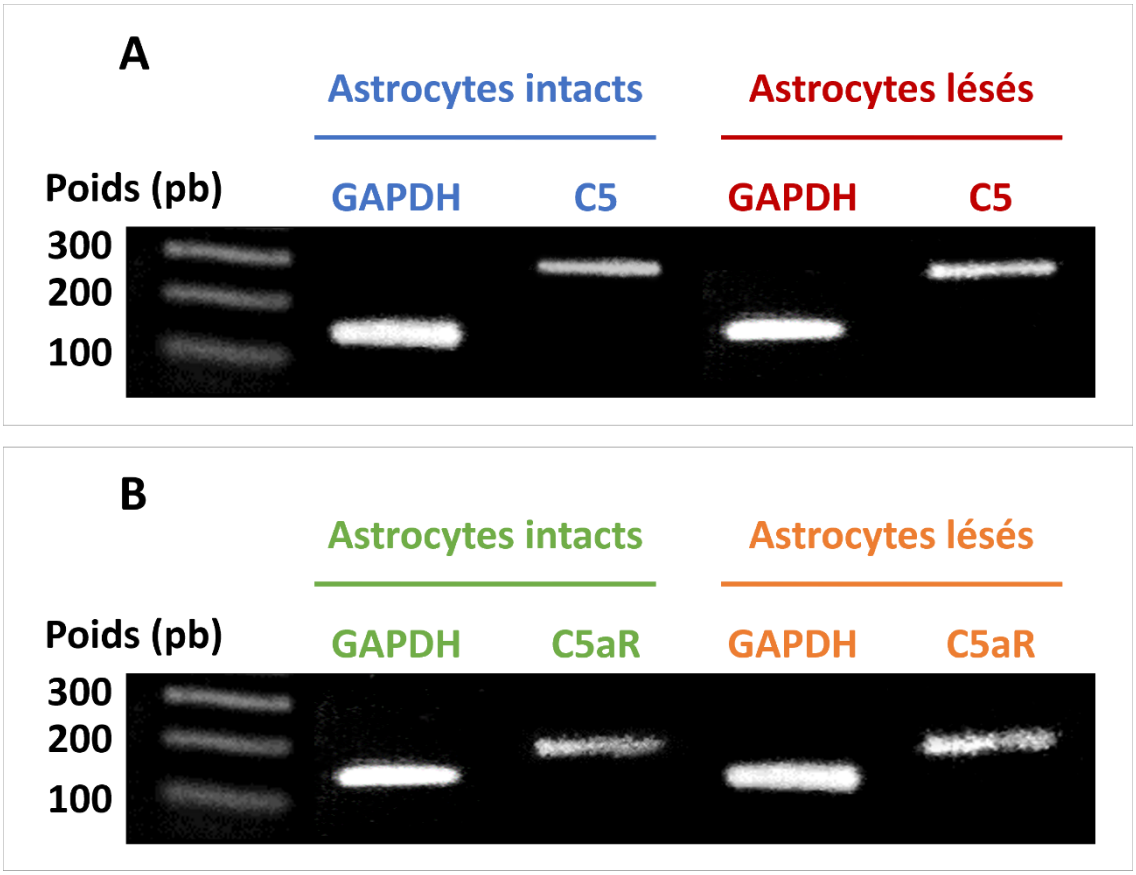


Figure 49. Expression du C5 et du C5aR par les cultures d'astrocytes.

La sécrétion du C5a par les astrocytes a été quantifiée dans les surnageants 24h après la lésion par dosage ELISA (*n* = 3). La quantité de C5a sécrétée est de 69,6 ± 2,4 pg/ml dans les cultures intactes et 69,1 ± 1,5 pg/ml dans les cultures d'astrocytes lésés (**Figure 50**). Aucune différence significative n'a été relevée entre la quantité de C5a sécrétée entre les populations.

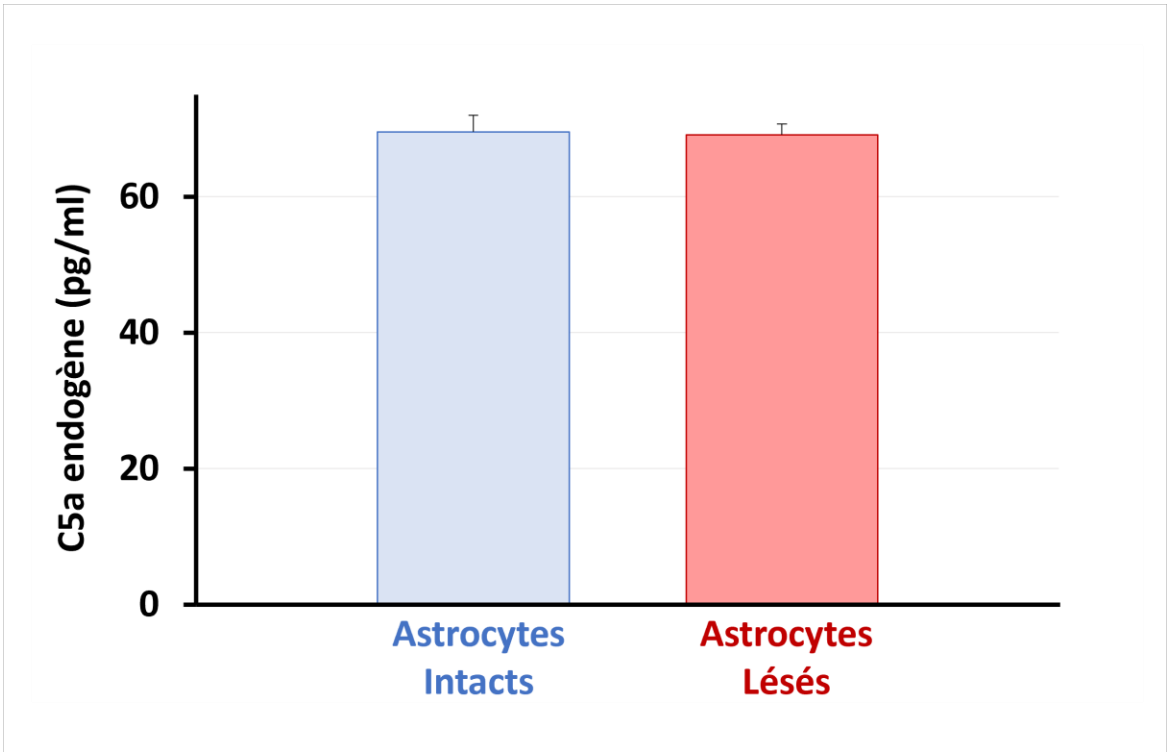


Figure 50. Sécrétion du C5a par les cultures d'astrocytes.

Le C5a sécrété dans les surnageants des cultures d'astrocytes a été quantifié par dosage ELISA. Le contrôle correspondait au milieu de culture Astro free. Les résultats indiquent une sécrétion significative du C5a dans les cultures d'astrocytes ($p < 0,05$, test de Kruskal-Wallis) mais aucune différence significative n'a été détectée entre les cultures intactes et lésées (test identique).

Puis, le marquage immunocytochimique du C5aR sur les astrocytes intacts a montré l'expression membranaire du C5aR. Aucun marquage n'a été observé dans le contrôle.

Enfin, la présence du C5aR a été vérifiée sur des cryocoupes de moelle épinière cervicale de rat (**Figure 51**).

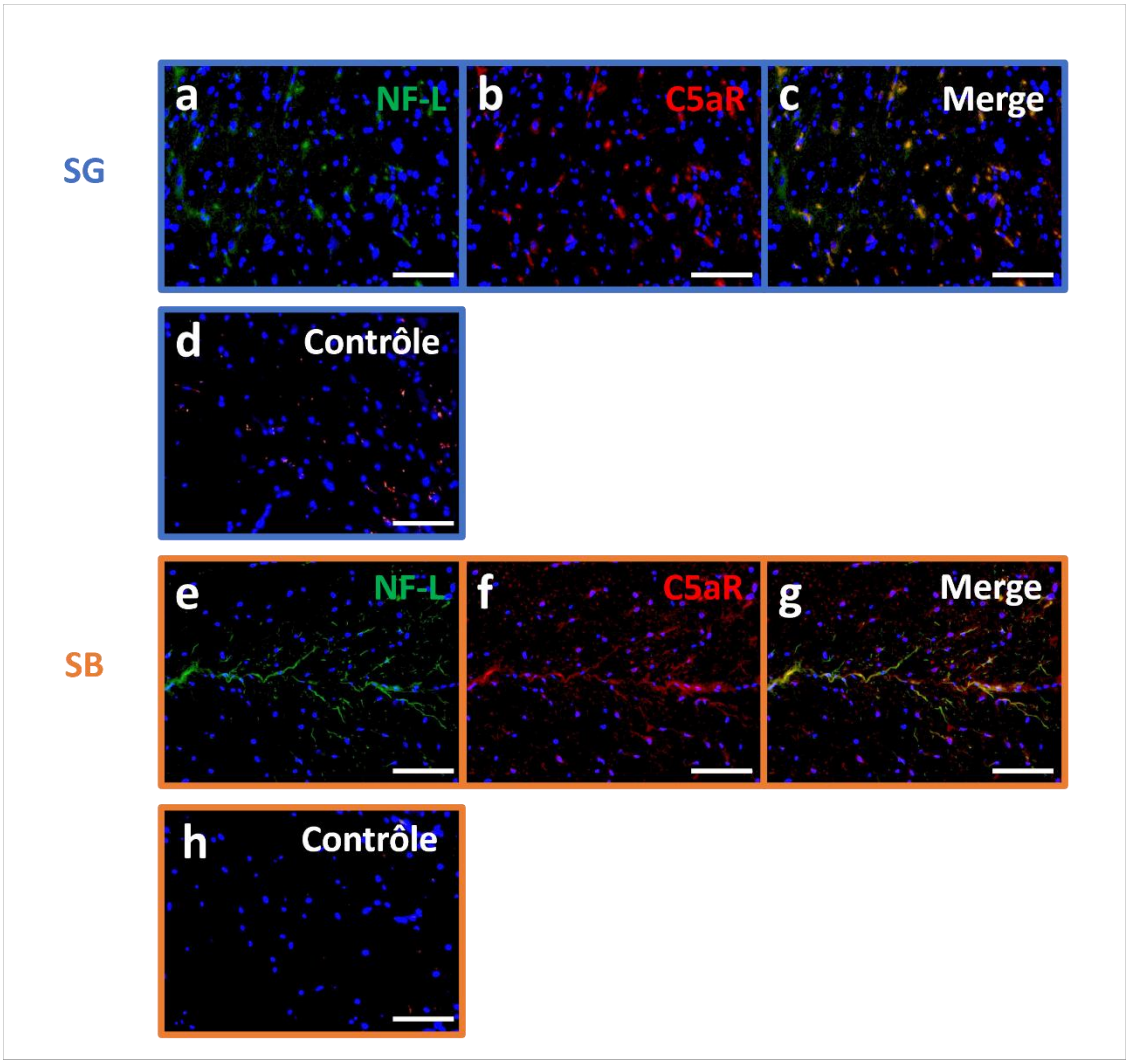


Figure 51. Expression du C5aR sur les astrocytes de la moelle épinière de rat.

Nos résultats ont montré l'expression du gène qui code pour le C5a et son récepteur, la quantification du C5a ainsi que le marquage du C5aR au sein des cultures d'astrocytes ainsi que la présence des astrocytes dans la moelle épinière (**Figure 51**). Ces résultats ne sont pas aberrants par rapport à la littérature. En effet, les astrocytes réactifs sont connus pour être capables de sécréter toutes les protéines du Complément [258] ainsi que d'être recrutés après une stimulation du C5aR à leur membrane [259].

7.6. Mesure des effets du C5a sur la repousse axonale dans un environnement inhibiteur

Afin d'évaluer l'effet du C5a sur la stimulation de la repousse axonale en présence des CSPGs, nous utiliserons dans un premier temps, un modèle de culture neuronale dans une puce microfluidique. Le milieu NB/B27 (contrôle), de CSPGs, de CSPGs + inhibiteurs seront ajoutés à chacune des conditions préalablement testées. La repousse axonale sera mesurée à différentes périodes dans la puce microfluidique. En se basant sur les travaux dans la littérature, nous nous attendons à une inhibition de la repousse axonale en présence du CSPGs seul et, au contraire, une stimulation de la repousse axonale par le C5a même en présence d'inhibiteurs de la repousse axonale [177,242].

Dans un second temps, nous testerons les mêmes conditions au sein de la matrice de collagène associée au C5a. La repousse axonale ainsi que la migration astrocytaire seront quantifiées après un marquage sur cellules vivantes et une observation en 3D des structures.

Jusqu'à présent les travaux mis en place permettent d'avancer sur plusieurs fronts : 1) de faire sécréter les CSPGs, inhibiteur de la repousse axonale par les astrocytes *in vitro*, 2) de vérifier la présence du NgR, un récepteur aux CSPGs sur les neurones puis 3) son activation après interaction avec les CSPGs ainsi que 4) son effet sur la repousse axonale avec une stimulation au C5a. En résumé, l'ensemble des expérimentations proposées auront pour but d'évaluer l'effet du C5a au sein de la matrice de collagène en présence des inhibiteurs CSPGs de la cicatrice gliale, localisés en majorité dans la substance grise. L'étude de l'effet des inhibiteurs de la myéline tels que les Nogo-A, *Myelin-Associated Glycoprotein* (MAG) et *Oligodendrocyte-Myelin Glycoprotein* (OMgp), localisés en majorité dans la substance blanche, complèteront les informations obtenues [246,250,255] pour constituer de potentielles synergies avec d'autres approches thérapeutiques pour renforcer la régénérescence nerveuse après une lésion de la moelle épinière.

8. Bibliographie

1. Bear, M.F.; Connors, B.W.; Paradiso, M.A. *Neuroscience: Exploring the Brain*; Wolters Kluwer; 4th ed.; 2020;
2. Papadopoulos, Z.; Herz, J.; Kipnis, J. Meningeal Lymphatics: From Anatomy to Central Nervous System Immune Surveillance. *J. Immunol.* **2020**, *204*, 286–293, doi:10.4049/jimmunol.1900838.
3. Les Laboratoires Servier SERVIER MEDICAL ART (SMART) Available online: https://smart.servier.com (accessed on 25 January 2025).
4. Chelyshev, Y.A.; Kabdesh, I.M.; Mukhamedshina, Y.O. Extracellular Matrix in Neural Plasticity and Regeneration. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2022**, *42*, 647–664, doi:10.1007/s10571-020-00986-0.
5. Yang, L.; Wei, M.; Xing, B.; Zhang, C. Extracellular Matrix and Synapse Formation. *Biosci. Rep.* **2023**, *43*, BSR20212411, doi:10.1042/BSR20212411.
6. Gaudet, A.D.; Fonken, L.K. Glial Cells Shape Pathology and Repair After Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics* **2018**, *15*, 554–577, doi:10.1007/s13311-018-0630-7.
7. Baldwin, K.T.; Murai, K.K.; Khakh, B.S. Astrocyte Morphology. *Trends Cell Biol.* **2024**, *34*, 547–565, doi:10.1016/j.tcb.2023.09.006.
8. Simons, M.; Nave, K.-A. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, *8*, a020479, doi:10.1101/cshperspect.a020479.
9. Kalafatakis, I.; Karagogeos, D. Oligodendrocytes and Microglia: Key Players in Myelin Development, Damage and Repair. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1058, doi:10.3390/biom11071058.
10. Paolicelli, R.C.; Bolasco, G.; Pagani, F.; Maggi, L.; Scianni, M.; Panzanelli, P.; Giustetto, M.; Ferreira, T.A.; Guiducci, E.; Dumas, L.; et al. Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science* **2011**, *333*, 1456–1458, doi:10.1126/science.1202529.
11. Nguyen, P.T.; Dorman, L.C.; Pan, S.; Vainchtein, I.D.; Han, R.T.; Nakao-Inoue, H.; Taloma, S.E.; Barron, J.J.; Molofsky, A.B.; Kheirbek, M.A.; et al. Microglial Remodeling of the Extracellular Matrix Promotes Synapse Plasticity. *Cell* **2020**, *182*, 388-403.e15, doi:10.1016/j.cell.2020.05.050.
12. Stevens, B.; Allen, N.J.; Vazquez, L.E.; Howell, G.R.; Christopherson, K.S.; Nouri, N.; Micheva, K.D.; Mehalow, A.K.; Huberman, A.D.; Stafford, B.; et al. The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell* **2007**, *131*, 1164–1178, doi:10.1016/j.cell.2007.10.036.

13. Del Bigio, M.R. Ependymal Cells: Biology and Pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **2010**, *119*, 55–73, doi:10.1007/s00401-009-0624-y.

14. Abbott, N.J.; Patabendige, A.A.K.; Dolman, D.E.M.; Yusof, S.R.; Begley, D.J. Structure and Function of the Blood-Brain Barrier. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *37*, 13–25, doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030.

15. Obermeier, B.; Verma, A.; Ransohoff, R.M. The Blood-Brain Barrier. *Handb. Clin. Neurol.* **2016**, *133*, 39–59, doi:10.1016/B978-0-444-63432-0.00003-7.

16. OMS Spinal Cord Injury Available online: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/spinal-cord-injury (accessed on 25 July 2024).

17. WHOS Rehabilitation for Persons with Traumatic Brain Injury Available online: https://www.who.int/publications/i/item/rehabilitation-for-persons-with-traumatic-brain-injury (accessed on 26 November 2024).

18. Spencer, L. James; Theadom, A.; Ellenbogen, R.G.; Bannick, M.; Mountjoy-Venning, W.C. Global, Regional, and National Burden of Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury, 1990–2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* **2019**, *18*, 56–87, doi:10.1016/S1474-4422(18)30415-0.

19. Capizzi, A.; Woo, J.; Verduzco-Gutierrez, M. Traumatic Brain Injury. *Med. Clin. North Am.* **2020**, *104*, 213–238, doi:10.1016/j.mcna.2019.11.001.

20. Saatman, K.E.; Duhaime, A.-C.; Bullock, R.; Maas, A.I.R.; Valadka, A.; Manley, G.T.; Workshop Scientific Team and Advisory Panel Members Classification of Traumatic Brain Injury for Targeted Therapies. *J. Neurotrauma* **2008**, *25*, 719–738, doi:10.1089/neu.2008.0586.

21. Mena, J.H.; Sanchez, A.I.; Rubiano, A.M.; Peitzman, A.B.; Sperry, J.L.; Gutierrez, M.I.; Puyana, J.C. Effect of the Modified Glasgow Coma Scale Score Criteria for Mild Traumatic Brain Injury on Mortality Prediction: Comparing Classic and Modified Glasgow Coma Scale Score Model Scores of 13. *J. Trauma* **2011**, *71*, 1185–1192; discussion 1193, doi:10.1097/TA.0b013e31823321f8.

22. Tator, C.H.; Fehlings, M.G. Review of the Secondary Injury Theory of Acute Spinal Cord Trauma with Emphasis on Vascular Mechanisms. *J. Neurosurg.* **1991**, *75*, 15–26, doi:10.3171/jns.1991.75.1.0015.

23. Ahuja, C.S.; Wilson, J.R.; Nori, S.; Kotter, M.R.N.; Druschel, C.; Curt, A.; Fehlings, M.G. Traumatic Spinal Cord Injury. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2017**, *3*, 17018, doi:10.1038/nrdp.2017.18.

24. Alizadeh, A.; Dyck, S.M.; Karimi-Abdolrezaee, S. Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Front. Neurol.* **2019**, *10*, 282, doi:10.3389/fneur.2019.00282.

25. Chen, Y.; He, Y.; DeVivo, M.J. Changing Demographics and Injury Profile of New Traumatic Spinal Cord Injuries in the United States, 1972–2014. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* **2016**, *97*, 1610–1619, doi:10.1016/j.apmr.2016.03.017.

26. Spinal Cord Injury Facts and Figures at a Glance. *J. Spinal Cord Med.* **2014**, *37*, 117–118, doi:10.1179/1079026813Z.000000000249.

27. Steinmetz, J.D.; Seeher, K.M.; Schiess, N.; Nichols, E.; Cao, B.; Servili, C.; Cavallera, V.; Cousin, E.; Hagins, H.; Moberg, M.E.; et al. Global, Regional, and National Burden of Disorders Affecting the Nervous System, 1990–2021: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Neurol.* **2024**, *23*, 344–381, doi:10.1016/S1474-4422(24)00038-3.

28. Chen, Y.; Tang, Y.; Vogel, L.C.; DeVivo, M.J. Causes of Spinal Cord Injury. *Top. Spinal Cord Inj. Rehabil.* **2013**, *19*, 1–8, doi:10.1310/sci1901-1.

29. Lu, Y.; Shang, Z.; Zhang, W.; Pang, M.; Hu, X.; Dai, Y.; Shen, R.; Wu, Y.; Liu, C.; Luo, T.; et al. Global Incidence and Characteristics of Spinal Cord Injury since 2000–2021: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMC Med.* **2024**, *22*, 285, doi:10.1186/s12916-024-03514-9.

30. Singh, A.; Tetreault, L.; Kalsi-Ryan, S.; Nouri, A.; Fehlings, M.G. Global Prevalence and Incidence of Traumatic Spinal Cord Injury. *Clin. Epidemiol.* **2014**, *6*, 309–331, doi:10.2147/CLEP.S68889.

31. Merritt, C.H.; Taylor, M.A.; Yelton, C.J.; Ray, S.K. Economic Impact of Traumatic Spinal Cord Injuries in the United States. *Neuroimmunol. Neuroinflammation* **2019**, *6*, 9, doi:10.20517/2347-8659.2019.15.

32. Jin, L.-Y.; Li, J.; Wang, K.-F.; Xia, W.-W.; Zhu, Z.-Q.; Wang, C.-R.; Li, X.-F.; Liu, H.-Y. Blood–Spinal Cord Barrier in Spinal Cord Injury: A Review. *J. Neurotrauma* **2021**, *38*, 1203–1224, doi:10.1089/neu.2020.7413.

33. Punjani, N.; Deska-Gauthier, D.; Hachem, L.D.; Abramian, M.; Fehlings, M.G. Neuroplasticity and Regeneration after Spinal Cord Injury. *North Am. Spine Soc. J.* **2023**, *15*, 100235, doi:10.1016/j.xnsj.2023.100235.

34. Cohen, A.S.; Pfister, B.J.; Schwarzbach, E.; Sean Grady, M.; Goforth, P.B.; Satin, L.S. Injury-Induced Alterations in CNS Electrophysiology. In *Progress in Brain Research*; Weber, J.T., Maas, A.I.R., Eds.; Neurotrauma: New Insights into Pathology and Treatment; Elsevier, 2007; Vol. 161, pp. 143–169.

35. Mukherjee, P.; Thomas, S.; Pasinetti, G.M. Complement Anaphylatoxin C5a Neuroprotects through Regulation of Glutamate Receptor Subunit 2 in Vitro and in Vivo. *J. Neuroinflammation* **2008**, *5*, 5, doi:10.1186/1742-2094-5-5.

36. Osaka, H.; Mukherjee, P.; Aisen, P.S.; Pasinetti, G.M. Complement-Derived Anaphylatoxin C5a Protects against Glutamate-Mediated Neurotoxicity. *J. Cell. Biochem.* **1999**, *73*, 303–311, doi:10.1002/(SICI)1097-4644(19990601)73:3<303::AID-JCB2>3.0.CO;2-2.

37. Freire, M.A.M.; Rocha, G.S.; Bittencourt, L.O.; Falcao, D.; Lima, R.R.; Cavalcanti, J.R.L.P. Cellular and Molecular Pathophysiology of Traumatic Brain Injury: What Have We Learned So Far? *Biology* **2023**, *12*, 1139, doi:10.3390/biology12081139.

38. Sterner, R.C.; Sterner, R.M. Immune Response Following Traumatic Spinal Cord Injury: Pathophysiology and Therapies. *Front. Immunol.* **2023**, *13*, doi:10.3389/fimmu.2022.1084101.

39. Morganti-Kossmann, M.C.; Satgunaseelan, L.; Bye, N.; Kossmann, T. Modulation of Immune Response by Head Injury. *Injury* **2007**, *38*, 1392–1400, doi:10.1016/j.injury.2007.10.005.

40. Abdul-Muneer, P.M.; Chandra, N.; Haorah, J. Interactions of Oxidative Stress and Neurovascular Inflammation in the Pathogenesis of Traumatic Brain Injury. *Mol. Neurobiol.* **2015**, *51*, 966–979, doi:10.1007/s12035-014-8752-3.

41. Jiang, W.; Li, M.; He, F.; Zhou, S.; Zhu, L. Targeting the NLRP3 Inflammasome to Attenuate Spinal Cord Injury in Mice. *J. Neuroinflammation* **2017**, *14*, 207, doi:10.1186/s12974-017-0980-9.

42. Chio, J.C.T.; Punjani, N.; Hejrati, N.; Zavvarian, M.-M.; Hong, J.; Fehlings, M.G. Extracellular Matrix and Oxidative Stress Following Traumatic Spinal Cord Injury: Physiological and Pathophysiological Roles and Opportunities for Therapeutic Intervention. *Antioxid. Redox Signal.* **2022**, *37*, 184–207, doi:10.1089/ars.2021.0120.

43. Gaudet, A.D.; Popovich, P.G. Extracellular Matrix Regulation of Inflammation in the Healthy and Injured Spinal Cord. *Exp. Neurol.* **2014**, *258*, 24–34, doi:10.1016/j.expneurol.2013.11.020.

44. Suttkus, A.; Morawski, M.; Arendt, T. Protective Properties of Neural Extracellular Matrix. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53*, 73–82, doi:10.1007/s12035-014-8990-4.

45. Miyata, S.; Kitagawa, H. Mechanisms for Modulation of Neural Plasticity and Axon Regeneration by Chondroitin Sulphate. *J. Biochem. (Tokyo)* **2015**, *157*, 13–22, doi:10.1093/jb/mvu067.

46. Raff, M.C.; Whitmore, A.V.; Finn, J.T. Axonal Self-Destruction and Neurodegeneration. *Science* **2002**, *296*, 868–871, doi:10.1126/science.1068613.

47. Seif, G.I.; Nomura, H.; Tator, C.H. Retrograde Axonal Degeneration “Dieback” in the Corticospinal Tract after Transection Injury of the Rat Spinal Cord: A Confocal Microscopy Study. *J. Neurotrauma* **2007**, *24*, 1513–1528, doi:10.1089/neu.2007.0323.

48. Yuasa-Kawada, J.; Kinoshita-Kawada, M.; Tsuboi, Y.; Wu, J.Y. Neuronal Guidance Genes in Health and Diseases. *Protein Cell* **2022**, *14*, 238–261, doi:10.1093/procel/pwac030.

