

Université de Montréal

Fabrication de microstructures pour le recrutement de protéines synaptiques par polymérisation à deux photons

par Maxime Gagnon

Département de Pharmacologie et Physiologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences appliquées
en Génie Biomédical
option Biophotonique et Nanotechnologie Biomédicale

Décembre 2017

© Maxime Gagnon, 2017

Résumé

Ce mémoire présente une technique permettant d'implémenter les surfaces des électrodes pour optimiser les connexions des neurones. Il a été précédemment démontré que des billes micrométriques chargées positivement stimulent la formation de jonctions synaptiques sur leur surface. Il a été suggéré par le Dr Santiago Costantino qu'il était possible de lier ces billes sur les surfaces des électrodes en utilisant la liaison entre la biotine et la streptavidine. Mais, ces liaisons étant trop faibles pour lier les billes efficacement, il a été ensuite suggéré par le Dr Costantino de recréer des jonctions synaptiques en utilisant d'autres structures conductrices similaires aux billes. Ces structures sont réalisées en utilisant un laser Ti:Sa à 800nm qui permet la photo-réduction à deux photons de structures micrométriques d'argent dans un polymère de polyvinylpyrrolidone (PVP). Ces structures ont une hauteur moyenne de $4.5 \pm 0.6 \mu\text{m}$ et un diamètre moyen à mi-hauteur de $8.8 \pm 1.6 \mu\text{m}$. Leur résistivité est de $4 \times 10^{-3} \Omega \cdot \text{m}$. L'analyse de la synaptophysine et de la PSD95, deux protéines largement retrouvées dans les régions pré et post-synaptiques, montre une accumulation significative autour des structures. Ce qui confirme que les structures de PVP et d'argent stimulent la formation de jonctions synaptiques et permettent l'optimisation des connexions neuronales sur des électrodes.

Mots-clés : Électrode, neurone, synapse, polymère, photo-réduction, polymérisation à deux photons

Abstract

This thesis presents a technique allowing the implementation of electrodes' surfaces for the optimisation of neuronal connexions. It was established that micrometric beads with a positive charge stimulate the formation of synaptic junctions on their surfaces. It was suggested by Dr. Santiago Costantino that it was possible to link those beads on the electrodes' surface using the connection between biotin and streptavidin-coated beads. But, those connections demonstrated to be too weak to link the beads efficiently. Alternatively, we recreated those synaptic junctions using others conductive structures comparable to beads. Those structures were fabricated using a Ti:Sa laser at 800nm that allows the two-photon reduction of micro structures made of silver nitrate integrated in a polymer of polyvinylpyrrolidone (PVP). Those structures have an average height of $4.5 \pm 0.6 \mu\text{m}$ and a diameter a mid-height of $8.8 \pm 1.6 \mu\text{m}$. Their resistivity is $4 \times 10^{-3} \Omega \cdot \text{m}$. The analysis of the synaptophysin and the PS95, two proteins widely found in the pre-synaptic and post-synaptic regions, demonstrates a significant accumulation around the structures. This confirms that microfabrication of structures of PVP and silver stimulates the formations of synaptic junction and allows the optimisation of neuronal connections on electrodes.

Keywords : Electrode, neuron, synapse, polymer, photo reduction, two-photon polymerisation

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des sigles et abréviations.....	x
Remerciements.....	xiii
1 Introduction.....	14
1.1 Les Neurones.....	17
1.2 Élongation et croissance des neurones.....	18
1.3 Connections des neurones : les synapses.....	19
1.4 La formation de synapses sur des substrats artificiels.....	20
1.5 Topographies.....	21
1.6 Les électrodes.....	21
1.7 Principe de l'absorption à deux photons.....	23
1.8 Polymérisation par absorption à deux photons.....	25
1.9 La photo-réduction de métaux.....	26
1.10 Matériaux pour la photo-réduction.....	27
2. Modification de substrats pour la liaison de billes.....	30
2.1 Matériel et méthodes.....	30
2.1.1 Patrons de biotine (LAPAP).....	30
2.1.2 Patrons et billes recouvertes de streptavidine.....	33
2.2 Résultats.....	34
2.2.1 Images d'un microprocesseur.....	34
2.2.2 Caractérisation du laser.....	35
2.2.3 Patron de biotine sur un microprocesseur.....	36
2.2.4 Patron de biotine sur du verre.....	38
2.2.5 Patron de B4F et billes recouvertes de streptavidine.....	39

2.3 Discussion	41
3. Structures micrométriques de polymère	42
3.1 Matériels et méthodes	42
3.1.1 Préparation des échantillons de polymères	43
3.1.2 Création des structures de polymère	43
3.1.3 Culture cellulaire.....	44
3.1.4 Immunofluorescence.....	45
3.1.5 Traitement des images	47
3.2.6 Analyse statistique	49
3.2 Résultats.....	51
3.2.1 Méthode indirecte	51
3.2.2 Méthode directe	62
3.3 Discussion.....	73
3.3.1 Méthode indirecte	73
3.3.2 Méthode directe	74
4. Conclusion	77
Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

Tableau I. Estimation des résistivités des composites des polymères dopés avec différents matériaux et concentrations	61
---	----

Liste des figures

Figure 1.	Représentation d'un axone, des dendrites et d'une jonction synaptique. (Reproduit du site web : http://le-controle-cerebrale.webnode.fr/le-système-nerveux/neurones/).....	17
Figure 2.	Différents types d'électrodes Michigan a . Électrodes Utah b , c . (Reproduit de (Bhatti et al., 2017)).	22
Figure 3.	Représentation de l'absorption à deux photons en rouge et de la désexcitation en bleu entre un niveau initial au repos (S_0) et un niveau excité (S_2) par un niveau virtuel (théorique).	24
Figure 4.	Étapes pour la création d'un patron de biotines. Incubation avec le B4F (A), liaison du B4F par illumination (B) et liaison de la streptavidine (C).	31
Figure 5.	Exemple de patron et lignes d'information envoyées au programme LabVIEW..	32
Figure 6.	Images en réflexion d'un microprocesseur constitué d'or (en gris clair) et de nitrate de silicium (en gris foncé), barre d'échelle de 100 μ m.	34
Figure 7.	Courbe de la puissance en fonction du voltage à la sortie du laser.	35
Figure 8.	Images en réflexion d'un microprocesseur et des patrons de biotin-4-fluorescéine (B4F) dans les carrés rouges sur le nitrate de silicium (A) et sur l'or (B), barre d'échelle de 100 μ m.	36
Figure 9.	Sur l'or, la fluorescence en fonction de la puissance et de la vitesse.	37
Figure 10.	Sur le nitrate de silicium, la fluorescence en fonction de la puissance et de la vitesse.	37
Figure 11.	Fluorescence de patrons de B4F sur le verre en fonction de la puissance. Et exemple de patron obtenu. Barre d'échelle de 70 μ m. Chaque valeur de fluorescence et puissance croissante entre 0 et 140 μ W est associée à un carré numéroté de 1 à 16.	38
Figure 12.	Patrons de B4F (en bleu) avec beaucoup de billes recouvertes de streptavidine (rouge) (A), comparativement à un patron semblable dans les mêmes conditions avec peu de billes (B).	39

Figure 13.	Patron en transmission de biotines avec billes avant culture cellulaire (A) et le même patron 12 heures après être placé en culture cellulaire dense MDCK (B).	40
Figure 14.	Schéma de montage et illumination directe (gauche), et indirecte (droite).	42
Figure 15.	Les différentes étapes de la segmentation des points. Barre d'échelle de 10µm..	47
Figure 16.	Image en transmission (gauche) et image de la tubuline (droite), les zones en bleu sont la segmentation des contours des structures.	48
Figure 17.	Image de la synaptophysine (gauche) et image de la synaptophysine après application du masque de la tubuline (droite), les zones en bleu sont la segmentation des contours des structures.....	49
Figure 18.	Exemple typique des zones pour l'analyse de la fluorescence.	49
Figure 19.	Quadrillage 20x20 de structures de polymère en transmission (A). Même patron en fluorescence placé avec des cellules MDCK, et enmarquant la membrane des cellules avec du WGA (vert).	52
Figure 20.	Structure de polymère (NOA61) en culture avec des cellules neuronales (A). En vert la PSD95 et en rouge la synaptophysine. Image en transmission en (B)...	52
Figure 21.	Structures de polymère NOA61 et de nanoparticules d'argent.	53
Figure 22.	Structures de polymère et d'argent en culture avec des cellules neuronales (A). En vert la PSD95 et en rouge la synaptophysine. Image correspondante en transmission en (B).....	54
Figure 23.	Exemple de zones pour l'analyse de la fluorescence. Fluorescence en A et transmission en B.	54
Figure 24.	Comparaison de la fluorescence entre les anneaux et les zones de contrôle en fonction de la protéine associée, (n.s. : $p > 0.1$).	54
Figure 25.	Structures de polymère NOA61 et de nanotube de carbone (MWCNT, 1wt%). Objectif de 0.95 O.N.	56
Figure 26.	Structure de polymère avec MWCNT en culture avec des cellules neuronales (A). En vert la PSD95 et en rouge la synaptophysine. Image en transmission en (B).....	57

