

Rapport présenté en vue de l'obtention du

**MASTER 1 IEAP – BTI**

BIO-INGENIERE DES TISSUS ET DES IMPLANTS  
FACTEURS HUMAINS DANS LES INTERACTIONS AVEC  
L'ENVIRONNEMENT

INGENIERIE ET ERGONOMIE DU MOUVEMENT HUMAIN

**ÉLABORATION D'UN PROTOCOLE DE MESURE DE L'INTEGRITÉ  
ET DE L'INFLAMMATION DES CELLULES NEURALES CHOQUÉES**

*Présenté par*

**NICOLAS Elise**

*Sous la direction de*

**TADRIST Loïc**

*(Maitre de conférence, équipe conception bio-inspirée)*

*Année 2021-2022*

## Table des matières

PRESENTATION DU STAGE .....	1
Laboratoire d'accueil .....	1
Objectifs .....	1
INTRODUCTION .....	2
1 - Contexte .....	2
2 - Les traumatismes crâniens .....	2
2.1 Les chocs .....	2
2.2 Les lésions .....	2
3 – Structure et biochimie du cerveau lors du choc .....	4
4 - Les méthodes médicales pour analyser les traumatismes crâniens .....	5
4-1 Evaluation clinique .....	5
4-2 Évaluation neurologique .....	6
5 - Etat de l'art sur les modèles in vitro des traumatismes crâniens .....	7
5-1 La mise en culture .....	7
5-2 Études précédentes .....	8
QUESTIONS DE RECHERCHE ET OBJECTIFS .....	9
METHODE .....	10
Modèle de simulation d'impact .....	11
Mise en culture de cellules neurales de souris .....	11
Utilisation du dispositif .....	12
Traitement d'image (microscope à contraste de phase) .....	13
Fixation des cellules .....	13
Marquage des cellules .....	14
RESULTATS .....	14
Caractérisation des butoirs 100MPa .....	14
Chocs sur cellule : Observation par microscopie à contraste de phase .....	14
Mise en évidence des changements structuraux par corrélation d'images .....	17
Observation par microscopie confocale à la suite de l'immunocytochimie .....	18
DISCUSSION .....	18
CONCLUSION .....	20
PERSPECTIVES .....	20

## Remerciement

Je remercie mon responsable de stage, Loïc TADRIST, pour m'avoir accompagné sur la réalisation de mon projet tout en me permettant d'évoluer au cours de ce stage. Je tiens également à remercier Andoni IZAGUIRRE ARRIETA, pour son accompagnement au cours des nombreuses expériences et pour ses explications des principaux éléments du projet. Je remercie Diarra THIANE ingénierie d'étude au sein de l'INP et Santiago RIVERA pour la description de l'ensemble des expériences menées au niveau de la biologie cellulaire, ainsi que le fonctionnement du microscope confocal. Je tiens enfin à remercier l'ensemble des personnels du groupe interdisciplinaire CBI, et ceux de l'INP pour leur accueil et leur soutien tout au long de mon stage.

## PRESENTATION DU STAGE

### Laboratoire d'accueil

J'ai réalisé mon stage de première année de master au sein de l'Institut de Science du Mouvement – Etienne Jules Marey (ISM). L'ISM est une unité mixte de recherche (CNRS / Aix-Marseille Université) qui se compose de plusieurs centres de recherche. Les centres de recherche sont situés sur le campus de Luminy, à l'hôpital Sainte-Marguerite, à l'hôpital de la Timone et à Aix-en-Provence sur le site de l'IUT. L'ISM est une unité spécialisée dans l'étude du mouvement humain.

L'ISM est composé de neufs groupes interdisciplinaires. C'est au sein de l'équipe Conception Bio-Inspirée (CBI) que j'ai effectué mon stage. Les projets de recherches de cette unité se concentrent autour de 3 axes. Le premier axe de recherche concerne la structure bio-inspirée. Les recherches ont pour but, le développement de pièces mécaniques allégées s'inspirant de la structure de l'os et des endosquelettes. Le second axe de recherche est orienté autour des liaisons bio-inspirées. Le dernier axe de recherche concerne les actionneurs et les dissipateurs bio-inspirés. Le sujet de mon stage rentre dans le cadre du troisième axe de recherche.

### Objectifs

Un projet de recherche concernant le développement d'un système de protection des chocs à la tête bio-inspiré a débuté en 2020. Le but du projet est de développer un système de protection qui s'inspire de la nature et des structures osseuses existantes chez les êtres vivants qui sont soumis à des chocs à la tête répétés et à fortes cinétiques. Pour la réalisation de ce projet, les recherches ont été organisées en suivant une approche multi-échelle. Une recherche bibliographique a été menée concernant les mécanismes de protection aux chocs crâniens présents chez les animaux. Une seconde partie s'intéressent à la compréhension du mécanisme de choc à la tête (interaction fluide-solide) et de son impact au niveau biologique (viabilité cellulaire). Enfin, un troisième axe sera développé pour la conception bio-inspirée du système de protection.

Mon stage de recherche s'inscrit dans la partie de caractérisation biologique de la réponse cellulaire au choc. Pour ce projet, un appareil de simulation de chocs a été conçu. Il permet de réaliser des chocs en choisissant les paramètres macroscopiques du choc, l'accélération et le temps de contact (simulant des chocs à différentes intensités), de manière contrôlée et reproductible.

L'objectif de mon stage est de proposer à partir de tests préliminaires un protocole de mesure de la réponse cellulaire au choc sur un modèle de cellules neurales de rat à l'aide du dispositif de simulation de choc. Le second objectif de mon stage est de déterminer certains changements dans la morphologie/inflammation des axones à la suite d'un choc. Cette détermination se fera par une visualisation à l'aide d'un microscope à contraste de phase, et également l'aide d'une étude d'immunocytochimie en marquant le cytosquelette des cellules permettant de voir des changements de structure. Pour réaliser les missions qui m'ont été confiées, mon stage s'est déroulé entre deux laboratoires, le premier est l'ISM (campus IUT Aix-en-Provence) et le

second est l'institut neurophysiopathologie (INP-Hôpital de la Timone, Marseille). L'INP est un laboratoire spécialisé dans la recherche des maladies neurologiques. Toute la partie de mon stage impliquant des manipulations cellulaires a été réalisée au sein de l'INP.

## INTRODUCTION

### 1 - Contexte

Selon l'institut du cerveau – ICM (« Traumatismes du cerveau et de la moelle épinière » s. d.), en Europe plus de 3,7 millions de personnes sont touchées par des traumatismes crâniens. Ces traumatismes peuvent intervenir au moment d'une chute (transport, travail, etc) ou lors de pratiques du sport (sport de contact, sports à haute cinétique).

Un traumatisme crânien a plusieurs impacts sur la santé, dont la gravité dépend de l'intensité du choc et de sa chronicité. A court terme, les personnes souffrant d'une lésion cérébrale engendrée par un traumatisme crânien peuvent éprouver des troubles attentionnels, des troubles mnésiques et des ralentissements psychiques et moteur. A long terme un traumatisme crânien pourrait favoriser le développement de maladie neurodégénérative tel que la maladie d'Alzheimer. L'étude de Mayeux et al. 1995, a mis en évidence une relation entre le gène apoE4, les traumatismes crâniens ainsi que la probabilité de développer la maladie d'Alzheimer.

De manière générale, les traumatismes crâniens entraînent des troubles neurologiques et neuropsychologiques. Ils sont l'une des principales causes de décès au cours de ces dernières décennies et sont donc un enjeu majeur de la santé publique, (Meaney et al. 1994). Les lésions traumatiques sont des maladies complexes et leur impact sur le court et long terme est souvent peu compris. La recherche sur les traumatismes crâniens est compliquée, car l'expérimentation sur l'homme n'est pas possible, et celle sur les animaux n'est pas éthique. Les recherches actuelles se concentrent sur des modélisations numériques des chocs à la tête, sur des expérimentations sur mannequins et sur l'étude de la réponse biologique à la suite d'un choc.

### 2 - Les traumatismes crâniens

#### 2.1 Les chocs

Un traumatisme crânien est la conséquence d'un choc à la tête qui peut être engendré par un objet, une autre personne ou un mouvement mal maîtrisé. Un choc se définit par un contact entre deux solides avec une grande quantité de mouvements échangés. Il est souvent intense et de courte durée. Un choc reçu au niveau de la tête génère des contraintes mécaniques dans le cerveau (déformations dynamiques) dont l'intensité varie en fonction de l'impact reçu.

#### 2.2 Les lésions

La lésion engendrée par un traumatisme crânien va diminuer les fonctionnalités du cerveau. Les lésions cérébrales sont de deux natures différentes : il y a les lésions corticales focales (œdèmes, dégénérescence cellulaire localisée) et les lésions axonales diffuses (plus difficiles à détecter).

Les lésions du cerveau peuvent être classées selon trois catégories en fonction de leurs gravités : légères, modérés ou graves. Actuellement, l'évaluation de ces lésions présente certaines limites (échelle de Glasgow), car elle ne permet pas de fournir des évaluations sans biais pour le diagnostic d'un même patient. Il n'existe pas pour l'instant de mesures biologiques objectives qui permettent de quantifier *in situ* l'impact d'un traumatisme crânien autre que celle déterminée avec l'échelle de Glasgow. Il est également difficile de déterminer à l'aide de cette évaluation l'ampleur du traumatisme en ce qui concerne le transfert d'énergie (Alexander 1995).

Une étude mené par Lecky et al. 2021 a permis de déterminer les différences de niveau de traumatismes en fonction de l'énergie transférée au moment du choc. Cette étude a pour objectif de comparer les patients blessés par un traumatisme crânien dû à une chute à faible énergie, et ceux blessés par un traumatisme crânien dû à une chute à forte énergie. Cette comparaison est établie en fonction de la caractéristique de la chute et de leur parcours en termes de soins. Sachant que les lésions plus graves sont largement prioritaires en termes de soins que les lésions légères.

Lecky et al rapportent dans leur étude un tableau permettant de classer le niveau d'énergie de chute (High Energy et Low Energy) en fonction du scénario de la chute. Le niveau d'énergie de la chute est également rapporté au niveau de gravité de la lésion cérébrale. Les données utilisées pour la mise en place de ce tableau sont directement issues du registre CENTER-TBI (Collaborative European-NeuroTrauma Effectiveness Research in TBI). Ces données sont issues de 21 681 patients souffrant d'une lésion cérébrale dû à un traumatisme crânien.

	Total	High-Energy	Low-Energy	p-value
Age moyen	55	42	74	<0,001
<b>Lieux de la blessure</b>				
Rue	33,8	48,5	11,6	<0,001
Domicile	38,3	21,9	63,0	
Sport	3,3	5,1	0,6	
Lieux public	15,7	15,3	16,2	
Travail / école	3,4	4,5	1,8	
Autre	3,4	2,4	5,0	
Inconnu	2,1	2,2	1,8	
Manquant	0,1	0,1	0,1	
<b>Gravité de lésion cérébrale</b>				
Légère	81,6	78,6	86,2	
Moyenne	3,8	3,7	4,1	
Sévère	5,5	6,7	3,7	

**Tableau 1 :** Tableau issu de l'étude de Lecky et al regroupant le niveau d'énergie d'une chute en fonction de lieux de la chute et de la gravité au niveau lésionnel. La gravité de la lésion a été déterminée grâce à l'échelle Glasgow. Les données en pourcent sont issues de 21 681 patients récoltées par le CENTER-TBI

A l'aide de ce tableau nous pouvons remarquer que les lieux de blessure sont principalement dans la rue ou au domicile. Les chutes à faible énergie sont les plus fréquentes. Dans la rue les

blessures ont plus tendance à être à haute énergie et dans le domicile à être à faible énergie. Nous pouvons noter que lésions légères sont les lésions les plus nombreuses au moment d'une chute. Cette étude a permis de montrer la nécessité d'une meilleure prise en charge de patients blessés par des traumatismes crâniens légers liés à des chutes consécutives à faible énergie.