49. Schanne, F.A.X.; Kane, A.B.; Young, E.E.; Farber, J.L. Calcium Dependence of Toxic Cell Death: A Final Common Pathway. *Science* **1979**, *206*, 700–702, doi:10.1126/science.386513.

50. Ransohoff, R.M. How Neuroinflammation Contributes to Neurodegeneration. *Science* **2016**, *353*, 777–783, doi:10.1126/science.aag2590.

51. Popovich, P.G.; Wei, P.; Stokes, B.T. Cellular Inflammatory Response after Spinal Cord Injury in Sprague-Dawley and Lewis Rats. *J. Comp. Neurol.* **1997**, *377*, 443–464, doi:10.1002/(sici)1096-9861(19970120)377:3<443::aid-cne10>3.0.co;2-s.

52. Guest, J.D.; Moore, S.W.; Aimetti, A.A.; Kutikov, A.B.; Santamaria, A.J.; Hofstetter, C.P.; Ropper, A.E.; Theodore, N.; Ulich, T.R.; Layer, R.T. Internal Decompression of the Acutely Contused Spinal Cord: Differential Effects of Irrigation Only versus Biodegradable Scaffold Implantation. *Biomaterials* **2018**, *185*, 284–300, doi:10.1016/j.biomaterials.2018.09.025.

53. Jones, L.L.; Sajed, D.; Tuszynski, M.H. Axonal Regeneration through Regions of Chondroitin Sulfate Proteoglycan Deposition after Spinal Cord Injury: A Balance of Permissiveness and Inhibition. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 9276–9288, doi:10.1523/JNEUROSCI.23-28-09276.2003.

54. Silver, J.; Miller, J.H. Regeneration beyond the Glial Scar. *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *5*, 146–156, doi:10.1038/nrn1326.

55. Naijil, G.; Herbert M., G. Extracellular Matrix and Traumatic Brain Injury. *J. Neurosci. Res.* **2018**, *96*, 573–588, doi:10.1002/jnr.24151.

56. Gaudet, A.D.; Popovich, P.G. Extracellular Matrix Regulation of Inflammation in the Healthy and Injured Spinal Cord. *Exp. Neurol.* **2014**, *258*, 24–34, doi:10.1016/j.expneurol.2013.11.020.

57. Bellver-Landete, V.; Bretheau, F.; Mailhot, B.; Vallières, N.; Lessard, M.; Janelle, M.-E.; Vernoux, N.; Tremblay, M.-È.; Fuehrmann, T.; Shoichet, M.S.; et al. Microglia Are an Essential Component of the Neuroprotective Scar That Forms after Spinal Cord Injury. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 518, doi:10.1038/s41467-019-08446-0.

58. Göritz, C.; Dias, D.O.; Tomilin, N.; Barbacid, M.; Shupliakov, O.; Frisén, J. A Pericyte Origin of Spinal Cord Scar Tissue. *Science* **2011**, *333*, 238–242, doi:10.1126/science.1203165.

59. Jones, L.L.; Margolis, R.U.; Tuszynski, M.H. The Chondroitin Sulfate Proteoglycans Neurocan, Brevican, Phosphacan, and Versican Are Differentially Regulated Following Spinal Cord Injury. *Exp. Neurol.* **2003**, *182*, 399–411, doi:10.1016/s0014-4886(03)00087-6.

60. Anderson, M.A.; Burda, J.E.; Ren, Y.; Ao, Y.; O'Shea, T.M.; Kawaguchi, R.; Coppola, G.; Khakh, B.S.; Deming, T.J.; Sofroniew, M.V. Astrocyte Scar Formation Aids CNS Axon Regeneration. *Nature* **2016**, *532*, 195–200, doi:10.1038/nature17623.

61. Clifford, T.; Finkel, Z.; Rodriguez, B.; Joseph, A.; Cai, L. Current Advancements in Spinal Cord Injury Research—Glial Scar Formation and Neural Regeneration. *Cells* **2023**, *12*, 853, doi:10.3390/cells12060853.

62. Okada, S.; Hara, M.; Kobayakawa, K.; Matsumoto, Y.; Nakashima, Y. Astrocyte Reactivity and Astrogliosis after Spinal Cord Injury. *Neurosci. Res.* **2018**, *126*, 39–43, doi:10.1016/j.neures.2017.10.004.

63. Wanner, I.B.; Anderson, M.A.; Song, B.; Levine, J.; Fernandez, A.; Gray-Thompson, Z.; Ao, Y.; Sofroniew, M.V. Glial Scar Borders Are Formed by Newly Proliferated, Elongated Astrocytes That Interact to Corral Inflammatory and Fibrotic Cells via STAT3-Dependent Mechanisms after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 12870–12886, doi:10.1523/JNEUROSCI.2121-13.2013.

64. Bradbury, E.J.; Burnside, E.R. Moving beyond the Glial Scar for Spinal Cord Repair. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3879, doi:10.1038/s41467-019-11707-7.

65. Rudge, J.S.; Silver, J. Inhibition of Neurite Outgrowth on Astroglial Scars in Vitro. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **1990**, *10*, 3594–3603, doi:10.1523/JNEUROSCI.10-11-03594.1990.

66. Leite, S.C.; Pinto-Costa, R.; Sousa, M.M. Actin Dynamics in the Growth Cone: A Key Player in Axon Regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2021**, *69*, 11–18, doi:10.1016/j.conb.2020.11.015.

67. Alto, L.T.; Havton, L.A.; Conner, J.M.; Hollis, E.R.; Blesch, A.; Tuszynski, M.H. Chemotropic Guidance Facilitates Axonal Regeneration and Synapse Formation after Spinal Cord Injury. *Nat. Neurosci.* **2009**, *12*, 1106–1113, doi:10.1038/nn.2365.

68. Bradke, F.; Fawcett, J.W.; Spira, M.E. Assembly of a New Growth Cone after Axotomy: The Precursor to Axon Regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **2012**, *13*, 183–193, doi:10.1038/nrn3176.

69. Liu, K.; Tedeschi, A.; Park, K.K.; He, Z. Neuronal Intrinsic Mechanisms of Axon Regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* **2011**, *34*, 131–152, doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113723.

70. Yang, L.J.-S.; Schnaar, R.L. Axon Regeneration Inhibitors. *Neurol. Res.* **2008**, *30*, 1047–1052, doi:10.1179/174313208X362523.

71. Tom, V.J.; Steinmetz, M.P.; Miller, J.H.; Doller, C.M.; Silver, J. Studies on the Development and Behavior of the Dystrophic Growth Cone, the Hallmark of Regeneration Failure, in an In Vitro Model of the Glial Scar and after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 6531–6539, doi:10.1523/JNEUROSCI.0994-04.2004.

72. Kriegstein, A.; Alvarez-Buylla, A. The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annu. Rev. Neurosci.* **2009**, *32*, 149–184, doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135600.

73. Molina-Gonzalez, I.; Holloway, R.K.; Jiwaji, Z.; Dando, O.; Kent, S.A.; Emelianova, K.; Lloyd, A.F.; Forbes, L.H.; Mahmood, A.; Skripuletz, T.; et al. Astrocyte-Oligodendrocyte Interaction Regulates Central Nervous System Regeneration. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 3372, doi:10.1038/s41467-023-39046-8.

74. Cieri, M.B.; Ramos, A.J. Astrocytes, Reactive Astrogliosis, and Glial Scar Formation in Traumatic Brain Injury. *Neural Regen. Res.* **2024**, *20*, 973–989, doi:10.4103/NRR.NRR-D-23-02091.

75. Silvestro, S.; Raffaele, I.; Quartarone, A.; Mazzon, E. Innovative Insights into Traumatic Brain Injuries: Biomarkers and New Pharmacological Targets. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 2372, doi:10.3390/ijms25042372.

76. Kirshblum, S.; Snider, B.; Eren, F.; Guest, J. Characterizing Natural Recovery after Traumatic Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma* **2021**, *38*, 1267–1284, doi:10.1089/neu.2020.7473.

77. Witiw, C.D.; Fehlings, M.G. Acute Spinal Cord Injury. *J. Spinal Disord. Tech.* **2015**, *28*, 202–210, doi:10.1097/BSD.0000000000000287.

78. Burke, J.F.; Yue, J.K.; Ngwenya, L.B.; Winkler, E.A.; Talbott, J.F.; Pan, J.Z.; Ferguson, A.R.; Beattie, M.S.; Bresnahan, J.C.; Haefeli, J.; et al. Ultra-Early (<12 Hours) Surgery Correlates With Higher Rate of American Spinal Injury Association Impairment Scale Conversion After Cervical Spinal Cord Injury. *Neurosurgery* **2019**, *85*, 199, doi:10.1093/neuros/nyy537.

79. Quintard, H.; Lebourdon, X.; Staccini, P.; Ichai, C. Decompression Surgery for Severe Traumatic Brain Injury (TBI): A Long-Term, Single-Centre Experience. *Anaesth. Crit. Care Pain Med.* **2015**, *34*, 79–82, doi:10.1016/j.accpm.2014.09.002.

80. Khellaf, A.; Khan, D.Z.; Helmy, A. Recent Advances in Traumatic Brain Injury. *J. Neurol.* **2019**, *266*, 2878–2889, doi:10.1007/s00415-019-09541-4.

81. Nolan, K.J.; Karunakaran, K.K.; Ehrenberg, N.; Kesten, A.G. Robotic Exoskeleton Gait Training for Inpatient Rehabilitation in a Young Adult with Traumatic Brain Injury. *Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Int. Conf.* **2018**, *2018*, 2809–2812, doi:10.1109/EMBC.2018.8512745.

82. Hwang, D.H.; Shin, H.Y.; Kwon, M.J.; Choi, J.Y.; Ryu, B.-Y.; Kim, B.G. Survival of Neural Stem Cell Grafts in the Lesioned Spinal Cord Is Enhanced by a Combination of Treadmill Locomotor Training via Insulin-Like Growth Factor-1 Signaling. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 12788–12800, doi:10.1523/JNEUROSCI.5359-13.2014.

83. Ho, C.H.; Triolo, R.J.; Elias, A.L.; Kilgore, K.L.; DiMarco, A.F.; Bogie, K.; Vette, A.H.; Audu, M.; Kobetic, R.; Chang, S.R.; et al. Functional Electrical Stimulation and Spinal Cord Injury. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* **2014**, *25*, 631–ix, doi:10.1016/j.pmr.2014.05.001.

84. The World Bank. World Development Indicators Database Available online: https://databankfiles.worldbank.org/public/ddpext_download/GDP.pdf (accessed on 27 November 2024).

85. Tedeschi, A.; Bradke, F. Spatial and Temporal Arrangement of Neuronal Intrinsic and Extrinsic Mechanisms Controlling Axon Regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2017**, *42*, 118–127, doi:10.1016/j.conb.2016.12.005.

86. Tian, T.; Zhang, S.; Yang, M. Recent Progress and Challenges in the Treatment of Spinal Cord Injury. *Protein Cell* **2023**, *14*, 635–652, doi:10.1093/procel/pwad003.

87. Uyeda, A.; Muramatsu, R. Molecular Mechanisms of Central Nervous System Axonal Regeneration and Remyelination: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8116, doi:10.3390/ijms21218116.

88. Bradke, F. Mechanisms of Axon Growth and Regeneration: Moving between Development and Disease. *J. Neurosci.* **2022**, *42*, 8393–8405, doi:10.1523/JNEUROSCI.1131-22.2022.

89. Fawcett, J.W. The Struggle to Make CNS Axons Regenerate: Why Has It Been so Difficult? *Neurochem. Res.* **2020**, *45*, 144–158, doi:10.1007/s11064-019-02844-y.

90. S. Ramon y Cajal Degeneration and Regeneration of the Nervous System. *Nature* **1930**, *125*, 230–231, doi:10.1038/125230a0.

91. Chang, J.; Yao, X.; Zou, H.; Wang, L.; Lu, Y.; Zhang, Q.; Zhao, H. BDNF/PI3K/Akt and Nogo-A/RhoA/ROCK Signaling Pathways Contribute to Neurorestorative Effect of Houshiheisan against Cerebral Ischemia Injury in Rats. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *194*, 1032–1042, doi:10.1016/j.jep.2016.11.005.

92. Gwak, S.-J.; Macks, C.; Jeong, D.U.; Kindy, M.; Lynn, M.; Webb, K.; Lee, J.S. RhoA Knockdown by Cationic Amphiphilic Copolymer/siRhoA Polyplexes Enhances Axonal Regeneration in Rat Spinal Cord Injury Model. *Biomaterials* **2017**, *121*, 155–166, doi:10.1016/j.biomaterials.2017.01.003.

93. Stern, S.; Hilton, B.J.; Burnside, E.R.; Dupraz, S.; Handley, E.E.; Gonyer, J.M.; Brakebusch, C.; Bradke, F. RhoA Drives Actin Compaction to Restrict Axon Regeneration and Astrocyte Reactivity after CNS Injury. *Neuron* **2021**, *109*, 3436-3455.e9, doi:10.1016/j.neuron.2021.08.014.

94. Cafferty, W.B.J.; McGee, A.W.; Strittmatter, S.M. Axonal Growth Therapeutics: Regeneration or Sprouting or Plasticity? *Trends Neurosci.* **2008**, *31*, 215–220, doi:10.1016/j.tins.2008.02.004.

95. de Almeida, F.M.; Marques, S.A.; dos Santos, A.C.R.; Prins, C.A.; dos Santos Cardoso, F.S.; dos Santos Heringer, L.; Mendonça, H.R.; Martinez, A.M.B. Molecular Approaches for Spinal Cord Injury Treatment. *Neural Regen. Res.* **2022**, *18*, 23–30, doi:10.4103/1673-5374.344830.

96. Du, K.; Zheng, S.; Zhang, Q.; Li, S.; Gao, X.; Wang, J.; Jiang, L.; Liu, K. Pten Deletion Promotes Regrowth of Corticospinal Tract Axons 1 Year after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2015**, *35*, 9754–9763, doi:10.1523/JNEUROSCI.3637-14.2015.

97. Gwak, S.-J.; Macks, C.; Jeong, D.U.; Kindy, M.; Lynn, M.; Webb, K.; Lee, J.S. RhoA Knockdown by Cationic Amphiphilic Copolymer/siRhoA Polyplexes Enhances Axonal Regeneration in Rat Spinal Cord Injury Model. *Biomaterials* **2017**, *121*, 155–166, doi:10.1016/j.biomaterials.2017.01.003.

98. Hellal, F.; Hurtado, A.; Ruschel, J.; Flynn, K.C.; Laskowski, C.J.; Umlauf, M.; Kapitein, L.C.; Strikis, D.; Lemmon, V.; Bixby, J.; et al. Microtubule Stabilization Reduces Scarring and Causes Axon Regeneration after Spinal Cord Injury. *Science* **2011**, *331*, 928–931, doi:10.1126/science.1201148.

99. Sun, W.; Larson, M.J.; Kiyoshi, C.M.; Annett, A.J.; Stalker, W.A.; Peng, J.; Tedeschi, A. Gabapentinoid Treatment Promotes Corticospinal Plasticity and Regeneration Following Murine Spinal Cord Injury. *J. Clin. Invest.* **2020**, *130*, 345–358, doi:10.1172/JCI130391.

100. Tedeschi, A.; Dupraz, S.; Laskowski, C.J.; Xue, J.; Ulas, T.; Beyer, M.; Schultze, J.L.; Bradke, F. The Calcium Channel Subunit Alpha2delta2 Suppresses Axon Regeneration in the Adult CNS. *Neuron* **2016**, *92*, 419–434, doi:10.1016/j.neuron.2016.09.026.

101. Warner, F.M.; Cragg, J.J.; Jutzeler, C.R.; Röhrich, F.; Weidner, N.; Saur, M.; Maier, D.D.; Schuld, C.; EMSCI Sites; Curt, A.; et al. Early Administration of Gabapentinoids Improves Motor Recovery after Human Spinal Cord Injury. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 1614–1618, doi:10.1016/j.celrep.2017.01.048.

102. Gurkoff, G.; Shahlaie, K.; Lyeth, B.; Berman, R. Voltage-Gated Calcium Channel Antagonists and Traumatic Brain Injury. *Pharmaceuticals* **2013**, *6*, 788–812, doi:10.3390/ph6070788.

103. Patel, R.; Dickenson, A.H. Mechanisms of the Gabapentinoids and A2δ-1 Calcium Channel Subunit in Neuropathic Pain. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2016**, *4*, e00205, doi:10.1002/prp2.205.

104. Blackmore, M.G.; Wang, Z.; Lerch, J.K.; Motti, D.; Zhang, Y.P.; Shields, C.B.; Lee, J.K.; Goldberg, J.L.; Lemmon, V.P.; Bixby, J.L. Krüppel-like Factor 7 Engineered for Transcriptional Activation Promotes Axon Regeneration in the Adult Corticospinal Tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 7517–7522, doi:10.1073/pnas.1120684109.

105. Kramer, A.A.; Olson, G.M.; Chakraborty, A.; Blackmore, M.G. Promotion of Corticospinal Tract Growth by KLF6 Requires an Injury Stimulus and Occurs within Four Weeks of Treatment. *Exp. Neurol.* **2021**, *339*, 113644, doi:10.1016/j.expneurol.2021.113644.

106. Li, W.-Y.; Fu, X.-M.; Wang, Z.-D.; Li, Z.-G.; Ma, D.; Sun, P.; Liu, G.-B.; Zhu, X.-F.; Wang, Y. Krüppel-like Factor 7 Attenuates Hippocampal Neuronal Injury after Traumatic Brain Injury. *Neural Regen. Res.* **2022**, *17*, 661–672, doi:10.4103/1673-5374.320991.

107. Burnside, E.R.; Bradbury, E.J. Manipulating the Extracellular Matrix and Its Role in Brain and Spinal Cord Plasticity and Repair. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2014**, *40*, 26–59, doi:10.1111/nan.12114.

108. Anjum, A.; Yazid, M.D.; Fauzi Daud, M.; Idris, J.; Ng, A.M.H.; Selvi Naicker, A.; Ismail, O.H.R.; Athi Kumar, R.K.; Lokanathan, Y. Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7533, doi:10.3390/ijms21207533.

109. Shultz, R.B.; Zhong, Y. Minocycline Targets Multiple Secondary Injury Mechanisms in Traumatic Spinal Cord Injury. *Neural Regen. Res.* **2017**, *12*, 702, doi:10.4103/1673-5374.206633.

110. Clemens, V.; Regen, F.; Le Bret, N.; Heuser, I.; Hellmann-Regen, J. Anti-Inflammatory Effects of Minocycline Are Mediated by Retinoid Signaling. *BMC Neurosci.* **2018**, *19*, 58, doi:10.1186/s12868-018-0460-x.

111. Guimarães, J.S.; Freire, M.A.M.; Lima, R.R.; Picanço-Diniz, C.W.; Pereira, A.; Gomes-Leal, W. Minocycline Treatment Reduces White Matter Damage after Excitotoxic Striatal Injury. *Brain Res.* **2010**, *1329*, 182–193, doi:10.1016/j.brainres.2010.03.007.

112. Bergold, P.J.; Furhang, R.; Lawless, S. Treating Traumatic Brain Injury with Minocycline. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* **2023**, *20*, 1546–1564, doi:10.1007/s13311-023-01426-9.

113. Casha, S.; Zygun, D.; McGowan, M.D.; Bains, I.; Yong, V.W.; Hurlbert, R.J. Results of a Phase II Placebo-Controlled Randomized Trial of Minocycline in Acute Spinal Cord Injury. *Brain J. Neurol.* **2012**, *135*, 1224–1236, doi:10.1093/brain/aws072.

114. Andrabi, S.S.; Yang, J.; Gao, Y.; Kuang, Y.; Labhasetwar, V. Nanoparticles with Antioxidant Enzymes Protect Injured Spinal Cord from Neuronal Cell Apoptosis by Attenuating Mitochondrial Dysfunction. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2020**, *317*, 300–311, doi:10.1016/j.jconrel.2019.12.001.

115. Kim, J.-W.; Mahapatra, C.; Hong, J.-Y.; Kim, M.S.; Leong, K.W.; Kim, H.-W.; Hyun, J.K. Functional Recovery of Contused Spinal Cord in Rat with the Injection of Optimal-Dosed Cerium Oxide Nanoparticles. *Adv. Sci. Weinh. Baden-Wurtt. Ger.* **2017**, *4*, 1700034, doi:10.1002/advs.201700034.

116. Alluin, O.; Delivet-Mongrain, H.; Gauthier, M.-K.; Fehlings, M.G.; Rossignol, S.; Karimi-Abdolrezaee, S. Examination of the Combined Effects of Chondroitinase ABC, Growth Factors and Locomotor Training Following Compressive Spinal Cord Injury on Neuroanatomical Plasticity and Kinematics. *PloS One* **2014**, *9*, e111072, doi:10.1371/journal.pone.0111072.

117. Bradbury, E.J.; Moon, L.D.F.; Popat, R.J.; King, V.R.; Bennett, G.S.; Patel, P.N.; Fawcett, J.W.; McMahon, S.B. Chondroitinase ABC Promotes Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *Nature* **2002**, *416*, 636–640, doi:10.1038/416636a.

118. Day, P.; Alves, N.; Daniell, E.; Dasgupta, D.; Ogborne, R.; Steeper, A.; Raza, M.; Ellis, C.; Fawcett, J.; Keynes, R.; et al. Targeting Chondroitinase ABC to Axons Enhances the Ability of Chondroitinase to Promote Neurite Outgrowth and Sprouting. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0221851, doi:10.1371/journal.pone.0221851.

119. Gonzenbach, R.R.; Zoerner, B.; Schnell, L.; Weinmann, O.; Mir, A.K.; Schwab, M.E. Delayed Anti-Nogo-a Antibody Application after Spinal Cord Injury Shows Progressive Loss of Responsiveness. *J. Neurotrauma* **2012**, *29*, 567–578, doi:10.1089/neu.2011.1752.

120. Kucher, K.; Johns, D.; Maier, D.; Abel, R.; Badke, A.; Baron, H.; Thietje, R.; Casha, S.; Meindl, R.; Gomez-Mancilla, B.; et al. First-in-Man Intrathecal

Application of Neurite Growth-Promoting Anti-Nogo-A Antibodies in Acute Spinal Cord Injury. *Neurorehabil. Neural Repair* **2018**, *32*, 578–589, doi:10.1177/1545968318776371.

121. Awad, B.I.; Carmody, M.A.; Steinmetz, M.P. Potential Role of Growth Factors in the Management of Spinal Cord Injury. *World Neurosurg.* **2015**, *83*, 120–131, doi:10.1016/j.wneu.2013.01.042.

122. Skaper, S.D. Neurotrophic Factors: An Overview. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2018**, *1727*, 1–17, doi:10.1007/978-1-4939-7571-6_1.

123. Sims, S.-K.; Wilken-Resman, B.; Smith, C.J.; Mitchell, A.; McGonegal, L.; Sims-Robinson, C. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Nerve Growth Factor Therapeutics for Brain Injury: The Current Translational Challenges in Preclinical and Clinical Research. *Neural Plast.* **2022**, *2022*, 3889300, doi:10.1155/2022/3889300.

124. Crowley, S.T.; Fukushima, Y.; Uchida, S.; Kataoka, K.; Itaka, K. Enhancement of Motor Function Recovery after Spinal Cord Injury in Mice by Delivery of Brain-Derived Neurotrophic Factor mRNA. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2019**, *17*, 465–476, doi:10.1016/j.omtn.2019.06.016.

125. Charsar, B.A.; Brinton, M.A.; Locke, K.; Chen, A.Y.; Ghosh, B.; Urban, M.W.; Komaravolu, S.; Krishnamurthy, K.; Smit, R.; Pasinelli, P.; et al. AAV2-BDNF Promotes Respiratory Axon Plasticity and Recovery of Diaphragm Function Following Spinal Cord Injury. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2019**, *33*, 13775–13793, doi:10.1096/fj.201901730R.

126. Anderson, M.A.; O'Shea, T.M.; Burda, J.E.; Ao, Y.; Barlatey, S.L.; Bernstein, A.M.; Kim, J.H.; James, N.D.; Rogers, A.; Kato, B.; et al. Required Growth Facilitators Propel Axon Regeneration across Complete Spinal Cord Injury. *Nature* **2018**, *561*, 396–400, doi:10.1038/s41586-018-0467-6.

127. Pollerberg, G.E.; Thelen, K.; Theiss, M.O.; Hochlehnert, B.C. The Role of Cell Adhesion Molecules for Navigating Axons: Density Matters. *Mech. Dev.* **2013**, *130*, 359–372, doi:10.1016/j.mod.2012.11.002.

128. Hu, X.; Xu, W.; Ren, Y.; Wang, Z.; He, X.; Huang, R.; Ma, B.; Zhao, J.; Zhu, R.; Cheng, L. Spinal Cord Injury: Molecular Mechanisms and Therapeutic Interventions. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2023**, *8*, 1–28, doi:10.1038/s41392-023-01477-6.

129. Karamouzian, S.; Nematollahi-Mahani, S.N.; Nakhaee, N.; Eskandary, H. Clinical Safety and Primary Efficacy of Bone Marrow Mesenchymal Cell Transplantation in Subacute Spinal Cord Injured Patients. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **2012**, *114*, 935–939, doi:10.1016/j.clineuro.2012.02.003.

130. Shang, Z.; Wang, M.; Zhang, B.; Wang, X.; Wanyan, P. Clinical Translation of Stem Cell Therapy for Spinal Cord Injury Still Premature: Results from a Single-Arm Meta-Analysis Based on 62 Clinical Trials. *BMC Med.* **2022**, *20*, 284, doi:10.1186/s12916-022-02482-2.

131. Wapinski, O.L.; Vierbuchen, T.; Qu, K.; Lee, Q.Y.; Chanda, S.; Fuentes, D.R.; Giresi, P.G.; Ng, Y.H.; Marro, S.; Neff, N.F.; et al. Hierarchical Mechanisms

for Direct Reprogramming of Fibroblasts to Neurons. *Cell* **2013**, *155*, 621–635, doi:10.1016/j.cell.2013.09.028.

132. Hilton, B.J.; Bradke, F. Can Injured Adult CNS Axons Regenerate by Recapitulating Development? *Development* **2017**, *144*, 3417–3429, doi:10.1242/dev.148312.

133. Chen, X.; Li, H. Neuronal Reprogramming in Treating Spinal Cord Injury. *Neural Regen. Res.* **2021**, *17*, 1440–1445, doi:10.4103/1673-5374.330590.