Figure 27.	Comparaison de la fluorescence entre les anneaux et les zones de contrôle en fonction de la protéine associée, (n.s. : $p > 0.1$).....	57
Figure 28.	Structures de polymère NOA61 et de nanotube de carbone (MWCNT), 1wt%) avec un objectif de 0.75 O.N.....	58
Figure 29.	Structure de polymère et MWCNT en culture avec des cellules neuronales (gauche). En vert la PSD95 et en rouge la synaptophysine. Image en transmission (droite).....	58
Figure 30.	Comparaison de la fluorescence entre les anneaux et les zones de contrôle en fonction de la protéine associée, (n.s. : $p > 0.1$).....	59
Figure 31.	Taille moyenne des structures de NOA61 en fonction de l'ouverture numérique.	60
Figure 32.	Structures de polymère NOA61 réalisé avec un objectif de 0.7 d'ouverture numérique.....	62
Figure 33.	Structure de polymère NOA61 vue de haut (gauche) et de côté (droite) en transmission, barre d'échelle de 10 μ m.....	62
Figure 34.	Fluorescence de la tubuline en vert et de la synaptophysine en rouge. Image en transmission associée en gris.....	64
Figure 35.	Fluorescence de la tubuline en vert, de la PSD95 en rouge et de MAP2 en bleu. Image en transmission associée en gris.....	65
Figure 36.	Comparaison de la fluorescence entre les anneaux et les zones de contrôle en fonction de la protéine associée pour la synaptophysine, la PSD95 et la tubuline, (n.s. : $p > 0.1$).	67
Figure 37.	Structure de PVP et nitrate d'argent.	68
Figure 38.	Patron typique utilisé pour mesurer la conductivité du polymère de PVP et argent.	68
Figure 39.	Courbe I-V pour le polymère de PVP et argent.....	69
Figure 40.	Fluorescence de la tubuline en vert, de la synaptophysine en rouge et transmission en gris. Barre d'échelle de 10 μ m.	70
Figure 41.	Comparaison de la fluorescence entre les anneaux et les zones de contrôle en fonction de la protéine associée pour la synaptophysine et la tubuline, (n.s. : $p > 0.1$).....	71

Figure 42. Fluorescence de la tubuline en vert et de la PSD95 en rouge, et image en transmission associée. 71

Figure 43. Comparaison de la fluorescence entre les anneaux et les zones de contrôle en fonction de la protéine associée pour la PSD95 et la tubuline, (n.s. : $p > 0.1$). 72

Liste des sigles et abréviations

Ω : Ohm

2P : deux photons

3D : trois dimensions

A : ampère

300K : trente mille

B4F : biotin-4-fluoresceine

BSA : sérum d'albumine bovin

CMOS : complémentaire métal oxyde semi-conducteur

FA : point focal d'adhésion

LAPAP : Laser-Assisted Protein Adsorption by Photobleaching

Map2 : protéine associée au microtubule 2

MEA : multielectrode array

HDMEA : high density multielectrode array

MWCNT : nanotubes de carbones à multiples couches

O.N. : ouverture numérique

PBS : solution de phosphate saline

PSD : densité post synaptique

PSD95 : densité post synaptique 95

PVP : polyvinylpyrrolidone

PZD : domaine protéine-interactive modulaire

SNC : système nerveux central

SNP : système nerveux périphérique

Ti:Sa : Titane:Saphir ($\text{Ti}:\text{Al}_2\text{O}_3$)

UV : ultraviolet

W : watt

wt% : pourcentage par masse

Parfois, la science est plus de l'art que de la science

Remerciements

J'aimerais remercier Santiago Costantino pour sa patience tout au long de ce projet qui a été difficile par moments. Je remercie aussi tous les membres du laboratoire Joannie Roy, Pierre Ghesquiere, Loïc Binan, Diane Sayah et Javier Mazzaferri pour leurs conseils et leurs temps pour répondre à mes nombreuses questions.

1 Introduction

Le cerveau humain est souvent vu comme une exception parmi les mammifères, par sa grande capacité cognitive, la taille par rapport à celle de son corps, doté d'un cortex cérébral surdéveloppé qui représente la majorité de la masse du cerveau et contenant environ 20 milliards de neurones. Le cerveau est la partie maîtresse du système nerveux central (SNC). Le SNC comprend le cerveau et la moelle épinière. Le cerveau reçoit les informations sensorielles de la moelle épinière qui rejoint les muscles par le système nerveux périphérique (SNP). En plus de recevoir les informations sensorielles, le SNP conduit les informations motrices entre le cerveau, plus spécifiquement le système moteur central et plusieurs terminaisons comme les muscles squelettiques, lisses et cardiaques. Pour toute une vie, les neurones du SNC et périphériques sont capables de maintenir et de communiquer efficacement entre le cerveau et les muscles.

Cependant, les neurones peuvent éprouver des dégénérescences prématurées qu'elles soient d'ordre biologique comme par la suite de maladie d'Alzheimer, de Parkinson, la maladie d'Huntington, etc. ou d'ordre physique par la suite à un stress important dû à un accident. Les troubles induits sont variés, mais peuvent toucher les systèmes cognitifs, sensoriels et moteurs. Après un accident, il est possible de reconnecter directement un membre sectionné avec la microchirurgie et aussi avec l'aide d'une greffe, dans le cas d'un membre trop endommagé, mais elles se limitent aux membres comme les bras et les jambes. Dans le cas du Parkinson, où le tremblement gêne grandement les mouvements, une approche pour rétablir une communication efficace entre le SNC et les muscles est de directement stimuler la zone du système moteur dans le cerveau. Dans d'autres cas comme la paralysie, il est aussi possible de se connecter directement à la zone motrice du cerveau au moyen d'un intermédiaire pour rétablir la communication. Cette dernière est limitée par la possibilité de contrôler un système externe, par exemple un bras artificiel.

Le moyen le plus utilisé pour artificiellement stimuler ou communiquer avec le cerveau et les neurones sont les électrodes. Mais la qualité de la communication à moyen et long terme est très limitée par le rejet des tissus nerveux et la qualité de la connexion. Une découverte intéressante a démontré qu'il est possible de créer des connexions entre des neurones et des

billes micrométriques à leur surface et même de créer des jonctions synaptiques (Gopalakrishnan et coll., 2010; Lucido et coll., 2009), puisque les neurones voient les formes sphériques comme des boutons. Cependant, son application est limitée par le fait que les billes peuvent bouger et ne sont attachées à aucune surface autre que les liens avec les neurones.

Cela nous amène à nous poser plusieurs questions. Par exemple, est-il possible de contrôler la position des billes micrométriques sur des surfaces des électrodes pour ainsi reproduire les connexions observées? Et par la suite, est-il possible de recréer des jonctions synaptiques en utilisant d'autres structures similaires aux billes? Est-ce que ces structures peuvent être conductrices?

Ce mémoire est constitué de deux sections découlant de ces questions. La première section utilise une technique optique qui permet de créer des patrons de molécules comme la biotine sur des surfaces de verre, l'absorption par photo-blanchiment assisté par laser (LAPAP) (Belisle, Correia, Wiseman, Kennedy, & Costantino, 2008). Et en utilisant l'interaction entre la biotine et la streptavidine, on peut lier des billes préalablement recouvertes de streptavidine sur les patrons de biotines réalisés avec le LAPAP. La seconde méthode découle de l'échec de la première, en utilisant des moyens optiques, il est possible d'implémenter des structures micrométriques de polymères conducteurs et biocompatibles sur les surfaces non translucides des systèmes d'électrodes (MEA, HDMEA) déjà existants. En utilisant l'absorption à deux photons pour durcir un polymère (L. J. Li, Gattass, Gershgoren, Hwang, & Fourkas, 2009) ou la photo-réduction de métaux pour obtenir des structures conductrices (Maruo & Saeki, 2008). Ces structures permettent, tout comme les billes, de créer des connexions avec les cellules neuronales, mais aussi de créer des jonctions synaptiques à leur surface. Cette introduction fournira le contexte théorique des neurones, l'élongation et croissance des axones, des synapses et leurs formations sur des substrats artificiels, des effets de la topographie et ainsi que de l'absorption à deux photons, de la polymérisation à deux photons et la photo-réduction de métaux.