Peu d'études se sont intéressées au moyen de protection et de détection des lésions cérébrales légères, bien que de nouvelles données permettent d'établir un lien entre des traumatismes légers et répétés, et l'accélération du développement de troubles neurodégénératifs.

### 3 – Structure et biochimie du cerveau lors du choc

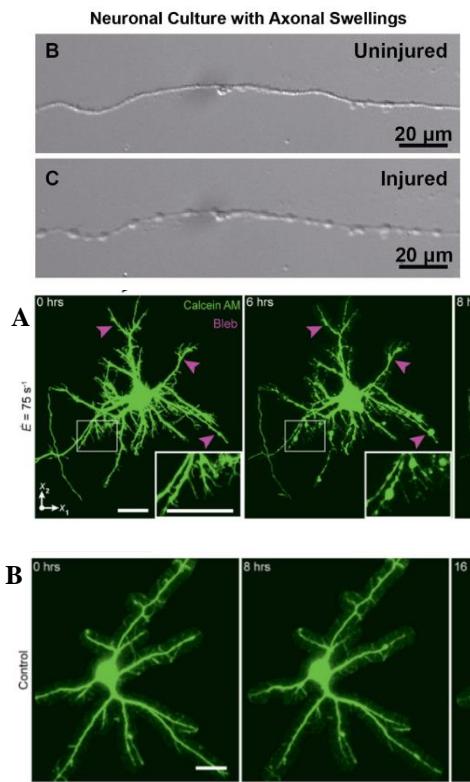
Les lésions traumatiques crâniennes se produisent à la suite d'un stimulus mécanique externe, entraînant des effets mécaniques puis biologiques. Les effets mécaniques correspondent à la phase de déformation du tissu cérébral (de l'ordre de quelques millisecondes) et les effets biologiques sont quant à eux la réponse inflammatoire consécutive.

Les neurones sont les unités principales de travail du cerveau, ils permettent de transmettre des informations au reste des cellules nerveuses. Les neurones sont composés de corps cellulaires, de neurite et d'axone. Au moment de la réception d'un message les neurones vont par l'intermédiaire d'un signal électrique le retransmettre par les axones aux autres cellules nerveuses.

Les cellules gliales jouent un rôle important dans le bon fonctionnement des neurones. Il existe deux sortes de cellules gliales, les macroglies qui comprennent les cellules telles que les astrocytes et les microglies composées de macrophage. Elles permettent de transporter les nutriments aux neurones et de nettoyer les débris cellulaires, elles participent donc au contrôle de l'environnement chimique et électrique.

Les cellules astrogliales synthétisent la protéine S-100 $\beta$ . Cette protéine agit en particulier sur les neurones en régulant leur croissance ou sur leur apoptose. La protéine S-100 $\beta$  est un bon marqueur biologique de différentes pathologies neurologiques mais également de lésions. En effet la concentration de la protéine S-100 $\beta$  est augmentée dans les fluides biologiques à la suite d'un choc important avec lésion. D'autres protéines telles que H-FABP, l'Interleukin-10 et la GFAP ont été identifiées comme marqueur d'un traumatisme crânien.

Les lésions axonales diffuses lors d'un traumatisme crânien sont causées par un cisaillement du tissu cérébral. La plupart du temps, elles vont se faire à la jonction entre la substance grise et la substance blanche (« Traumatismes crâniens » s. d.). Ces forces de cisaillement vont donc engendrer des effets d'étirement qui vont déformer les axones. A ce moment, les lésions engendrées sur les axones vont endommager leur fonctionnement chimique, structurel et ultimement empêcher le transport du signal électrique de l'axone. Elles vont engendrées un gonflement en chapelet de perle (perte du cytosquelette de microtubules) de l'axone puis une lyse du neurone. (« Traumatismes crâniens » s. d.)



**Figure 1 :** Images issues de l'étude de (Hemphill et al. 2015). Image de deux neurones **B** : neurone de contrôle sans injure. **C** : neurone soumis à un traumatisme mécanique. On peut voir que le neurone qui a subi un stress mécanique à des parties de l'axone qui ont gonflé.

**Figure 2 :** Images issues de l'étude de Bar-Kochba et al. (2016).

**A :** Imagerie d'un neurone au cours du temps marqué à la calcéine AM après chargement mécanique  $E=75 \text{ s}^{-1}$  ( $E$  étant le taux de déformation maximal)

**B :** Imagerie d'un neurone au cours du temps marqué à la calcéine AM sans chargement mécanique.

Barre d'échelle : 20  $\mu\text{m}$ .

Les lésions axonales diffuses sont donc engendrées par des accélérations/décélérations soudaines, la gravité de ces lésions et donc du traumatisme dépend de la force d'inertie transmise. Plus la force d'inertie est grande plus les lésions sont importantes (Alexander 1995).

D'autres effets ont été étudiés en analysant le comportement des astrocytes. Les astrocytes sont des cellules gliales situées au niveau du système nerveux central (SNC), ceux sont les cellules les plus abondantes du SNC. Elles sont directement associées aux neurones, et permettent de leurs apporter des molécules et des nutriments essentielles. Les astrocytes sont sensibles aux chocs que peut subir le SNC, la réponse des astrocytes aux traumatismes s'appelle l'astrogliose. Ce mécanisme permet de protéger le système nerveux des dommages que peuvent impliquer un choc.

#### 4 - Les méthodes médicales pour analyser les traumatismes crâniens

Les méthodes actuelles d'évaluation des traumatismes crâniens sont basées sur des quantifications initiales clinique et neurologique (scanner cérébral).

Les principaux moyens de diagnostic sont des examens neurologiques, de l'imagerie radiographique par topodensitométrie et de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (Zongo et al. 2012). Certaines études suggèrent de mesurer la concentration plasmatique de la protéine S-100 $\beta$  pour pouvoir diagnostiquer des traumatismes crâniens. (Beaudeux 2009)

##### 4-1 Evaluation clinique

L'évaluation clinique du traumatisme crânien permet de déterminer l'état de conscience du patient. Elle se fait grâce à l'échelle de Glasgow Coma Scale (GCS), en se basant sur la réponse du blessé pour différentes actions. L'évaluation se fait sur 3 critères, la première action étant

d'ouvrir les yeux (4 points), la seconde action correspond à la réponse à une question (5 points) et la dernière action est l'exécution simple d'un ordre (6 points). La somme de ces trois critères permet de fixer le niveau d'atteinte de l'état de conscience du blessé. Le résultat est inversement proportionnel au score obtenu. La réponse maximale qui est de 15 correspond à un état normal de vigilance. La réponse minimale de 3 correspond à un état de coma aréactif, et donc à un état de mort cérébrale.

Niveau de traumatisme	Score GCS
TC léger	15-13
TC moyen	12-9
TC grave	8-3

**Tableau 2 :** Niveau du traumatisme crânien en fonction du score de l'évaluation clinique réalisé à l'aide de l'échelle de Glasgow.

Le score de Glasgow permet également de suivre l'évolution du patient dans le temps, car cette évaluation peut être répétée. La notion d'aggravation sera prise en compte lorsque deux examens successifs auront une perte de deux points.

#### 4-2 Évaluation neurologique

A la suite de l'évaluation clinique, un examen neurologique doit être effectué. Cet examen se base sur une évaluation de la motricité, du tonus musculaire et sur une oculomotricité. Un scanner cérébral sera ensuite effectué. Ce scanner est réalisé pour tous les traumatismes crâniens obtenant un score de maximum 13 au GCS, le scanner va être utile pour visualiser les lésions. Une évaluation nanométrique peut également être effectuée, elle correspond à une mesure de la pression intracrânienne, cette mesure est réalisée en cas de traumatisme crânien grave soit un score de 3 à 7 au GCS.

Les diagnostics médicaux des traumatismes crâniens sont donc principalement basés sur une imagerie radiographique et un examen neurologique. A ce jour, un examen scanographique cérébral est l'élément le plus utilisé pour détecter des traumatismes crâniens, de niveau faible ou modéré, cependant sa réalisation en urgence reste exceptionnelle car son coût est élevé.

Une seconde méthode biologique peut être utilisée pour déterminer un traumatisme crânien. Cette méthode est la détection de biomarqueurs sanguins. Les biomarqueurs permettent à la suite de leurs quantifications de diagnostiquer une maladie, de détecter des signes de maladie, de déterminer si un traitement est efficace. Les biomarqueurs permettent également d'avoir une vision globale des changements qui se produisent au sein d'une cellule. En revanche l'identification de biomarqueur spécifique aux réponses du système nerveux central est difficile. Un des biomarqueurs qui peut être utilisé pour la détection de traumatisme crânien est la protéine gliale S-100 $\beta$  et la protéine acide fibrillaire gliale. Ces protéines permettent entre autres de déterminer la réponse inflammatoire gliale (Okonkwo et al. 2013).

## 5 - Etat de l'art sur les modèles in vitro des traumatismes crâniens

### 5-1 La mise en culture

Plusieurs études ont cherché à établir une corrélation entre les propriétés des impacts et les lésions cérébrales. Pour arriver à cette corrélation des modèles de simulation de chocs ont été développés *in vivo* et *in vitro*, ces modèles mettent en rapport les propriétés des impacts au type de lésions cérébrales. Cependant le lien entre les lésions cérébrales et le niveau de traumatisme reste incomplet. En effet dans les études déjà menées, la corrélation entre la force appliquée/ déformation des tissus et neuro-inflammation n'est pas évidente, il est donc difficile de caractériser les blessures en fonction de l'intensité du traumatisme.

La mise en culture des cellules neurales est nécessaire pour pouvoir mener à bien ces expérimentations *in vitro*. Les méthodes de mise en culture de cellules neurales permettent d'avoir des échantillons simplifiés de cerveau. Le principe de mise en culture d'un échantillon est de prélever un morceau de tissu cérébrale de mammifère et de le mettre en culture dans un milieu physiologiquement favorable. Les cellules directement prélevées sur l'organisme vivant s'appellent des cellules primaires, lorsqu'elles sont subdivisées on parle de cellules secondaires. A la suite de leur prélèvement les cellules sont mises en culture dans un incubateur. L'incubateur permet d'appliquer des conditions de culture (température et mélange gazeux) particulières. Les paramètres de culture varient en fonction du type de cellule, des conditions particulières entraînent une expression de phénotypes différents. Le milieu de croissance est également un paramètre qui peut être modifié pour la mise en culture. Pour obtenir différents types de culture, le milieu de culture peut varier au niveau du taux de glucose, des facteurs de croissance, du pH et de la présence ou non d'éléments nutritifs. Dans les études déjà menées concernant les dispositifs de simulation de chocs, les cultures utilisées étaient des cultures de type organotypique ou primaire dissocié.