134. Hu, X.; Xu, W.; Ren, Y.; Wang, Z.; He, X.; Huang, R.; Ma, B.; Zhao, J.; Zhu, R.; Cheng, L. Spinal Cord Injury: Molecular Mechanisms and Therapeutic Interventions. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2023**, *8*, 1–28, doi:10.1038/s41392-023-01477-6.

135. Ashammakhi, N.; Kim, H.-J.; Ehsanipour, A.; Bierman, R.D.; Kaarela, O.; Xue, C.; Khademhosseini, A.; Seidlits, S.K. Regenerative Therapies for Spinal Cord Injury. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2019**, *25*, 471–491, doi:10.1089/ten.teb.2019.0182.

136. Tedeschi, A.; Omura, T.; Costigan, M. CNS Repair and Axon Regeneration: Using Genetic Variation to Determine Mechanisms. *Exp. Neurol.* **2017**, *287*, 409–422, doi:10.1016/j.expneurol.2016.05.004.

137. Ahmad, A.; Ashraf, S.; Komai, S. Optogenetics Applications for Treating Spinal Cord Injury. *Asian Spine J.* **2015**, *9*, 299–305, doi:10.4184/asj.2015.9.2.299.

138. Ceto, S.; Courtine, G. Optogenetic Interrogation of Circuits Following Neurotrauma. *Front. Mol. Neurosci.* **2021**, *14*, doi:10.3389/fnmol.2021.803856.

139. Cai, M.; Chen, L.; Wang, T.; Liang, Y.; Zhao, J.; Zhang, X.; Li, Z.; Wu, H. Hydrogel Scaffolds in the Treatment of Spinal Cord Injury: A Review. *Front. Neurosci.* **2023**, *17*, 1211066, doi:10.3389/fnins.2023.1211066.

140. Li, G.; Che, M.-T.; Zhang, K.; Qin, L.-N.; Zhang, Y.-T.; Chen, R.-Q.; Rong, L.-M.; Liu, S.; Ding, Y.; Shen, H.-Y.; et al. Graft of the NT-3 Persistent Delivery Gelatin Sponge Scaffold Promotes Axon Regeneration, Attenuates Inflammation, and Induces Cell Migration in Rat and Canine with Spinal Cord Injury. *Biomaterials* **2016**, *83*, 233–248, doi:10.1016/j.biomaterials.2015.11.059.

141. Drobnik, J.; Pietrucha, K.; Janczar, K.; Polis, L.; Polis, B.; Safandowska, M.; Szymański, J. Intra-Cerebral Implantation of a Variety of Collagenous Scaffolds with Nervous Embryonic Cells. *Exp. Ther. Med.* **2019**, *18*, 4758–4764, doi:10.3892/etm.2019.8116.

142. Silva, D.; Sousa, R.A.; Salgado, A.J. Hydrogels as Delivery Systems for Spinal Cord Injury Regeneration. *Mater. Today Bio* **2021**, *9*, 100093, doi:10.1016/j.mtbio.2021.100093.

143. Bai, T.; Duan, H.; Zhang, B.; Hao, P.; Zhao, W.; Gao, Y.; Yang, Z.; Li, X. Neuronal Differentiation and Functional Maturation of Neurons from Neural

Stem Cells Induced by bFGF-Chitosan Controlled Release System. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2023**, *13*, 2378–2393, doi:10.1007/s13346-023-01322-x.

144. Haggerty, A.; Oudega, M. Biomaterials for Spinal Cord Repair. *Neurosci. Bull.* **2013**, *29*, doi:10.1007/s12264-013-1362-7.

145. Liu, S.; Xie, Y.-Y.; Wang, B. Role and Prospects of Regenerative Biomaterials in the Repair of Spinal Cord Injury. *Neural Regen. Res.* **2019**, *14*, 1352–1363, doi:10.4103/1673-5374.253512.

146. Kiyotake, E.A.; Martin, M.D.; Detamore, M.S. Regenerative Rehabilitation with Conductive Biomaterials for Spinal Cord Injury. *Acta Biomater.* **2022**, *139*, 43–64, doi:10.1016/j.actbio.2020.12.021.

147. Bonnet, M.; Trimaille, T.; Brezun, J.-M.; Feron, F.; Gigmes, D.; Marqueste, T.; Decherchi, P. Motor and Sensitive Recovery after Injection of a Physically Cross-Linked PNIPAAm-g-PEG Hydrogel in Rat Hemisectioned Spinal Cord. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2020**, *107*, 110354, doi:10.1016/j.msec.2019.110354.

148. Blando, S.; Anchesi, I.; Mazzon, E.; Gugliandolo, A. Can a Scaffold Enriched with Mesenchymal Stem Cells Be a Good Treatment for Spinal Cord Injury? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7545, doi:10.3390/ijms23147545.

149. Costăchescu, B.; Niculescu, A.-G.; Dabija, M.G.; Teleanu, R.I.; Grumezescu, A.M.; Eva, L. Novel Strategies for Spinal Cord Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 4552, doi:10.3390/ijms23094552.

150. Lewis, M.; David, G.; Jacobs, D.; Kuczwara, P.; Woessner, A.E.; Kim, J.-W.; Quinn, K.P.; Song, Y. Neuro-Regenerative Behavior of Adipose-Derived Stem Cells in Aligned Collagen I Hydrogels. *Mater. Today Bio* **2023**, *22*, 100762, doi:10.1016/j.mtbio.2023.100762.

151. Liu, X.; Zhang, L.; Xu, Z.; Xiong, X.; Yu, Y.; Wu, H.; Qiao, H.; Zhong, J.; Zhao, Z.; Dai, J.; et al. A Functionalized Collagen-I Scaffold Delivers microRNA 21-Loaded Exosomes for Spinal Cord Injury Repair. *Acta Biomater.* **2022**, *154*, 385–400, doi:10.1016/j.actbio.2022.10.027.

152. Nazerian, Y.; Nazerian, A.; Mohamadi-Jahani, F.; Sodeifi, P.; Jafarian, M.; Javadi, S.A.H. Hydrogel-Encapsulated Extracellular Vesicles for the Regeneration of Spinal Cord Injury. *Front. Neurosci.* **2023**, *17*, 1309172, doi:10.3389/fnins.2023.1309172.

153. Ziemba, A.M.; Gilbert, R.J. Biomaterials for Local, Controlled Drug Delivery to the Injured Spinal Cord. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 245, doi:10.3389/fphar.2017.00245.

154. Elliott Donaghue, I.; Tator, C.H.; Shoichet, M.S. Local Delivery of Neurotrophin-3 and Anti-NogoA Promotes Repair After Spinal Cord Injury. *Tissue Eng. Part A* **2016**, *22*, 733–741, doi:10.1089/ten.tea.2015.0471.

155. Ozcicek, I.; Aysit, N.; Balcikanli, Z.; Ayturk, N.U.; Aydeger, A.; Baydas, G.; Aydin, M.S.; Altintas, E.; Erim, U.C. Development of BDNF/NGF/IKVAV Peptide Modified and Gold Nanoparticle Conductive PCL/PLGA Nerve

Guidance Conduit for Regeneration of the Rat Spinal Cord Injury. *Macromol. Biosci.* **2024**, e2300453, doi:10.1002/mabi.202300453.

156. Chen, Y.; Chu, J.M.T.; Chang, R.C.C.; Wong, G.T.C. The Complement System in the Central Nervous System: From Neurodevelopment to Neurodegeneration. *Biomolecules* **2022**, *12*, 337, doi:10.3390/biom12020337.

157. Bergmann, M.; Jeanneau, C.; Giraud, T.; Richard, G.; About, I. Complement Activation Links Inflammation to Dental Tissue Regeneration. *Clin. Oral Investig.* **2020**, *24*, 4185–4196, doi:10.1007/s00784-020-03621-w.

158. Sarma, J.V.; Ward, P.A. The Complement System. *Cell Tissue Res.* **2011**, *343*, 227–235, doi:10.1007/s00441-010-1034-0.

159. An, X.-Q.; Xi, W.; Gu, C.-Y.; Huang, X. Complement Protein C5a Enhances the β-Amyloid-Induced Neuro-Inflammatory Response in Microglia in Alzheimer's Disease. *Med. Sci. MS* **2018**, *34 Focus issue F1*, 116–120, doi:10.1051/medsci/201834f120.

160. Monk, P.N.; Scola, A.-M.; Madala, P.; Fairlie, D.P. Function, Structure and Therapeutic Potential of Complement C5a Receptors: C5a Receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 429–448, doi:10.1038/sj.bjp.0707332.

161. Brennan, F.H.; Gordon, R.; Lao, H.W.; Biggins, P.J.; Taylor, S.M.; Franklin, R.J.M.; Woodruff, T.M.; Ruitenberg, M.J. The Complement Receptor C5aR Controls Acute Inflammation and Astrogliosis Following Spinal Cord Injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2015**, *35*, 6517–6531, doi:10.1523/JNEUROSCI.5218-14.2015.

162. Gavrilyuk, V.; Kalinin, S.; Hilbush, B.S.; Middlecamp, A.; McGuire, S.; Pelligrino, D.; Weinberg, G.; Feinstein, D.L. Identification of Complement 5a-like Receptor (C5L2) from Astrocytes: Characterization of Anti-Inflammatory Properties. *J. Neurochem.* **2005**, *92*, 1140–1149, doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02942.x.

163. Gao, H.; Neff, T.A.; Guo, R.-F.; Speyer, C.L.; Sarma, J.V.; Tomlins, S.; Man, Y.; Riedemann, N.C.; Hoesel, L.M.; Younkin, E.; et al. Evidence for a Functional Role of the Second C5a Receptor C5L2. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2005**, *19*, 1003–1005, doi:10.1096/fj.04-3424fje.

164. Li, R.; Coulthard, L.G.; Wu, M.C.L.; Taylor, S.M.; Woodruff, T.M. C5L2: A Controversial Receptor of Complement Anaphylatoxin, C5a. *FASEB J.* **2013**, *27*, 855–864, doi:10.1096/fj.12-220509.

165. Li, R.; Coulthard, L.G.; Wu, M.C.L.; Taylor, S.M.; Woodruff, T.M. C5L2: A Controversial Receptor of Complement Anaphylatoxin, C5a. *FASEB J.* **2013**, *27*, 855–864, doi:https://doi.org/10.1096/fj.12-220509.

166. Ohno, M.; Hirata, T.; Enomoto, M.; Araki, T.; Ishimaru, H.; Takahashi, T.A. A Putative Chemoattractant Receptor, C5L2, Is Expressed in Granulocyte and Immature Dendritic Cells, but Not in Mature Dendritic Cells. *Mol. Immunol.* **2000**, *37*, 407–412, doi:10.1016/S0161-5890(00)00067-5.

167. Bénard, M.; Gonzalez, B.J.; Schouft, M.-T.; Falluel-Morel, A.; Vaudry, D.; Chan, P.; Vaudry, H.; Fontaine, M. Characterization of C3a and C5a Receptors in Rat Cerebellar Granule Neurons during Maturation: NEUROPROTECTIVE EFFECT OF C5a AGAINST APOPTOTIC CELL DEATH *. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 43487–43496, doi:10.1074/jbc.M404124200.

168. Gorelik A; Sapir T; Woodruff Tm; Reiner O Serping1/ C1 Inhibitor Affects Cortical Development in a Cell Autonomous and Non-Cell Autonomous Manner. *Front. Cell. Neurosci.* **2017**, *11*, doi:10.3389/fncel.2017.00169.

169. Coulthard, L.G.; Hawksworth, O.A.; Li, R.; Balachandran, A.; Lee, J.D.; Sepehrband, F.; Kurniawan, N.; Jeanes, A.; Simmons, D.G.; Wolvetang, E.; et al. Complement C5aR1 Signaling Promotes Polarization and Proliferation of Embryonic Neural Progenitor Cells through PKCζ. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2017**, *37*, 5395–5407, doi:10.1523/JNEUROSCI.0525-17.2017.

170. Nataf, S.; Stahel, P.F.; Davoust, N.; Barnum, S.R. Complement Anaphylatoxin Receptors on Neurons: New Tricks for Old Receptors? *Trends Neurosci.* **1999**, *22*, 397–402, doi:10.1016/s0166-2236(98)01390-3.

171. Brennan, F.H.; Gordon, R.; Lao, H.W.; Biggins, P.J.; Taylor, S.M.; Franklin, R.J.M.; Woodruff, T.M.; Ruitenberg, M.J. The Complement Receptor C5aR Controls Acute Inflammation and Astrogliosis Following Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 6517–6531, doi:10.1523/JNEUROSCI.5218-14.2015.

172. Daveau, M.; Benard, M.; Scotte, M.; Schouft, M.-T.; Hiron, M.; Francois, A.; Salier, J.-P.; Fontaine, M. Expression of a Functional C5a Receptor in Regenerating Hepatocytes and Its Involvement in a Proliferative Signaling Pathway in Rat. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2004**, *173*, 3418–3424, doi:10.4049/jimmunol.173.5.3418.

173. Mastellos, D.; Papadimitriou, J.C.; Franchini, S.; Tsonis, P.A.; Lambris, J.D. A Novel Role of Complement: Mice Deficient in the Fifth Component of Complement (C5) Exhibit Impaired Liver Regeneration. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2001**, *166*, 2479–2486, doi:10.4049/jimmunol.166.4.2479.

174. Chmilewsky, F.; Ayaz, W.; Appiah, J.; About, I.; Chung, S. Nerve Growth Factor Secretion From Pulp Fibroblasts Is Modulated by Complement C5a Receptor and Implied in Neurite Outgrowth. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31799, doi:10.1038/srep31799.

175. Mukherjee, P.; Pasinetti, G.M. Complement Anaphylatoxin C5a Neuroprotects through Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Inhibition of Caspase 3. *J. Neurochem.* **2001**, *77*, 43–49, doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00167.x.

176. O'Barr, S.A.; Caguioa, J.; Gruol, D.; Perkins, G.; Ember, J.A.; Hugli, T.; Cooper, N.R. Neuronal Expression of a Functional Receptor for the C5a Complement Activation Fragment. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 4154–4162, doi:10.4049/jimmunol.166.6.4154.

177. Guo, Q.; Cheng, J.; Zhang, J.; Su, B.; Bian, C.; Lin, S.; Zhong, C. Delayed Post-Injury Administration of C5a Improves Regeneration and Functional

Recovery after Spinal Cord Injury in Mice. *Clin. Exp. Immunol.* **2013**, *174*, 318–325, doi:10.1111/cei.12175.

178. About, I.; Richard, G.; Bergmann, M.; Jeanneau, C.; Djoudi, M. COMPLEMENT ACTIVE FRAGMENT-LOADED THREE-DIMENSIONAL BIOMATERIAL FOR DENTAL AND/OR OTHER TISSUE REGENERATION 2021.

179. Elango, J.; Robinson, J.; Zhang, J.; Bao, B.; Ma, N.; de Val, J.E.M.S.; Wu, W. Collagen Peptide Upregulates Osteoblastogenesis from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells through MAPK- Runx2. *Cells* **2019**, *8*, 446, doi:10.3390/cells8050446.

180. Pomeraniec, L.; Benayahu, D. Mesenchymal Cell Growth and Differentiation on a New Biocomposite Material: A Promising Model for Regeneration Therapy. *Biomolecules* **2020**, *10*, 458, doi:10.3390/biom10030458.

181. Sugai, K.; Nishimura, S.; Kato-Negishi, M.; Onoe, H.; Iwanaga, S.; Toyama, Y.; Matsumoto, M.; Takeuchi, S.; Okano, H.; Nakamura, M. Neural Stem/Progenitor Cell-Laden Microfibers Promote Transplant Survival in a Mouse Transected Spinal Cord Injury Model. *J. Neurosci. Res.* **2015**, *93*, 1826–1838, doi:10.1002/jnr.23636.

182. Makadia, H.K.; Siegel, S.J. Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* **2011**, *3*, 1377–1397, doi:10.3390/polym3031377.

183. Lefol, L.-A. PLGA-Based Microparticles: Towards an Elucidation of the Drug Release Mechanisms. **2023**.

184. Kalaji, N.; Deloge, A.; Sheibat-Othman, N.; Boyron, O.; About, I.; Fessi, H. Controlled Release Carriers of Growth Factors FGF-2 and TGFbeta1: Synthesis, Characterization and Kinetic Modelling. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2010**, *6*, 106–116, doi:10.1166/jbn.2010.1102.

185. Chan, E.C.; Kuo, S.-M.; Kong, A.M.; Morrison, W.A.; Dusting, G.J.; Mitchell, G.M.; Lim, S.Y.; Liu, G.-S. Three Dimensional Collagen Scaffold Promotes Intrinsic Vascularisation for Tissue Engineering Applications. *PloS One* **2016**, *11*, e0149799, doi:10.1371/journal.pone.0149799.

186. Loh, Q.L.; Choong, C. Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2013**, *19*, 485, doi:10.1089/ten.teb.2012.0437.

187. Hoffman, A.S. Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 3–12, doi:10.1016/S0169-409X(01)00239-3.

188. Brewer, G.J.; Torricelli, J.R.; Evege, E.K.; Price, P.J. Optimized Survival of Hippocampal Neurons in B27-Supplemented Neurobasal, a New Serum-Free Medium Combination. *J. Neurosci. Res.* **1993**, *35*, 567–576, doi:10.1002/jnr.490350513.

189. Xie, C.; Markesbery, W.R.; Lovell, M.A. Survival of Hippocampal and Cortical Neurons in a Mixture of MEM+ and B27-Supplemented Neurobasal Medium.

Free Radic. Biol. Med. **2000**, *28*, 665–672, doi:10.1016/s0891-5849(99)00268-3.

190. Taylor, A.M.; Blurton-Jones, M.; Rhee, S.W.; Cribbs, D.H.; Cotman, C.W.; Jeon, N.L. A Microfluidic Culture Platform for CNS Axonal Injury, Regeneration and Transport. *Nat. Methods* **2005**, *2*, 599–605, doi:10.1038/nmeth777.

191. Virlogeux, A.; Moutaux, E.; Christaller, W.; Genoux, A.; Bruyère, J.; Fino, E.; Charlot, B.; Cazorla, M.; Saudou, F. Reconstituting Corticostriatal Network On-a-Chip Reveals the Contribution of the Presynaptic Compartment to Huntington's Disease. *Cell Rep.* **2018**, *22*, 110–122, doi:10.1016/j.celrep.2017.12.013.

192. Oh, K.W.; Lee, K.; Ahn, B.; Furlani, E.P. Design of Pressure-Driven Microfluidic Networks Using Electric Circuit Analogy. *Lab. Chip* **2012**, *12*, 515–545, doi:10.1039/c2lc20799k.

193. Meijering, E.; Jacob, M.; Sarria, J.-C.F.; Steiner, P.; Hirling, H.; Unser, M. Design and Validation of a Tool for Neurite Tracing and Analysis in Fluorescence Microscopy Images. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **2004**, *58*, 167–176, doi:10.1002/cyto.a.20022.

194. Kaech, S.; Banker, G. Culturing Hippocampal Neurons. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2406–2415, doi:10.1038/nprot.2006.356.

195. Roppongi, R.T.; Champagne-Jorgensen, K.P.; Siddiqui, T.J. Low-Density Primary Hippocampal Neuron Culture. *J. Vis. Exp. JoVE* **2017**, 55000, doi:10.3791/55000.

196. Banker, G.; Goslin, K. *Culturing Nerve Cells*; The MIT PRess; 1991;

197. Reeves, A.M.B.; Shigetomi, E.; Khakh, B.S. Bulk Loading of Calcium Indicator Dyes to Study Astrocyte Physiology: Key Limitations and Improvements Using Morphological Maps. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2011**, *31*, 9353–9358, doi:10.1523/JNEUROSCI.0127-11.2011.

198. Banker, G.A.; Cowan, W.M. Rat Hippocampal Neurons in Dispersed Cell Culture. *Brain Res.* **1977**, *126*, 397–342, doi:10.1016/0006-8993(77)90594-7.

199. Conta Steencken, A.C.; Smirnov, I.; Stelzner, D.J. Cell Survival or Cell Death: Differential Vulnerability of Long Descending and Thoracic Propriospinal Neurons to Low Thoracic Axotomy in the Adult Rat. *Neuroscience* **2011**, *194*, 359–371, doi:10.1016/j.neuroscience.2011.05.052.

200. Lucas, J.H.; Gross, G.W.; Emery, D.G.; Gardner, C.R. Neuronal Survival or Death after Dendrite Transection Close to the Perikaryon: Correlation with Electrophysiologic, Morphologic, and Ultrastructural Changes. *Cent. Nerv. Syst. Trauma J. Am. Paralys. Assoc.* **1985**, *2*, 231–255, doi:10.1089/cns.1985.2.231.

201. Zhang, G.; Rodemer, W.; Lee, T.; Hu, J.; Selzer, M.E. The Effect of Axon Resealing on Retrograde Neuronal Death after Spinal Cord Injury in Lamprey. *Brain Sci.* **2018**, *8*, 65, doi:10.3390/brainsci8040065.

202. Fayaz, I.; Tator, C.H. Modeling Axonal Injury in Vitro: Injury and Regeneration Following Acute Neuritic Trauma. *J. Neurosci. Methods* **2000**, *102*, 69–79, doi:10.1016/s0165-0270(00)00282-x.

203. Hill, C.E. A View from the Ending: Axonal Dieback and Regeneration Following SCI. *Neurosci. Lett.* **2017**, *652*, 11–24, doi:10.1016/j.neulet.2016.11.002.

204. Thomas, A.; Gasque, P.; Vaudry, D.; Gonzalez, B.; Fontaine, M. Expression of a Complete and Functional Complement System by Human Neuronal Cells in Vitro. *Int. Immunol.* **2000**, *12*, 1015–1023, doi:10.1093/intimm/12.7.1015.

205. Gasque, P.; Singhrao, S.K.; Neal, J.W.; Götze, O.; Morgan, B.P. Expression of the Receptor for Complement C5a (CD88) Is up-Regulated on Reactive Astrocytes, Microglia, and Endothelial Cells in the Inflamed Human Central Nervous System. *Am. J. Pathol.* **1997**, *150*, 31–41.

206. Farkas, I.; Takahashi, M.; Fukuda, A.; Yamamoto, N.; Akatsu, H.; Baranyi, L.; Tateyama, H.; Yamamoto, T.; Okada, N.; Okada, H. Complement C5a Receptor-Mediated Signaling May Be Involved in Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2003**, *170*, 5764–5771, doi:10.4049/jimmunol.170.11.5764.

207. Gasque, P.; Chan, P.; Fontaine, M.; Ischenko, A.; Lamacz, M.; Götze, O.; Morgan, B.P. Identification and Characterization of the Complement C5a Anaphylatoxin Receptor on Human Astrocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **1995**, *155*, 4882–4889.

208. Jx, Y.; Bm, B.; Nr, C. Constitutive Expression of Proinflammatory Complement Components by Subsets of Neurons in the Central Nervous System. *J. Neuroimmunol.* **2002**, *123*, doi:10.1016/s0165-5728(01)00483-0.

209. Crane, J.; Baiquni, G.; Sullivan, R.; Lee, J.; Sah, P.; Taylor, S.; Noakes, P.; Woodruff, T. The C5a Anaphylatoxin Receptor CD88 Is Expressed in Presynaptic Terminals of Hippocampal Mossy Fibres. *J. Neuroinflammation* **2009**, *6*, doi:10.1186/1742-2094-6-34.

210. Sayah, S.; Patte, C.; Gasque, P.; Chan, P.; Ischenko, A.; Vaudry, H.; Fontaine, M. Characterization of Rat C5a Anaphylatoxin Receptor (C5aR): Cloning of Rat C5aR cDNA and Study of C5aR Expression by Rat Astrocytes. *Mol. Brain Res.* **1997**, *48*, 215–222, doi:10.1016/S0169-328X(97)00094-6.

211. Dong, Q.; Sun, L.; Peng, L.; Yan, B.; Lv, J.; Wang, G.; Gong, S. Expression of C5a and Its Receptor Following Spinal Cord Ischemia Reperfusion Injury in the Rat. *Spinal Cord* **2015**, *53*, 581–584, doi:10.1038/sc.2015.65.

212. Faulkner, J.R.; Herrmann, J.E.; Woo, M.J.; Tansey, K.E.; Doan, N.B.; Sofroniew, M.V. Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 2143–2155, doi:10.1523/JNEUROSCI.3547-03.2004.

213. Kawaja, M.D.; Gage, F.H. Reactive Astrocytes Are Substrates for the Growth of Adult CNS Axons in the Presence of Elevated Levels of Nerve Growth Factor. *Neuron* **1991**, *7*, 1019–1030, doi:10.1016/0896-6273(91)90346-2.

214. Li, D.; Zhang, S.; Yao, Y.; Xiang, Y.; Ma, X.; Wei, X.; Yan, H.; Liu, X. Sigma-1 Receptor Agonist Increases Axon Outgrowth of Hippocampal Neurons via Voltage-gated Calcium Ions Channels. *CNS Neurosci. Ther.* **2017**, *23*, 930–939, doi:10.1111/cns.12768.

215. Nieuwenhuis, B.; Barber, A.C.; Evans, R.S.; Pearson, C.S.; Fuchs, J.; MacQueen, A.R.; van Erp, S.; Haenzi, B.; Hulshof, L.A.; Osborne, A.; et al. PI 3-kinase Delta Enhances Axonal PIP 3 to Support Axon Regeneration in the Adult CNS. *EMBO Mol. Med.* **2020**, *12*, e11674, doi:10.15252/emmm.201911674.

216. Mathieu, S.; Jeanneau, C.; Sheibat-Othman, N.; Kalaji, N.; Fessi, H.; About, I. Usefulness of Controlled Release of Growth Factors in Investigating the Early Events of Dentin-Pulp Regeneration. *J. Endod.* **2013**, *39*, 228–235, doi:10.1016/j.joen.2012.11.007.

217. Bergmann, M. Développpement d'un nouveau biomatériau pour la régénération pulpo-dentinaire. **2021**, 137.

218. Soppimath, K.S.; Aminabhavi, T.M.; Kulkarni, A.R.; Rudzinski, W.E. Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Devices. *J. Controlled Release* **2001**, *70*, 1–20, doi:10.1016/S0168-3659(00)00339-4.

219. Beck, K.D.; Nguyen, H.X.; Galvan, M.D.; Salazar, D.L.; Woodruff, T.M.; Anderson, A.J. Quantitative Analysis of Cellular Inflammation after Traumatic Spinal Cord Injury: Evidence for a Multiphasic Inflammatory Response in the Acute to Chronic Environment. *Brain* **2010**, *133*, 433, doi:10.1093/brain/awp322.

220. Huang, W.-H.; Ding, S.-L.; Zhao, X.-Y.; Li, K.; Guo, H.-T.; Zhang, M.-Z.; Gu, Q. Collagen for Neural Tissue Engineering: Materials, Strategies, and Challenges. *Mater. Today Bio* **2023**, *20*, 100639, doi:10.1016/j.mtbio.2023.100639.