Objectif général :

Travailler dans le domaine optique et microscopique pour appliquer les billes sur des microstructures des électrodes dans le but de recréer les jonctions synaptiques observées par (Lucido et coll., 2009).

Objectifs spécifiques :

1. Utiliser la technique optique LAPAP pour fixer des billes sur une surface de verre.
2. Utiliser la photo-polymérisation pour créer des structures micrométriques hautement conductrices semblables aux billes.
3. Utiliser la photo-réduction d'argent pour créer des structures micrométriques hautement conductrices semblables aux billes.
4. Mesurer la capacité des structures à recréer les jonctions synaptiques observées par (Lucido et coll., 2009).

Hypothèses :

1. Des billes micrométriques liées sur une surface de verre créent des connexions entre des neurones et les billes et peuvent établir des jonctions synaptiques.
2. Des structures micrométriques conductrices similaires aux billes créent des connexions entre des neurones et les billes et peuvent établir des jonctions synaptiques.

Questions de recherches :

1. Est-il possible de contrôler la position des billes micrométriques sur des surfaces des électrodes pour ainsi reproduire les connexions observées?
2. Est-il possible de recréer des jonctions synaptiques en utilisant d'autres structures conductrices similaires aux billes?

1.1 Les Neurones

Les structures conductrices d'informations du SNC et SNP sont les neurones et ils ont différentes caractéristiques physiologiques qui sont détaillées avant d'explorer leurs elongations et connexions des synapses. Les neurones diffèrent dans leurs morphologies selon leurs types, mais contiennent tous quatre sections caractéristiques avec chacune leurs fonctions : le corps de la cellule, les dendrites, l'axone et les terminaisons des axones. Le corps cellulaire contenant le noyau est aussi le site de la synthèse de la grande majorité des protéines et membranes.

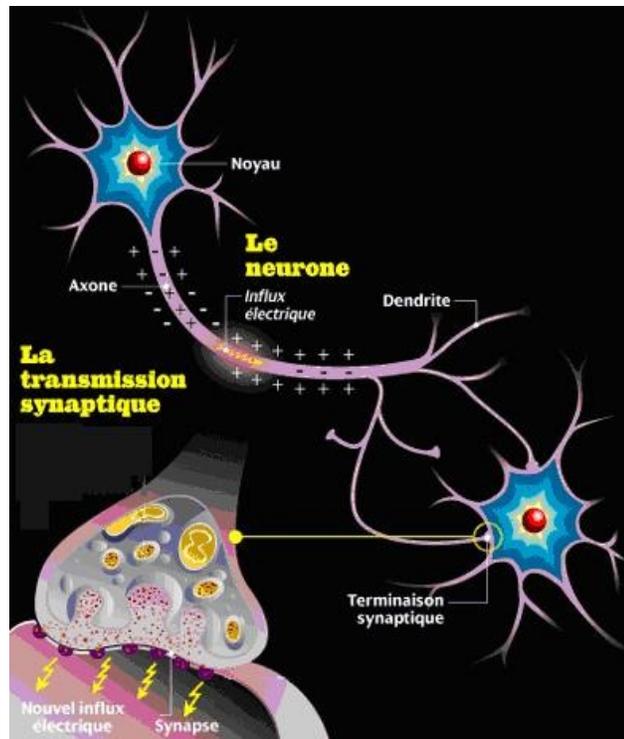


Figure 1. Représentation d'un axone, des dendrites et d'une jonction synaptique.
(Reproduit du site web : <http://le-controle-cerebrale.webnode.fr/le-système-nerveux/neurones/>)

La plupart des neurones n'ont qu'un seul axone d'un diamètre variant de quelques micromètres selon les espèces et pouvant atteindre un millimètre chez le calmar géant avec son axone non myélinisé. Les axones sont responsables de la conduction des potentiels d'action. Une impulsion électrique ou un potentiel d'action se propage le long de l'axone vers les terminaisons synaptiques. Les membranes des neurones ont des séries de canaux qui

laissent sélectivement passer soit l'ion de sodium ou de potassium. D'autres ions comme le chlore sont retrouvés à l'extérieur de la cellule et le calcium conservés à l'intérieur des cellules. De plus, les membranes sont polarisées, par rapport à 0 mV à l'extérieur des cellules, au repos on retrouve un voltage de -70mV à l'intérieur. Un potentiel d'action est créé lorsque la cellule se dépolarise suffisamment pour déclencher la cascade de l'ouverture de canaux sodiques suivie par l'ouverture de canaux potassiques entraînant la dépolarisation et ensuite le retour au potentiel au repos. De plus, les neurones ont généralement plusieurs dendrites, lesquels s'étendent à partir du corps de la cellule. Les dendrites sont spécialisées dans la réception des signaux chimiques venant des terminaisons synaptiques des autres neurones. Les dendrites convertissent les informations en petits signaux électriques qui se propagent vers le corps cellulaire (Lodish, 2000).

1.2 Élongation et croissance des neurones

Dans la période du développement du SNC, les axones s'allongent dynamiquement sur de longues distances. Les mouvements des axones sont guidés par des signaux dans l'environnement direct des cellules qui servent à rejoindre les cibles appropriées. À leurs destinations, la formation des synapses est initialisée par l'interaction de contact avec la cible ou par des molécules locales de signalisation. La stabilisation de la zone de contact et le passage à l'assemblage d'une synapse fonctionnelle impliquent le réarrangement du cytosquelette et ainsi que l'agrégation et l'insertion de composant pré et post-synaptique dans la zone synaptique (Chia, Li, & Shen, 2013; Jin & Garner, 2008; McAllister, 2007; Waites, Craig, & Garner, 2005). Par la suite, la maturation et la variation de ces nouvelles synapses peuvent par la suite arriver par réarrangement ou changement de composition des protéines synaptiques pour répondre aux besoins physiologiques (S. H. Lee & Sheng, 2000). Inversement, l'élimination de contact ou de protéines synaptiques permet de raffiner et spécialiser un circuit neuronal (Sanes & Yamagata, 2009).

Les neurones en croissance ont une région très mobile en forme de cône qui a pour but de guider les terminaisons des axones vers les cibles en réponse à différentes molécules se retrouvant dans leur environnement (Tessier-Lavigne & Goodman, 1996). L'actine et les

microtubules du cytosquelette sont responsables de la dynamique des mouvements de l'axone et du cône de croissance (Dent & Gertler, 2003). La région la plus dynamique à la base du cône comprend principalement de l'actine et régule la mobilité, et la région centrale comprend un grand nombre de structures de tubuline essentielles pour faire tourner le cône (Kalil & Dent, 2005). La protéine associée au microtubule 2 (Map2) fait partie de la famille des protéines associées aux microtubules chez l'humain. Cette famille de protéines appartient au complexe d'assemblage responsable de la neurogenèse. Chez le rat et la souris, Map2 est spécifiquement enrichie dans les dendrites, impliquant un rôle dans la détermination et la stabilisation de leur forme dans le développement (Coordinators, N.R., 2017).

1.3 Connexions des neurones : les synapses

Les synapses sont des jonctions cellule-cellule asymétriques très spécialisées pour la communication entre un axone et un neurone incorporant une série de protéines et neurotransmetteurs. La première étude documentée sur la structure des synapses décrit une structure dite triple, comprenant une membrane pré et post-synaptique spécialisée et entre les deux, la jonction synaptique. En 1959, Gray concluait que la région synaptique démontre des propriétés d'adhérences spécifiques (Gray, 1959). L'adhérence est une des propriétés importantes dans la structure des synapses, par le fait que les structures pré et post-synaptiques résistent aux effets biochimiques de dissociation (Gray & Whittaker, 1962). Dernièrement, en utilisant la technique de cryo-microscopie électronique il a été montré la présence d'une forte densité de molécules et protéines dans la jonction synaptique, et même plus grande que dans le cytoplasme (Zuber, Nikonenko, Klauser, Muller, & Dubochet, 2005).

Une grande quantité des molécules et protéines se retrouvant dans les structures pré et post-synaptiques sont des protéines. Plusieurs protéines sont synthétisées dans les dendrites par la présence de polyribosomes à leurs bases (Steward & Levy, 1982). Aussi, une grande quantité des protéines et membranes qui sont requises pour le renouvellement des axones et des terminaisons nerveuses sont synthétisées dans le corps cellulaire et assemblées au même endroit dans des vésicules. Et, elles sont transportées par un processus de transport antérograde qui consiste au mouvement de ces vésicules du noyau vers les terminaisons des

axones. Ce mécanisme utilise les microtubules pour transporter les vésicules du noyau, le long des axones, jusqu'aux terminaisons synaptiques. Le processus inverse, le transport rétrograde ramène les éléments destinés à la dégradation cellulaire jusqu'aux lysosomes (Lodish, 2000).