#### *Technique 1 : Culture organotypique*

Bottlang et al. 2007 ont utilisé pour leur étude une culture dite organotypique. Les cultures organotypiques ont pour caractéristiques d'être obtenues à partir de tranches minces du tissu, dans le cas présent issues de tissus du système nerveux central. La technique de mise en culture de cellule organotypique la plus utilisée, est la technique du rouleau. Pour cette technique un bout de tissu nerveux est fixé à une lame de verre. Cette lame est ensuite placée dans une éprouvette en plastique où l'on pourra également trouver le milieu de culture. L'éprouvette sera ensuite positionnée sur un tambour à rouleau qui tournera à une vitesse et à un angle précis. Grâce à cette technique les cultures peuvent être utilisées pour de la micromanipulation et elles survivent plusieurs semaines. Cependant ce type de culture reste très coûteux.

#### *Technique 2 : Culture primaire dissociée*

Les cellules de type primaire dissociées sont séparées du tissu cérébral par voie enzymatique et mécanique. Les cultures primaires dissociées ont déjà été utilisées pour examiner des lésions mécaniques notamment dans l'étude d'Ellis et al. 1995. L'âge des cellules est un désavantage de l'utilisation de cette technique, en effet sur des cellules âgées, la réponse au traumatisme et le phénotype cellulaire sera d'une moins bonne qualité que sur des cellules de type embryonnaire.

## *Marquage Immunocytochimie*

L'immunocytochimie est une technique de localisation des protéines d'un tissu. C'est une technique qui repose sur le principe de reconnaissance d'un antigène par un anticorps. La révélation de l'antigène par l'anticorps se fait à l'aide d'une réaction chimique, grâce à un marqueur fluorescent. Il existe des marquages des antigènes directs, et indirects. Pour la technique direct l'anticorps réagit directement avec l'antigène sur les tissus. La méthode indirecte permet d'obtenir un meilleur signal, elle est plus sensible. Pour cette technique un premier anticorps réagit avec l'antigène du tissu, au cours de cette étape il n'y a pas de marquage. Un second anticorps va se lier avec l'anticorps primaire pour le marquage de ce dernier.

La visualisation est effectuée à la suite du marquage. Un marqueur fluorescent est utilisé afin de révéler les protéines. Généralement cette étape est associée à une contre coloration des noyaux, de cette façon une différenciation des structures de la cellule est effectuée.

### 5-2 Études précédentes

Différentes méthodes d'analyse ont été mises en place pour permettre d'évaluer l'influence d'un choc sur la déformation du cerveau. Une des techniques mise en place est la méthode des éléments finis. Elle a été utilisée pour permettre de modéliser l'impact sur la tête au moment d'un choc, cette technique est utile pour déterminer et quantifier des impacts. Les modèles des éléments finis permettent d'avoir la cinématique globale du cerveau au cours du choc en observant la distribution des déformations et des contraintes. Les déformations observées pendant le choc sont supposées corrélées aux lésions cérébrales. Ces modèles sont utiles pour prédire les risques de traumatisme crânien à la suite d'un choc. Cependant ils ne permettent pas de déterminer l'impact d'un traumatisme crânien sur les cellules neurales au moment et à la suite du choc.

### *Modèles in vivo*

Dans l'étude de Meaney et al. 1994 des cerveaux de rats ont été soumis à des impacts sur leurs cortex moteur. Les cerveaux de rats ont ensuite été examinés après une période de 2 à 7 jours de survie. Les recherches de Meaney et al ont permis de révéler la présence de boules de rétractions axonales.

Gutierrez et al. 2001 s'intéressent quant à eux aux lésions cérébrales induites par des rotations rapides de la tête, sur des lapins, ils ont développé un nouveau modèle d'accélération rotationnelle qui permet d'étudier les lésions cérébrales par simple translation de la tête. 8 à 14 jours après l'induction du traumatisme une astrogliose réactive a été constatée.

Les modèles in vivo ont permis de montrer une grande bio fidélité et d'apporter des informations importantes et nécessaires à la bonne compréhension de l'impact d'un traumatisme sur des cellules neurales. Cependant leurs mises en place sur des animaux limitent certains aspects de la recherche.

Pour éviter cette limite certains chercheurs ont développé des modèles in vitro de simulation de traumatisme crânien. De récents modèles ont été proposés pour recueillir des données biologiques sur les lésions cérébrales et les propriétés des impacts. Ces dispositifs ont été développés dans le but d'induire un stress dynamique contrôlé sur les cellules neuronales de manière reproductible.

## Modèle *in vitro*

Un des modèles de simulation de lésion cérébrales *in vitro* est celui de Bottlang et al. 2007. Pour réaliser leur recherche ils ont développé un modèle induisant une contrainte de cisaillement induite par une force d'inertie, cette contrainte a été appliquée à des cultures organotypiques. Pour réaliser leur étude des cultures organotypiques d'hippocampe provenant de rats ont été insérées dans un module d'inertie. Ce module a ensuite subi des impacts à des vitesses différentes allant de 2 à 10 m/s. A la suite des expérimentations ils ont pu analyser le phénomène de mécano traumatisme. Une corrélation a été établie entre la vitesse d'impact et la mort cellulaire. Des vitesses d'impact de 8,1 à 10,4 m/s ont entraîné une augmentation de la mort cellulaire. Cependant dans cette étude seulement la vitesse d'impact induite par un mouvement d'inertie est étudiée. La corrélation établie entre la mort cellulaire et la vitesse d'impact ne prend donc pas en compte l'accélération maximale induite par le mouvement ni le temps de contact.

Un second modèle de simulation de lésions cérébrales est celui de Bar-Kochba et al. 2016 où un modèle de compression neurale en 3D a été développé. Ce système permet d'étudier le rôle de la déformation et la vitesse de déformation sur la durée de vie, la viabilité et la pathomorphologie des neurones. Des neurones corticaux primaires intégrés dans des gels de collagène de type I ont été utilisés pour les différents paramètres de test. A l'aide de leur modèle ils ont pu démontrer que l'ampleur de la déformation entraîne la mort des neurones, tandis que la vitesse de déformation a davantage d'influence sur la pathomorphologie et l'étendue des lésions. Ils ont également démontré que les lésions cellulaires ne sont pas initiées par une déformation localisée du cytosquelette mais plus par une contrainte au niveau de la cellule. Ils montrent donc que la mécanoporation n'a pas été observée pour une contrainte en compression. Or la mécanoporation est un mécanisme de déclenchement pathologique des lésions neurales pour des contraintes d'étirement et de cisaillement. Cependant cette étude ne permet pas d'établir un lien entre les dégâts cellulaires et la nature du choc.

Un autre modèle de simulation de lésions cérébrales a été développé par Koumlis et al. 2018. Ce dernier se nomme Highly Automated Mechanical Impactor (HAMr). Il a été conçu pour réaliser des impacts répétitifs de faible amplitude, soit 64 impulsions d'une pression contrôlée, sur des cultures mixtes de cellules gliales. Ce système permet de simuler des traumatismes crâniens répétés de faible amplitude. Pour cette étude la réponse mécanique des réseaux gliaux a été quantifiée en mesurant la déformation par le système en utilisant le principe de corrélation d'image numérique sous imagerie microscopique. Le cisaillement des réseaux gliaux a pu être observé quatre heures après l'application de la contrainte. Un cisaillement des réseaux gliaux est un phénomène caractéristique des traumatismes crâniens.

## QUESTIONS DE RECHERCHE ET OBJECTIFS

L'objectif principal de ce projet est de valider le dispositif de simulation d'impact déjà développé pour qu'il soit utilisable sur des cellules neurales de souris. Pour cela le système sera testé sur des cellules neurales de souris. Ces cellules seront par la suite analysées pour détecter les changements possibles dans la topologie des axones notamment en détectant des lésions

axonales diffuses. Une analyse immunohistochimique sera réalisée pour détecter des éventuels changements.

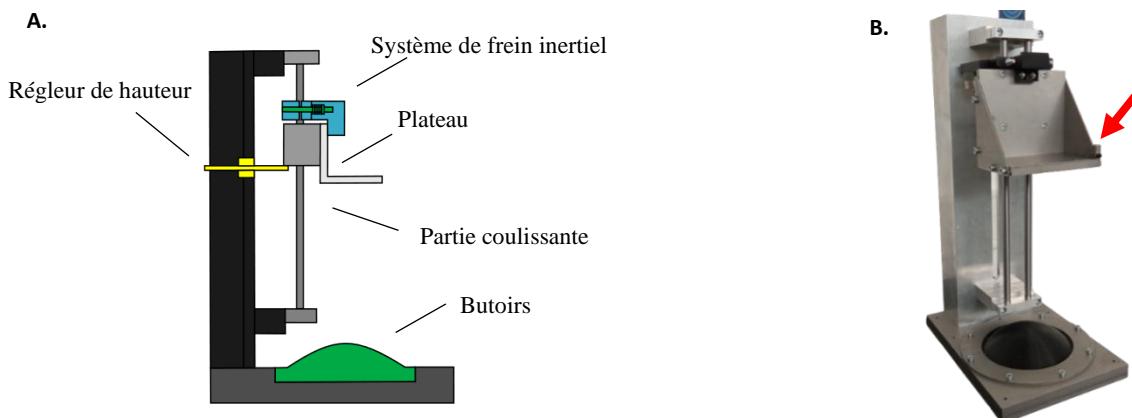
Nous chercherons à établir l'étendue des chocs à considérer : *une faible accélération est suffisante pour affecter la topologie des cellules ? L'accélération maximale que l'on peut obtenir grâce au système est suffisante pour observer des modifications de structure des cellules ?*

**Ces tests préliminaires permettront le développement d'un protocole expérimental pour déterminer systématiquement la réponse inflammatoire de neurones choqués.**

Ces objectifs s'inscrivant dans un projet à plus grande ampleur, la principale question de recherche étant de développer un système de détection des traumatismes crâniens orienté autour du diagnostic et de la prévention. Ce dispositif pourra caractériser les dégâts biologiques au niveau macroscopique en fonction de la nature du traumatisme. Les résultats pourraient être utilisés par la médecine pour adapter les soins à la suite d'un traumatisme crânien.

## METHODE

De manière préliminaire à ce projet, un appareil de simulation de chocs a été développé. Il mesure l'accélération et le temps de contact des impacts. Ce dispositif réalise des chocs inertiels, permettant de simuler des lésions cérébrales. Il a été conçu de façon à modifier les paramètres des chocs, pour cela la vitesse d'impact, la géométrie des butoirs et leurs propriétés mécaniques peuvent être modifiées. Ce dispositif est répétable pour 4 butoirs différents, de modules de Young de 5 MPa (fait en thermoplastique polyuréthane) pour des rayons de courbures de 50, 100, 300, et 1 000mm. Une plateforme susceptible de contenir des cultures cellulaires a été incluse sur le dispositif.



**Figure 3** : Système de simulation d'impact **A.** Schéma du système composé de 5 éléments. **Jaune** : partie permettant d'ajuster la hauteur de chute. **Vert** : butoir. **Bleu** : système de frein inertiel. **Gris-clair** : plateau pour déposer les cellules **B.** Le système de simulation d'impact, au niveau de la flèche rouge se trouve l'accéléromètre.

Hauteur de chute (h), en cm	Vitesse déterminée (m/s)
30	2,43
25	2,21
20	1,98
15	1,72
10	1,40

Tableau 3 : Tableau regroupant les différentes hauteurs de chute et leurs vitesses en m/s correspondantes.