221. O'Connor, S.M.; Stenger, D.A.; Shaffer, K.M.; Ma, W. Survival and Neurite Outgrowth of Rat Cortical Neurons in Three-Dimensional Agarose and Collagen Gel Matrices. *Neurosci. Lett.* **2001**, *304*, 189–193, doi:10.1016/S0304-3940(01)01769-4.

222. Seyedhassantehrani, N.; Li, Y.; Yao, L. Dynamic Behaviors of Astrocytes in Chemically Modified Fibrin and Collagen Hydrogels. *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro* **2016**, *8*, 624–634, doi:10.1039/c6ib00003g.

223. Wong, D.Y.; Leveque, J.-C.; Brumblay, H.; Krebsbach, P.H.; Hollister, S.J.; LaMarca, F. Macro-Architectures in Spinal Cord Scaffold Implants Influence Regeneration. *J. Neurotrauma* **2008**, *25*, 1027–1037, doi:10.1089/neu.2007.0473.

224. Yoshii, S.; Ito, S.; Shima, M.; Taniguchi, A.; Akagi, M. Functional Restoration of Rabbit Spinal Cord Using Collagen-Filament Scaffold. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2009**, *3*, 19–25, doi:10.1002/term.130.

225. Willits, R.K.; Skornia, S.L. Effect of Collagen Gel Stiffness on Neurite Extension. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2004**, *15*, 1521–1531, doi:10.1163/1568562042459698.

226. Zhou, W.; Blewitt, M.; Hobgood, A.; Willits, R.K. Comparison of Neurite Growth in Three Dimensional Natural and Synthetic Hydrogels. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2013**, *24*, 301–314, doi:10.1080/09205063.2012.690277.

227. Sundararaghavan, H.G.; Monteiro, G.A.; Firestein, B.L.; Shreiber, D.I. Neurite Growth in 3D Collagen Gels with Gradients of Mechanical Properties. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102*, 632–643, doi:10.1002/bit.22074.

228. Flanagan, L.A.; Ju, Y.-E.; Marg, B.; Osterfield, M.; Janmey, P.A. Neurite Branching on Deformable Substrates. *Neuroreport* **2002**, *13*, 2411–2415, doi:10.1097/01.wnr.0000048003.96487.97.

229. Moeendarbary, E.; Weber, I.P.; Sheridan, G.K.; Koser, D.E.; Soleman, S.; Haenzi, B.; Bradbury, E.J.; Fawcett, J.; Franze, K. The Soft Mechanical Signature of Glial Scars in the Central Nervous System. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14787, doi:10.1038/ncomms14787.

230. Willits, R.K.; Skornia, S.L. Effect of Collagen Gel Stiffness on Neurite Extension. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2004**, *15*, 1521–1531, doi:10.1163/1568562042459698.

231. Hawksworth, O.A.; Li, X.X.; Coulthard, L.G.; Wolvetang, E.J.; Woodruff, T.M. New Concepts on the Therapeutic Control of Complement Anaphylatoxin Receptors. *Mol. Immunol.* **2017**, *89*, 36–43, doi:10.1016/j.molimm.2017.05.015.

232. Ulndreaj, A.; Marbourg, J.M.; Vidal, P.M. The Complement Receptor C5aR Has a Dual, Time-Dependent Effect on the Outcome of Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 12325–12327, doi:10.1523/JNEUROSCI.2380-15.2015.

233. Nataf, S.; Levison, S.; Barnum, S. Expression of the Anaphylatoxin C5a Receptor in the Oligodendrocyte Lineage. *Brain Res.* **2001**, *894*, 321–326, doi:10.1016/S0006-8993(01)02003-0.

234. Shah, T.A.; Pallera, H.K.; Kaszowski, C.L.; Bass, W.T.; Lattanzio, F.A. Therapeutic Hypothermia Inhibits the Classical Complement Pathway in a Rat Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Front. Neurosci.* **2021**, *15*, 616734, doi:10.3389/fnins.2021.616734.

235. Coulthard, L.G.; Hawksworth, O.A.; Li, R.; Balachandran, A.; Lee, J.D.; Sepehrband, F.; Kurniawan, N.; Jeanes, A.; Simmons, D.G.; Wolvetang, E.; et al. Complement C5aR1 Signaling Promotes Polarization and Proliferation of Embryonic Neural Progenitor Cells through PKCζ. *J. Neurosci.* **2017**, *37*, 5395–5407, doi:10.1523/JNEUROSCI.0525-17.2017.

236. Fenrich, K.K.; Rose, P.K. Spinal Interneuron Axons Spontaneously Regenerate after Spinal Cord Injury in the Adult Feline. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2009**, *29*, 12145–12158, doi:10.1523/JNEUROSCI.0897-09.2009.

237. Inman, D.M.; Steward, O. Ascending Sensory, but Not Other Long-Tract Axons, Regenerate into the Connective Tissue Matrix That Forms at the Site of a Spinal Cord Injury in Mice. *J. Comp. Neurol.* **2003**, *462*, 431–449, doi:10.1002/cne.10768.

238. Jin, Y.; Dougherty, S.E.; Wood, K.; Sun, L.; Cudmore, R.H.; Abdalla, A.; Kannan, G.; Pletnikov, M.; Hashemi, P.; Linden, D.J. Regrowth of Serotonin Axons in the Adult Mouse Brain Following Injury. *Neuron* **2016**, *91*, 748–762, doi:10.1016/j.neuron.2016.07.024.

239. Zhou, B.; Zuo, Y.-X.; Jiang, R.-T. Astrocyte Morphology: Diversity, Plasticity, and Role in Neurological Diseases. *CNS Neurosci. Ther.* **2019**, *25*, 665–673, doi:10.1111/cns.13123.

240. Enright, H.A.; Lam, D.; Sebastian, A.; Sales, A.P.; Cadena, J.; Hum, N.R.; Osburn, J.J.; Peters, S.K.G.; Petkus, B.; Soscia, D.A.; et al. Functional and Transcriptional Characterization of Complex Neuronal Co-Cultures. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 11007, doi:10.1038/s41598-020-67691-2.

241. Fulmer, C.G.; VonDran, M.W.; Stillman, A.A.; Huang, Y.; Hempstead, B.L.; Dreyfus, C.F. Astrocyte-Derived BDNF Supports Myelin Protein Synthesis after Cuprizone-Induced Demyelination. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 8186, doi:10.1523/JNEUROSCI.4267-13.2014.

242. Yu, P.; Wang, H.; Katagiri, Y.; Geller, H.M. An In Vitro Model of Reactive Astrogliosis and Its Effect on Neuronal Growth. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2012**, *814*, 327–340, doi:10.1007/978-1-61779-452-0_21.

243. Susarla, B.T.S.; Laing, E.D.; Yu, P.; Katagiri, Y.; Geller, H.M.; Symes, A.J. Smad Proteins Differentially Regulate Transforming Growth Factor-β-Mediated Induction of Chondroitin Sulfate Proteoglycans. *J. Neurochem.* **2011**, *119*, 868–878, doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07470.x.

244. Jones, L.L.; Margolis, R.U.; Tuszynski, M.H. The Chondroitin Sulfate Proteoglycans Neurocan, Brevican, Phosphacan, and Versican Are Differentially Regulated Following Spinal Cord Injury. *Exp. Neurol.* **2003**, *182*, 399–411, doi:10.1016/S0014-4886(03)00087-6.

245. Tang, X.; Davies, J.E.; Davies, S.J.A. Changes in Distribution, Cell Associations, and Protein Expression Levels of NG2, Neurocan, Phosphacan, Brevican, Versican V2, and Tenascin-C during Acute to Chronic Maturation of Spinal Cord Scar Tissue. *J. Neurosci. Res.* **2003**, *71*, 427–444, doi:10.1002/jnr.10523.

246. Dickendesher, T.L.; Baldwin, K.T.; Mironova, Y.A.; Koriyama, Y.; Raiker, S.J.; Askew, K.L.; Wood, A.; Geoffroy, C.G.; Zheng, B.; Liepmann, C.D.; et al. NgR1 and NgR3 Are Receptors for Chondroitin Sulfate Proteoglycans. *Nat. Neurosci.* **2012**, *15*, 703–712, doi:10.1038/nn.3070.

247. Lang, B.T.; Cregg, J.M.; DePaul, M.A.; Tran, A.P.; Xu, K.; Dyck, S.M.; Madalena, K.M.; Brown, B.P.; Weng, Y.-L.; Li, S.; et al. Modulation of the Proteoglycan Receptor PTPσ Promotes Recovery after Spinal Cord Injury. *Nature* **2015**, *518*, 404–408, doi:10.1038/nature13974.

248. Xu, B.; Park, D.; Ohtake, Y.; Li, H.; Hayat, U.; Liu, J.; Selzer, M.E.; Longo, F.M.; Li, S. Role of CSPG Receptor LAR Phosphatase in Restricting Axon Regeneration after CNS Injury. *Neurobiol. Dis.* **2015**, *73*, 36–48, doi:10.1016/j.nbd.2014.08.030.

249. Asher, R.A.; Morgenstern, D.A.; Fidler, P.S.; Adcock, K.H.; Oohira, A.; Braistead, J.E.; Levine, J.M.; Margolis, R.U.; Rogers, J.H.; Fawcett, J.W. Neurocan Is Upregulated in Injured Brain and in Cytokine-Treated Astrocytes. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 2427–2438, doi:10.1523/JNEUROSCI.20-07-02427.2000.

250. Chivatakarn, O.; Kaneko, S.; He, Z.; Tessier-Lavigne, M.; Giger, R.J. The Nogo-66 Receptor NgR1 Is Required Only for the Acute Growth Cone-Collapsing But Not the Chronic Growth-Inhibitory Actions of Myelin Inhibitors. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 7117–7124, doi:10.1523/JNEUROSCI.1541-07.2007.

251. McKeon, R.J.; Schreiber, R.C.; Rudge, J.S.; Silver, J. Reduction of Neurite Outgrowth in a Model of Glial Scarring Following CNS Injury Is Correlated with the Expression of Inhibitory Molecules on Reactive Astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **1991**, *11*, 3398–3411, doi:10.1523/JNEUROSCI.11-11-03398.1991.

252. Ferrer-Acosta, Y.; Gonzalez-Vega, M.N.; Rivera-Aponte, D.E.; Martinez-Jimenez, S.M.; Martins, A.H. Monitoring Astrocyte Reactivity and Proliferation in Vitro Under Ischemic-Like Conditions. *J. Vis. Exp. JoVE* **2017**, 55108, doi:10.3791/55108.

253. Asher, R.A.; Morgenstern, D.A.; Fidler, P.S.; Adcock, K.H.; Oohira, A.; Braistead, J.E.; Levine, J.M.; Margolis, R.U.; Rogers, J.H.; Fawcett, J.W. Neurocan Is Upregulated in Injured Brain and in Cytokine-Treated Astrocytes. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 2427–2438, doi:10.1523/JNEUROSCI.20-07-02427.2000.

254. Yang, R.; Zhang, Y.; Kang, J.; Zhang, C.; Ning, B. Chondroitin Sulfate Proteoglycans Revisited: Its Mechanism of Generation and Action for Spinal Cord Injury. *Aging Dis.* **2024**, *15*, 153–168, doi:10.14336/AD.2023.0512.

255. Hunt, D.; Coffin, R.S.; Anderson, P.N. The Nogo Receptor, Its Ligands and Axonal Regeneration in the Spinal Cord; a Review. *J. Neurocytol.* **2002**, *31*, 93–120, doi:10.1023/a:1023941421781.

256. Mingorance, A.; Fontana, X.; Solé, M.; Burgaya, F.; Ureña, J.M.; Teng, F.Y.H.; Tang, B.L.; Hunt, D.; Anderson, P.N.; Bethea, J.R.; et al. Regulation of Nogo and Nogo Receptor during the Development of the Entorhino-Hippocampal Pathway and after Adult Hippocampal Lesions. *Mol. Cell. Neurosci.* **2004**, *26*, 34–49, doi:10.1016/j.mcn.2004.01.001.

257. Wu, C.; Zhou, Y.; Tu, P.; Yang, G.; Zheng, S.; Pan, Y.; Sun, J.; Guo, Y.; Ma, Y. Jisuikang Promotes the Repair of Spinal Cord Injury in Rats by Regulating NgR/RhoA/ROCK Signal Pathway. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* **2020**, *2020*, 9542359, doi:10.1155/2020/9542359.

258. Pekna, M.; Pekny, M. The Complement System: A Powerful Modulator and Effector of Astrocyte Function in the Healthy and Diseased Central Nervous System. *Cells* **2021**, *10*, 1812, doi:10.3390/cells10071812.

259. Gasque, P.; Singhrao, S.K.; Neal, J.W.; Götze, O.; Morgan, B.P. Expression of the Receptor for Complement C5a (CD88) Is up-Regulated on Reactive Astrocytes, Microglia, and Endothelial Cells in the Inflamed Human Central Nervous System. *Am. J. Pathol.* **1997**, *150*, 31–41.

9. Annexes

11.1. Article 1

Cotten, A., Jeanneau, C., Decherchi, P., & About, I. (2024). Complement C5a Implication in Axonal Growth After Injury. Cells, 13(20), Article 20. https://doi.org/10.3390/cells13201729

Erratum : Le PMX53 est l'antagoniste du C5aR

cells

MDPI

Article

Complement C5a Implication in Axonal Growth After Injury

Aurélie Cotten, Charlotte Jeanneau, Patrick Decherchi and Imad About *

Aix-Marseille University, CNRS, ISM, 13009 Marseille, France; aurelie.cotten@univ-amu.fr (A.C.); charlotte.jeanneau@univ-amu.fr (C.J.); patrick.decherchi@univ-amu.fr (P.D.)
* Correspondence: imad.about@univ-amu.fr; Tel.: +33-(0)4-86-13-68-59

Abstract: Complement C5a protein has been shown to play a major role in tissue regeneration through interaction with its receptor (C5aR) on target cells. Expression of this receptor has been reported in the nervous system which, upon injury, has no treatment to restore the lost functions. This work aimed at investigating the Complement C5a effect on axonal growth after axotomy in vitro. Primary hippocampal neurons were isolated from embryonic Wistar rats. Cell expression of C5aR mRNA was verified by RT-PCR while its membrane expression, localization, and phosphorylation were investigated by immunofluorescence. Then, the effects of C5a on injured axonal growth were investigated using a 3D-printed microfluidic device. Immunofluorescence demonstrated that the primary cultures contained only mature neurons (93%) and astrocytes (7%), but no oligodendrocytes or immature neurons. Immunofluorescence revealed a co-localization of NF-L and C5aR only in the mature neurons where C5a induced the phosphorylation of its receptor. C5a application on injured axons in the microfluidic devices significantly increased both the axonal growth speed and length. Our findings highlight a new role of C5a in regeneration demonstrating an enhancement of axonal growth after axotomy. This may provide a future therapeutic tool in the treatment of central nervous system injury.

Keywords: Complement C5a; neuron injury; axotomy; axon regeneration

check for updates

Citation: Cotten, A.; Jeanneau, C.; Decherchi, P.; About, I. Complement C5a Implication in Axonal Growth After Injury. *Cells* **2024**, *13*, 1729. https://doi.org/10.3390/cells13201729

Academic Editor: Alexander E. Kalyuzhny

Received: 5 September 2024
Revised: 3 October 2024
Accepted: 15 October 2024
Published: 18 October 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Axonal growth has been well investigated during neurodevelopment, where multiple attractive/permissive as well as repulsive/inhibitory signals guide axon pathfinding and target recognition. Decisions to continue a particular path, turn, collapse, or retract depend on receptors on the growth cones, located at the axon's extremity. These include cell adhesion molecules [1], repulsive molecules [2], and soluble molecules, which act as guidance signals directing the axonal growth [2]. While several guidance factors and their receptors persist in adulthood, the axonal regeneration potential in the mature neurons is limited [3,4]. Additionally, upon injury of the adult central nervous system (CNS), it is difficult to achieve/enhance axonal regeneration. Strategies have been developed to enhance axonal regeneration after CNS injury. These were mainly based on using the residual and intact neuronal networks to stimulate and guide axonal growth over long distances in an inhibitory environment to form functional synapses with the appropriate targets [5]. Among these strategies, pharmacological treatments [6,7] combined with tissue grafting [8,9] and scaffolds [10,11] have been developed. However, to date, there is still no effective pharmacological strategy to restore the lost functions. Recently, attention has turned to target the Complement system.

The Complement system is made of 35 proteins mainly synthesized by the liver [12]. Its functions are well demonstrated during the inflammation process. Indeed, infection and tissue injury are known to activate the Complement system, leading to the production of active fragments. Among these, C3a and C5a act as anaphylatoxins. They increase vessel permeability and allow the recruitment of inflammatory cells expressing their receptors to eliminate cell debris and pathogens [13]. Another fragment, C3b, opsonizes the pathogens

and enhances their phagocytosis by the recruited and resident phagocytes [14], while the membrane attack complex (C5-b9), which is made of several proteins, polymerizes in the bacterial wall creating tunnel-shaped structures. These allow loss of electrolytes and the massive entry of extracellular fluids, leading to the pathogen lysis [15]. Since the Complement system initiates the inflammatory reaction, which hinders the axonal regeneration, Complement protein C5a was targeted in several studies with the idea that inhibiting the inflammation would allow axonal regeneration [16,17].

Interestingly, the expression of Complement receptors on cell types other than the inflammatory cells has attracted much attention. This led to exploring the Complement implication in other functions, and especially in the regeneration process [12,18]. Indeed, previous studies provided evidence supporting the chemotactic role of C5a through interaction with its G-protein-coupled receptor (C5aR) in the regeneration of the liver, muscles, bones, heart, and skin [12]. C5aR expression has also been reported in the central nervous system (CNS). During development, its expression has been demonstrated in mouse embryonic neural progenitor cells in vivo and on human embryonic stem cell-derived neural progenitors [19]. In situ hybridization studies coupled with immunohistochemical approaches revealed that most neurons in the hippocampal formation, many pyramidal cortical neurons, and cerebellar Purkinje neurons in normal human and murine brains constitutively express C5a receptors [17,20–22]. Thus, while C5a is involved in the inflammatory process, its expression in the CNS suggests its implication in other processes such as development and regeneration.

Indeed, depending on the concentrations used, C5a has been shown to induce neurite growth of intact mice neurons in vitro [23]. More recently, upon stimulation with lipoteichoic acid, human pulp fibroblasts were found to produce C5a. The interaction of this molecule with the C5aR of these cells mediated the local brain-derived neurotrophic factor (BDNF) secretion, which guided the neuronal growth toward the lipoteichoic acid-stimulated fibroblasts [24].

We, therefore, hypothesized that C5a may promote the axonal growth of damaged neurons. Based on this hypothesis, we investigated the neuronal expression of C5aR on hippocampal neurons, and the effect of C5a on its phosphorylation and on the growth of axotomized neurons, by measuring the axonal growth length and speed in vitro.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Hippocampal cells were isolated from embryonic Wistar rats (E18.5) and spinal cords from pregnant Wistar rats (n = 30), weighing 250 to 300 g (Centre d'Élevage Roger JANVIER®, Le Genest Saint Isle, France). A veterinarian performed animal sacrifices without any injected substances that could affect the cell cultures.

2.2. Experimental Design

In the first step, we cultured rat E18.5 embryonic hippocampal neurons, obtained by enzymatic and mechanical dissociation. Then, cell characterization, and C5aR expression and activation, were determined by immunostaining. RT-PCR and immunostaining were used to determine the C5aR mRNA and protein expression. C5a toxicity was evaluated by MTT assay. Then, a microfluidic device was fabricated using soft lithography, and the injured axonal growth speed and length were measured under the expression of a Green Fluorescent protein (GFP) using ImageJ and a tracing plugin after applying a C5a gradient (Figure 1).

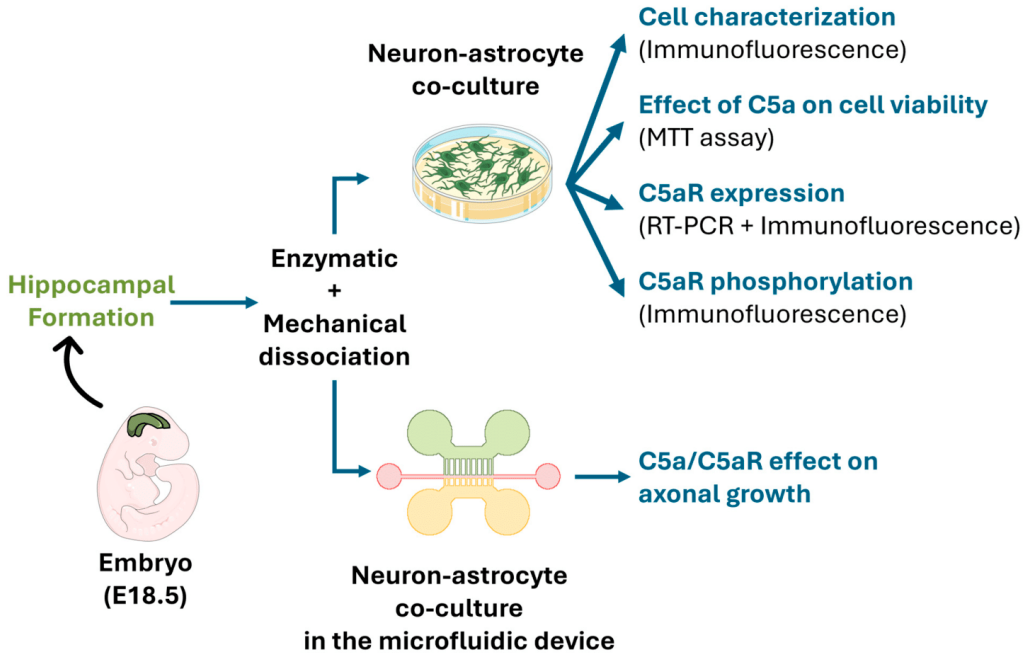


Figure 1. A schematic view of the experimental design. Cells were obtained from the hippocampal formation of rat embryos (E18.5) using enzymatic and mechanical dissociation methods. Neuron-astrocyte co-cultures were used to investigate C5aR expression/activation and the effect of C5a on cell viability. The microfluidic device was used to quantify the C5a effect on axonal growth.

2.3. Reagents and Materials

Cell culture media, supplements, laminin, and immunofluorescence mounting medium were purchased from ThermoFisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France) while cell culture materials were from Dominique Dutscher (Bernolsheim, France). Rabbit IgG against phosphorylated rat C5aR (AY-AF8362) was purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France); rabbit IgG anti-rat C5aR (CPA4586) from CliniSciences (Nanterre, France); Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (A11012), Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (A11034), Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse IgG (A21203), and rabbit IgG anti-rat NF-L (PA587394) from ThermoFischer Scientific; mouse IgG anti-rat glial Fibrillary Acidic Protein (MAB360) from Merck Millipore (Darmstadt, Germany); and mouse IgG anti-rat oligodendrocyte transcription factor (sc-515947) and mouse IgG anti-rat neuronal Differentiation 2 (sc-365896) from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Poly-D-lysin was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.4. Cell Cultures and Characterization

2.4.1. Primary Neuron Culture

Culture supports were coated with Poly-D-lysin (0.1 mg/mL) and laminin mouse protein (10 µg/mL) overnight at 4 °C. Hippocampal structures were isolated at 4 °C, washed 2 times in fresh HBSS/10 mM HEPES solution, and incubated at 37 °C for 15 min in HBSS/10 mM HEPES 0.25% trypsin for enzymatic cell dissociation. Mechanical dissociation was then performed with two different dimensions of a sterile pastor pipette precoated with fetal bovine serum (FBS). The supernatant was centrifuged for 5 min at 0.1 relative

centrifugal force (rcf) and the cellular pellet was suspended in 1 mL of Neurobasal™ medium 2% B-27™ supplemented with 1% Penicillin-Streptomycin (100 UI/mL) and 1% L-glutamine (0.5 mM) preheated at 37 °C. Cells were seeded in the same medium and incubated at 37 °C, 5% CO_2, and 95% humidity.

2.4.2. Cell Characterization

Cells were cultured (1.5×10^4 cells/cm^2) on glass coverslips. Then, after 14 days of culture, they were characterized by immunostaining. The cells were fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde (PFA) containing 4% sucrose prewarmed at 37 °C. After two washes with phosphate buffer (PBS), cells were permeabilized and nonspecific binding sites were blocked for 1 h at room temperature with 0.1 M PBS (pH 7.4), 0.22% gelatin, and 0.1% Triton X-100. The primary antibodies used were mouse IgG anti-rat glial fibrillary acidic protein (GFAP, 0.4 µg/mL), rabbit IgG anti-rat NF-L (7.9 µg/mL), mouse IgG anti-rat oligodendrocyte transcription factor (OLIG2, 0.4 µg/mL), and mouse IgG anti-rat neuronal Differentiation 2 (NeuroD2, 0.4 µg/mL). The primary antibodies and their respective control IgG were incubated overnight at 4 °C. The cells were then incubated with secondary antibodies: Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG and donkey anti-mouse IgG, and Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG, while nuclei were labeled with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1 µg/mL) for 1 h at room temperature. Images were acquired with an epifluorescence microscope (Axio Observer Z1, Carl Zeiss S.A.S., Marly Le Roi, France). The labeled cells were counted in three different fields at 20×, and the results are expressed as a percentage of the total cell count.

2.5. C5aR Expression

2.5.1. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Neurons were cultured in 6-well plates (4.5×10^4 cells/cm^2). After 14 days, the cells were injured with a sterile scalpel by performing 5 parallel horizontal and 5 perpendicular lines. Total RNA from injured and intact neurons was isolated using a PureLink RNA mini kit (Life Technologies, Oslo, Norway) according to the manufacturer's indications. Purified RNA was reverse transcribed into cDNA using the reverse transcription system kit (Promega, Madison, WI, USA). The primer sequences used are listed in Table 1. PCR products were separated onto 1% agarose gel using E-Gel™ Imager Blue-Light Base (ThermoFisher Scientific). Data were analyzed using a GelCapture image Analysis software version 4.25 (ThermoFischer Scientific). GAPDH gene expression was used as the internal control.

Table 1. Primers used for gene expression by RT-PCR.