Beaucoup des composantes et molécules spécifiques des synapses sont identifiées et encore aujourd'hui certaines composantes sont encore découvertes (Batista, Martinez, & Hengst, 2017; Missler, Sudhof, & Biederer, 2012). Dans ce mémoire, on utilise deux protéines déjà bien connues, et utilisées précédemment pour identifier les jonctions synaptiques appartenant aux domaines pré ou post-synaptiques. La première, la synaptophysine, un polypeptide de masse moléculaire relatif M_r de 38000 qui est acide et glycosylé apparaît être une protéine membranaire retrouvée dans les vésicules des neurones du cerveau, de la moelle épinière, dans la rétine et dans les jonctions neuromusculaires. Elle est aussi fréquemment retrouvée chez diverses espèces de vertébrés indiquant sa grande stabilité au cours de l'évolution (Wiedenmann & Franke, 1985). La seconde, la PSD95 est une protéine abondante constituant l'architecture des synapses et elle est présente dans la terminaison des synapses (E. Kim & Sheng, 2004) et dans les récepteurs de glutamate (Okabe, 2007).

1.4 La formation de synapses sur des substrats artificiels

Les premières études montrant la création d'un complexe présynaptique sur un substrat artificiel ont été publiées dans les années 80, et elles montrent la présence d'un complexe présynaptique sur des billes micrométriques par des neurones de l'hippocampe de rat, et ce une fois que la surface avait été recouverte d'une protéine chargée positivement incluant la Poly-D-Lysine (PDL) ou une bicouche lipidique (Gopalakrishnan et coll., 2010), mais pas avec des billes recouvertes d'une charge négative ou nulle (Burry, 1980, 1982, 1983). Il a aussi été démontré que les complexes présynaptiques se formaient rapidement dans des temps aussi courts que deux minutes et ils peuvent être formés en l'absence d'éléments post-synaptiques (Lucido et coll., 2009). De plus, selon leurs observations, la formation d'un complexe post-synaptique serait toutefois dépendante de la présence d'un complexe présynaptique. De plus, les billes sont aussi utilisées pour identifier certains éléments de la formation des synapses (Batista et coll., 2017) et ainsi que pour permettre l'extension et la

manipulation de circuit de neurones une fois celui-ci accroché à une bille (Magdesian et coll., 2017).

1.5 Topographies

Plusieurs types de plateformes ont été développés pour améliorer la croissance des neurones avec différentes topographies et matériaux. Le choix des matériaux affecte la croissance des neurones et inclut différents polymères, le silicium, l'or, les nanoparticules d'argent et les nanotubes de carbone et autres (Bell & Haycock, 2012; Flanagan, Ju, Marg, Osterfield, & Janmey, 2002; Georges & Janmey, 2005; Georges, Miller, Meaney, Sawyer, & Janmey, 2006; Khan & Newaz, 2010). Les topographies micrométriques comme les sillons et lignes affectent la polarité, l'élongation continue et la direction de croissance des axones. Inversement, la topographie avec des formes en boutons comme les nanofils, billes ou piliers agissent comme une terminaison plutôt qu'une prolongation de l'élongation des axones. Ces structures peuvent spécifier les sites de contact à être denses en zones d'adhérences (Kang et coll., 2016; Micholt et coll., 2013; Xie et coll., 2010).

1.6 Les électrodes

Puisque les neurones du système nerveux communiquent par signaux électriques, une grande attention a été portée à comprendre, mais aussi à réussir à se connecter à ce réseau pour explorer son fonctionnement physiologique et pathologique (Spira & Hai, 2013). Les interfaces neuronales comme les électrodes sont des outils efficaces qui permettent l'échange d'information dans les deux directions. La stimulation électrique peut être vue comme l'introduction d'information dans le système neuronale et est utilisée de façon efficace pour réduire les effets du Parkinson, mais aussi d'autres pathologies (Gurwell et coll., 2017). Pour l'acquisition d'informations ou d'activités électriques neuronales à long terme, les MEA (Multielectrode array) sont aussi largement utilisées. Les MEA utilisent les courants ioniques produits par les différents canaux protéiques à la surface des membranes des cellules neuronales pour détecter différentes activités électriques. Les ensembles de multiélectrodes

sont généralement utilisés en forme planaire *in vitro*, mais peuvent aussi avoir différentes formes (Figure 2) *in vivo* implantées dans le cerveau (Bhatti, Lee, Garmestani, & Chee, 2017; Marcus et coll., 2017). Ces électrodes ont différentes tailles, mais sont généralement de la taille de quelques micromètres à quelques dizaines de micromètres de large à quelques millimètres de long.

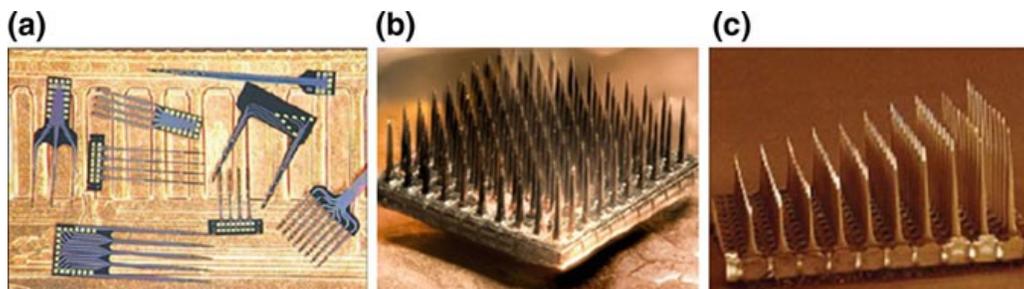


Figure 2. Différents types d'électrodes Michigan **a**. Électrodes Utah **b**, **c**. (Reproduit de (Bhatti et al., 2017)).

Ces électrodes branchées dans le SNC, plus spécifiquement à la zone contrôlant les mouvements, peuvent par la suite communiquer avec un système informatique pour ainsi déplacer par exemple un bras robotisé relié à une personne quadriplégique (Hochberg L. et coll., 2012).

La technologie utilisée pour créer ces électrodes est la (CMOS) pour (Complementary metal–oxide–semiconductor) et la technologie plus récente et plus denses en électrodes est la (HDMEA) (Hafizovic et coll., 2007). Des matériaux rigides sont généralement utilisés dans les électrodes classiques (Figure 2) (Ghane-Motlagh & Sawan, 2013). Plusieurs matériaux considérés sont le platine, l'or, l'acier inoxydable, le tungstène, l'oxyde d'iridium, le nitrate de titane et le silicium (Bhandari, Negi, & Solzbacher, 2010; Cogan, Guzelian, Agnew, Yuen, & McCreery, 2004). Les électrodes rigides ne permettent pas de garder une liaison stable avec les neurones et de maintenir une communication de signaux électriques à long terme. Le contact limité entre l'interface rigide et les tissus mous provoque une réaction d'inflammation des tissus et neurones menant à une réaction de rejet ainsi que des dommages (Turner et coll., 1999). Pour éviter les dommages et l'inflammation dans les zones d'implantation, les ensembles d'électrodes faites à base de polymère ont été développés pour fournir une méthode moins invasive pour la stimulation des neurones et l'acquisition de signaux. Des polymères

comme le SU-8, Polyimide, Parylene-C et même en soie sont utilisés pour la fabrication d'électrodes flexibles (Cho et coll., 2008; D. H. Kim et coll., 2010; S. E. Lee et coll., 2012; Metallo, White, & Trimmer, 2011; Subbaroyan, Martin, & Kipke, 2005). Les électrodes flexibles sont largement utilisées pour l'acquisition à long terme de signaux neuronaux, car elles ont une grande flexibilité, une grande résistance à la corrosion et une bonne biocompatibilité (Khodagholy et coll., 2011).

En bref, pour créer des électrodes à base de polymère, ou plus précisément des structures micrométriques, la lithographie peut être utilisée. Certains polymères comme le SU-8 ou le NOA61 sont idéaux pour la lithographie. Celle-ci repose sur le principe physique d'absorption à deux photons.

1.7 Principe de l'absorption à deux photons

L'absorption à deux photons est un processus non linéaire dans lequel deux photons de mêmes ou différentes fréquences sont absorbés simultanément par une molécule qui est excitée de l'état fondamental à un état d'énergie plus élevé. La différence en énergie entre les deux états est égale à la somme de l'énergie des deux photons. L'énergie des deux photons absorbés par la molécule est : $E = h\nu_1 + h\nu_2$ où h est la constante de Plank, ν_n est la fréquence du n-ième photon absorbé et E , l'énergie de transition.