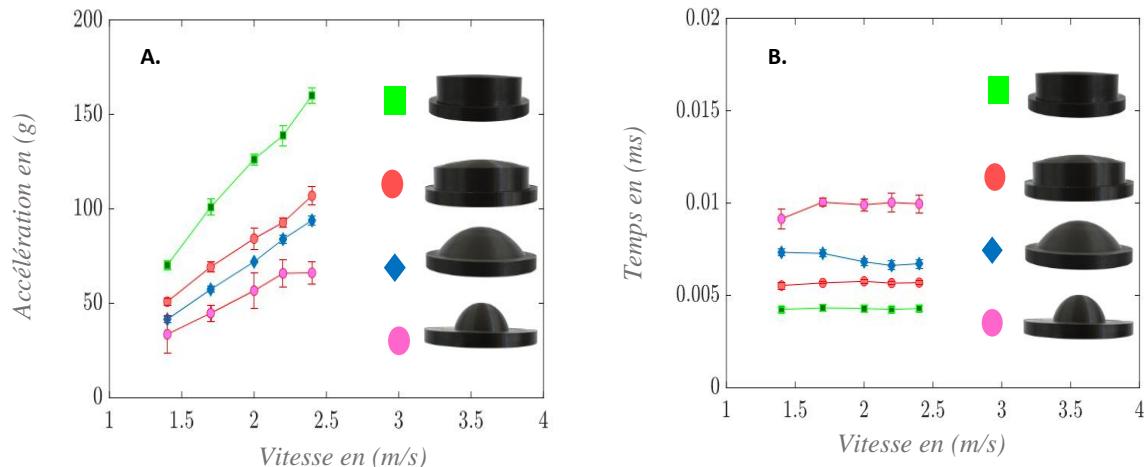


Figure 4 : Données obtenues pour les quatre butoirs de module d'Young de 5MPa. Les dimensions (rayon de courbure) des butoirs sont vert R=1000mm, rouge R=300mm, bleu R=100mm et rose R=50mm **A.** Accélération maximale en g en fonction des vitesses d'impact en m/s déterminées, pour chaque butoir. Sur ce graphique on remarque que plus la vitesse est élevée plus l'accélération au contact du centre du butoir est grande. Nous remarquons également que plus la surface de contact du butoir est grande plus l'accélération est élevée. **B.** Temps de contact en ms en fonction des vitesses d'impact en m/s. Sur ce graphique, nous pouvons observer que plus la surface de contact du butoir est grande moins le temps de contact est élevé.

À la suite de la validation du système de simulation d'impact, les cultures de cellules peuvent être ajoutées au dispositif. Ce dispositif est en cours de validation pour des butoirs de modules d'Young différents (j'ai participé à cette validation). De cette façon, une corrélation entre le type d'impact et les lésions cellulaires peut être établie.

### Modèle de simulation d'impact

Ce dispositif a été testé pour des butoirs de module d'Young de 100MPa, pour cela ils ont été modélisés sur un logiciel de CAO (SolidWorks), puis fabriqués par impression 3D. Le matériau utilisé pour cette impression est du nylon. Les butoirs alors développés ont été testés sur le système, des courbes de l'accélération en fonction du temps de contact ont pu être extraites de ces essais.

### Mise en culture de cellules neurales de souris

Pour le déroulement des essais, des cultures primaires mixtes (neurone/cellule gliale) ont été réalisées sur la base d'embryons de souris E16C57BL/6. La culture a été faite par une ingénierie d'étude (IGE) du laboratoire de l'INP (Diarra THIANE), suivant une technique de culture de cellules primaires dissociées. Pour cela, des cellules neurales issues d'embryon de souris ont été prélevées, puis mises en culture (le protocole utilisé pour la dissection ainsi que pour la mise en culture est donné en **annexe 1 et 2**). 10 embryons ont été préparés pour la mise en place des essais. Chaque culture primaire a été divisée en 3, il y avait donc 40 plaques de

culture disponibles pour réaliser les essais (10 de cultures primaires et 30 de cultures secondaires issues des cultures primaires).

## Utilisation du dispositif

### Mise en place des essais

Pour les premiers essais, seul les butoirs et les hauteurs de chute qui infligent les plus faibles et les plus fortes accélérations ont été choisis. Ce sont donc les butoirs possédant un rayon de courbure (R) 50mm et de 1000mm. Pour le butoir de 50mm les hauteurs de 10cm et de 30cm ont été sélectionnées et pour le butoir de 1000mm la hauteur de 30cm a été réalisée.

Ces essais ont été réalisés pour les cultures cellulaires secondaires découlant des quatre premiers embryons.

Embryon	Numéro de la culture	Module d'Young du butoir	Rayon de courbure du butoir	Hauteur de chute du plateau
1 primaire	1	Contrôle	Contrôle	Contrôle
1 secondaire	2	5 MPa	R = 50mm	10 cm
1 secondaire	3	5 MPa	R = 50mm	30 cm
1 secondaire	4	5 MPa	R = 1000mm	30 cm

**Tableau 4 :** Paramètres des essais de la première expérience pour l'embryon 1. Les paramètres des essais étaient identiques pour les quatre premiers embryons, soit les 16 premières cultures. Le tableau récapitulatif des essais est donné en **annexe 3**.

Pour les seconds essais, deux butoirs ont été sélectionnés (Module d'Young de 40MPa et de 100MPa). Les hauteurs de chutes étaient de 10cm et de 30cm pour le butoir possédant le module d'Young de 40MPa, et de 30cm pour le butoir de 100MPa. Le premier embryon de l'expérience 2 était l'embryon 5.

Embryon	Numéro de la culture	Module d'Young du butoir	Rayon de courbure du butoir	Hauteur de chute du plateau
5 primaire	1	Contrôle	Contrôle	Contrôle
5 secondaire	2	40 MPa	R = 50mm	10 cm
5 secondaire	3	100 MPa	R = 50mm	30 cm
5 secondaire	4	100 MPa	R = 50mm	30 cm

**Tableau 5 :** Paramètre des essais, les paramètres des essais étaient similaires pour les embryons 5,6,7,8,9 et 10, soit 24 cultures. Tableau récapitulatif des essais en **annexe 3**.

Pour mener à bien les essais et pour éviter les pertes de milieu de culture par projection sur la surface des trous, une partie du milieu a été retirée avant d'appliquer le choc. Le milieu des cellules a directement été remis à la suite du choc. Pour éviter la contamination des cellules lors du transport dans la zone d'expérimentation les plaques ont été protégées avec du Parafilm. Pour éviter de stresser les cellules hors de leur milieu de culture, l'expérimentation a été réalisée dans des délais courts (1 à 2 minutes hors milieu de culture).

### Imagerie optique à contraste de phase et protocole de prise d'image

La visualisation des cellules s'est faite à l'aide d'un microscope optique classique. Ces images ont été, par la suite, traitées pour déterminer des changements de structure. Toutes les cellules ont été observées avant les impacts, puis juste après les impacts. A la suite de l'impact, les cellules ont été de nouveau placées en zone d'incubation. De nouvelles acquisitions d'images ont été réalisées 4h après l'impact pour les embryons numéros deux et quatre, soit trois images

par expérience. Pour les autres embryons, des images ont été acquises 3h après l'impact, puis 6h après l'impact et enfin 24h après l'impact, soit cinq images pour chaque lamelle de cellule. Les réglages de luminosité et de focus ont été réalisés sur chaque lamelle pour obtenir une image de qualité. Des repères visuels ont été placées sur les boîtes de Pétri, permettant de retrouver la même zone d'imagerie sur une même cellule. De cette façon les images réalisées sur une même lamelle ont pu être comparées entre elles.

### Traitement d'image (microscope à contraste de phase)

Un code sur Matlab a été réalisé pour le traitement des images. A l'aide ce code, nous sommes capables de relocaliser (au pixel près) certains points de deux images prises à des temps différents. Pour cela une rotation de l'image 2 est réalisée en parallèle d'une corrélation entre l'image 1 et l'image 2. Lorsque la corrélation est optimale la rotation de l'image 2 s'arrête. L'image 2 est ensuite recadrée aux dimensions de l'image 1. Les deux images sont alors juxtaposées l'une au-dessus de l'autre. Un filtre permettant de labelliser les nuances de gris est appliqué sur l'image 1. Ce code a pour l'instant été testé sur les images prises au microscope optique.

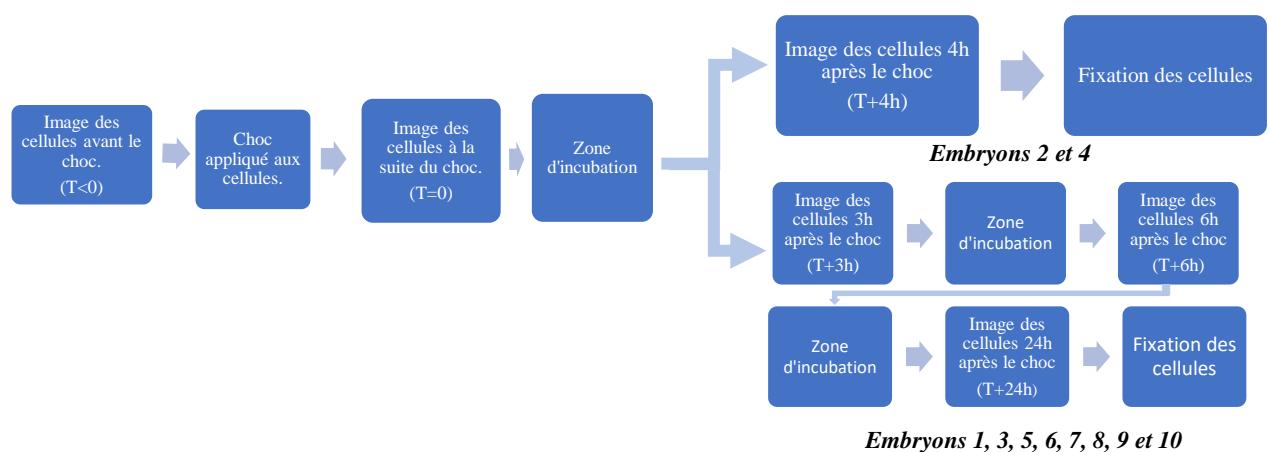
### Fixation des cellules

Après acquisition des images d'évolution de l'inflammation consécutive au choc, les cellules ont été fixées. Leurs structures ne pouvaient donc plus se modifier au cours du temps. La fixation a été réalisée grâce à l'Antigenfix 4%.

#### La fixation a été réalisée suivant le protocole suivant :

1. Enlever le milieu de culture,
2. Déposer 200uL d'Antigenfix par lamelle,
3. Incuber à température ambiante pendant 15 minutes,
4. Laver 3 fois avec 300uL de DPBS 1X,
5. Déposer 300uL de DPBS1 X+0,05% d'acide et stocker à 4°C jusqu'au marquage.

La dépose de l'acide a permis d'éviter la contamination des cellules à la suite de la fixation.