	Forward Primer	Reverse Primer
C5aR	5′—ACCATTCCGTCCTTCGT—3′	5′—CACCACTTTGAGCGTCTT—3′
GAPDH	5′—GCAAGTTCAACGGCACAG—3′	5′—CGCCAGTAGACTCCACGAC—3′

2.5.2. Spinal Cord Isolation and Histological Processing

The cervical spinal cord was extracted from Wistar rats, routinely processed, and cryosectioned after discarding the meninges (n = 3). Immediately after rat sacrifice, the spinal cord was extracted with the meninges (C2-T12), fixed in 4% PFA overnight at room temperature, and conserved for 1 week in fresh 4% PFA at 4 °C. Then, tissular segments were removed from the meninges and cryoprotected with 0.1 M PBS 30% sucrose for 5 days at 4 °C before being frozen at −80 °C. Cryosection was performed with cryostat at a 5 µm thickness. Cervical sections were recovered on slides doubly gelatinized with distilled H_2O 0.1% porcine gelatin 0.5% Chromium (III) potassium sulfate dodecahydrate ($Crk(SO_4)_2$).

2.5.3. Immunostaining

Double immunostaining was performed on intact and injured neurons (1.5×10^4 cells/cm^2) cultured on a glass coverslip for 14 days. First, rabbit IgG anti-rat NF-L and Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (1 µg/mL) antibodies were used, and rabbit IgG anti-rat C5aR (0.7 µg/mL) and Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1 µg/mL) antibodies were applied with DAPI (1 µg/mL). Controls were prepared by incubating the cells with unrelated IgG isotypes.

Similarly, double immunostaining was performed on spinal cord cryosection to localize the NF-L in red and C5aR in green. Spinal cord sections were permeabilized and non-specific binding sites were blocked overnight with 0.1 M PBS (pH 7.4) 0.22% gelatin, and 0.1% Triton X-100. Sections were then incubated with primary antibodies of rabbit anti-rat NF-L, (1.18 µg/mL), rabbit IgG anti-rat C5aR (1.34 µg/mL), or control IgG for 48 h at 4 °C in a humidity chamber. Controls were performed by omitting the primary antibodies and nuclei were counterstained in blue using DAPI. After 3 washes (2 h) in 0.1 M PBS (pH 7.4) 0.22% gelatin, and 0.1% Triton X-100 at 30 rpm, sections were incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibodies Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG and 594 goat anti-rabbit IgG (0.25 µg/mL), and with DAPI (1 µg/mL). Spinal cord sections were washed 3 times for 2 h before being mounted with ProLong Glass^{TM} (ThermoFischer Scientific).

2.6. C5a and Cell Viability

Neurons (3.5×10^4 cells/cm^2) cultured in 48-well plates for 14 days were injured (as described above). After 30 min, cells were incubated for 24 h at 37 °C in a medium containing 3 concentrations of C5a (50, 200, and 1000 ng/mL). After 24 h and 48 h, an MTT assay was performed by incubating cells with (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (50 ng/mL) for 2 h at 37 °C. The supernatants were discarded and 350 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO, 100%) was added to each well. The optical density at 550 nm was recorded using a spectrometer (Σ960, Metertech, Taipei, Taiwan) and normalized to the number of surviving cells obtained at 2 h incubated in medium without C5a.

2.7. C5aR Phosphorylation

Neurons (6.5×10^4 cells/cm^2) were seeded in 8-well culture plates (Lab-Tek^{TM}, ThermoFisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). After 14 days, the cells were incubated in the culture medium for 1 h at 37 °C with the PMX53 (R&D Systems, Lille, France) at 500 ng/mL to ensure the inhibition of C5a fixation in conditions with the PMX53. Then, the cells were incubated for 5 min with the culture medium ± C5a (50 ng/mL) or with the C5a and PMX53 inhibitor. The cells were fixed with 4% PFA containing 4% sucrose for 20 min, blocked with PBS 4% BSA for 1 h, and permeabilized with PBS 0.1% Triton X-100 for 2 h at room temperature. Finally, immunostaining was performed using rabbit IgG anti-rat C5aR phosphorylated and rabbit IgG anti-rat NF-L as the primary antibodies, and Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG and goat anti-rabbit IgG 488 as the secondary antibodies.

2.8. Axonal Regeneration

2.8.1. Microfluidic Device Conception and Fabrication

The microfluidic device was developed by the Institut de Neurophysiophatologie (Timone, Marseille, France). It was fabricated using soft lithography as previously described [25,26]. First, a master mold of the chamber and microchannel was fabricated in polymerized resin (type R123, Soloplast, Vosschemie, France). Then the Epoxy molds were filled with Polydimethylsiloxane (PDMS) silicone (SYLGARDTM 184 Silicone Elastomer kit, Dow Silicones, Germany) and polymerized at 70 °C for 90 min. The silicon-containing chamber and microchannel stamps were de-molded and cleaned in ethanol with ultrasound for 1 min at 40 kHz (Ultrasonic Cleaner, BPAC, Vern-sur-Seiche, France). The cut PDMS and Petri dishes glass-bottom (FluoroDish, WPI) were placed into plasma cleaner (Diener Electronic, Ebhausen, Germany) under vacuum for 60 s for surface activation.

They were brought together to form a tight seal by incubating them for 30 min in an oven at 70 °C as described [26]. Then, they were plasma cleaned a second time for 6 s. This device was developed to culture neurons in the upper compartment and to allow axonal growth through 3 µm diameter microchannels to the lower compartment. The device also comprises a central channel designed perpendicular to the microchannels to perform the axotomy (Figure 2).

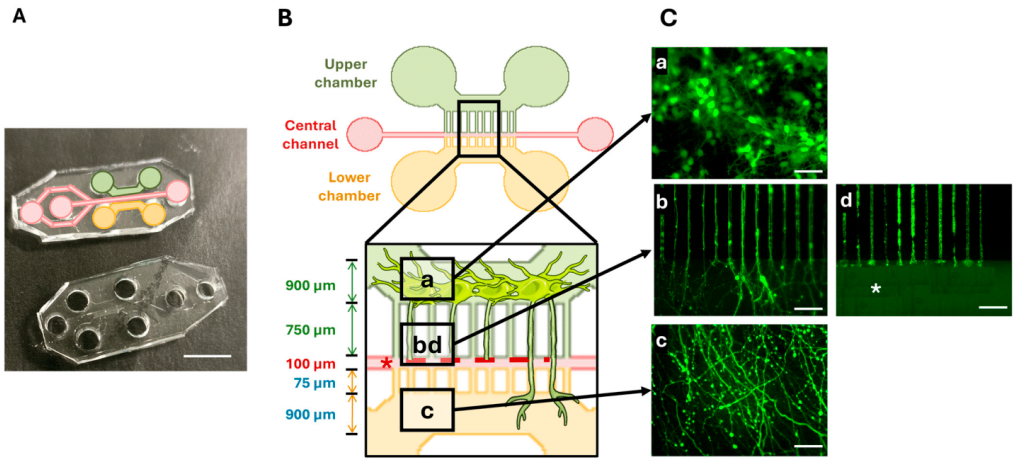


Figure 2. The microfluidic device. (**A**) A photography of the Polydimethylsiloxane (PDMS)-printed cell culture device. (**B**) A schematic drawing of the microfluidic device. The upper (green) and lower (orange) chambers are connected to a central channel (red) via 3 µm wide microchannels. Boxes indicate the regions of interest. (**C**) Cell culture and injury in the microfluidic device. The upper chamber contained green GFP-labeled neurons with cellular bodies measuring around 15 µm in diameter (a). The axons extend through the microchannels to the lower compartment (b). The lower chamber contained neurites (c). Injury to the axons was performed in the central channel (* and d). Scale bars: (**A**): 5 mm; (**C**): 50 µm.

2.8.2. Cell Culture in the Microfluidic Device

The device surface was treated as previously explained for cell cultures and the cells were seeded at 140 cells/cm^2 in the upper chamber for 3 h. The neurons were then infected with GFP lentivirus [26] 3 h after seeding and incubated for 14 days at 37 °C. Then, a mechanical axotomy was performed in the central channel on the mature axons by vacuum aspiration. The process was repeated 5 times to ensure a complete axotomy. After 30 min of incubation, a medium ± PMX53 (500 ng/mL) was added to the two compartments for 1 h. Subsequently, the compartments were emptied, and 40 µL of medium with C5a (50 ng/mL) or PMX53 and C5a was added to the lower chamber and 20 µL of medium without C5a into the upper one. A differential pressure was created by a volume difference, establishing a gradient between the two chambers 2 h after adding the treatment. The treatment conditions were medium (control), C5a (50 ng/mL), and C5a (50 ng/mL) + PMX53 (500 ng/mL). All these experiments were performed 12 times to decrease inter- and intra-variability. Live-cell imaging was performed using a microscope and a fluorescence filter at 450–490 nm (40×/1.3 Oil DICII, Optovar 1×) connected to a camera using MetaMorph software version 7.10.2.240 64-bit, (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). The region of interest (ROI) includes the central canal and the axonal compartment. ROI pictures at multiple steps were taken in these compartments in each device (20 × 3 pictures). These steps were performed at 0 h, 24 h, and 48 h after the gradient establishment.

2.8.3. Image Analysis

The ROI was reconstructed by creating a mosaic of all pictures in one chip using the MosaicJ plugin in ImageJ software 1.53k (Java 1.8.0_172 64-bit, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The cumulative length of axonal growth (n = 200 axons/conditions) was measured as a function of time by image analysis using the NeuronJ 1.4.3 plugin [27]. Values were collected in Excel version 2409 (Microsoft Ireland Operations Ltd., Dublin, Ireland) and the median replaced the values outside the interquartile range. The speed was calculated by the ratio of the axon length difference by the time (µm/h). All data were normalized as a percent of the control condition (Medium at 0 h).

2.9. Statistical Analysis

All experiments were performed at least in triplicate. Statistical analysis was performed using RStudio 1.4.1106 (Rasband, W.S., U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). After the Shapiro test, Friedman tests were conducted to assess temporal changes, and Kruskal–Wallis tests for condition comparisons with Bonferroni correction for multiple comparisons to study axonal growth speed and length. Additionally, Wilcoxon post hoc tests were performed to examine specific differences between conditions. Data are expressed as means ± SD and were considered significant for p-value < 0.05. Cell percentages were analyzed by performing the Shapiro, Kruskal–Wallis, and Wilcoxon post hoc tests with Bonferroni correction for cell culture characterization.

3. Results

3.1. Cell Culture Mainly Contained Neurons

The cells obtained from embryonic hippocampal rat formations (n = 3) developed extensive neurites (Figure 3A(a)). Immunofluorescence staining revealed that the cultured cells expressed the neuron intermediated filaments marker NF-L (Figure 3A(c)), specific to differentiated neurons, but did not express NeuroD2, the undifferentiated neuron marker (Figure 3A(b)). Furthermore, data analysis indicated that cells did not express the oligodendrocyte marker (oligodendrocyte transcription factor, Olig2) (Figure 3A(d)) but expressed the glial fibrillary acidic protein (GFAP) astrocyte marker (Figure 3A(e)). No staining was detected in the controls (Figure 3A(f)).

Analysis of the obtained cell populations revealed that our primary cultures were composed of 93 ± 5% of differentiated neurons (NF-L) and 7 ± 5% of astrocytes (GFAP) (Figure 3B). Kruskal–Wallis ($H(3) = 47.09$, $p = 3.331 \times 10^{-10}$), and Wilcoxon's post hoc test revealed that the primary culture was a mixed population of cells mainly composed of differentiated neurons (93%), astrocytes (7%), and other cell populations.

3.2. Neurons Expressed the C5aR

RT-PCR analysis on differentiated neuron cultures showed that C5aR mRNA was expressed in both injured and intact cultures (Figure 4A). Immunostaining revealed that the NF-L marker and C5aR were expressed and localized in the membrane around the cell bodies and cell extensions (Figure 4B(a,b)). The merged images indicated that these expressions were co-localized (Figure 4B(c)). No labeling was observed in the control condition (Figure 4B(d,h)) and the area on the lesion (Figure 4B(e–g)). In vivo, C5aR was strongly expressed in cells expressing NF-L in the grey and white matters (Figure 4C(a,b,e,f)). Merged images show a co-expression of C5aR and NF-L both in the grey and white matters (Figure 4C(c,g)), while no labeling was observed in the controls (Figure 4C(d,h)).

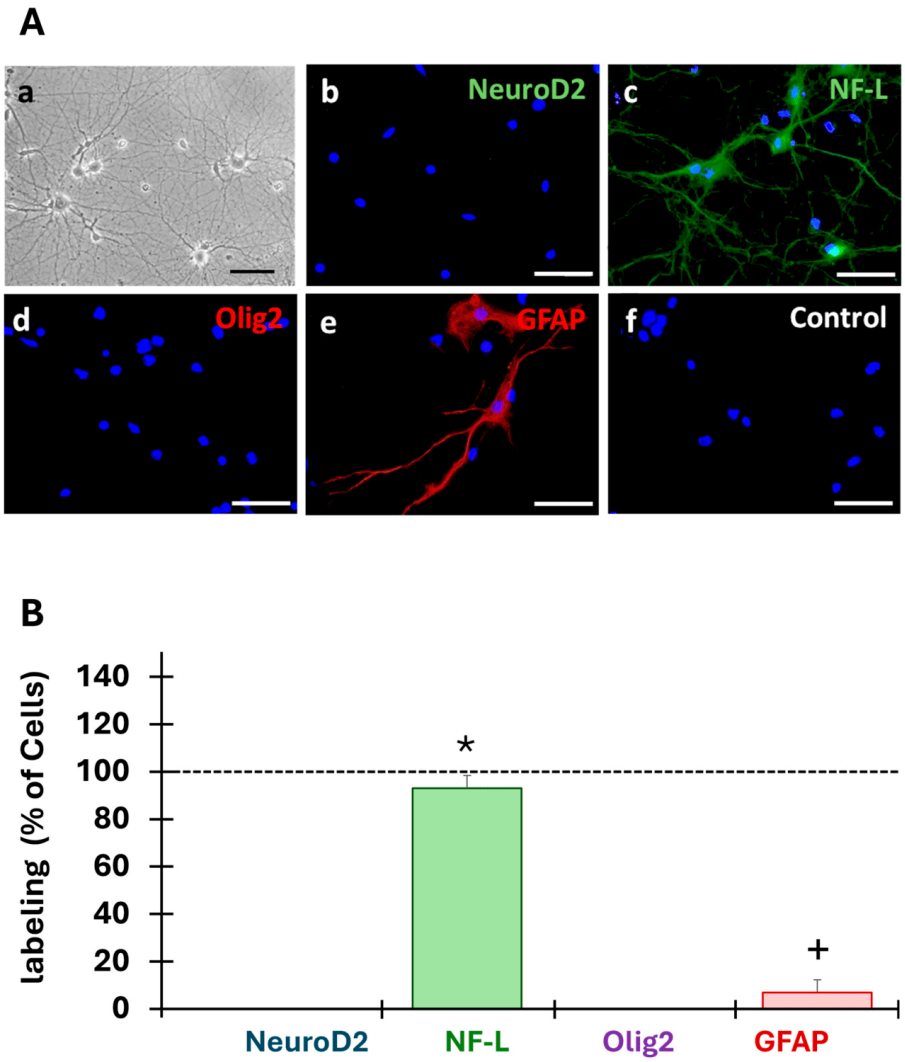


Figure 3. Characterization of the primary cell cultures. (**A**) After 14 days of culture, the cells obtained from embryonic hippocampal rat formations ($n = 3$) developed extensive neurites (**a**). Expression of markers of undifferentiated (NeuroD2) and differentiated (NF-L) neurons, astrocytes (GFAP), and oligodendrocytes (Olig2) was investigated by immunofluorescence. NF-L (**c**) and GFAP (**e**) were expressed in the primary cultures but not NeuroD2 (**b**) nor Olig2 (**f**). No staining was observed in the control condition (**d**). Scale bars: 50 µm. (**B**) The cells labeled with the different markers were counted in three fields (20×) and were expressed as a percentage of all cells (DAPI, dotted lines at 100%). * Indicates a significant ($p < 0.05$) difference between the percent of NF-labeled cells and the other conditions, and + indicates a significant ($p < 0.05$) difference between the percentage of GFAP-labeled cells with other conditions.

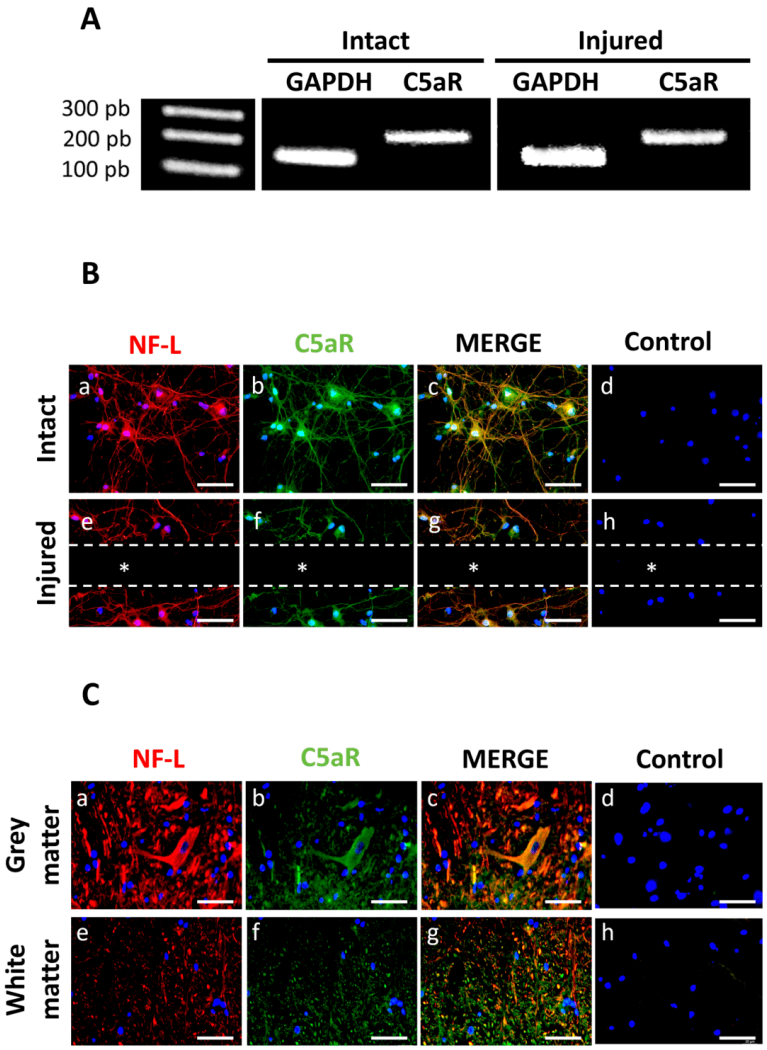


Figure 4. C5aR expression in neuron-astrocyte co-cultures by RT-PCR. (**A**) C5aR mRNA expression was observed in both injured and intact cell cultures. Controls included expression of housekeeping GAPDH mRNA. (**B**) Double immunostaining for NF-L (green) and C5aR (red) indicated that injured and intact neurons expressed NF-L (**a**,**e**) and C5aR (**b**,**f**) on their membranes ($n = 3$). Merged images in yellow (**c**,**g**) revealed a co-localization of these markers. Controls for each condition were performed by omitting the primary antibodies (**d**,**h**) and nuclei were counterstained using DAPI. The dotted lines and * indicate the site of injury. Scale bars: 50 µm. (**C**) Double immunostaining of NF-L in red (**a**,**e**) and C5aR in green (**b**,**f**) on spinal cord cryosections. Controls were performed by omitting the primary antibodies (**d**,**h**) and nuclei were counterstained in blue using DAPI. Images revealed that C5aR was co-expressed with NF-L in grey and white matters (yellow in (**c**,**g**)). Scale bars: 50 µm.

3.3. C5a Did Not Affect Cell Viability

The use of C5a at all determined concentrations (50, 200, and 1000 ng/mL) did not affect the cell viability at all tested concentrations for 24 or 48 h (Figure 5).

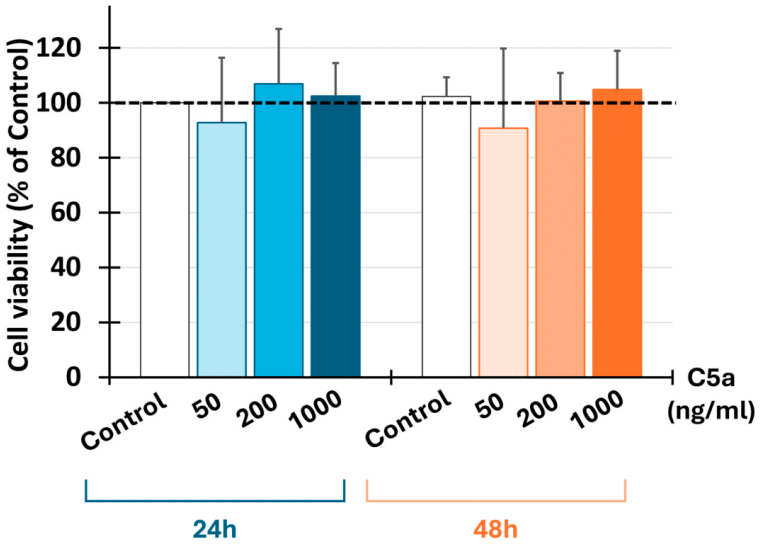


Figure 5. C5a and cell viability. Injured neural cell viability was determined by MTT assay after 24 and 48 h of culture (n = 5) using three C5a concentrations: 50 ng/mL, 200 ng/mL, and 1000 ng/mL. The results are expressed as a percentage of control (dashed line). C5a did not affect the cell viability after 24 or 48 h.

3.4. C5a Induced C5aR Phosphorylation

Immunofluorescence demonstrated a co-localization of phosphorylated C5aR (C5aR-P) with the mature neuron NF-L marker (Figure 6a). Adding C5a to the differentiated cell cultures phosphorylated the C5aR-P on these cells (Figure 6b). When the C5aR inhibitor (PMX53) was added together with the C5a, immunofluorescence demonstrated an absence of phosphorylation of the C5a receptor (Figure 6c).

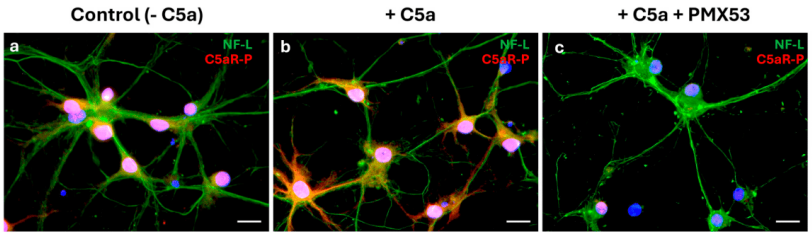


Figure 6. Interaction between C5a and neuron C5aR. Cells were cultured in the B-27-supplemented neurobasal medium as a control condition without C5a (**a**), stimulated with C5a (50 ng/mL) (**b**) or with both C5a and PMX53 (**c**) for 5 min (n = 3). Immunostaining of the phosphorylated C5a receptor (C5aR-P, red) and NF-L (green) indicated that while NF-L was expressed in all conditions, C5aR-P was not expressed by cells when the inhibitor was added. Scale bars: 20 µm.

3.5. Culture of Neurons in the Microfluidic Device and Axonal Growth

Two days after cell seeding, GFP protein was added to the neurons in the microfluidic device (Figure 2C). The cell bodies, measuring around 15 µm, were maintained in the upper chamber (Figure 2C(a)), whereas the axons grew through the microchannels (Figure 2C(b)) into the lower chamber (Figure 2C(c)). The mechanical injury was performed in the central channel where no axons were detectable after the vacuum aspiration was performed (Figure 2C(b)).

3.6. C5a Increased the Axonal Growth

After axotomy, the axonal growth significantly increased ($p < 0.05$) between 24 (Figure 7A(a–c),B) and 48 h (Figure 7A(d–f),B) under all culture conditions. Kruskal–Wallis tests revealed significant differences between the conditions at both 24 h (H = 102.04, df = 2, $p = 2.2 \times 10^{-16}$) and 48 h (H = 134.02, df = 2, $p = 2.2 \times 10^{-16}$). The axonal growth with C5a was significantly higher than without C5a both after 24 h and 48 h (Figure 7B) ($p < 0.05$). This axonal growth increase was suppressed after the addition of the C5aR inhibitor (PMX53), leading to values comparable to those of the control at both periods (Figure 7A(c,f),B).

3.7. The Effect of C5a Treatment on Axonal Growth Speed

Measurement of the axonal growth showed that C5a significantly enhanced the axonal growth speed from 0–24 h and 24–48 h hours as compared to the control without C5a ($p < 0.05$). The Kruskal–Wallis test revealed highly significant differences between conditions at 0–24 h (H = 147.38, df = 2, $p = 2.2 \times 10^{-16}$) and 24–48 h (H = 121.46, df = 2, $p = 2.2 \times 10^{-16}$). This speed significantly decreased between 24 and 48h with the control and after adding C5a ($p < 0.05$). When PMX53 was added to the medium containing C5a, the axonal growth speed significantly decreased when compared to the control and remained stable between 24 and 48 h (Figure 8).