L'évènement d'absorption à deux photons avait été prédit en 1931 par Maria Goeppert-Mayer (Goppert-Mayer, M., 2009). Plus tard en 1961, elle sera confirmée par les chercheurs Kaiser et Garret utilisant un cristal de fluorure de calcium dopé avec de l'euporium. Seulement une grande densité d'énergie comme celle délivrée avec un laser pulsé donne un apport de flux suffisant en photon pour observer l'absorption de deux photons (Kaiser W, 1961).

Comme la figure 3 montre, il n'y a pas de niveau intermédiaire dans le processus, les deux photons sont absorbés quasi simultanément par ce que l'on appelle un niveau virtuel. Par contre, le processus d'absorption avec un niveau intermédiaire réel ou absorption linéaire peut être divisé en deux étapes d'un seul photon distinct. Chaque niveau peut être physiquement rempli. Par exemple, si un photon revient à son état fondamental du niveau intermédiaire l'on pourra, par spectroscopie, l'observer. Ce dernier et second niveau excité est rempli seulement après le précédent.

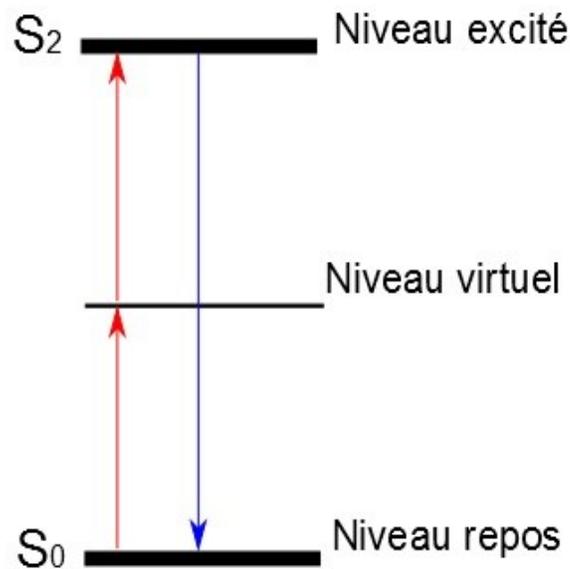


Figure 3. Représentation de l'absorption à deux photons en rouge et de la désexcitation en bleu entre un niveau initial au repos (S₀) et un niveau excité (S₂) par un niveau virtuel (théorique).

L'absorption à deux photons est connue comme un processus non linéaire qui dépend de l'intensité de la lumière au carré (Tabrizi, Cao, Lin, & Jia, 2017). En se basant sur la théorie de Beer-Lambert pour l'absorption à un photon, l'atténuation du faisceau du laser transmis pour l'absorption à deux photons, en ignorant l'absorption à un photon est donnée par :

$$\partial I / \partial z = -N a_2 I^2 = -N \delta F I \quad (1)$$

où I est l'intensité, z la distance dans le médium, N le nombre de molécule par unité de volume et a_2 est le coefficient moléculaire pour l'absorption à deux photons. L'intensité peut être aussi exprimée comme un flux de photon $F = I/h\nu$ (avec les unités de photon $s^{-1}cm^{-2}$, $h\nu$ est l'énergie du photon), dans ce cas le coefficient δ est le coefficient de Goeppert-Mayer GM (1GM = $10^{50} cm^4 photons^{-1} molécule^{-1}$) et aussi connu comme la section efficace moléculaire de l'absorption à deux photons (Pawlicki, Collins, Denning, & Anderson, 2009).

Donc, pour obtenir une intensité suffisante pour l'absorption à deux photons, il faut un flux (F dans (1)) de photons ou une intensité (I) très grande, soit un nombre important de photons par seconde et par cm^2 .

1.8 Polymérisation par absorption à deux photons

La polymérisation à deux photons est basée sur les effets non linéaires d'absorption où le taux de réaction est proportionnel au carré de l'intensité de la lumière plutôt que la relation linéaire de l'absorption à un photon de certains polymères capables de se solidifier à la lumière U.V. Ces matériaux peuvent absorber deux photons simultanément, ce qui permet au polymère initialement liquide de se solidifier au point focal du laser, et ce, seulement une fois que l'énergie déposée est suffisante. De ce fait, un laser infrarouge de longueur d'onde de 800nm est typiquement utilisé pour transmettre la lumière au travers du polymère liquide et scanné au long d'une région qui se solidifiera au point focal du laser. Lorsque le laser est focalisé à l'intérieur du polymère, la taille et la forme du volume solidifié dépendent de l'ouverture numérique de l'objectif, du temps d'exposition nécessaire à la polymérisation de la photo-résine et sa sensibilité. En contrôlant l'énergie déposée et l'ouverture numérique, on peut construire des structures de résolution nanométriques. Pour que l'absorption à deux photons se produise, la puissance du laser doit être élevée, par exemple : $1TW/cm^2$. Une durée de pulse de l'ordre de la centaine de femtoseconde (10^{-13} secondes) est requis pour l'absorption presque simultanée. Elle requiert l'excitation des molécules du polymère à un niveau d'énergie virtuelle intermédiaire qui a un niveau de vie très court avant l'arrivée du second photon (L. Li et coll., 2011).

La première fabrication de microstructure 3D a été réalisée par Maruo S. en 1996, en utilisant un laser Ti:Saphir permettant de réaliser des structures de l'ordre de 6µm de résolution. La résolution spatiale du processus étant limitée par la diffusion et la polymérisation à l'extérieur de la zone focale illuminée par le laser. Mais, ces effets sont plus réduits que l'absorption à un photon. Ce qui a pour résultat que le polymère ne durcit pas au-delà de la région illuminée (Maruo, Nakamura, & Kawata, 1996, 1997). La résolution a par la suite été augmentée à 120nm par la construction de micromachines montrée par Kawata et coll. en 2001 (Kawata, Sun, Tanaka, & Takada, 2001). La résolution possible est basée sur la limite de diffraction de la lumière utilisée. Avec une lumière de 800nm, il a été prouvé qu'il était possible de créer des structures plus petites que 100nm (Juodkazis, Mizeikis, Seet, Miwa, & Misawa, 2005). Ceci est possible, car le polymère pour devenir solide a besoin d'un niveau minimal d'énergie qui est caractéristique au polymère. Et cette zone d'énergie est plus petite que la zone totale illuminée, car elle a une distribution de forme gaussienne. Par exemple, un objectif de 1.4 d'ouverture numérique illumine une zone de 700nm de diamètre, mais le diamètre efficace en considérant l'énergie requise se réduit à 30-90 nm.

1.9 La photo-réduction de métaux

Un polymère seul n'est généralement pas conducteur, mais peut servir de structure de support pour y implémenter et stabiliser un matériau hautement conducteur par photo-réduction. La photo-réduction de métaux commence par l'absorption de deux photons par les ions métalliques par un fluorochrome comme le Coumarin 440 (Ishikawa & Tanaka, 2012), qui agit comme intermédiaire en absorbant la lumière et transférant l'énergie aux ions métalliques ou sans fluorochrome directement aux ions métalliques (Cao, Takeyasu, Tanaka, Duan, & Kawata, 2009). Lorsqu'on utilise un fluorochrome avec les ions métalliques, le transfert d'un électron du fluorochrome excité à l'ion métallique conduit à la réduction d'un atome métallique, celui-ci peut interagir avec d'autres atomes métalliques et entraîne la nucléation, ou se lie avec d'autres molécules métalliques. Certains électrons provenant des fluorochromes une fois qu'ils ont rencontré un ion métallique vont faire une recombinaison de charge avec les fluorochromes. Ceci place une limite au taux de production des atomes

métalliques, mais reste supérieur au taux sans fluorochromes (Ishikawa & Tanaka, 2012). L'ajout de fluorochrome pour la photo-réduction augmente le transfert d'électrons aux ions métalliques apportant une augmentation de la formation d'atomes métalliques.

La synthèse de structures de métaux par l'absorption directe ou indirecte de deux photons peut être réalisée à l'intérieur de différents environnements translucides, comme des milieux aqueux ou des surfactants. De même, une structure de polymère peut servir de support aux molécules métalliques en formations pour en contrôler la taille et la forme (Cao et coll., 2009). Le processus général de formation de structure de nitrate d'argent par absorption à deux photons se produit comme suit au point focal du laser (Cao et coll., 2009) :

1. L'absorption de photons par les ions métalliques.
2. La nucléation des atomes d'argent.
3. La croissance des nanoparticules d'argent
4. L'agrégation des particules d'argent.