**Figure 5 :** Diagramme récapitulatif des essais effectués.

## Marquage des cellules

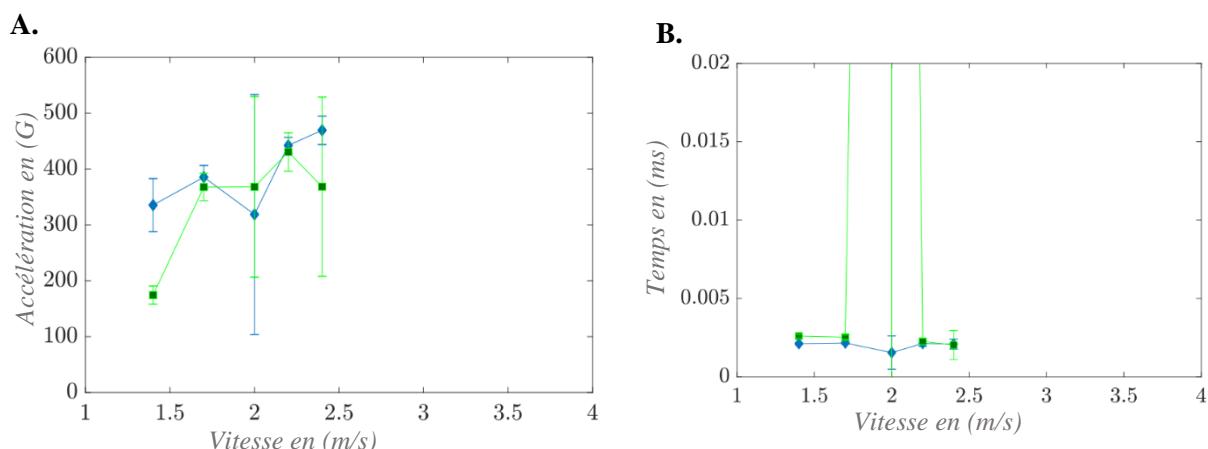
A la suite de la fixation, les cellules ont été marquées. Le marquage est de type indirect car il a été réalisé à l'aide de deux anticorps. L'anticorps primaire était de l'anti  $\beta$ -3-tubuline de sigma (T8660-2mL) et l'anticorps secondaire était de l'anti mousse Alexa-488. Ces deux anticorps ont permis de marquer le cytosquelette des cellules. Les noyaux ont quant à eux étaient marqués à l'aide d'un fluorophore Hoechst, qui se fixe à l'ADN. Le protocole de la mise en place de l'immunocytochimie est disponible en **annexe 4**.

Après 48h de polymérisation les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser. 3 images de lieux différents ont été prises pour chaque lamelle.

## RESULTATS

### Caractérisation des butoirs 100MPa

Les butoirs de 100MPa possédant un rayon de courbure de 1000mm et de 300mm ont été testés pour le dispositif. Ces butoirs ont été testés pour toutes les hauteurs de chutes. Seulement ces butoirs ont été testés pour cette étape.

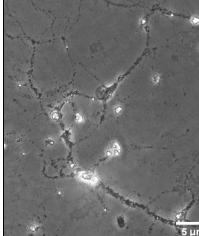
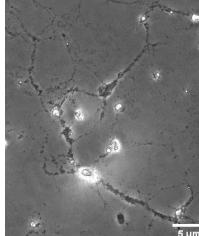
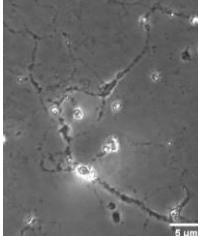
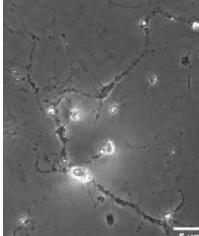
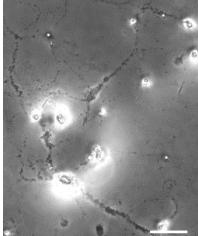
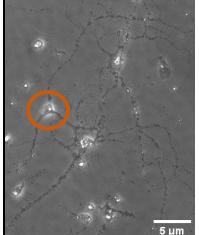
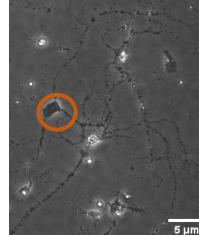
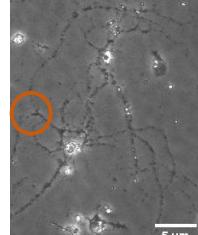
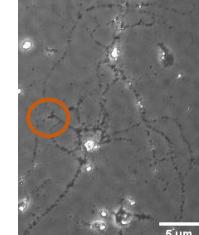
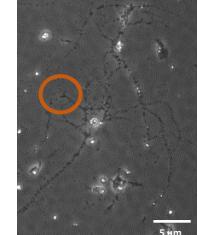
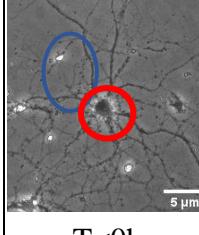
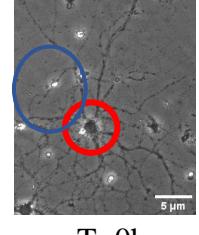
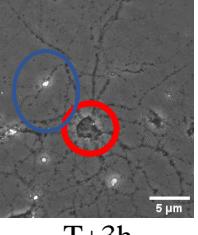
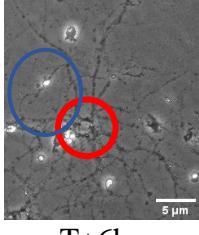
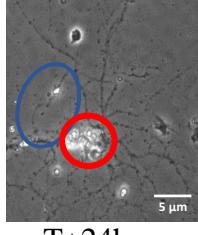
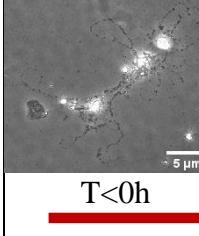
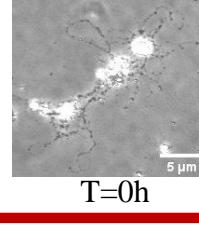
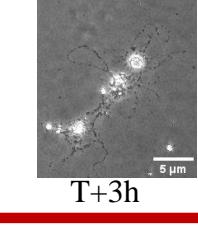
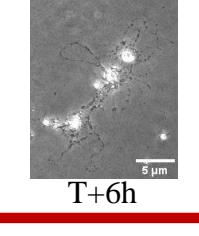
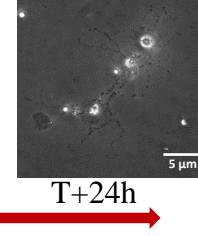


**Figure 6 :** Données obtenues pour deux butoirs de module d'Young de 100MPa. Les dimensions (rayon de courbures) des butoirs sont : Bleu : 1000mm, Vert : 300mm. **A.** Graphique regroupant les valeurs moyennes de l'accélération maximale en G en fonction des vitesses d'impact en m/s, pour chaque butoir. **B.** Graphique regroupant les valeurs moyennes du temps de contact en ms en fonction des vitesses d'impact en m/s.

Sur les graphiques obtenus nous remarquons que le butoir possédant la plus grande dimension a l'accélération la plus élevée, en revanche ce butoir possède le temps de contact le plus faible. Nous remarquons également que certaines valeurs ne suivent pas un schéma classique, cela est dû à un manque au niveau de l'accéléromètre, en effet l'accéléromètre ne permet pas de mesurer des accélérations aussi importantes.

### Chocs sur cellule : Observation par microscopie à contraste de phase

Les premières conditions de manipulation étaient des impacts avec deux butoirs de 5MPa. Le premier butoir testé a un rayon de courbure de 50mm sur lequel le plateau contenant les cellules a chuté de 10cm et de 30cm. Le second butoir testé a un rayon de courbure de 1000mm et une chute de 30cm a été appliquée au plateau sur le butoir.

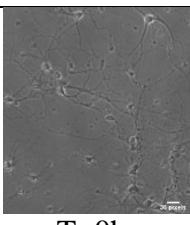
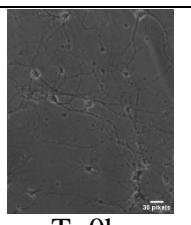
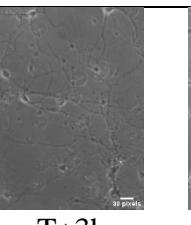
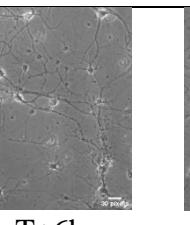
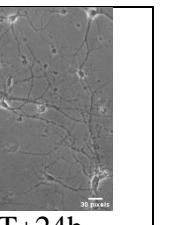
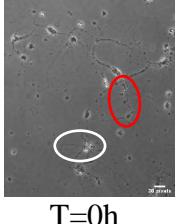
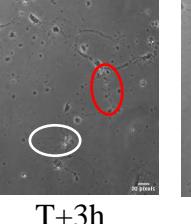
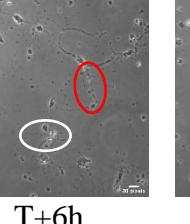
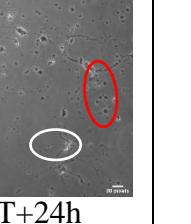
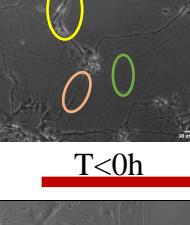
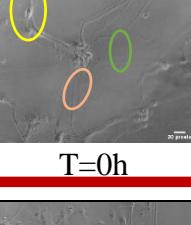
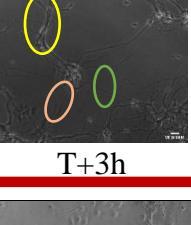
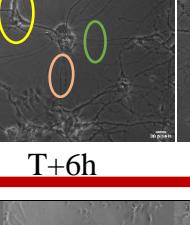
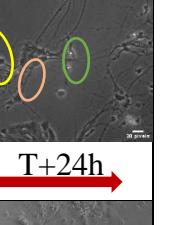
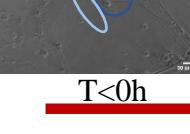
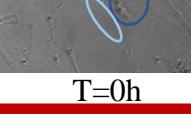
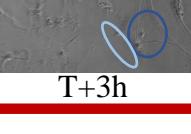
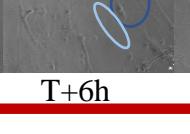
Embryon Lamelle (Nature de l'essai)	T<0	T=0	T+3h	T+6h	T+24h
3_1 (contrôle)					
3_2 (5MPa, R=50mm h=10cm)					
3_3 (5MPa, R=50mm h=30cm)					
3_4 (5MPa, R=1000mm h=30cm)					

**Tableau 6 :** Images prises au microscope optique, avec une magnification  $\times 10$ , des essais menés sur l'embryon 3 à différents moments, **T<0** (avant l'impact), **T=0** (après l'impact), **T+3h** (3 heures après l'impact), **T+6h** (6 heures après l'impact) et **T+24h** (24 heures après l'impact). Essais menés sur butoir de 5MPa. Les zones d'intérêt ont été sélectionnées sur les images d'origines, les images sont donc des images redimensionnées. Cercle orange, bleu et rouge représentent les éléments sur les cellules qui ont changé au cours du temps.

Sur la lamelle contrôle, on ne remarque aucun changement de structure de la cellule. Les changements observés au niveau de l'intensité proviennent de réglages différents de luminosité concernant le microscope. Sur l'essai 3\_2, la structure des neurones a changé au cours du temps notamment au niveau du cercle entouré en orange. En effet sur cet essai on remarque qu'une partie de la cellule c'est désintégrée, cependant avec un microscope à contraste de phase on ne peut pas être sur de si cet élément correspond à un astrocyte ou à un neurone. Sur l'essai 3\_3,

la structure de certains axones a diminué en intensité (entourée en bleu). Le noyau entouré en rouge semble avoir changé, en effet sur les images on remarque que sa forme c'est modifié, il est passé d'une forme ronde à une forme plus étalé, le noyau semble s'être désintégré. En revanche sur l'essai 3\_4 on ne remarque aucun changement de structure (sur cette lamelle de culture il n'y avait pas beaucoup de développement cellulaire avant le début des essais), pour cet essai on pense que les cellules étaient déjà morte avant la manipulation.