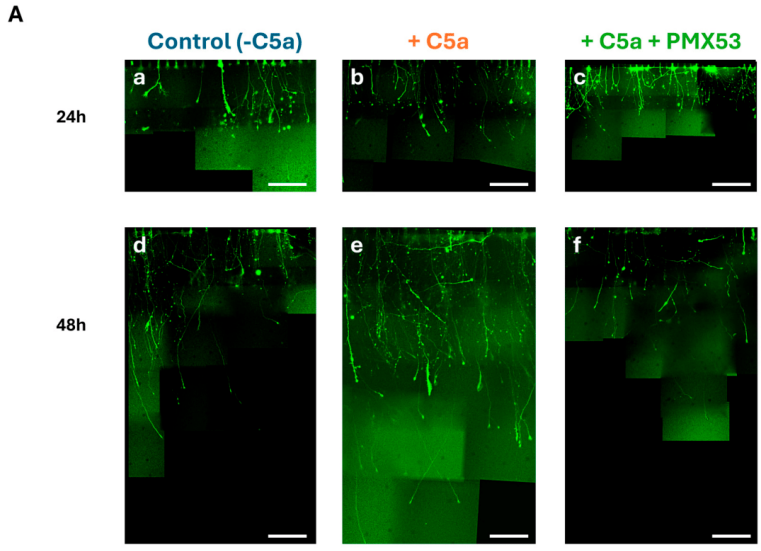


Figure 7. *Cont.*

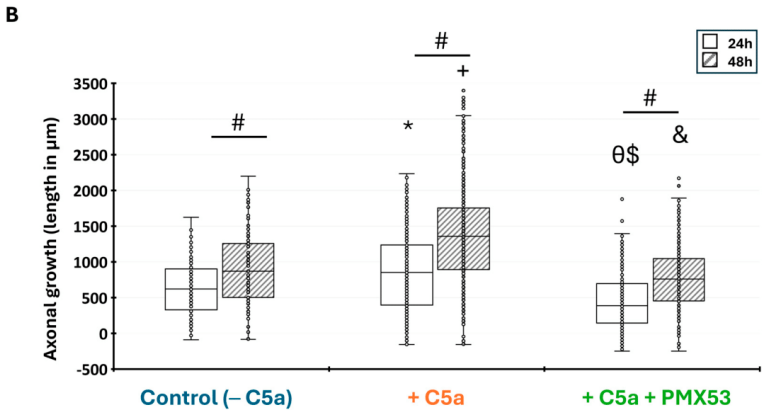


Figure 7. Axonal growth in the microfluidic device. (**A**) Cells were incubated with the control medium for 48 h either without C5a (**a**,**d**), or with C5a (50 ng/mL) (**b**,**e**), or with both C5a and PMX53 (**c**,**f**). GFP labeling allowed visualization of the axonal growth via pictures taken at 40×. The axonal growth is reported by combining the images obtained over the 48 h growth period. Scale bars: 100 µm. (**B**) After axonal injury, the axonal length significantly increased under all conditions between 24 h (white) and 48 h (hatching). Adding C5a significantly increased the axonal length at 24 h and at 48 h as compared to the controls at the same delays. This increase was suppressed after adding the C5aR inhibitor. Results are presented as boxplots. The central line in each boxplot represents the median values while the box edges indicate the first and third quartiles. All points beyond the whiskers up to 1.5 times the interquartile range are considered as outliers. # indicates a significant ($p < 0.05$) difference between incubation periods for the same treatment. * and + indicate significant ($p < 0.05$) differences between the axonal lengths after adding C5a as compared to the control at 24 and 48 h, respectively. $ and & indicate significant ($p < 0.05$) differences with C5a + PMX53 compared to the C5a treatment at 24 and 48 h, respectively. Θ indicates significant ($p < 0.05$) differences with C5a + PMX53 compared to the control at 24 h.

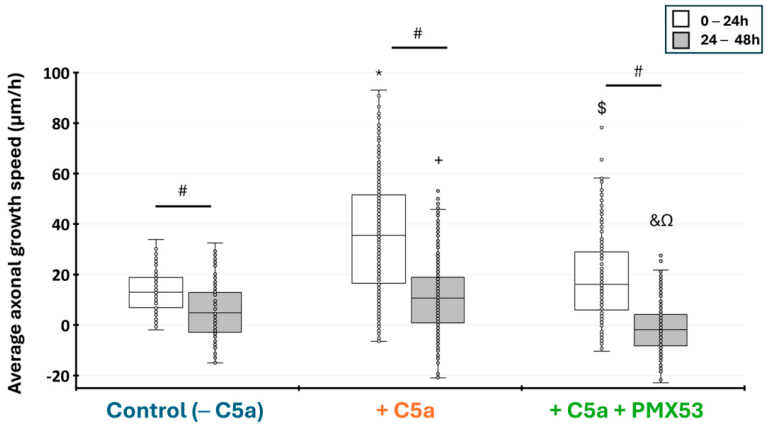


Figure 8. Injured axonal growth speed in the microfluidic device. The average growth speed (µm/h) was measured between 0–24 h and 24–48 h after the axonal injury. The axonal growth speed was higher

during the first 24 h and slower from 24 to 48 h with all culture conditions. This speed significantly increased when C5a was added to the injured neurons for the periods from 0 to 24 h and from 24 to 48 h. Adding PMX53 and C5a simultaneously significantly decreased the axonal growth speed at both time periods. Results are presented as boxplots. The central line in each boxplot represents the median values while the box edges indicate the first and third quartiles. All points beyond the whiskers up to 1.5 times the interquartile range are considered as outliers. # indicates a significant ($p < 0.05$) difference between incubation periods for the same treatment. * and + indicate significant ($p < 0.05$) differences after between the axonal growth speed after adding C5a as compared to the control at 0–24 h and 24–48 h, respectively. $ and & indicate significant ($p < 0.05$) differences with C5a + PMX53 compared to the C5a treatment at 0–24 h and 24–48 h, respectively. Ω indicates significant ($p < 0.05$) differences with C5a + PMX53 compared to the control at 24–48 h.

4. Discussion

This study shows that C5aR is expressed in neurons of hippocampal formation and that C5a enhances the injured axonal growth.

In situ hybridization combined with immunohistochemistry have already demonstrated that most neurons in the hippocampal formation constitutively express C5a receptors, which responded to C5a with increased calcium fluxes [22]. C5aR expression has also been reported in the spinal cord on motor neurons, and the microglia and its expression was significantly upregulated in the lumbar spinal cord following spinal cord injury [28]. Thus, C5aR expression in neurons is not a new finding. However, the novelty of this work is the demonstration that C5a phosphorylates its receptor on neurons and subsequently enhances the injured axonal growth. This investigation was possible thanks to the 3D-printed microfluidic device, which has been previously used as an in vitro model of axonal growth [25]. This model allowed us to (1) seed the cells in the upper chamber; (2) isolate and direct the axonal growth in microchannels of a separate compartment; (3) make a mechanical injury of the axons in the central channel and control their growth; and (4) apply a C5a in the lower chamber to create a gradient over 48 h between the upper and lower chambers through the microchannels. Use of this microfluidic device demonstrated that when C5a was applied in the lower chamber, the axons grew from the upper chamber towards C5a in the lower chamber through the microchannels. However, adding the C5a antagonist, PMX53, inhibited the C5aR phosphorylation in the cell culture and significantly inhibited the axonal growth. This highlights that the axonal growth is C5a-dependent. Surprisingly, although to a lesser extent than after adding C5a, adding the culture medium also enhanced the C5aR phosphorylation. This could be due to the secretion of C5a by astrocytes and neurons as reported previously [29,30]. Of note, these cells represent 7 and 93% of our cell cultures, respectively.

Our work demonstrates that C5a significantly enhanced the axonal growth after a mechanical injury. Indeed, while the average axonal growth speed of the control was 13 µm/h, adding C5a enhanced the axonal growth speed to 35 µm/h. This is of particular interest as adult central nervous system neurons have a weak axonal regeneration capacity with a reported speed ranging from ~2 to 10.7 µm/h [31,32]. Differences in the experimental designs used might explain this difference in the axonal growth speed between our results and previously reported data. Nevertheless, this highlights that C5a modulates the axonal growth after axotomy, which is of prime importance in case of injury to the central nervous system. This was investigated by injecting C5a intraperitoneally before or after spinal cord injury. When C5a was injected 24 h before or immediately after injury, the locomotor function, assessed for 9 weeks after SCI, was significantly impaired. However, when the treatment with C5a took place 24 h after injury, locomotor function improved significantly. This highlights that the delayed post-injury administration of C5a improves regeneration and functional recovery after spinal cord injury in mice [23].

C5a has been reported to have other effects on neurons, including a neuroprotective effect. Indeed, while adding C5a (50–100 nM) to cultured neurons significantly enhanced neurite outgrowth, it also inhibited caspase-3-mediated neuron apoptosis [23,33]. Similarly,

pre-treatment of murine cortico-hippocampal neuronal cultures with C5a protected against glutamate-mediated apoptosis [34]. A confirmation of this effect was reported in C5aR knockout mice which confirmed that C5a deficiency renders C5aR knockout animals more susceptible to apoptotic injury in vivo [35]. Our findings are in line with these data as the observed effects in our study were obtained with the same C5a concentration (50 nM).

Notwithstanding the C5a-enhanced injured axonal speed in vitro, understanding C5a effects in vivo is much more difficult. This is due to the fact that, after spinal cord injury, C5a has been demonstrated to have time-dependent effects [18,23]. The initial effects have been ascribed to C5a implication in neuroprotection and inflammation [22,36,37] while the delayed effects are due to its implication in the improvement of regeneration and functional recovery after spinal cord injury [23]. This explains why some studies targeted C5a in the acute injury phase, as it may have deleterious effects and may hinder the delayed regeneration stage [16,17]. Pharmacological blockade or genetic ablation of the C5a receptor (C5aR) in mice significantly improved functional recovery [17]. These functional benefits corresponded with reduced inflammatory cytokine levels and monocyte-derived macrophage infiltration early after injury. Conversely, prolonged C5aR blockade for up to 21 days post-injury or permanent blockade in C5aR knock-out impaired the formation of the astrogliosis scar around the lesion core, exacerbated peripheral immune cell infiltration and lesion size, and reduced functional recovery [18].

It should be noted, however, that our results are obtained in vitro and the neurons used here are completely isolated/protected from the immune system/inflammatory events reported in vivo. Thus, our results cannot be compared to the clinical situation. However, this work highlights that inhibiting C5a, which provides neuroprotection and enhances axonal growth, may not be the best option in the therapeutic treatment of spinal cord injury. These results rather represent a future research direction.

In this context, the enhancement of axonal growth appears pivotal. The effect of C5a on axonal growth can be direct, as reported above, or indirect through inducing cellular release of neurotrophic factors. While our data demonstrate a direct effect of C5a by interacting with its receptor and enhancing axonal growth, the indirect effect has been illustrated in a previous study where C5a stimulated NGF secretion from dental pulp fibroblasts, leading to nerve sprouting and pulp nerve regeneration [24]. Similarly, astrocytes are known to secrete growth factors such as NGF and proliferate following C5a stimulation through STAT-3 pathway signalization [17,38]. Thus, activation of astrocytes by C5a could lead to release of growth factors by these cells and subsequently increase axonal growth. While the link between astrocyte activation by C5a, neurotrophic factor release, and axonal growth needs to be investigated, this highlights that C5a and its receptor also indirectly contribute to the outgrowth of peripheral axons [24].

Finally, while axonal regeneration is very limited in adult neurons as compared to the developing tissue, the cells obtained in this study are mainly mature neurons and the observed effects of C5a on the enhancement of axonal growth is of an added value for future investigations in vivo.

Thus, while C5a has the potential to stimulate axonal regeneration of mature neurons in vitro, and its delayed injection after spinal cord injury enhanced axonal growth and improved locomotor function, future studies are scheduled to investigate the effect of C5a sustained release from a specifically designed scaffold on healing and locomotor recovery after spinal cord injury.

5. Conclusions

Our findings highlight a new role of C5a in axonal regeneration by increasing the length and speed of axonal growth in vitro. These results may provide a valuable future therapeutic tool in CNS injury to repair neural networks over long distances and within the inhibitory environment of the adult CNS.

Author Contributions: Conceptualization, A.C., C.J., P.D. and I.A.; methodology, A.C. and C.J.; software, A.C.; validation, A.C., C.J., P.D. and I.A.; data curation, A.C.; writing—original draft prepa-

ration, A.C.; writing—review and editing, A.C., C.J., P.D. and I.A.; visualization, A.C.; supervision, C.J., P.D. and I.A.; project administration, P.D. and I.A.; funding acquisition, I.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Aix-Marseille Université (AMU) and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Institutional Review Board Statement: All experiments were conducted in accordance with the French legislation related to animal care guidelines for animal experimentation, and they were conducted after receiving approval from the Animal Care Committees of Aix-Marseille Université and the Centre National de la Recherche Scientifique. The authorization number granted by the French Ministry of Higher Education, Research, and Innovation (MESRI) is APAFIS#20242. All individuals involved in the experiments held the necessary licenses to conduct live animal experiments (License G130555).

Informed Consent Statement: Not applicable

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Acknowledgments: We thank Maxime Cazorla and Maxime Bonnet for the free access to the microfluidic device platform and for their guidance in the fabrication and culture process. We also thank Christophe Leterrier and Fanny Rueda for sharing their expertise in the neurons culture.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Moreland, T.; Poulain, F.E. To Stick or Not to Stick: The Multiple Roles of Cell Adhesion Molecules in Neural Circuit Assembly. *Front. Neurosci.* **2022**, *16*, 889155. [CrossRef] [PubMed]
2. Yuasa-Kawada, J.; Kinoshita-Kawada, M.; Tsuboi, Y.; Wu, J.Y. Neuronal Guidance Genes in Health and Diseases. *Protein Cell* **2022**, *14*, 238–261. [CrossRef] [PubMed]
3. Bradke, F. Mechanisms of Axon Growth and Regeneration: Moving between Development and Disease. *J. Neurosci.* **2022**, *42*, 8393–8405. [CrossRef] [PubMed]
4. Tedeschi, A.; Bradke, F. Spatial and Temporal Arrangement of Neuronal Intrinsic and Extrinsic Mechanisms Controlling Axon Regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2017**, *42*, 118–127. [CrossRef]
5. Alto, L.T.; Havton, L.A.; Conner, J.M.; Hollis, E.R.; Blesch, A.; Tuszynski, M.H. Chemotropic Guidance Facilitates Axonal Regeneration and Synapse Formation after Spinal Cord Injury. *Nat. Neurosci.* **2009**, *12*, 1106–1113. [CrossRef]
6. Cafferty, W.B.J.; McGee, A.W.; Strittmatter, S.M. Axonal Growth Therapeutics: Regeneration or Sprouting or Plasticity? *Trends Neurosci.* **2008**, *31*, 215–220. [CrossRef]
7. Zhang, Y.; Al Mamun, A.; Yuan, Y.; Lu, Q.; Xiong, J.; Yang, S.; Wu, C.; Wu, Y.; Wang, J. Acute Spinal Cord Injury: Pathophysiology and Pharmacological Intervention. *Mol. Med. Rep.* **2021**, *23*, 417. [CrossRef]
8. Shang, Z.; Wang, M.; Zhang, B.; Wang, X.; Wanyan, P. Clinical Translation of Stem Cell Therapy for Spinal Cord Injury Still Premature: Results from a Single-Arm Meta-Analysis Based on 62 Clinical Trials. *BMC Med.* **2022**, *20*, 284. [CrossRef]
9. Zheng, Y.; Gallegos, C.M.; Xue, H.; Li, S.; Kim, D.H.; Zhou, H.; Xia, X.; Liu, Y.; Cao, Q. Transplantation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Progenitor Cells Promotes Forelimb Functional Recovery after Cervical Spinal Cord Injury. *Cells* **2022**, *11*, 2765. [CrossRef]
10. Haggerty, A.E.; Oudega, M. Biomaterials for Spinal Cord Repair. *Neurosci. Bull.* **2013**, *29*, 445–459. [CrossRef]
11. Ziemba, A.M.; Gilbert, R.J. Biomaterials for Local, Controlled Drug Delivery to the Injured Spinal Cord. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 245. [CrossRef] [PubMed]
12. Bergmann, M.; Jeanneau, C.; Giraud, T.; Richard, G.; About, I. Complement Activation Links Inflammation to Dental Tissue Regeneration. *Clin. Oral. Investig.* **2020**, *24*, 4185–4196. [CrossRef] [PubMed]
13. Guo, R.-F.; Ward, P.A. Role of C5a in Inflammatory Responses. *Annu. Rev. Immunol.* **2005**, *23*, 821–852. [CrossRef] [PubMed]
14. Le Fournis, C.; Jeanneau, C.; Roumani, S.; Giraud, T.; About, I. Pulp Fibroblast Contribution to the Local Control of Pulp Inflammation via Complement Activation. *J. Endod.* **2020**, *46*, S26–S32. [CrossRef] [PubMed]
15. Le Fournis, C.; Hadjichristou, C.; Jeanneau, C.; About, I. Human Pulp Fibroblast Implication in Phagocytosis via Complement Activation. *J. Endod.* **2019**, *45*, 584–590. [CrossRef]
16. Biggins, P.J.C.; Brennan, F.H.; Taylor, S.M.; Woodruff, T.M.; Ruitenberg, M.J. The Alternative Receptor for Complement Component 5a, C5aR2, Conveys Neuroprotection in Traumatic Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma* **2017**, *34*, 2075–2085. [CrossRef]
17. Brennan, F.H.; Gordon, R.; Lao, H.W.; Biggins, P.J.; Taylor, S.M.; Franklin, R.J.M.; Woodruff, T.M.; Ruitenberg, M.J. The Complement Receptor C5aR Controls Acute Inflammation and Astrogliosis Following Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 6517–6531. [CrossRef]
18. Ulndreaj, A.; Marbourg, J.M.; Vidal, P.M. The Complement Receptor C5aR Has a Dual, Time-Dependent Effect on the Outcome of Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 12325–12327. [CrossRef]

19. Coulthard, L.G.; Hawksworth, O.A.; Li, R.; Balachandran, A.; Lee, J.D.; Sepehrband, F.; Kurniawan, N.; Jeanes, A.; Simmons, D.G.; Wolvetang, E.; et al. Complement C5aR1 Signaling Promotes Polarization and Proliferation of Embryonic Neural Progenitor Cells through PKCζ. *J. Neurosci.* **2017**, *37*, 5395–5407. [CrossRef]
20. Nataf, S.; Levison, S.; Barnum, S. Expression of the Anaphylatoxin C5a Receptor in the Oligodendrocyte Lineage. *Brain Res.* **2001**, *894*, 321–326. [CrossRef]
21. Crane, J.; Baiquni, G.; Sullivan, R.; Lee, J.; Sah, P.; Taylor, S.; Noakes, P.; Woodruff, T. The C5a Anaphylatoxin Receptor CD88 Is Expressed in Presynaptic Terminals of Hippocampal Mossy Fibres. *J. Neuroinflamm.* **2009**, *6*, 34. [CrossRef] [PubMed]
22. O'Barr, S.A.; Caguioa, J.; Gruol, D.; Perkins, G.; Ember, J.A.; Hugli, T.; Cooper, N.R. Neuronal Expression of a Functional Receptor for the C5a Complement Activation Fragment. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 4154–4162. [CrossRef] [PubMed]
23. Guo, Q.; Cheng, J.; Zhang, J.; Su, B.; Bian, C.; Lin, S.; Zhong, C. Delayed Post-Injury Administration of C5a Improves Regeneration and Functional Recovery after Spinal Cord Injury in Mice. *Clin. Exp. Immunol.* **2013**, *174*, 318–325. [CrossRef] [PubMed]
24. Chmilewsky, F.; Ayaz, W.; Appiah, J.; About, I.; Chung, S. Nerve Growth Factor Secretion From Pulp Fibroblasts Is Modulated by Complement C5a Receptor and Implied in Neurite Outgrowth. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31799. [CrossRef] [PubMed]
25. Taylor, A.M.; Blurton-Jones, M.; Rhee, S.W.; Cribbs, D.H.; Cotman, C.W.; Jeon, N.L. A Microfluidic Culture Platform for CNS Axonal Injury, Regeneration and Transport. *Nat. Methods* **2005**, *2*, 599–605. [CrossRef] [PubMed]
26. Virlogeux, A.; Moutaux, E.; Christaller, W.; Genoux, A.; Bruyère, J.; Fino, E.; Charlot, B.; Cazorla, M.; Saudou, F. Reconstituting Corticostriatal Network On-a-Chip Reveals the Contribution of the Presynaptic Compartment to Huntington's Disease. *Cell Rep.* **2018**, *22*, 110–122. [CrossRef]
27. Meijering, E.; Jacob, M.; Sarria, J.-C.F.; Steiner, P.; Hirling, H.; Unser, M. Design and Validation of a Tool for Neurite Tracing and Analysis in Fluorescence Microscopy Images. *Cytometry A* **2004**, *58*, 167–176. [CrossRef]
28. Dong, Q.; Sun, L.; Peng, L.; Yan, B.; Lv, J.; Wang, G.; Gong, S. Expression of C5a and Its Receptor Following Spinal Cord Ischemia Reperfusion Injury in the Rat. *Spinal. Cord.* **2015**, *53*, 581–584. [CrossRef]
29. Thomas, A.; Gasque, P.; Vaudry, D.; Gonzalez, B.; Fontaine, M. Expression of a Complete and Functional Complement System by Human Neuronal Cells in Vitro. *Int. Immunol.* **2000**, *12*, 1015–1023. [CrossRef]
30. Yu, J.X.; Bradt, B.M.; Cooper, N.R. Constitutive Expression of Proinflammatory Complement Components by Subsets of Neurons in the Central Nervous System. *J. Neuroimmunol.* **2002**, *123*, 91–101. [CrossRef]
31. Li, D.; Zhang, S.; Yao, Y.; Xiang, Y.; Ma, X.; Wei, X.; Yan, H.; Liu, X. Sigma-1 Receptor Agonist Increases Axon Outgrowth of Hippocampal Neurons via Voltage-gated Calcium Ions Channels. *CNS Neurosci. Ther.* **2017**, *23*, 930–939. [CrossRef] [PubMed]
32. Nieuwenhuis, B.; Barber, A.C.; Evans, R.S.; Pearson, C.S.; Fuchs, J.; MacQueen, A.R.; van Erp, S.; Haenzi, B.; Hulshof, L.A.; Osborne, A.; et al. PI 3-kinase Delta Enhances Axonal PIP 3 to Support Axon Regeneration in the Adult CNS. *EMBO Mol. Med.* **2020**, *12*, e11674. [CrossRef] [PubMed]
33. Mukherjee, P.; Pasinetti, G.M. Complement Anaphylatoxin C5a Neuroprotects through Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Inhibition of Caspase 3. *J. Neurochem.* **2001**, *77*, 43–49. [CrossRef] [PubMed]
34. Tocco, G.; Musleh, W.; Sakhi, S.; Schreiber, S.S.; Baudry, M.; Pasinetti, G.M. Complement and Glutamate Neurotoxicity. Genotypic Influences of C5 in a Mouse Model of Hippocampal Neurodegeneration. *Mol. Chem. Neuropathol.* **1997**, *31*, 289–300. [CrossRef]
35. Mukherjee, P.; Thomas, S.; Pasinetti, G.M. Complement Anaphylatoxin C5a Neuroprotects through Regulation of Glutamate Receptor Subunit 2 in Vitro and in Vivo. *J. Neuroinflamm.* **2008**, *5*, 5. [CrossRef]
36. Bamberg, C.E.; Mackay, C.R.; Lee, H.; Zahra, D.; Jackson, J.; Lim, Y.S.; Whitfeld, P.L.; Craig, S.; Corsini, E.; Lu, B.; et al. The C5a Receptor (C5aR) C5L2 Is a Modulator of C5aR-Mediated Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 7633–7644. [CrossRef]
37. Donnelly, D.J.; Popovich, P.G. Inflammation and Its Role in Neuroprotection, Axonal Regeneration and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *Exp. Neurol.* **2008**, *209*, 378–388. [CrossRef]
38. Jauneau, A.; Ischenko, A.; Chatagner, A.; Benard, M.; Chan, P.; Schouft, M.; Patte, C.; Vaudry, H.; Fontaine, M. Interleukin-1beta and Anaphylatoxins Exert a Synergistic Effect on NGF Expression by Astrocytes. *J. Neuroinflamm.* **2006**, *3*, 8. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

11.2. Article 2

Roumani, S., Jeanneau, C., Giraud, T., Cotten, A., Laucournet, M., Sohier, J., Pithioux, M., About, I., 2023. Osteogenic Potential of a Polyethylene Glycol Hydrogel Functionalized with Poly-Lysine Dendrigrafts (DGL) for Bone Regeneration. Mater. Basel Switz. 16, 862. https://doi.org/10.3390/ma16020862

Cet article présente un lien direct avec mes travaux de recherche car il explore l'utilisation de biomatériaux fonctionnalisés pour favoriser la régénérescence tissulaire. Bien que l'article se concentre sur la régénérescence osseuse, il met en avant une méthodologie expérimentale similaire à celle que j'ai employée dans mes recherches notamment l'intégration de molécules bioactives, ici les dendrigrafts de poly-l-lysine au sein d'un hydrogel de polyéthylène glycol

materials

MDPI

Article

Osteogenic Potential of a Polyethylene Glycol Hydrogel Functionalized with Poly-Lysine Dendrigrafts (DGL) for Bone Regeneration

Sandra Roumani [1], Charlotte Jeanneau [1], Thomas Giraud [1,2], Aurélie Cotten [1], Marc Laucournet [3], Jérôme Sohier [3], Martine Pithioux [1,4] and Imad About [1,*]

[1] Aix-Marseille University, CNRS, ISM, 13009 Marseille, France
[2] APHM, Hôpital Timone, Pôle Odontologie, 13005 Marseille, France
[3] Laboratory for Tissue Biology and Therapeutic Engineering (LBTI), UMR 5305, CNRS, Lyon University, 69367 Lyon, France
[4] Aix-Marseille University, APHM, CNRS, ISM, Sainte-Marguerite Hospital, Institute for Locomotion, Department of Orthopaedics and Traumatology, 13009 Marseille, France
* Correspondence: imad.about@univ-amu.fr; Tel.: +33-(0)4-86-13-68-59

Abstract: Resorbable hydrogels are widely used as scaffolds for tissue engineering. These hydrogels can be modified by grafting dendrimer-linked functionalized molecules (dendrigrafts). Our aim was to develop a tunable poly(L-lysine) dendrigrafts (DGL)/PEG-based hydrogel with an inverse porosity and to investigate its osteogenic potential. DGL/PEG hydrogels were emulsified in a surfactant-containing oil solution to form microspheres. The toxicity was evaluated on Human Vascular Endothelial Cells (HUVECs) and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) with Live/Dead and MTT assays. The effects on HUVECs were investigated through C5 Complement expression by RT-PCR and C5a/TGF-β1 secretion by ELISA. Recruitment of hMSCs was investigated using Boyden chambers and their osteogenic differentiation was studied by measuring Alkaline Phosphatase activity (ALP) and BMP-2 secretion by ELISA. Adjusting the stirring speed during the emulsification allowed to obtain spherical microspheres with tunable diameters (10–1600 µm). The cell viability rate with the hydrogel was 95 and 100% with HUVECs and hMSCs, respectively. Incubating HUVECs with the biomaterial induced a 5-fold increase in TGF-β1 and a 3-fold increase in Complement C5a release. Furthermore, HUVEC supernatants obtained after incubation with the hydrogel induced a 2.5-fold increase in hMSC recruitment. The hydrogel induced a 3-fold increase both in hMSC ALP activity and BMP-2 secretion. Overall, the functionalized hydrogel enhanced the osteogenic potential by interacting with endothelial cells and hMSCs and represents a promising tool for bone tissue engineering.