1.10 Matériaux pour la photo-réduction

Pour créer des structures 3D hautement conductrices, ces structures doivent être composées de métaux. Parmi tous les métaux, l'argent est le matériau le plus populaire pour être utilisé pour la fabrication à deux photons de micro ou nanostructure, mais d'autres métaux peuvent être utilisés comme par exemple l'or et le sélénure de plomb (Min Gu, 2016). Le début des recherches pour la photo-réduction d'argent commence en 1976. Hada et coll. ont utilisé du perchlorate d'argent (AgClO_4) comme sel en milieu aqueux et une illumination directe avec une longueur d'onde de 253.7nm à 15watts pour obtenir une percolation de la structure d'argent (Hada, Yonezawa, Yoshida, & Kurakake, 1976).

Un matériau facilement accessible et peu dispendieux est l'argent sous forme de sel d'argent pour le dissoudre en solution ou comme ion métalliques dans une matrice de polymère. Des sels d'argent comme l' AgNO_3 , AgClO_4 et AgBF_4 sont dissous dans de l'eau désionisée avec un fluorochrome ou un polymère pour la préparation d'une solution aqueuse

ou un film de polymère. Pour l'or, le HAuCl_4 peut être utilisé comme sel, mais le sel d'argent est en fait un produit plus utilisé par son faible coût comparativement aux sels d'or (Tabrizi et coll., 2017).

La réduction d'argent dans une matrice de polymère peut réduire la rugosité comparativement aux structures réalisées dans un milieu aqueux par le fait que les ions métalliques se distribuent à l'intérieur de la matrice du polymère et préviennent la diffusion des ions métalliques (Tabrizi et coll., 2017). Les structures réalisées par Maruo et al. sont suffisamment continues et régulières dans leur surface pour être conductrices avec une résistivité de $3.48 \times 10^{-7} \Omega \cdot \text{m}$, pour des lignes de 200nm de large. (Maruo & Saeki, 2008)

Ce mémoire est divisé en deux principaux chapitres découlant des deux questions élaborées au début de l'introduction. Est-il possible de lier des billes micrométriques sur des surfaces et matériaux des électrodes pour ainsi reproduire les connexions observées? Et, est-il possible de recréer des jonctions synaptiques en utilisant d'autres structures similaires aux billes? Est-ce que ces structures peuvent être conductrices?

2. Modification de substrats pour la liaison de billes

Notre but dans ce chapitre est de décrire la création des patrons des molécules de biotine sur des matériaux utilisés pour les électrodes neuronales pour après attacher des billes recouvertes de streptavidine sur leur surface. On utilise un microprocesseur, car les surfaces sont planes et composées de silicium et d'or, des matériaux retrouvés sur les électrodes neuronales. De plus, un micropresseur est idéal pour connecter un ensemble de neurones à un système de mesure de courant pour mesurer le courant provenant des neurones ou pour exciter les neurones. Pour commencer, on détaille la méthode LAPAP pour lier des patrons de biotines sur le verre. Par la suite, on image la surface d'un microprocesseur pour identifier les différentes zones d'or et de silicium et on caractérisera les énergies et vitesses nécessaires pour lier la biotine sur ces surfaces. Ultérieurement, on teste la capacité des patrons de biotines à lier des billes recouvertes de streptavidine.

2.1 Matériel et méthodes

2.1.1 Patrons de biotine (LAPAP)

Une technique qui est utilisée dans ce mémoire est la méthode LAPAP (Laser-Assisted Protein Adsorption by Photobleaching). Elle permet de lier la biotine sur des surfaces de verre en utilisant des moyens optiques simples et efficaces. (Belisle et coll., 2008) Cette technique permet de lier de façon très précise les molécules de biotine et ce à différentes concentrations selon l'ouverture numérique de l'objectif et la puissance utilisée. Dans la méthode LAPAP, la molécule biotin-4-fluoresceine (B4F) est photo-blanchie par un laser à 473 nm de façon à ce que les molécules soit adsorbée par la surface de verre. Le photo-blanchiment crée des radicaux libres qui réagissent et lient les molécules de B4F qui sont adjacentes et suffisamment près de la surface illuminée. Le laser peut être déplacé sur une surface pour ainsi illuminer une zone précise, et la puissance variée pour créer différentes concentrations de biotine spatialement contrôlées. Puisque la streptavidine à une forte affinité avec la biotine, il est par la suite possible d'accrocher différentes molécules ou particules liées avec la streptavidine sur ces patrons. (Belisle et coll., 2008; Belisle, Kunik, & Costantino, 2009; Belisle, Mazzaferri, & Costantino, 2014)

Les patrons de biotine sont réalisés sur la surface de verre d'une boîte de Pétri et on utilise un microscope inversé pour la simplicité d'utilisation. Le processus se détaille en plusieurs étapes. Pour débiter une goutte de 40-400 μ L, selon la taille de la surface d'une solution à 3% de sérum d'albumine bovin (BSA) est placée sur la surface de verre de la boîte de Pétri pendant 15 minutes, pour minimiser que le B4F s'attache aux zones non illuminées. La surface est ensuite rincée 3 fois pendant environ 30 secondes avec 2mL d'une solution de phosphate saline (PBS). Ensuite, un laser de 473nm est focalisé sur la surface du verre (Figure 4). Le point focal est ajusté en utilisant la réflexion observée dans le microscope et en déplaçant la boîte de Pétri dans l'axe (z). Subséquemment, le laser est éteint ou bloqué et une goutte de 40 μ L de B4F à 3% dans le BSA est déposée sur la surface de verre de façon méticuleuse pour éviter de déplacer le «focus» de la boîte de Pétri. Après, un programme contrôlant les moteurs déplace la boîte de Pétri pour illuminer une surface prédéterminée. Une fois la surface illuminée, la boîte de Pétri doit être rincée de 5 à 6 fois avec du PBS en évitant d'assécher la surface. Finalement, 40 μ L de streptavidine à 5 μ g/mL dans 3% de BSA est incubé avec le patron de B4F pour 15 minutes suivi de 3-4 rinçages avec du PBS. La streptavidine peut être liée à un fluorochrome et être utilisée pour caractériser les patrons et ainsi maximiser la quantité de biotine liée sur la surface utilisée.

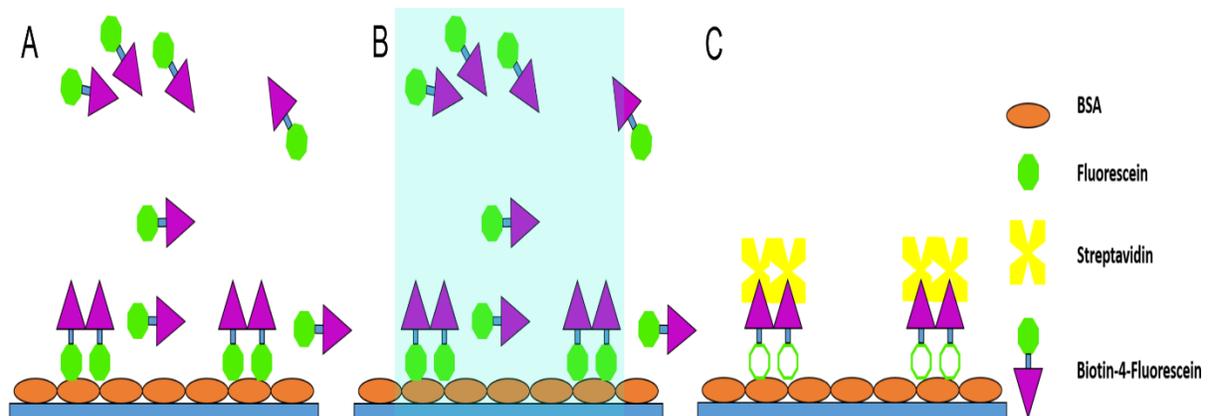


Figure 4. Étapes pour la création d'un patron de biotines. Incubation avec le B4F (A), liaison du B4F par illumination (B) et liaison de la streptavidine (C).

Pour réaliser les patrons, les moteurs reçoivent une série de coordonnées (Figure 5, cercle rouge) utilisant un programme LabVIEW. Le processus est itératif et se passe comme

suit : la première ligne de coordonnées du tableau est transmise aux moteurs, les moteurs doivent se déplacer en cette position (x, y) avec un voltage V appliqué au laser à des vitesses v_x et v_y . Une fois les moteurs arrêtés en la position (x, y) ciblée le programme continue à la ligne suivante. Ce que l'on obtient est une suite de lignes horizontales tracées en bleu sur la figure 5.