Les secondes conditions de manipulation sont des impacts avec deux butoirs ayant un rayon de courbure de 50mm. Le premier butoir a un module d'Young de 40MPa il a été testé pour une chute de 10 et de 30cm. Le second butoir a un module d'Young de 100MPa il a été testé pour une chute de 30cm.

Embryon_nature de l'essai	T<0h	T=0h	T+3h	T+6h	T+24h
6_contôle					
6_2 (R=50mm, 40MPa, h=10cm)					
6_3 (R=50mm, 40MPa, h=30cm)					
6_4 (R=50mm, 100MPa, h=30cm) Culture de cellule de moins bonne qualité.					

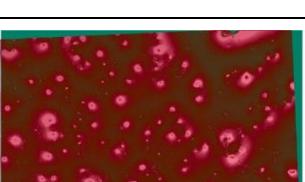
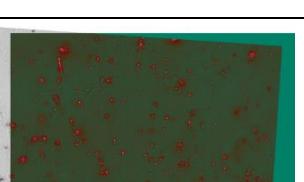
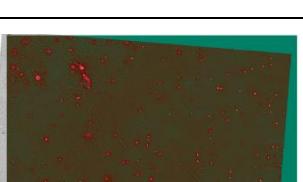
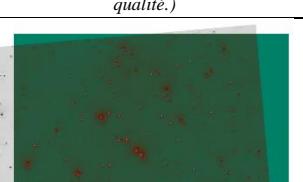
**Tableau 7 :** Images prises au microscope optique des essais menés sur l'embryon 6 à différents moments, **T<0h** (avant l'impact), **T=0h** (après l'impact), **T+3h** (3 heures après l'impact), **T+6h** (6 heures après l'impact) et **T+24h** (24 heures après l'impact). Essais menés sur butoir de 40MPa et de 100MPa. Certaines zones d'intérêt ont été sélectionnées sur les images d'origines, les images sont donc des images redimensionnées. Les cercles rouge et blanc représentent des changements de structure de la cellules au cours du temps sur l'essai 6\_2. Les cercles jaune, orange et vert représentent des changements de structure de la cellules au cours du temps sur l'essai 6\_3. Les cercles bleu foncé et bleu ciel représentent des changements de structure de la cellules au cours du temps sur l'essai 6\_4.

Sur l'essai 6\_2 nous pouvons observer des changements de la structure des axones ( cercle rouge) et également une baisse de l'intensité de la visibilité de certains axones ( cercle blanc).

Sur l'essai 6\_3 nous pouvons remarquer des changements de structure ( cercle jaune), l'apparition de gonflement sur les axones ( cercle orange) et le développement de nouveaux éléments ( cercle vert). Sur l'essai 6\_4 nous pouvons observer une diminution en intensité de la visibilité d'axone ( cercle bleu foncé) et l'apparition de certains éléments ( cercle bleu ciel), tels que des dépôts et des débris cellulaires. Enfin sur l'essai contrôle nous ne remarquons pas de changement de la structure des neurones.

## Mise en évidence des changements structuraux par corrélation d'images

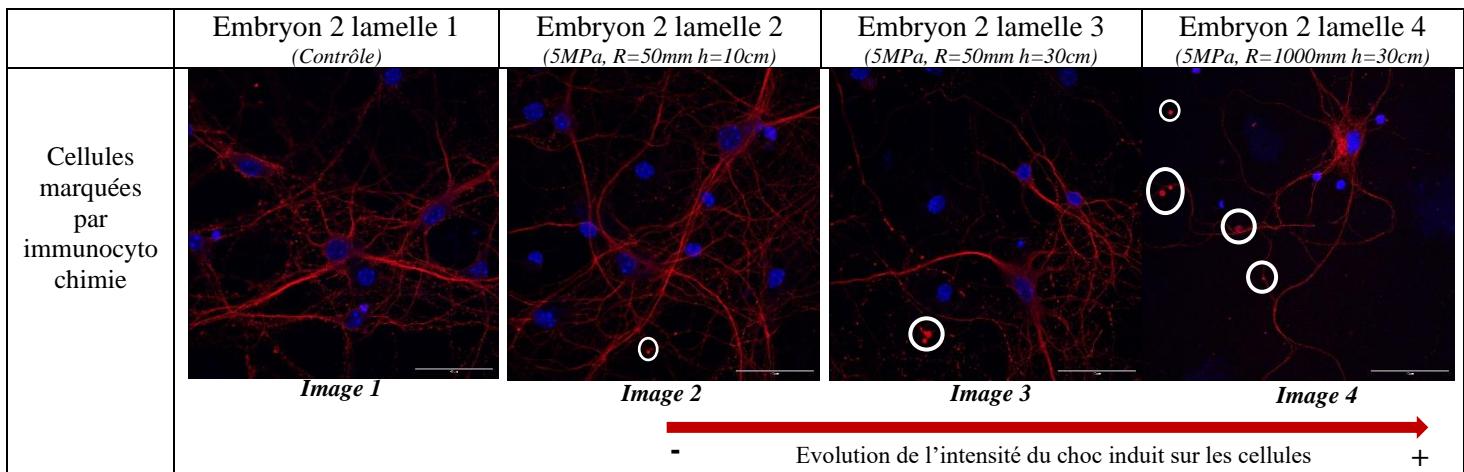
À la suite de la corrélation des images nous avons pu voir de façon plus quantitative les changements de structure des neurones à la suite d'un traumatisme. Pour cela, nous avons corrélé les images avant l'impact et les images 24h après l'impact.

	Embryon 3 lamelle 1 (Contrôle)	Embryon 3 lamelle 2 (5MPa, R=50mm h=10cm)	Embryon 3 lamelle 3 (5MPa, R=50mm h=30cm)	Embryon 3 lamelle 4 (5MPa, R=1000mm h=30cm) (Culture de cellule de moins bonne qualité.)
Image T<0 juxtaposé à T+24h				

**Tableau 8 :** images prises de l'embryon 1, des lamelles 1, 2, 3 et 4, à  $T < 0$  juxtaposé aux images prises à  $T + 24\text{h}$ . Les images utilisées sont les images d'origines.

Sur ces images, nous pouvons remarquer qu'il y a des différences d'intensité de couleurs. Sur la première image qui correspond à la condition contrôle, le fond de l'image est rouge et des zones plus lumineuses sont visibles. Sur les images suivantes, nous pouvons remarquer que les images ont un fond vert et que des points lumineux rouges sont visibles. L'image qui ressort en couleur est l'image prise 24 heures après l'impact et l'image grise du fond est l'image avant le choc. La corrélation d'image a permis de mettre en évidence les changements structuraux en replaçant les images l'une par rapport à l'autre. Il était attendu que les changements structuraux apparaissent en rouge. Malheureusement, les différences d'éclairage sont les principaux changements observés. Cette technique ne paraît pas prometteuse si le problème d'éclairage n'est pas corrigé. La correction peut se faire directement sur le microscope.

## Observation par microscopie confocale à la suite de l'immunocytochimie



**Tableau 9 :** Images prises de l'embryon 2, des lamelles 1, 2, 3 et 4, à l'aide d'un microscope à confocal à balayage laser (LSM 700 de Zeiss), les lasers utilisés sont le 405nm et le 639nm. En **rouge** : cytosquelette des neurones marqués à l'aide de l'anticorps  $\beta$ -3-tubuline, Alexa 647 (laser 639nm). En **bleu** : noyaux marqués à l'aide du fluorophore Hoechst (laser 405nm). La barre d'échelle est de 40 $\mu$ m. Cercles blancs représentent l'apparition de gonflements sur le cytosquelette.

Sur ces images, nous pouvons remarquer, qu'au fur et à mesure la densité des informations diminue (présence de neurone). En effet, l'image correspondant à la condition contrôle (image 1) possède plus d'informations que l'image 4. Nous pouvons également notifier la présence de gonflements sur les axones présents sur l'image 4 (entourés en blanc), ces gonflements se retrouvent au niveau du cytosquelette. Les cercles blancs présents sur les autres images, peuvent s'apparenter à des débris cellulaires, ou à des gonflements que l'on peut observer sur certains axones.

## DISCUSSION

Un protocole permettant de suivre l'évolution d'une inflammation neuronale pendant 24h a été mis en place. Pour cela, un dispositif de simulation de choc a été développé, où l'accélération et le temps de contact du choc peuvent être modifiés à l'aide de différents paramètres (forme et matériaux des butoirs et hauteur de chute). La modification de ces paramètres permet d'infliger une intensité de choc différente. Pour pouvoir tester la viabilité du dispositif et du protocole, des chocs ont été appliqués sur des cellules neurales de souris. Pour cela des cultures de souris primaires mixtes (neurone/cellule gliale) ont été développées, puis choquées. Les tests ont été effectués selon une intensité de choc croissante, permettant d'avoir une évolution de l'inflammation neurale en fonction de l'intensité du choc. L'ordre de mise en place des essais se trouve en **annexe 3**. Pour chaque embryon, a été mis en place une lamelle de cellule contrôle. L'évolution de la structure des neurones a été observée par microscopie à contraste de phase. Une étude d'immunocytochimie a été réalisée permettant de révéler le cytosquelette des cellules à l'aide des anticorps primaire anti- $\beta$ 3-tubuline et de l'anticorps secondaire anti-mousse, et les noyaux des cellules grâce au fluorophore Hoechst.

Les résultats concernant l'évolution de la structure des cellules, obtenus par une observation par microscopie à contraste de phase, ont permis de démontrer l'absence de changement sur les lamelles contrôles. Le protocole n'inflige donc pas de stress, en l'absence de choc, sur les cellules. Les changements observés sur les cellules choquées permettent de démontrer l'efficacité du dispositif sur sa capacité à infliger des dégâts aux cellules. En effet sur les observations réalisées nous remarquons que plus l'intensité du choc est élevée plus les dégâts sur les cellules sont visibles et nombreux. Les dégâts observés se traduisent par une destruction des axones, ou par l'apparition de débris cellulaires. Cependant, ce résultat n'est pas observé sur les lamelles de culture où le développement cellulaire est trop faible ou de mauvaise qualité (essai 3\_4 présents sur le tableau 6). Il est donc nécessaire pour obtenir un résultat exploitable d'utiliser, pour les essais, des cultures de cellules ayant un développement cellulaire suffisant. Sur chacune des observations, nous pouvons voir un changement de la structure des neurones, un choc à faible intensité est donc suffisant pour obtenir des résultats. Cependant, ces résultats restent faibles, pour avoir des résultats plus visibles, il est nécessaire d'infliger aux cultures de cellules une intensité de chocs plus élevée, soit minimum une accélération d'environ 60g. De la même manière les premiers dégâts sur les cellules sont visibles 6 heures après le choc. Ces dégâts sont encore plus importants 24 heures après le choc. En effet, 24 heures après le choc nous pouvons observer sur certaines lamelles une lyse cellulaire. Il est donc nécessaire pour pouvoir observer des dégâts sur les cellules, de réaliser une imagerie 6 heures après le choc.

En ce qui concerne l'observation au microscope à contraste de phase, il est indispensable de procéder à l'observation d'une zone d'intérêt et d'établir un marquage de cette zone directement sur la boîte de pétri. De cette façon, il est possible d'obtenir une image de la même zone à différents intervalles de temps. Les images que l'on obtient au cours du temps peuvent donc être comparées entre elles. De la même façon la luminosité et le focus doivent être identiques, pour permettre une bonne comparaison. Sur certaines images d'une même lamelle l'ajustement de la luminosité n'était pas le même rendant difficile l'obtention d'un résultat à la suite de l'application du code de corrélation des images. En effet, lorsque la luminosité n'est pas la même sur les images comparées, comme sur l'**image 1 du tableau 8**, nous pouvons observer de nombreux points lumineux. Or les images comparées proviennent de la lamelle contrôle, et comme nous avons pu le remarquer dans le **tableau 6** la lamelle contrôle n'a pas eu de changement de structure au cours du temps. Nous pouvons également observer sur le **tableau 6** que l'image prise avant le choc et l'image prise 24 heures après le choc ont des grandes différences au niveau de l'intensité lumineuse appliquée à l'image. Les points lumineux alors observés sur l'image obtenue à l'aide du code de corrélation, sont seulement dû à une différence d'intensité lumineuse entre les deux images.