Keywords: poly-lysin dendrigraft; hydrogel; bone regeneration scaffold; stem cell chemotaxis; osteogenic potential

check for updates

Citation: Roumani, S.; Jeanneau, C.; Giraud, T.; Cotten, A.; Laucournet, M.; Sohier, J.; Pithioux, M.; About, I. Osteogenic Potential of a Polyethylene Glycol Hydrogel Functionalized with Poly-Lysine Dendrigrafts (DGL) for Bone Regeneration. *Materials* **2023**, *16*, 862. https://doi.org/10.3390/ma16020862

Academic Editor: Haobo Pan

Received: 30 November 2022
Revised: 28 December 2022
Accepted: 12 January 2023
Published: 16 January 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Bone regeneration is a well-orchestrated process which occurs through successive steps including hematoma formation, acute inflammatory reaction, granulation tissue formation, bone regeneration and remodeling [1–5]. During this process, mesenchymal stem cells (MSCs) are recruited from the bone marrow, the periosteum, and the endosteum, and differentiate towards the chondrogenic and osteogenic lineages to regenerate bone [5]. In small size defects, this process leads to a spontaneous bone regeneration. However, if a scaffold is not used in critical-sized defects, bone regeneration may be compromised [6,7]. Strategies for bone regeneration have been developed based on bone grafts and various substitutes including autologous, allogenic, and xenogenic bone grafts. While the autologous bone graft has been considered as the gold standard for critical size bone regeneration [8],

major drawbacks have been reported including donor site morbidity, risk of infection, and reduced graft volume [7]. Current bone regeneration strategies are based on applying osteo-conductive or osteo-inductive scaffolds. In the osteo-inductive strategy, a scaffold containing/loaded with bioactive molecules such as growth factors is used. This allows the host progenitor cell recruitment, proliferation, and differentiation. In the osteo-conductive strategy, the scaffold structure/porosity allows its passive colonization by the host stem cells and ingrowth of blood vessels to regenerate the missing bone [9,10].

Resorbable materials in the form of granules, particles or microspheres have long been used as osteo-conductive scaffolds in critical size bone defects regeneration. These provide an appropriate environment for cell adhesion, migration, proliferation, and osteogenic differentiation. They also play a crucial role in supporting ingrowth of new blood vessels [11]. A variety of scaffold materials including ceramics, synthetic polymers, and composite materials are used in this strategy [12]. In addition, biomaterials prepared as injectable hydrogels or microspheres have drawn attention with their minimal invasiveness. These materials are easy to handle and can fill in the defect space and match irregular and complex defects [13]. Additionally, their use reduces the infection risk, scarring, and post-operative pain. Hydrogels form the major part of currently used tissue engineering scaffolds [13,14]. Based on their origin, hydrogels can be classified into three categories: naturally derived hydrogels (e.g., collagen, hyaluronic acid, gelatin, fibrin, etc.), synthetic hydrogels (e.g., poly(ethylene) glycol (PEG)), and semi-synthetic hydrogels (PEG combined with a cholesterol-bearing polysaccharide). In addition, when prepared in the form of microspheres, hydrogels provide an inverse porosity between the microspheres that can be colonized by host stem cells and vascularized by ingrowth of newly formed blood vessels [15,16].

Poly-L-lysine (PLL) of extracellular matrix proteins is a small natural homopolymer of the essential amino acid L-lysine frequently used to coat culture substrates. PLL functions as an attachment factor that enhances cell adhesion due to its strong affinity to proteins and electrostatic interactions between the positive charges on the PLL molecule and the negative charges on the cell membrane [17]. Thus, PLL is commonly used to enhance cell adhesion, spreading, proliferation and differentiation [18–20]. It has been shown that poly(ethylene terephthalate) stent surface modification with PLL promotes endothelial cell adhesion and growth [21,22]. In addition, several studies have shown that MSC adhesion, spread, proliferation and chondrogenic and osteogenic differentiation are enhanced in PLL-loaded hydrogels [23–25]. In particular, PLL-coated surfaces have been shown to upregulate genes involved in human bone marrow MSC (BMMSCs) adhesion, proliferation, and differentiation [26]. Poly(L-lysine) (PLL) dendrigrafts (DGL) are arborescent biosynthetic polymers of regular and controlled structures. When these dendritic structures with terminal amine groups are used for surface coating, they increase cell adhesion and proliferation as compared to PLL coating alone [27]. Synthesis of PEG hydrogels, containing dendritic or hyperbranched fragments, with very promising biomedical applications is not limited solely to the poly(L-lysine) dendrigrafts. Indeed, previous works demonstrated fabrication of hydrogels with hyperbranched molecules as well as their applications in the repair of corneal wounds and in orthopedic surgery for the treatment of osteoarthritis [28,29].

Recently, injectable poly(L-lysine) dendrigrafts (DGL)/PEG-based hydrogels with an inner porosity have been created using an effervescent reaction. Cell survival, adhesion, and proliferation allowed the formation of the new tissue inside the porous scaffold. Additionally, after a subcutaneous transplantation into mice, the hydrogel supported an extensive neo-vascularization [30].

The aim of this study was to prepare an injectable poly(L-lysine) dendrigraft (DGL) hydrogel in the form of tailorable microspheres with an inverse porosity and to investigate its osteogenic properties for potential use in bone regeneration [31]. We evaluated the hydrogel toxicity in endothelial and mesenchymal stem cells as both cell types play a major role in bone regeneration. Then, the hydrogel interaction with endothelial cells was studied by investigating the release of chemotactic factors such as TGF- β1 and Complement C5a.

The effect of the hydrogel on mesenchymal stem cell osteogenic potential was investigated through their recruitment, BMP-2 secretion, and Alkaline phosphatase activity.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

Cells and culture media were obtained from PromoCell (Heidelberg, Germany). Culture materials and reagents were obtained from Dominique Dutscher (Brumath, France). ELISA kits were purchased from R&D Systems (Lille, France), Live/Dead® staining kit from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). For the microspheres preparation, PEG-bis(N-succinimidyl succinate) (PEG-NHS), anhydrous dimethylsulfoxide (DMSO) and SPAN80® were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), and poly(L-lysine) dendrigrafts (DGL) were obtained from COLCOM (Clapiers, France).

2.2. DGL/PEG Microspheres Preparation

Poly(L-lysine) dendrigrafts (DGL, third generation, 22,000 g/mol) and PEG-bis(N-succinimidyl succinate) (PEG-NHS, 2000 g/mol) were first solubilized at 400 mg/mL in phosphate buffered saline (PBS) and anhydrous DMSO, respectively. Each stock solution was added to a determined volume of PBS in 2 mL tube followed by vigorous homogenization to obtain the desired concentrations of DGL and PEG in a fixed final volume. The hydrogel was prepared on ice to inhibit the initiation of cross-linking [20]. Once homogenized, the resulting mixed solution was injected in less than 5 s into an oil bath in a 50 mL beaker containing 20 mL of a mix of mineral oil and SPAN 80® surfactant under agitation with a stirring bar. Stirring of the oil bath was pursued for 10 min to allow the hydrogel cross-linking and microsphere formation. Afterwards, the obtained microspheres were resuspended with manual stirring and ultrasound bath 3 times for 10 s, centrifuged for 10 min at 5000 rpm, washed 3 times with 20 mL of PBS until the solution became clear, and stored in PBS at 4 °C. For the in vitro assays, the hydrogel microspheres were sterilized overnight in EtOH:PBS (70:30, *v*/*v*) solution, washed 3 times for 30 min with 20 mL of sterile PBS, and kept at 4 °C prior to use (Figure 1).

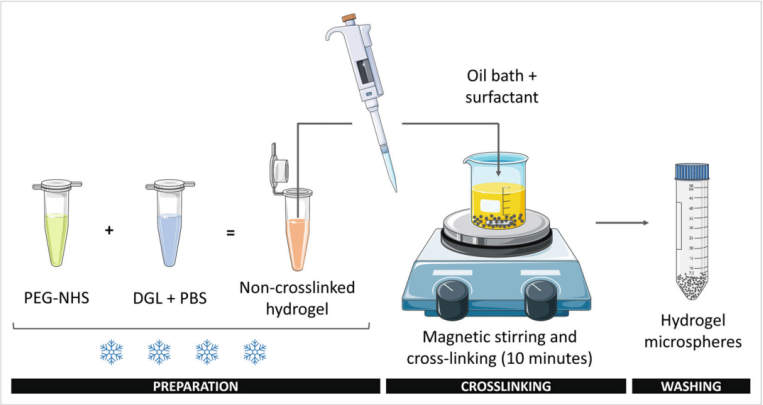


Figure 1. Representative sketch of the protocol used to prepare the DGL/PEG hydrogel microspheres. PEG-NHS was added to DGL prepared in PBS buffer on ice to inhibit the initiation of crosslinking. After vigorous homogenization on ice, the hydrogel is transferred to an oil bath containing the surfactant to allow crosslinking under magnetic stirring. After 10 min, the obtained microspheres are washed before use.

2.3. Factorial Design and Characterization of DGL/PEG Microspheres

To investigate the effect of the processing parameters on DGL/PEG microsphere diameters, a full two-level factorial design (randomized 16 runs with three random center points) was performed. Four easily adjustable parameters were considered as variables in the factorial design: the hydrogel volume (50 to 200 µL), the stirring speed during water-in-oil emulsion (100 to 1300 rpm), the surfactant concentration (0.5 to 3 vol%) and the hydrogel composition (25 to 50 mg/mL of DGL for 50 mg/mL of PEG).

For each run, DGL/PEG microspheres average diameter was evaluated by image analysis using Image J open-source software (v.1.53t). Prior to the image acquisition with a light microscope (Leica, Wetzlar, Germany), 2 µL of an eosin alcoholic solution (Abcam, Cambridge, UK) was added to 50 µL of each microsphere batch, which was subsequently deposited on a glass slide and covered with a coverslip. For each sample, between 5 and 43 pictures were taken randomly at the same magnification. They were studied using the 'analyze particle' tool after thresholding of the pink microspheres. For each microsphere, the diameter was calculated from the measured area and 310 values were obtained on average for each sample. From these data, the average diameter was calculated, and variance analysis performed using statgraphics (Statpoint technologies, Inc., Warrenton, VA, USA).

2.4. Endothelial and Mesenchymal Stem Cell Culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured in endothelial cell growth medium 2 (ECGM-2). These commercially available cells are derived from the endothelium of veins from the human umbilical cord. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) from the bone marrow were cultured in hMSCs growth medium 2 (MGM-2). Cells were incubated at 37 °C, 5% CO_2 atmosphere, cultured until reaching confluency, and sub-cultured. Culture medium was refreshed every 3 days.

2.5. Cell Treatment with the DGL/PEG Hydrogel

In order to prepare the hydrogel microspheres for the cell treatment, we used a mixture of 50 mg/mL of DGL with 50 mg/mL of PEG prepared in an oil bath containing 0.5% surfactant and stirred at 1300 rpm. HUVECs and hMSCs were seeded into 6-well plates and cultured in their respective media. At confluency, the hydrogel microspheres were added to the cells (25 microspheres/cm^2). After 72 h, the cell viability was determined, and the supernatants were harvested to study cell migration and perform Elisa tests. ALP quantification was performed after 7 days directly on lysed cells (Figure 2A,B).

2.6. Cell Viability

Two methods were used to evaluate toxicity.

2.6.1. Qualitative Method

In order to check the toxicity of the hydrogel, a Live/Dead® assay (Thermo Fisher Scientific, L3224) was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, after incubation with the hydrogel microspheres (25 microspheres/cm^2) for 72 h, HUVECs and hMSCs were washed with PBS. We added a mix of Calcein AM and Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) at 1 and 4 µM, respectively, prepared in 1 mL of PBS. After 30 min of incubation with the cells at 37 °C and 5% CO_2, the cells were washed two times with PBS and observed with fluorescence equipped light microscope (Axio Observer A1, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) within 20 min (live cells excitation at 517 nm and emission at 494 nm; dead cell excitation at 617 nm and emission at 528 nm). A positive control was performed by incubating the cells with Triton™ 1% for 15 min at room temperature prior to staining.

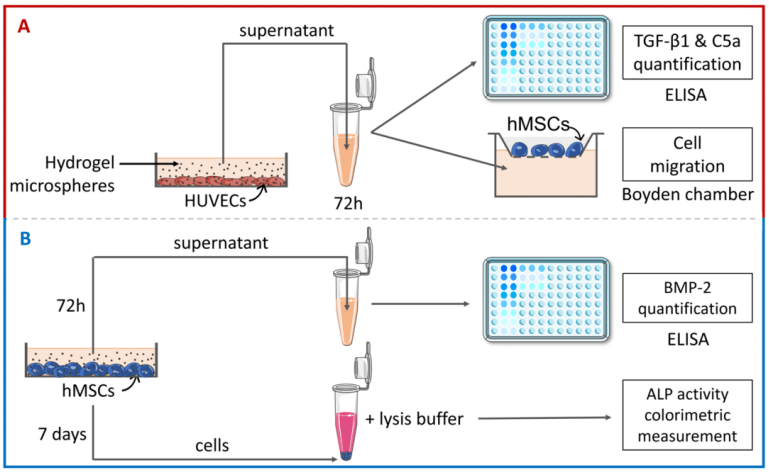


Figure 2. Representative sketch of the experimental protocol. (**A**) HUVECs and hMSCs were incubated with the hydrogel. After 72 h, the HUVEC supernatants were harvested and TGF-β1 and C5a secretion was quantified by ELISA. Migration of hMSCs was studied using Boyden chambers with HUVEC supernatants. (**B**) Secretion of BMP-2 was quantified after 72 h in hMSC supernatants by Elisa while hMSC differentiation was investigated after 7 days by measuring Alkaline Phosphatase (ALP) activity on cell lysates using a colorimetric method.

2.6.2. Quantitative Method

The quantitative evaluation of the cell viability was performed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test. After incubating the HUVECs and hMSCs for 72 h with the hydrogel microspheres (25 microspheres/cm^2), the supernatants were removed, and immediately replaced with 1 mL/well of MTT solution (0.5 mg/mL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 2 h at 37 °C and 5% CO_2. Supernatants were removed, and the produced crystals were solubilized with 1 mL/well of dehydrated DMSO. The absorbance was recorded at 550 nm with a microplate reader (Σ960; MeterTech, Taipei, Taiwan). Results were expressed as percent of controls (untreated cells).

2.7. C5 Complement Expression by Endothelial Cells

After incubating HUVECs for 72 h with the hydrogel (25 microspheres/cm^2), the cells were harvested, and total RNAs were immediately isolated using a PureLink RNA minikit (Life Technologies, Oslo, Norway). RNA samples (2 µg) were reverse transcribed using a reverse transcription AMV system (Promega, Madison, WI, USA). Primers used were C5 forward 5′-AGTGTGTGGAAGGGTGGAAG-3′ and reverse 5′-GTTCTCTCGGGCTTCAACAG-3′; and Glyceraldehyde 3-phodphate dehydrogenase (GAPDH) as an internal control: forward 5′-GAAGGTGAAGTTCGGAGTC-3′ and reverse 5′-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3′. PCR conditions were 94 °C for 2 min, then 30 cycles (94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 68 °C for 30 s), and 68 °C for 2 min. PCR products were separated onto 1.5% agarose gels.

2.8. Growth Factors and C5a Complement Protein Quantification

HUVECs and hMSCs were cultured with the hydrogel microspheres (25 microspheres/cm^2) to investigate their effects on growth factor secretion. After incubation for 72 h, the supernatants were harvested to quantify TGF-β1 and C5a secretion by HUVECs and BMP-2 secretion by hMSCs using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions (DuoSet ELISA Development System kit, R&D Systems, Lille, France).

2.9. Mesenchymal Stem Cell Migration

Migration of hMSCs was studied using Boyden chambers (8 µm pore size) in 24-well plates. hMSCs (10^5 cells/100 µL) were seeded in the upper chamber while supernatants from HUVECs (+/− hydrogel) were placed in the lower chamber (500 µL per well). Serum-free hMSC culture medium was used as a control. After 24 h, cells migrating through the porous membrane were fixed (15 min, cold ethanol 70%) and stained with hematoxylin (20 min). The number of migrating cells was counted in 5 random fields using light microscopy. Results are expressed as number of migrating cells.

2.10. Mesenchymal Stem Cell ALP Activity

Osteogenic differentiation of hMSCs was studied by quantifying alkaline phosphatase (ALP) enzyme activity using a colorimetric ALP Kit (Abcam). hMSCs (10^5 cells) seeded in 6-well plates were incubated (+/− 25 microspheres/cm^2) for 7 days. Upon reaching confluency, the cells were dissociated using trypsin and counted. After rinsing, they were collected using 50 µL/10^5 cells lysis buffer and three-time 10-s ultrasonic bath. Samples were centrifuged at 4 °C for 15 min to remove any insoluble material and the supernatant was collected and kept on ice. Standards and samples were placed in a 96-well plate and ALP measurement was performed according to the manufacturer's instructions. Absorbance was measured at OD 405 nm with a microplate reader (Σ960, MeterTech, Taipei, Taiwan). Results are expressed as the percentage of control.

2.11. Statistical Analysis

All experiments were performed in triplicates with 3 different cell populations. Statistical significance was determined using the Student's *t*-test to compare two sets of data from the different treatments and their respective controls. Data were expressed as means ± standard deviation and considered significant for $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Production of Tunable Poly(L-Lysine) Dendrigrafts (DGL)/PEG-Based Hydrogel Microspheres

A water-in-oil method was employed to prepare the hydrogel in the form of microspheres. The crosslinking reaction of DGL/PEG was very rapid and took place within seconds. This allowed to create an emulsion prior to the hydrogel formation, which occurred in each of the water-containing droplets within the oil phase. The resulting microspheres exhibited a spherical shape as assessed by optical microscopy (Figure 3).

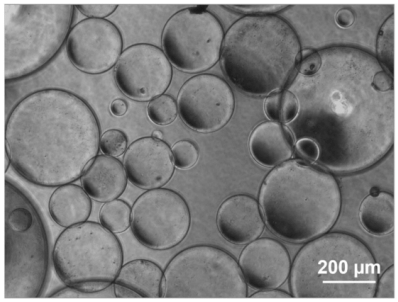


Figure 3. A representative image of DGL/PEG hydrogel microspheres. Illustration of the microsphere morphology obtained at a stirring speed of 1300 rpm. The spheres display different sizes, but the majority had a diameter of 200–300 µm as illustrated under optical microscopy. Scale bar: 200 µm.

To control the DGL/PEG microspheres' diameters, the effect of four easily adjustable processing parameters (hydrogel volume, stirring speed during water in oil emulsion,

hydrogel composition and surfactant concentration) on the resulting microspheres diameter was investigated in a full two-level factorial design. The multiple experiments performed indicated that the microsphere diameter was controlled by the stirring speed during water-in-oil emulsion (p = 0.0022). The other factors such as the hydrogel volume, hydrogel composition and surfactant concentration did not have any significant effect on the microsphere diameters (p = 0.33, 0.28 and 0.11, respectively). The mathematical model obtained from the data correlated well with the experimental results (r^2 = 81%). Within the factorial design range, the average diameter could be adjusted between 2 and 900 µm in a reproducible manner. Overall, increasing the stirring velocity led to smaller microspheres (Figure 4).

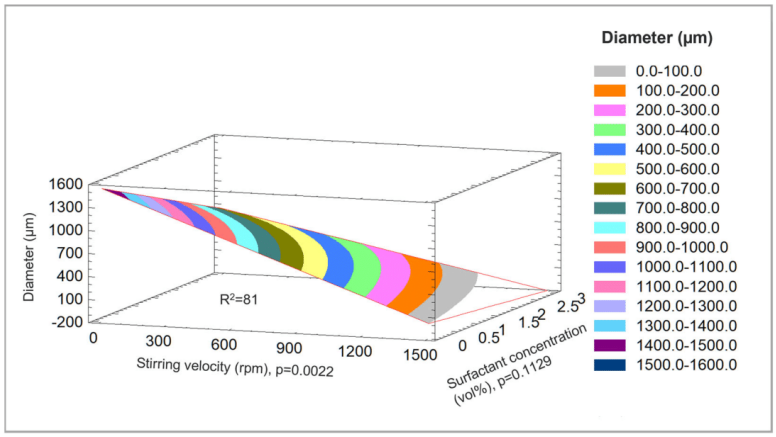


Figure 4. Full two-level factorial design of the DGL/PEG hydrogel microspheres preparation. Average microsphere diameters obtained in function of the stirring speed during water in oil emulsion, and surfactant concentration.

3.2. Poly(L-Lysine) Dendrigrafts (DGL)/PEG-Based Hydrogel Is Not Toxic

HUVECs and hMSCs monolayers cultured with the hydrogel for 72 h displayed a confluent aspect surrounding the hydrogel microspheres under phase contrast microscopy. The spheres appeared entrapped by the cells which grew around and adhered on the microspheres (Figure 5A). Live/Dead® staining revealed that the cells in contact with the biomaterial were alive as demonstrated by the green fluorescence (Figure 5B). The cell viability was quantified by the MTT test, and the results demonstrated that the microspheres did not affect the HUVECs and the hMSCs viability. The obtained results were comparable to the controls (without hydrogel), indicating an absence of hydrogel toxicity (Figure 5C).

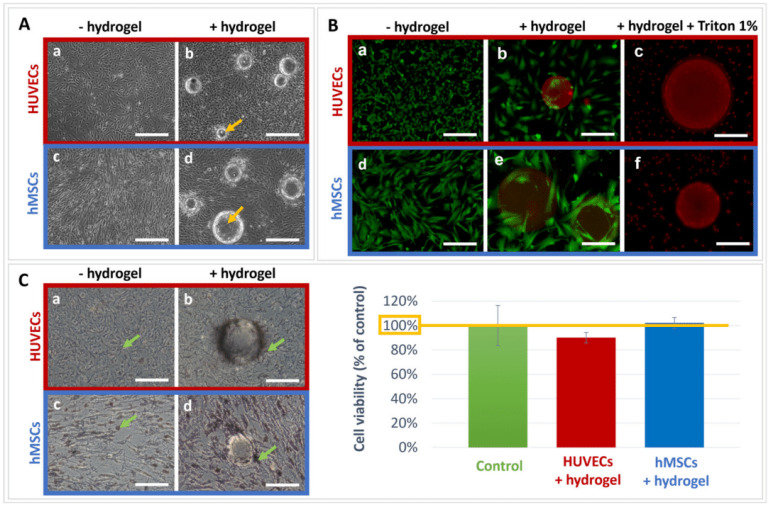


Figure 5. Cell viability. (**A**) Representative images of HUVECs and hMSCs cells cultured without (a,c) or with (b,d) the hydrogel microspheres (yellow arrows) for 72 h under phase-contrast microscopy. Scale bar = 400 µm. (**B**) Representative images of the HUVECs and hMSCs cells labelled with fluorescent Live/Dead® staining (living cells in green; dead cells in red) after culture without (a,d), or with the microspheres (b,e) and the positive control where the cells were incubated with Triton™ 1% (c,f). (a,d) Scale bar = 400 µm; (b,c,e,f) scale bar = 200 µm. (**C**) Representative images of HUVECs and hMSCs cultured with the hydrogel microspheres for 72 h under phase-contrast microscopy (a–d) with visible MTT crystals (green arrows). Scale bar = 200 µm. Cell viability quantification showed no effect of the hydrogel on HUVECs or hMSCs viability. The results are expressed as percentage of control (culture media without hydrogel).

3.3. Endothelial Cells Express Complement C5 Gene

RT-PCR analysis revealed that HUVECs express C5 mRNA. This expression did not change after their incubation with the hydrogel (Figure 6).

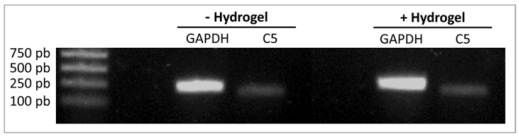


Figure 6. Complement C5 expression by endothelial cells. RT-PCR analysis of C5 mRNA expression shows that HUVECs express C5 mRNA whether incubated with the hydrogel or not. GAPDH was used as a housekeeping control.

3.4. Poly(L-Lysine) Dendrigrafts (DGL)/PEG-Based Hydrogel Induces TGF-β1 and C5a Secretion from HUVECs

When HUVECs were incubated with the hydrogel, a significant increase in TGF-β1 secretion was observed in the supernatants after 72 h. This secretion was significantly higher with the hydrogel (1600 pg/mL) as compared to the control (300 pg/mL) (Figure 7A). The measurement of C5a in the same supernatants also showed a significant increase after the same delay of 72 h. This secretion was also much higher than the control (respectively, 325 pg/mL versus 100 pg/mL) (Figure 7B).

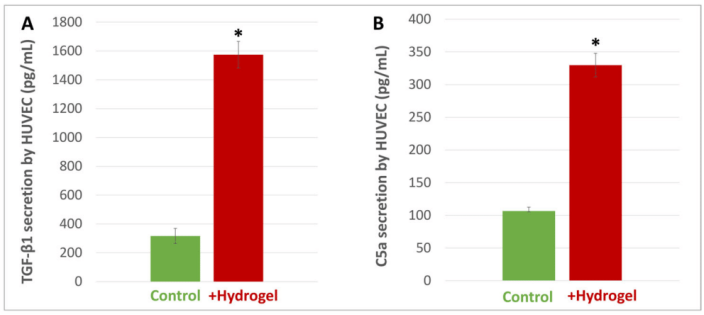


Figure 7. TGF-β1 (**A**) and C5a secretion (**B**) by endothelial cells. After incubating HUVEC cells with the hydrogel for 72 h, enzyme-linked immunosorbent assay showed a significant increase in TGF-β1 and C5a secretion as compared to the controls. Results are expressed in pg/mL. * indicates a statistical difference with the control ($p < 0.05$).

3.5. Incubating HUVECs with Poly(L-Lysine) Dendrigrafts (DGL)/PEG-Based Hydrogel Enhances Mesenchymal Stem Cell Migration

When hMSCs were subjected to HUVEC supernatants, they migrated from the upper to the lower compartment of Boyden chambers. This migration was higher than with the control both with and without the hydrogel. However, the increase with the hydrogel was 2.5 times higher than that obtained without the hydrogel (Figure 8A).

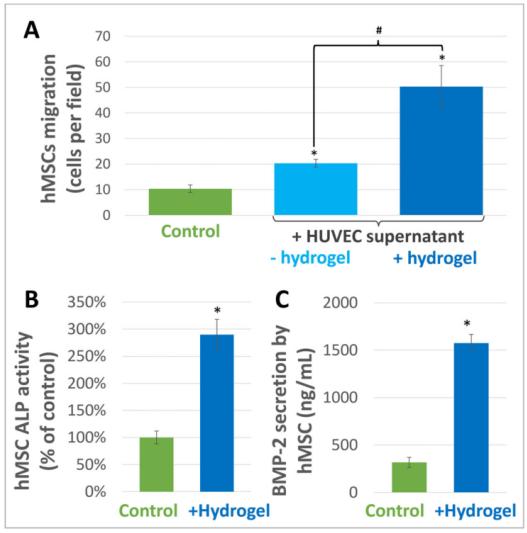


Figure 8. (**A**) Effect of the hydrogel on hMSC migration. Migration of hMSCs significantly increased when they were incubated with HUVEC supernatants in Boyden chambers for 24 h. The increase was significant whether HUVECs were incubated with or without the hydrogel as compared to the control. However, this increase was significantly higher with the hydrogel. Results are expressed as number of cells per field. * indicates a significant difference with the control. # indicates a statistical difference between the two stimulation conditions (+/− hydrogel) ($p < 0.05$). (**B**) hMSC osteogenic differentiation. Incubating hMSCs with the hydrogel for 7 days significantly increased their alkaline

phosphatase activity. Results are expressed in percentage of the control. * indicates a statistical difference with the control ($p < 0.05$). (**C**) BMP-2 secretion by hMSCs. After incubating hMSCs with the hydrogel for 72 h, a significant increase in BMP-2 secretion was observed as compared to the control. Results are expressed in ng/mL. * indicates a statistical difference with the control ($p < 0.05$).