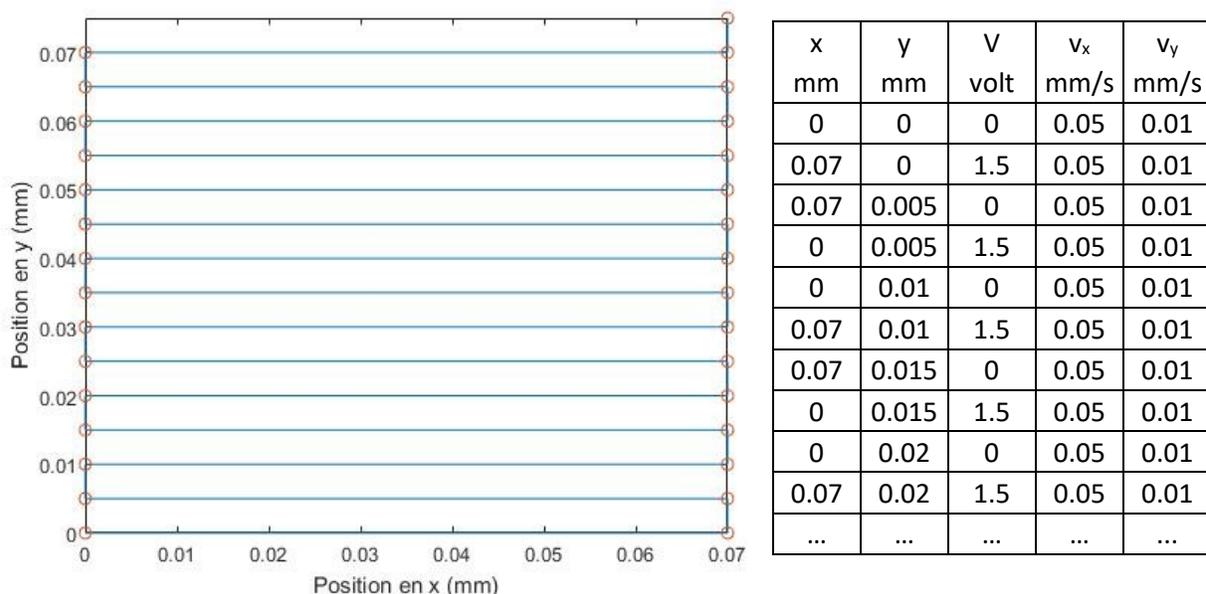


Figure 5. Exemple de patron et lignes d'information envoyées au programme LabVIEW.

Les carrés créés sont ajustés avec des tailles et positions souhaitées en variant le nombre de lignes, ainsi que leurs longueurs. La distance entre les lignes est réduite au maximum, pour que les patrons soient continus, pour minimiser le nombre de lignes et ainsi que le temps total nécessaire à leurs créations. De même, chaque carré peut avoir une vitesse différente. Encore une fois, la vitesse maximale permettant de saturer la surface en biotine peut-être déterminée pour minimiser le temps et ainsi rendre le processus plus efficace.

2.1.2 Patrons et billes recouvertes de streptavidine

Les billes magnétiques recouvertes de streptavidine sont achetées chez Sigma-Aldrich Co. Ces billes ont une taille de $1\mu\text{m}$ avec une déviation standard de $0.1\mu\text{m}$ et elles sont dans un milieu aqueux à 1% de masse réalisée par le fabricant.

Avant d'être utilisées, les billes sont diluées à un ratio 1/100 (1%) dans une solution de 3% de BSA. Ensuite, pour placer les billes avec les patrons de biotine, on enlève un maximum du PBS sans assécher la surface de verre pour placer les billes le plus près des patrons et éviter de trop diluer la solution avec billes. Ensuite, on dépose une goutte de $70\mu\text{L}$ de billes diluées à 1% sur la surface de verre directement sur le patron. Par la suite, le patron est placé sur un aimant faible et sur un agitateur à faible vitesse pour 15 minutes. Le surplus de billes est rincé 3 fois avec du PBS 3%.

2.2 Résultats

2.2.1 Images d'un microprocesseur

Le microprocesseur que l'on possède est constitué d'éléments conducteurs en or et d'une structure isolante de nitrate de silicium, des éléments constituant les électrodes neuronales utilisées dans la littérature. Comparativement au verre, qui est déjà caractérisé en termes de puissance et de vitesse pour lier efficacement la biotine, il faut déterminer les paramètres à utiliser sur l'or et le silicium.

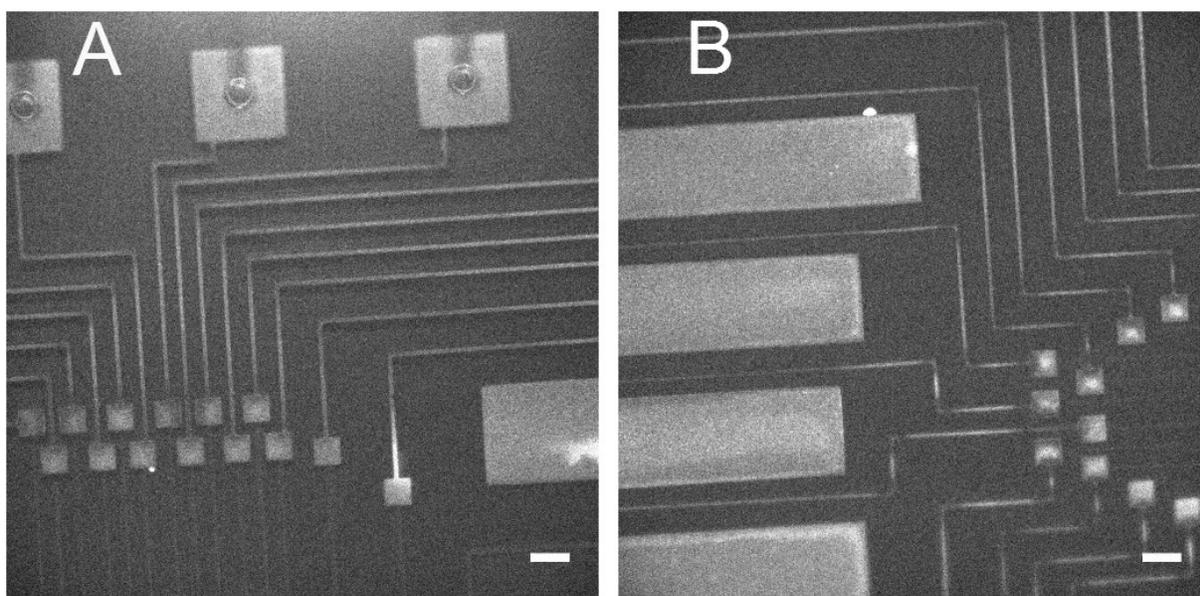


Figure 6. Images en réflexion d'un microprocesseur constitué d'or (en gris clair) et de nitrate de silicium (en gris foncé), barre d'échelle de 100µm.

Le microprocesseur est un ensemble de circuits en or séparés par des zones d'éléments isolants de nitrate de silicium (Figure 6). Deux sections principales du microprocesseur ont été imagées. La première (Figure 6, A) est la zone en bordure, où l'on peut observer les différentes connexions carrées entre les différentes structures du microprocesseur. La zone B est une section de la zone centrale du microprocesseur. Les petits carrés de 70µm font le pont entre les branchements sur la surface et sous la surface de silicium. Les grands carrés de 300µm font le pont entre les branchements à la surface et le système de branchement au dos du microprocesseur.

2.2.2 Caractérisation du laser

Le laser utilisé a une longueur d'onde de 473 nm utilise une diode comme source lumineuse, ce qui permet d'ajuster rapidement le voltage appliqué et ainsi la puissance souhaitée. Ainsi, on peut dériver une courbe de la puissance de sortie en fonction du voltage.

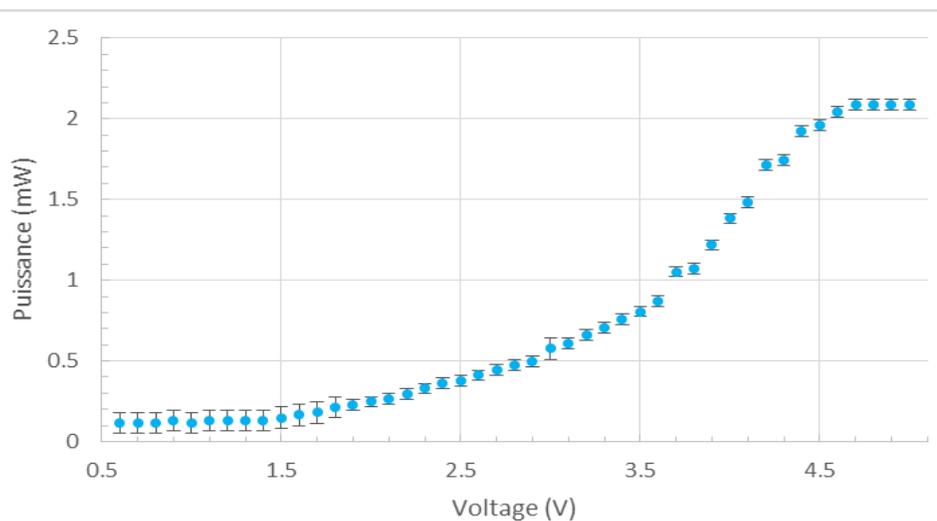


Figure 7. Courbe de la puissance en fonction du voltage à la sortie du laser.