L'étude d'immunocytochimie a permis d'observer de façon plus qualitative les dégâts infligés sur les cellules en fonction de l'intensité du choc. Pour rappel, le processus d'immunocytochimie a été réalisé à la suite de la fixation des cellules, et celle-ci a été effectuée 24 heures à la suite du choc. Nous pouvons constater grâce aux résultats obtenus que plus l'intensité du choc est élevée plus les dégâts sur les cellules sont importants. En effet, nous pouvons observer sur les images récoltées au microscope confocal, que plus l'intensité du choc est élevée, moins il y a d'information cellulaire sur les lamelles. De plus, nous pouvons noter la présence de gonflements sur le cytosquelette des cellules. Ces gonflements sont comparables à ceux présents sur les axones observés dans l'étude de Bar-Kochba et al, 2016 (**figure 2**). Pour rappel dans cette étude, les cellules ont subi une déformation de type compressive. Grâce à

l'étude d'immunocytochimie nous pouvons affirmer la présence de dégâts, infligés par le dispositif de choc, sur les cellules.

## CONCLUSION

La mise en place de ces essais a permis d'adapter et d'améliorer le protocole, et également d'affirmer la capacité du dispositif à infliger des dégâts sur les cellules. Des changements qualitatifs ont été appliqués au cours des essais, ces changements ont été adaptés en fonction des résultats obtenus. De cette façon un protocole fonctionnel permettant de suivre l'évolution d'une inflammation neuronale pendant 24 heures a été mis en place.

## PERSPECTIVES

A la suite de la validation du protocole, les essais vont se poursuivre permettant d'avoir les données nécessaires pour démontrer la répétabilité de l'expérience. Ainsi, des mesures quantitatives seront mises en place, pour se faire de nouveaux butoirs seront construits en différents matériaux, puis testés sur le dispositif. Un traitement des images obtenues et des données biologiques sera effectué. Les expériences menées fourniront des informations utiles permettant de réaliser une étude statistique entre les dégâts biologiques et les propriétés des impacts. A la suite de cela, une base de données pourra être mise en place permettant de fournir de nouvelles informations concernant le type d'impact et les dégâts cellulaires qui en découlent.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] Alexander, M. P. 1995. « Mild Traumatic Brain Injury: Pathophysiology, Natural History, and Clinical Management ». *Neurology* 45 (7): 1253-60. <https://doi.org/10.1212/WNL.45.7.1253>.
- [2] Bar-Kochba, Eyal, Mark T. Scimone, Jonathan B. Estrada, et Christian Franck. 2016. « Strain and Rate-Dependent Neuronal Injury in a 3D in Vitro Compression Model of Traumatic Brain Injury ». *Scientific Reports* 6 (1): 30550. <https://doi.org/10.1038/srep30550>.
- [3] Beaudeux, J. -L. 2009. « La protéine S100B : premier marqueur biologique pour le diagnostic du traumatisme crânien mineur ou modéré ». *Annales Pharmaceutiques Françaises* 67 (3): 187-94. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2009.03.002>.
- [4] Bottlang, Michael, Mark B. Sommers, Theresa A. Lusardi, Jennifer J. Miesch, Roger P. Simon, et Zhi-Gang Xiong. 2007. « Modeling Neural Injury in Organotypic Cultures by Application of Inertia-Driven Shear Strain ». *Journal of Neurotrauma* 24 (6): 1068-77. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.3772>.
- [5] Ellis, E. F., J. S. McKinney, K. A. Willoughby, S. Liang, et J. T. Povlishock. 1995. « A New Model for Rapid Stretch-Induced Injury of Cells in Culture : Characterization of the Model Using Astrocytes ». *Journal of Neurotrauma* 12 (3): 325-39. <https://doi.org/10.1089/neu.1995.12.325>.
- [6] Gutierrez, E., Y. Huang, K. Haglid, F. Bao, H. A. Hansson, A. Hamberger, et D. Viano. 2001. « A New Model for Diffuse Brain Injury by Rotational Acceleration: I Model, Gross Appearance, and Astrocytosis ». *Journal of Neurotrauma* 18 (3): 247-57. <https://doi.org/10.1089/08977150151070874>.
- [7] Hemphill, Matthew A., Stephanie Dauth, Chung Jong Yu, Borna E. Dabiri, et Kevin Kit Parker. 2015. « Traumatic Brain Injury and the Neuronal Microenvironment: A Potential Role for Neuropathological Mechanotransduction ». *Neuron* 85 (6): 1177-92. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.041>.
- [8] Koumlis, S., H. Cheng, T. E. Morgan, C. E. Finch, et V. Eliasson. 2018. « Glial Model for Traumatic Brain Injury: Network Strain Field and Inflammation Induced by Repeated Mechanical Impacts In Vitro ». *Experimental Mechanics* 58 (1): 125-35. <https://doi.org/10.1007/s11340-017-0338-3>.
- [9] Lecky, Fiona E., Olubukola Otesile, Carl Marincowitz, Marek Majdan, Daan Nieboer, Hester F. Lingsma, Marc Maegele, et al. 2021. « The Burden of Traumatic Brain Injury from Low-Energy Falls among Patients from 18 Countries in the CENTER-TBI Registry: A Comparative Cohort Study ». *PLOS Medicine* 18 (9): e1003761. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003761>.
- [10] Mayeux, R., R. Ottman, G. Maestre, C. Ngai, M. X. Tang, H. Ginsberg, M. Chun, B. Tycko, et M. Shelanski. 1995. « Synergistic Effects of Traumatic Head Injury and Apolipoprotein-Epsilon 4 in Patients with Alzheimer's Disease ». *Neurology* 45 (3 Pt 1): 555-57. <https://doi.org/10.1212/wnl.45.3.555>.
- [11] Meaney, D.F., D.T. Ross, B.A. Winkelstein, J. Brasko, D. Goldstein, L.B. Bilston, L.E. Thibault, et T.A. Gennarelli. 1994. « Modification of the Cortical Impact Model To Produce Axonal Injury in the Rat Cerebral Cortex ». *Journal of Neurotrauma* 11 (5): 599-612. <https://doi.org/10.1089/neu.1994.11.599>.
- [12] Okonkwo, David O., John K. Yue, Ava M. Puccio, David M. Panczykowski, Tomoo Inoue, Paul J. McMahon, Marco D. Sorani, et al. 2013. « GFAP-BDP as an Acute Diagnostic Marker in Traumatic Brain Injury: Results from the Prospective Transforming Research and Clinical Knowledge in Traumatic Brain Injury Study ». *Journal of Neurotrauma* 30 (17): 1490-97. <https://doi.org/10.1089/neu.2013.2883>.
- [13] « Traumatismes crâniens ». s. d. Consulté le 23 mai 2022. [https://www.unilim.fr/campus-neurochirurgie/IMG/pdf/Traumatismes\\_cr\\_ioniens\\_-\\_copie.pdf](https://www.unilim.fr/campus-neurochirurgie/IMG/pdf/Traumatismes_cr_ioniens_-_copie.pdf).
- [14] « Traumatismes du cerveau et de la moelle épinière ». s. d. Institut du Cerveau. Consulté le 23 mai 2022. <https://institutducerveau-icm.org/fr/chiffres-cles/>.
- [15] Zongo, Drissa, Régis Ribéreau-Gayon, Françoise Masson, Magali Laborey, Benjamin Contrand, Louis Rachid Salmi, Danièle Montaudon, et al. 2012. « S100-B Protein as a Screening Tool for the Early Assessment of Minor Head Injury ». *Annals of Emergency Medicine* 59 (3): 209-18. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2011.07.027>.

## ANNEXES

### Annexe 1 :

#### *Protocole de Dissection des neurones d'embryons de souris*

##### **Matériels :**

- |   |                  |
|---|------------------|
| ❖ Matériel de dissection (scalpel, ciseaux, pinces) | ❖ Boite de pétri |
| ❖ Souris gestante (C57BL/6J : C57j-5322)            | ❖ Glace          |
| ❖ HBSS 10X (Ref :14185045-500mL, Sigma)             | ❖ Falcon 15 mL   |
| ❖ HEPES 1M (Ref :15630049-100mL, Sigma)             | ❖ Eau BBraun     |
| ❖ Boite de pétri 35 mm                              | ❖ Flasque 75 mL  |

##### **Méthode :**

- Préparer la solution de dissection HBSS/HEPES :
  - 445 mL d'eau BBraun
  - 50 mL HBSS 10x w/o
  - 5 mL 1M HEPES solution
- Filtrer la solution de dissection et répartir 250 mL dans une flasque T75 et garder au frais si préparer la veille sinon mettre au congélateur 1heure avant utilisation
- Garder la solution restante dans la bouteille sous le PSM pour les lavages
- Sacrifier la souris gestante en brisant les cervicales
- Préparer les 2 bacs de glaces avec l'un pour y mettre les Falcon 15 et l'autre pour y déposer les produits de la dissection
- Nettoyer à l'éthanol 70% l'abdomen de l'animal
- Faire une incision de l'abdomen avec ciseau
- Récupérer la poche contenant les embryons
- Placer le placenta dans une boite de Pétri
- Enlever le placenta et déposer chaque embryon dans la boite de Pétri contenant la solution de dissection
- Faire une incision au-dessus des cervicales pour visualiser le cerveau
- Enlever la peau et la dure mère
- Récupérer les deux cortex et les placer dans la petite boite de Pétri contenant la solution de dissection
- Isoler sous microscope chaque cervelet et enlever les méninges (en rouge)
- Une fois les cortex clairs, déposer chacun d'eux dans 5 mL de solution de dissection (Falcon 15)

## Annexe 2 :

### *Protocole de culture primaire de souris*

#### Matériels

- |   |  |
|---|--|
| ❖ Lamelles Marienfield 18mm (Ref : 0111580) | ❖ Glutamax DMEM (Ref : 619665026-500mL, Sigma)                 |
| ❖ Acide nitrique (20422297-1L, VWR)         | ❖ FBS (10270-098-100mL, Gibco)                                 |
| ❖ Eau mQ                                    | ❖ Sodium pyruvate (Ref : 11360039-100mL, Sigma)                |
| ❖ Erlenmeyer 250                            | ❖ Penicilline/Streptomycine(P/S) (Ref : 15140122-100mL, Sigma) |
| ❖ Parafilm                                  | ❖ Neurobasal avec vitamineA (Ref : 12348017-500mL, Sigma)      |
| ❖ Ethanol absolu (20823-293-1L, VWR)        | ❖ B-27 supplément sans vitamine A (Ref : 17504044-10mL, Sigma) |
| ❖ Kimtech                                   | ❖ L-Glutamine (Ref : 25030024-200mM, Sigma)                    |
| ❖ Poly-D-Lysine (P7280-5MG, Sigma)          | ❖ DNase (DN-25-100MG, Sigma)                                   |
| ❖ Filtre 0,22um (431097, Corning)           | ❖ Trypsine 2,5% (Ref :15090046, Sigma)                         |
|   | ❖ Eau BBraun(06665701-1L. Ecotainer)                           |

#### Méthode :

##### **J-3 : Lavage acide nitrique**

- Préparer la solution d'acide nitrique à 30% : Pour un volume final de 50mL, placer 22,06mL d'acide nitrique 68% dans 27,94mL d'eau mQ. Homogénéiser
- Déposer les lamelles dans l'rlenmeyer et ajouter la solution d'acide nitrique à 30%.
- Recouvrir l'rlenmeyer avec du parafilm pour éviter l'évaporation puis le placer sur l'agitateur pendant au moins 24 heures. Vérifier que les lamelles sont bien agitées dans l'rlenmeyer.