3.6. Poly(L-Lysine) Dendrigrafts (DGL)/PEG-Based Hydrogel Induces Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation

When hMSCs were incubated with the hydrogel for 7 days, a significant increase in their ALP activity was observed. The ALP activity level was almost three times higher than that of the control (Figure 8B). Measurement of BMP-2 secretion from hMSCs also showed a significant increase after 72 h, reaching 5 times that of the control (Figure 8C).

4. Discussion

In this work, we prepared a poly(L-lysine) dendrigrafts (DGL)/PEG-based hydrogel in the form of tunable microspheres to provide an inversed porosity which can be used as a suitable scaffold for bone regeneration.

Numerous fabrication procedures have been used to prepare polymer-based microspheres. These include the emulsion solvent evaporation, spray drying, electro-spinning, gelation followed by emulsification, suspension polymerization, ultrasonication and phase separation [32]. Here, we prepared the hydrogel under the form of microspheres using the water-in-oil emulsion method. This method allows the crosslinking of hydrogel droplets precursor solutions in oil to form the microspheres [33]. This microsphere-type scaffold can provide more versatile applications than pre-shaped scaffolds as it can be directly deposited into various shaped bone defects with only minimally invasive surgery and better recovery [34]. Our fabrication method allowed to prepare spherical microspheres with a diameter that can be controlled by adjusting the stirring speed during the w/o emulsion to form a microsphere-type scaffold, providing a porosity between the microspheres. As demonstrated, the volume of hydrogel, the surfactant concentration or the hydrogel composition had no effect on the microsphere's synthesis. However, a previous study demonstrated that the mechanical properties of the hydrogel can be tailored by varying the concentrations of each hydrogel components [20]. Here, we demonstrated that this new PEG-based hydrogel cross-linked with DGL is a promising candidate for bone tissue engineering. Several additive manufacturing processes are used in tissue engineering. These allow fabricating the scaffold with the required shape/organization and inner porosity (reviewed in [35]). The objective here is to prepare microspheres of different diameters, mixing different sizes together in order to obtain the inversed porosity which corresponds to the empty spaces left between the microspheres. The function of the hydrogel then would be to create this inversed porosity between the microspheres once injected into the bone defect. Thus, in the initial phase, the hydrogel fills in the defect and maintains the space required for cell recruitment and new blood vessel growth. At a later stage, it will be degraded and replaced by the newly formed bone. Indeed, PEG hydrogel degradation has been studied in vivo by subcutaneous implantation in mice with macrophages. These macrophages were able to degrade the hydrogel after 3 weeks through phagocytosis as demonstrated with histological analysis [30]. In addition, a previous study demonstrated that PEG-based hydrogels inhibit the growth of bacteria in vitro [36]. Both the degradation and antibacterial potential represent important properties of hydrogels in tissue engineering.

The hydrogel biocompatibility was evaluated on two cell types that play pivotal roles in bone regeneration, namely endothelial and mesenchymal stem cells. The hydrogel was biocompatible and did not induce any toxicity as demonstrated with the MTT test. Additionally, the cells adhered on and even entrapped the hydrogel microspheres. Labelling these cells with Live/Dead® Viability/Cytotoxicity kit demonstrated that they were all labelled with the green fluorescence, indicating their viability. The absence of toxicity in the hydrogel in this study is comparable to polycaprolactone/chitosan nanofibers scaffold

containing antibacterial agents and ZnO nanoparticles which has been recently developed for use in wound dressing. While the material inhibited bacterial growth, it did not have a significant effect on the viability of L929 Fibroblasts cultured for 24 h directly on the nanofibers, as demonstrated with MTT test [37]. This result is in line with a previous work using the same hydrogel but in a different form where porous hydrogels were prepared by the particulate/leaching technique using paraffin to create the inner porosity. Upon subcutaneous implantation in mice for 3 weeks, the hydrogel was biocompatible and cell infiltration and blood vessel invasion was obtained. This demonstrates the potential of this novel biomaterial for tissue regeneration through the presence of multiple amine groups [20]. Indeed, poly(L-lysine) dendrigrafts (DGL) have numerous advantages for the development of bioengineering materials. They are biocompatible and allow cellular adhesion which adds a bioactive property to the otherwise bio-inert material [31,38]. When DGL was used for surface coating, it has been shown to increase cell adhesion and proliferation [27].

In this study, incubating hMSCs with the hydrogel enhanced their alkaline phosphatase activity, which is considered as an early marker of osteogenic differentiation. This activity strongly increased after 7 days of cell culture with the hydrogel. Although we did not investigate the mechanism of this increase, our result is in agreement with previously published data which reported ALP activity being highest between 4 and 7 days of cell culture [39]. This result is confirmed by the quantification of BMP-2 growth factor secretion as our study showed that the hydrogel enhanced BMP-2 secretion by hMSCs. This growth factor is known to promote bone formation by directing hMSC differentiation into osteoblasts/osteocytes [40,41]. In ectopic bone formation, BMP-2 plays an important role in the rapid induction of bone matrix by remodeling mature bone similar to that observed in normal bone development [40]. The osteogenic potential of the hydrogel reported in our study is similar to those obtained with a gelatin-based nanocomposite scaffold developed by loading zoledronic acid molecules. These represent a subset of synthetic small molecules used as the main drugs to stimulate the growth and differentiation of osteoblastic cells, increasing bone formation and preventing bone loss. When human adipose stem cells were seeded on the prepared scaffolds, zoledronic acid increased the cell proliferation, showed a high viability rate as obtained with the MTT assay. This was associated with an increased osteogenic differentiation as demonstrated with an increase in alkaline phosphatase level and mineralization [42]. Our data are also in line with another study using nano hydroxyapatite/collagen scaffold to encapsulate Narigirin, a natural flavonoid. This scaffold increased alkaline phosphatase activity, the formation of calcium nodules, and a higher expression of osteogenic-related genes such as Osteocalcin, BMP-2, and Osteopontin. When administered into the rats with skull defects, the scaffold significantly promoted the reconstruction of bone tissues and the early repair of skull defects [43].

Taken together, both ALP activity and BMP-2 secretion suggest that the developed hydrogel induced hMSC osteogenic differentiation. However, the mechanism beyond this induction needs to be investigated.

An original aspect of this work is the consequence of the hydrogel interaction with endothelial cells which occurs upon placement of the scaffold in vivo. In agreement with previously published studies [44], our work shows that endothelial cells express Complement C5. However, a novelty of our study is the demonstration that the addition of the hydrogel lead to a significant increase of C5a release from endothelial cells which, to our knowledge, has never been reported.

Complement proteins are produced by the liver and some immune cells [45,46]. They are known for their well-established roles during the inflammation process where their efficiency in eliminating pathogens has been well studied and demonstrated [47]. Interestingly, expression of complement receptors on cell types other than the inflammatory cells suggested Complement implication in other processes such as tissue regeneration as recently demonstrated in dental pulp mesenchymal stem cells [48].

Investigating the relationships between Complement and bone regeneration reported the expression of C5aR in mesenchymal stem cells as well as in osteoblasts [49]. This expression appears to be modulated during the regeneration process. Indeed, when C5aR expression pattern was investigated after tibia fracture in rats, C5aR was expressed by osteoblasts from 3 up to 28 days in the newly formed bone [50], indicating its implication in the bone regeneration process.

This implication has further been shown recently in vitro by demonstrating that Complement C5a plays a significant role in BMMSCs recruitment. Indeed, when Complement C5a produced by injured periodontal ligament cells (PDL) was incubated with BMMSCs, C5a bound to their C5aR and induced its subsequent phosphorylation leading to their proliferation and recruitment towards injured PDL cells. When bone filling materials were applied onto the injured PDL cells, they modulated C5a production. Indeed, C5a secretion by injured PDLs level doubled, its binding to BMMSC C5aR significantly increased, leading to an increased receptor phosphorylation and subsequent increase in stem cell proliferation and recruitment to the materials' application site [51].

While the mechanism by which C5a release upon cell interaction with a given material remains to be elucidated, our work demonstrates Complement C5a implication in two important steps for bone regeneration: mesenchymal stem cell proliferation and recruitment to the stimulation/injury site.

Thus, the release of C5a when endothelial cells are incubated with the hydrogel strongly suggests that endothelial cells represent a major actor of bone regeneration by providing a C5a gradient for hMSCs recruitment.

Interestingly, interaction of the hydrogel with the HUVECs also induced the secretion of TGF-β1. This growth factor is ubiquitous in skeletal tissue playing major roles in maintenance of bone metabolism through the control of cellular proliferation, differentiation, and migration [52]. It is stored in a latent form in the bone, and it is activated upon bone injury/fracture. During bone resorption, TGF-β1 release by osteoclasts generates a gradient that induces hMSCs recruitment to the bone surface [53]. Similarly, the increase in TGF-β1 obtained after incubating HUVECs with the hydrogel and the subsequent mesenchymal stem cell recruitment obtained here is in line with these findings.

5. Conclusions

Overall, this work allowed to develop a poly(L-lysine) dendrigrafts (DGL) hydrogel in the form of microspheres with tunable diameters varying from 10 to 1600 µm to provide an inversed porosity. Its interaction with endothelial cells increased the secretion of bioactive molecules such as C5a by 3-fold and TGF-β1 by 5-fold, and enhanced mesenchymal stem cell recruitment by 2.5-fold. Furthermore, the hydrogel interaction with these cells enhanced their osteogenic potential.

Even if our study did not provide an explanation for the possible mechanisms of the hydrogel osteogenic potential, these results appear promising and deserves further investigations for the future applications of the hydrogel in tissue engineering.

Within the limit of this in vitro study, this poly(L-lysine) dendrigrafts (DGL) hydrogel appears promising for bone regeneration.

Author Contributions: Conceptualization, J.S., M.P. and I.A.; methodology, S.R., C.J., A.C. and M.L.; software, S.R., M.L. and J.S.; validation, J.S., M.P. and I.A.; formal analysis, S.R. and C.J.; investigation, S.R., C.J. and T.G.; data curation, S.R. and J.S.; writing—original draft preparation, S.R., C.J. and J.S.; writing—review and editing, T.G., M.P. and I.A.; supervision, C.J., M.P. and I.A.; project administration, M.P. and I.A.; funding acquisition, M.P. and I.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Aix-Marseille University and Centre National de la Recherche Scientifique.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Loi, F.; Córdova, L.A.; Pajarinen, J.; Lin, T.; Yao, Z.; Goodman, S.B. Inflammation, Fracture and Bone Repair. *Bone* **2016**, *86*, 119–130. [CrossRef] [PubMed]
2. Dimitriou, R.; Jones, E.; McGonagle, D.; Giannoudis, P.V. Bone Regeneration: Current Concepts and Future Directions. *BMC Med.* **2011**, *9*, 66. [CrossRef] [PubMed]
3. Zhu, G.; Zhang, T.; Chen, M.; Yao, K.; Huang, X.; Zhang, B.; Li, Y.; Liu, J.; Wang, Y.; Zhao, Z. Bone Physiological Microenvironment and Healing Mechanism: Basis for Future Bone-Tissue Engineering Scaffolds. *Bioact. Mater.* **2021**, *6*, 4110–4140. [CrossRef]
4. Ho-Shui-Ling, A.; Bolander, J.; Rustom, L.E.; Johnson, A.W.; Luyten, F.P.; Picart, C. Bone Regeneration Strategies: Engineered Scaffolds, Bioactive Molecules and Stem Cells Current Stage and Future Perspectives. *Biomaterials* **2018**, *180*, 143–162. [CrossRef] [PubMed]
5. Colnot, C. Skeletal Cell Fate Decisions Within Periosteum and Bone Marrow During Bone Regeneration. *J. Bone Miner. Res.* **2009**, *24*, 274–282. [CrossRef]
6. Roberts, T.T.; Rosenbaum, A.J. Bone Grafts, Bone Substitutes and Orthobiologics. *Organogenesis* **2012**, *8*, 114–124. [CrossRef] [PubMed]
7. Wang, W.; Yeung, K.W.K. Bone Grafts and Biomaterials Substitutes for Bone Defect Repair: A Review. *Bioact. Mater.* **2017**, *2*, 224–247. [CrossRef]
8. Gibbs, D.M.R.; Black, C.R.M.; Dawson, J.I.; Oreffo, R.O.C. A Review of Hydrogel Use in Fracture Healing and Bone Regeneration. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2016**, *10*, 187–198. [CrossRef]
9. Giannoudis, P.V.; Dinopoulos, H.; Tsiridis, E. Bone Substitutes: An Update. *Injury* **2005**, *36*, S20–S27. [CrossRef]
10. Robinson, P.G.; Abrams, G.D.; Sherman, S.L.; Safran, M.R.; Murray, I.R. Autologous Bone Grafting. *Oper. Tech. Sport. Med.* **2020**, *28*, 150780. [CrossRef]
11. Spicer, C.D. Hydrogel Scaffolds for Tissue Engineering: The Importance of Polymer Choice. *Polym. Chem.* **2020**, *11*, 184–219. [CrossRef]
12. Sohn, H.-S.; Oh, J.-K. Review of Bone Graft and Bone Substitutes with an Emphasis on Fracture Surgeries. *Biomater. Res.* **2019**, *23*, 9. [CrossRef] [PubMed]
13. Dreifke, M.B.; Ebraheim, N.A.; Jayasuriya, A.C. Investigation of Potential Injectable Polymeric Biomaterials for Bone Regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2013**, *101*, 2436–2447. [CrossRef]
14. Hunt, J.A.; Chen, R.; van Veen, T.; Bryan, N. Hydrogels for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 5319–5338. [CrossRef] [PubMed]
15. Ma, Z.; Gao, C.; Gong, Y.; Shen, J. Paraffin Spheres as Porogen to Fabricate Poly(L-Lactic Acid) Scaffolds with Improved Cytocompatibility for Cartilage Tissue Engineering. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2003**, *67*, 610–617. [CrossRef] [PubMed]
16. Zaborowska, M.; Bodin, A.; Bäckdahl, H.; Popp, J.; Goldstein, A.; Gatenholm, P. Microporous Bacterial Cellulose as a Potential Scaffold for Bone Regeneration. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 2540–2547. [CrossRef] [PubMed]
17. de Kruijff, B.; Cullis, P.R. The Influence of Poly(L-Lysine) on Phospholipid Polymorphism. Evidence That Electrostatic Polypeptide-Phospholipid Interactions Can Modulate Bilayer/Non-Bilayer Transitions. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *601*, 235–240. [CrossRef]
18. Huang, R.; Liu, S.; Shao, K.; Han, L.; Ke, W.; Liu, Y.; Li, J.; Huang, S.; Jiang, C. Evaluation and Mechanism Studies of PEGylated Dendrigraft Poly-L-Lysines as Novel Gene Delivery Vectors. *Nanotechnology* **2010**, *21*, 265101. [CrossRef]
19. Chinnadayyala, S.R.; Park, J.; Choi, Y.; Han, J.-H.; Yagati, A.K.; Cho, S. Electrochemical Impedance Characterization of Cell Growth on Reduced Graphene Oxide–Gold Nanoparticles Electrodeposited on Indium Tin Oxide Electrodes. *Appl. Sci.* **2019**, *9*, 326. [CrossRef]
20. Carrancá, M.; Griveau, L.; Remoué, N.; Lorion, C.; Weiss, P.; Orea, V.; Sigaudo-Roussel, D.; Faye, C.; Ferri-Angulo, D.; Debret, R.; et al. Versatile Lysine Dendrigrafts and Polyethylene Glycol Hydrogels with Inherent Biological Properties: In Vitro Cell Behavior Modulation and in Vivo Biocompatibility. *J. Biomed. Mater. Res.* **2020**, *109*, 926–937. [CrossRef]
21. Li, X.; Ji, J.; Pu, M.; Wang, X.; Shen, J. Surface Tailoring of Poly(Ethylene Terephthalate) via Ligand-Tethered Comb-like PEG to Enhance Endothelialization. *J. Mater. Sci: Mater. Med.* **2008**, *19*, 291–299. [CrossRef] [PubMed]
22. Wang, G.-X.; Deng, X.-Y.; Tang, C.-J.; Liu, L.-S.; Xiao, L.; Xiang, L.-H.; Quan, X.-J.; Legrand, A.P.; Guidoin, R. The Adhesive Properties of Endothelial Cells on Endovascular Stent Coated by Substrates of Poly-L-Lysine and Fibronectin. *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* **2006**, *34*, 11–25. [CrossRef] [PubMed]
23. Lu, H.; Guo, L.; Kawazoe, N.; Tateishi, T.; Chen, G. Effects of Poly(L-Lysine), Poly(Acrylic Acid) and Poly(Ethylene Glycol) on the Adhesion, Proliferation and Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2009**, *20*, 577–589. [CrossRef] [PubMed]

24. Tian, B.; Wang, N.; Jiang, Q.; Tian, L.; Hu, L.; Zhang, Z. The Immunogenic Reaction and Bone Defect Repair Function of ε-Poly-L-Lysine (EPL)-Coated Nanoscale PCL/HA Scaffold in Rabbit Calvarial Bone Defect. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2021**, *32*, 63. [CrossRef] [PubMed]
25. Kim, Y.S.; Chien, A.J.; Guo, J.L.; Smith, B.T.; Watson, E.; Pearce, H.A.; Koons, G.L.; Navara, A.M.; Lam, J.; Scott, D.W.; et al. Chondrogenesis of Cocultures of Mesenchymal Stem Cells and Articular Chondrocytes in Poly(l-Lysine)-Loaded Hydrogels. *J. Control. Release* **2020**, *328*, 710–721. [CrossRef] [PubMed]
26. Heo, J.S.; Kim, H.O.; Song, S.Y.; Lew, D.H.; Choi, Y.; Kim, S. Poly-L-Lysine Prevents Senescence and Augments Growth in Culturing Mesenchymal Stem Cells Ex Vivo. *Biomed. Res. Int.* **2016**, *2016*, 8196078. [CrossRef] [PubMed]
27. Lorion, C.; Faye, C.; Maret, B.; Trimaille, T.; Régnier, T.; Sommer, P.; Debret, R. Biosynthetic Support Based on Dendritic Poly(L-Lysine) Improves Human Skin Fibroblasts Attachment. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2014**, *25*, 136–149. [CrossRef]
28. Zhu, C.; Hard, C.; Lin, C.; Gitsov, I. Novel Materials for Bioanalytical and Biomedical Applications: Environmental Response and Binding/Release Capabilities of Amphiphilic Hydrogels with Shape-Persistent Dendritic Junctions. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2005**, *43*, 4017–4029. [CrossRef]
29. Grinstaff, M.W. Dendritic Macromers for Hydrogel Formation: Tailored Materials for Ophthalmic, Orthopedic, and Biotech Applications. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2008**, *46*, 383–400. [CrossRef]
30. Griveau, L.; Lafont, M.; le Goff, H.; Drouglazet, C.; Robbiani, B.; Berthier, A.; Sigaudo-Roussel, D.; Latif, N.; Visage, C.L.; Gache, V.; et al. Design and Characterization of an in Vivo Injectable Hydrogel with Effervescently Generated Porosity for Regenerative Medicine Applications. *Acta Biomater.* **2021**, *140*, 324–337. [CrossRef]
31. Francoia, J.-P.; Vial, L. Everything You Always Wanted to Know about Poly-L-Lysine Dendrigrafts (But Were Afraid to Ask). *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 2806–2814. [CrossRef] [PubMed]
32. Hossain, K.M.Z.; Patel, U.; Ahmed, I. Development of Microspheres for Biomedical Applications: A Review. *Prog. Biomater.* **2015**, *4*, 1–19. [CrossRef] [PubMed]
33. Zhao, Z.; Wang, Z.; Li, G.; Cai, Z.; Wu, J.; Wang, L.; Deng, L.; Cai, M.; Cui, W. Injectable Microfluidic Hydrogel Microspheres for Cell and Drug Delivery. *Adv. Funct. Mater.* **2021**, *31*, 2103339. [CrossRef]
34. Hu, X.; Shen, H.; Yang, F.; Liang, X.; Wang, S.; Wu, D. Modified Composite Microspheres of Hydroxyapatite and Poly(Lactide-Co-Glycolide) as an Injectable Scaffold. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *292*, 764–772. [CrossRef]
35. Wu, Y.; Lu, Y.; Zhao, M.; Bosiakov, S.; Li, L. A Critical Review of Additive Manufacturing Techniques and Associated Biomaterials Used in Bone Tissue Engineering. *Polymers* **2022**, *14*, 2117. [CrossRef] [PubMed]
36. Liu, S.; Jiang, T.; Guo, R.; Li, C.; Lu, C.; Yang, G.; Nie, J.; Wang, F.; Yang, X.; Chen, Z. Injectable and Degradable PEG Hydrogel with Antibacterial Performance for Promoting Wound Healing. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, *4*, 2769–2780. [CrossRef]
37. Mosallanezhad, P.; Nazockdast, H.; Ahmadi, Z.; Rostami, A. Fabrication and Characterization of Polycaprolactone/Chitosan Nanofibers Containing Antibacterial Agents of Curcumin and ZnO Nanoparticles for Use as Wound Dressing. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 1027351. [CrossRef] [PubMed]
38. Yuan, Y.; Shi, X.; Gan, Z.; Wang, F. Modification of Porous PLGA Microspheres by Poly-l-Lysine for Use as Tissue Engineering Scaffolds. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *161*, 162–168. [CrossRef]
39. Mauney, J.R.; Blumberg, J.; Pirun, M.; Volloch, V.; Vunjak-Novakovic, G.; Kaplan, D.L. Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells on Partially Demineralized Bone Scaffolds in Vitro. *Tissue Eng.* **2004**, *10*, 81–92. [CrossRef]
40. Lieberman, J.R.; Daluiski, A.; Einhorn, T.A. The Role of Growth Factors in the Repair of Bone. Biology and Clinical Applications. *J. Bone Joint. Surg. Am.* **2002**, *84*, 1032–1044. [CrossRef]
41. Bessa, P.C.; Casal, M.; Reis, R.L. Bone Morphogenetic Proteins in Tissue Engineering: The Road from the Laboratory to the Clinic, Part I (Basic Concepts). *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2008**, *2*, 1–13. [CrossRef] [PubMed]
42. Abdulahy, S.B.; Esmaeili Bidhendi, M.; Vaezi, M.R.; Moosazadeh Moghaddam, M. Osteogenesis Improvement of Gelatin-Based Nanocomposite Scaffold by Loading Zoledronic Acid. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 890583. [CrossRef] [PubMed]
43. Zuo, Y.; Li, Q.; Xiong, Q.; Li, J.; Tang, C.; Zhang, Y.; Wang, D. Naringin Release from a Nano-Hydroxyapatite/Collagen Scaffold Promotes Osteogenesis and Bone Tissue Reconstruction. *Polymers* **2022**, *14*, 3260. [CrossRef] [PubMed]
44. Sartain, S.E.; Turner, N.A.; Moake, J.L. TNF Regulates Essential Alternative Complement Pathway Components and Impairs Activation of Protein C in Human Glomerular Endothelial Cells. *J. Immunol.* **2016**, *196*, 832–845. [CrossRef] [PubMed]
45. Morris, K.M.; Aden, D.P.; Knowles, B.B.; Colten, H.R. Complement Biosynthesis by the Human Hepatoma-Derived Cell Line HepG2. *J. Clin. Investig.* **1982**, *70*, 906–913. [CrossRef] [PubMed]
46. Lubbers, R.; van Essen, M.F.; van Kooten, C.; Trouw, L.A. Production of Complement Components by Cells of the Immune System. *Clin. Exp. Immunol.* **2017**, *188*, 183–194. [CrossRef]
47. Ehrnthaller, C.; Ignatius, A.; Gebhard, F.; Huber-Lang, M. New Insights of an Old Defense System: Structure, Function, and Clinical Relevance of the Complement System. *Mol. Med.* **2011**, *17*, 317–329. [CrossRef]
48. Chmilewsky, F.; Jeanneau, C.; Laurent, P.; About, I. Pulp Fibroblasts Synthesize Functional Complement Proteins Involved in Initiating Dentin-Pulp Regeneration. *Am. J. Pathol.* **2014**, *184*, 1991–2000. [CrossRef]
49. Ignatius, A.; Schoengraf, P.; Kreja, L.; Liedert, A.; Recknagel, S.; Kandert, S.; Brenner, R.E.; Schneider, M.; Lambris, J.D.; Huber-Lang, M. Complement C3a and C5a Modulate Osteoclast Formation and Inflammatory Response of Osteoblasts in Synergism with IL-1β. *J. Cell. Biochem.* **2011**, *112*, 2594–2605. [CrossRef]

50. Ignatius, A.; Ehrnthaller, C.; Brenner, R.E.; Kreja, L.; Schoengraf, P.; Lisson, P.; Blakytny, R.; Recknagel, S.; Claes, L.; Gebhard, F.; et al. The Anaphylatoxin Receptor C5aR Is Present during Fracture Healing in Rats and Mediates Osteoblast Migration in Vitro. *J. Trauma* **2011**, *71*, 952–960. [CrossRef]
51. Jeanneau, C.; Le Fournis, C.; About, I. Xenogeneic Bone Filling Materials Modulate Mesenchymal Stem Cell Recruitment: Role of the Complement C5a. *Clin. Oral Investig.* **2019**, *24*, 2321–2329. [CrossRef] [PubMed]
52. Janssens, K.; ten Dijke, P.; Janssens, S.; Van Hul, W. Transforming Growth Factor-B1 to the Bone. *Endocr. Rev.* **2005**, *26*, 743–774. [CrossRef] [PubMed]
53. Tang, Y.; Wu, X.; Lei, W.; Pang, L.; Wan, C.; Shi, Z.; Zhao, L.; Nagy, T.R.; Peng, X.; Hu, J.; et al. TGF-Beta1-Induced Migration of Bone Mesenchymal Stem Cells Couples Bone Resorption with Formation. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 757–765. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.