##### **J-2 : Lavage eau mQ**

- Remettre la solution d'acide nitrique dans la bouteille si moins de 3 utilisations
- Réaliser un premier lavage des lamelles à l'eau mQ
- Déposer environ 50mL d'eau mQ dans l'rlen et le placer sous agitation au moins 2 ou 3 heures
- Répéter les lavages au moins 3 fois puis laisser les lamelles dans l'eau mQ pour la nuit

##### **J-1 : Lavage éthanol absolu**

- Rincer les lamelles à l'éthanol absolu (100%)
- Placer l'rlen sous agitation pendant au moins 15 minutes
- Egoutter les lamelles une à une sur du papier Kimtech
- Laisser sécher sur le papier 1 minute
- Placer les lamelles dans la boite métallique pour stérilisation
- Mettre sur la boite la colle de stérilisation (motif en V)
- Stériliser les lamelles à 180°C pendant 1h30

##### **J0 : Coating des plaques avec poly-D-Lysine**

- Calculer les volumes de poly-D-lysine nécessaire pour les lamelles avec 0,5 mg/mL par lamelle (1ml de solution par puits/lamelle) et pour les plaques en plastique (plaques 6 puits) avec 10ug/mL par plaque. (2ml de solution par puits)
- Préparer le tampon borate pour solubiliser la poly-D-lysine
  - Peser 1,24g d'acide borique et 1,90g de sodium tétraborate et les diluer dans 400 mL d'eau BBraun destinée uniquement aux solutions de culture
  - Placer la solution sous agitation avec la bille jaune pour dissolution
  - Laver la pointe du pH mètre et calibrer ce dernier
  - Mesurer le pH du tampon borate
  - Ajuster le pH à 8,5 avec HCL/NaOH au besoin seulement quand il y a de petites différences, si la différence est grande (valeur de 1,0 ph) faire un nouveau tampon
- Filtrer le tampon borate avec un filtre 0,22mm sous PSM
- Préparer le stock initial (10mg/ml) de poly-D-lysine avec 500 uL de tampon borate

- Répartir sur 2 falcons15 les solutions de poly-D-lysine utilisées dans les plaques 6 puits et sur les lamelles
- Déposer les lamelles stérilisées dans la plaque 12 puits à l'aide d'une pipette 1mL
- Déposer 1mL solution de poly-D-lysine dans chaque puits de la plaque 12puits et 2 mL de solution sur les plaques 6puits.
- Incuber les plaques à l'étuve à 37°C et 5%CO2 pendant toute la nuit.

### **J1 : Mise en culture**

- Laver les puits au moins 5fois avec l'eau BBraun
- Préparer le milieu d'adhésion (GlutamaxDMEM)
  - 445mL GlutamaxDMEM (supply center)
  - 50 mL de FBS (-20°C P2)
  - 3,25 mL de sodium pyruvate (+4°C)
  - 2,5 mL P/S (0,5%final) (-20°C P2)
- Déposer 1mL de milieu d'adhésion par puits et incuber 2heures avant la mise en culture des cellules
- Disséquer les cerveaux pendant l'incubation des plaques. Après dissection, les cellules doivent être mises en culture dans les 1h30 à 2heures (cf, protocole dissection)
- Laver 3 fois les cerveaux avec la solution de dissection (HBSS/HEPES) filtrée
- Dissociation enzymatique par embryon : ajouter dans 1mL de solution de dissection 100uL de trypsine 0,25% et 2uL de DNase (stock 5mg/mL dans 0,15mM de NaCl soit 10ug/mL).
- Incuber à 37°C pendant 12 minutes et agiter le tube toutes les 4 minutes
- Retirer la solution de dissociation et laver 1fois avec HBSS/HEPES
- Dissociation mécanique : ajouter 1mL de solution d'adhésion et dissocier mécaniquement le tissu avec une p1000. Aspirer et refouler au moins 10 fois sans faire de bulles.
- Laisser les amas de tissus sédimenter et aspirer avec précaution le surnageant et le déposer dans un nouveau tube
- Prélever 10uL de suspension de cellules et les déposer dans 1mL de milieu pour compter les cellules
- Déposer 400000 cellules/puits dans les plaques 6 puits et 100000 à 200000 cellules/puits dans les plaques 12 puits
- Après comptage, prélever du tube initial (non dilué) le volume de cellules nécessaire pour la mise en culture. Homogénéiser et déposer les cellules dans les plaques
- Incuber les plaques à l'étuve à 37°C et 5%CO2 pendant 2heures
- Préparer le milieu de culture des cellules neuronales
  - 485 mL NB (supply center)
  - 10 mL B27 (supply center)
  - 2,5 mL L-Glutamine (1/200 stocks de 200 mM soit 1 mM final)
  - 2,5 mL de P/S (0,5% final)
- Retirer après 2heures le milieu d'adhésion et remplacer par le milieu de culture

### **NB :**

Les solutions de Poly-D lysine et de dissociation peuvent être préparées 2 jours avant usage si on les conserve au frais à 4°C.

Le milieu d'adhésion peut être réutiliser dans les 1 mois suivant préparation si stockage à 4°C

Le milieu de culture peut être utilisées pendant 3 semaines

Les lamelles restantes peuvent utilisées pour une autre manip prévue dans les 3 semaines

Le lavage des plaques peut être effectué un jour avant la culture, les plaques/lamelles avec milieu d'adhésion peuvent être conservées pendant 24 h dans l'incubateur

### Annexe 3 :

*Tableau récapitulatif des essais menés*

Embryon	Numéro de la culture	Module d'Young du butoir	Rayon de courbure du butoir (R)	Hauteur de chute du plateau
1_primaire	1	Contrôle	Contrôle	Contrôle
1_secondaire	2	5 MPa	R = 50mm	10 cm
1_secondaire	3	5 MPa	R = 50mm	30 cm
1_secondaire	4	5 MPa	R = 1000mm	30 cm
2_primaire	1	Contrôle	Contrôle	Contrôle
2_secondaire	2	5 MPa	R = 50mm	10 cm
2_secondaire	3	5 MPa	R = 50mm	30 cm
2_secondaire	4	5 MPa	R = 1000mm	30 cm
3_primaire	1	Contrôle	Contrôle	Contrôle
3_secondaire	2	5 MPa	R = 50mm	10 cm
3_secondaire	3	5 MPa	R = 50mm	30 cm
3_secondaire	4	5 MPa	R = 1000mm	30 cm
4_primaire	1	Contrôle	Contrôle	Contrôle
4_secondaire	2	5 MPa	R = 50mm	10 cm
4_secondaire	3	5 MPa	R = 50mm	30 cm
4_secondaire	4	5 MPa	R = 1000mm	30 cm
5_primaire	1	Contrôle	Contrôle	Contrôle
5_secondaire	2	40 MPa	R = 50mm	10 cm
5_secondaire	3	40 MPa	R = 50mm	30 cm
5_secondaire	4	100 MPa	R = 50mm	30 cm
6_primaire	1	Contrôle	Contrôle	Contrôle
6_secondaire	2	40 MPa	R = 50mm	10 cm
6_secondaire	3	40 MPa	R = 50mm	30 cm
6_secondaire	4	100 MPa	R = 50mm	30 cm
7_primaire	1	Contrôle	Contrôle	Contrôle
7_secondaire	2	40 MPa	R = 50mm	10 cm
7_secondaire	3	40 MPa	R = 50mm	30 cm
7_secondaire	4	100 MPa	R = 50mm	30 cm
8_primaire	1	Contrôle	Contrôle	Contrôle
8_secondaire	2	40 MPa	R = 50mm	10 cm
8_secondaire	3	40 MPa	R = 50mm	30 cm
8_secondaire	4	100 MPa	R = 50mm	30 cm
9_primaire	1	Contrôle	Contrôle	Contrôle
9_secondaire	2	40 MPa	R = 50mm	10 cm
9_secondaire	3	40 MPa	R = 50mm	30 cm
9_secondaire	4	100 MPa	R = 50mm	30 cm
10_primaire	1	Contrôle	Contrôle	Contrôle
10_secondaire	2	40 MPa	R = 50mm	10 cm
10_secondaire	3	40 MPa	R = 50mm	30 cm
10_secondaire	4	100 MPa	R = 50mm	30 cm

## Annexe 4 :

### *Protocole d'Immunocytochimie*

#### Matériel :

- DPBS 1X (ref : 14190-09450-Gibco)
- BSA (100g) (ref : A7906-Sigma)
- TRITON X-100(100mL) (Lot: STBH8537)
- Anticorps primaire anti MT5
- Anticorps primaire anti Beta3-Tubuline (T8660-2ML, Sigma)
- Anticorps secondaire anti Rabbit Alexa-488
- Anticorps secondaire anti-Mousse Alexa-568
- DAPI (1/2000)
- Prolong Gold (P36934, Sigma)

#### Méthode :

- **Fixation avec Antigenfix 4% PFA**
  - Enlever le milieu de culture
  - Déposer 200uL d'Antigenfix par lamelle
  - Incuber à RT pendant 15 minutes
  - Laver 3 fois avec 300uL de DPBS 1X
  - Déposer 300uL de DPBS1 X+0,05% d'azide et stocker à 4°C jusqu'au marquage
- **Blogeage avec PBS 1X, BSA 3% et Triton X-100 0,1%**
  - Peser 0,15g de BSA et diluer dans 5 mL de PBS 1X et 5uL de Triton X-100
  - Déposer 500uL de cette solution par lamelle et incuber pendant 2 heures sous agitation (vitesse 150)
- **Incubation avec anticorps primaire dilué au 1/500(B3T)**
  - Placer sur du papier mouillé un carré de parafilm
  - Déposer 40uL d'anticorps primaire sur le parafilm
  - Déposer la lamelle de 18mm
  - Incuber pendant toute la nuit à l'abri de la lumière et à 4°C
- **Lavage des lamelles**
  - Remettre les lamelles dans la plaque
  - Laver chaque lamelle au PBS 1X pendant au moins 10 minutes sous agitation
  - Répéter 3 fois le lavage
- **Incubation avec anticorps secondaire dilué au 1/800**
  - Préparer la solution d'anticorps secondaire avec du DAPI dilué au 1/2000
  - Déposer au moins 300uL de la solution par lamelle
  - Incuber les lamelles sous agitation au moins 2heures
- **Lavage des lamelles**
  - Laver chaque lamelle au PBS 1X pendant au moins 10 minutes sous agitation
  - Répéter 3 fois le lavage
- **Montage des lamelles**
  - Placer sur une lame une goutte (20uL) de Prolong Gold
  - Déposer une à une les lamelles
  - Laisser polymériser à l'abri de la lumière au moins 48 heures

#### NB :

Ne pas oublier de faire un contrôle de spécificité en incubant les lamelles (test et contrôle) avec l'anticorps secondaire sans l'anticorps primaire.