Cette courbe nous sera utile lorsqu'on caractérisera les patrons de biotine, pour maximiser ou varier la quantité de biotine qu'on souhaite attacher sur différentes surfaces.

2.2.3 Patron de biotine sur un microprocesseur

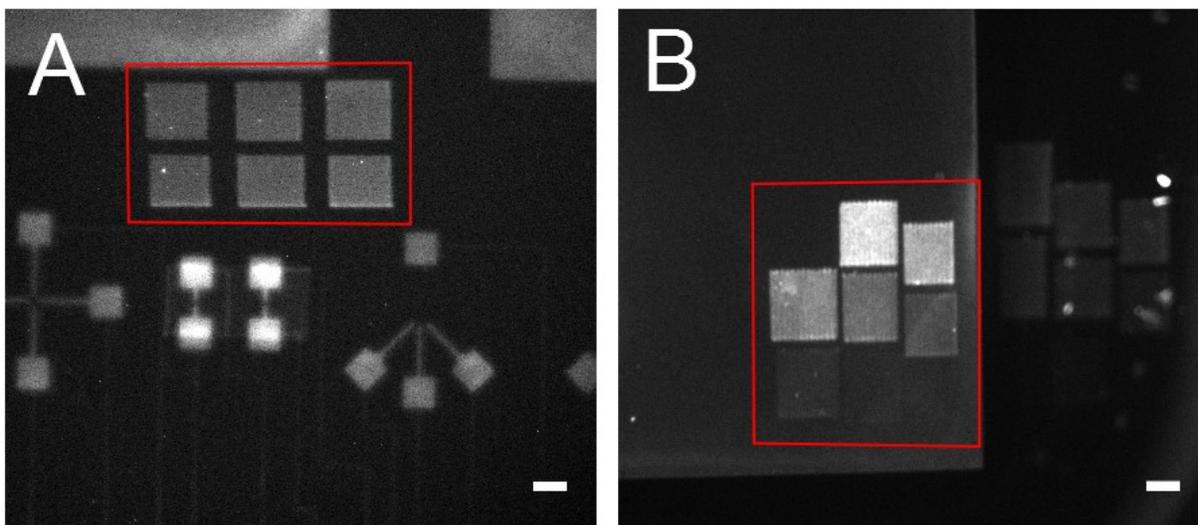


Figure 8. Images en réflexion d'un microprocesseur et des patrons de biotin-4-fluorescéine (B4F) dans les carrés rouges sur le nitrate de silicium (A) et sur l'or (B), barre d'échelle de 100 μ m.

Maintenant que l'on peut créer différents patrons de B4F sur les composants d'un microprocesseur, il est nécessaire de caractériser les vitesses optimales pour lier un maximum de B4F. La fluorescence mesurée est l'intensité lumineuse ou fluorescence par pixels d'une image de chacun des carrés correspondant à une caractéristique donnée. Les unités sont arbitraires, mais peuvent être comparées au sein de la même image.

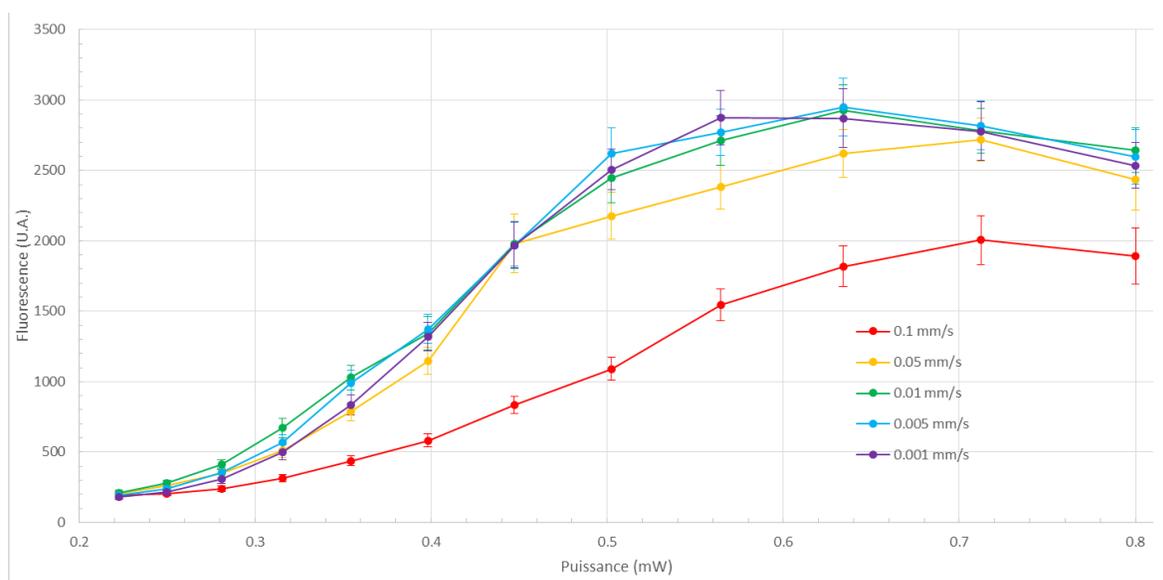


Figure 9. Sur l'or, la fluorescence en fonction de la puissance et de la vitesse.

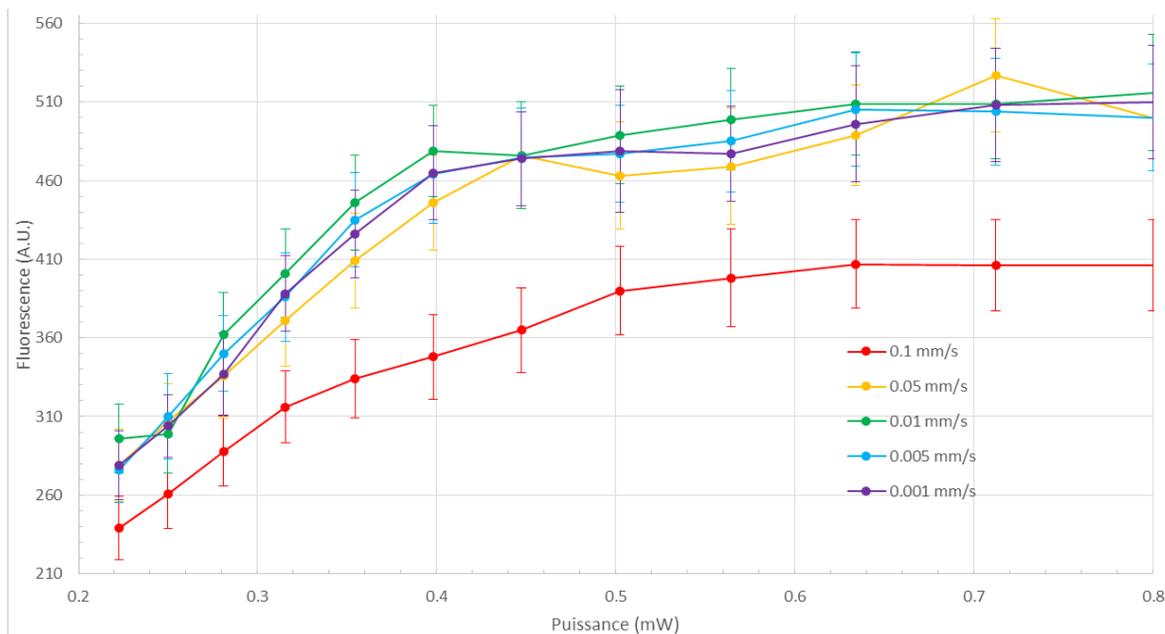


Figure 10. Sur le nitrate de silicium, la fluorescence en fonction de la puissance et de la vitesse.

Pour le silicium et l'or, la vitesse optimale est de 0.05 mm/s. Une vitesse de 0.1 mm/s ne permet pas d'atteindre la saturation de biotine. Il est important d'atteindre une saturation pour avoir le maximum de biotine disponible pour ensuite lier efficacement les billes recouvertes de streptavidines. Pour cela, une puissance d'environ 0.6 mW est nécessaire avec une vitesse de 0.05mm/s.

2.2.4 Patron de biotine sur du verre

Avant de placer des billes recouvertes de streptavidine sur les surfaces d'or ou de silicium du microprocesseur, on débute par des patrons de B4F réalisés sur le verre. Et pour maximiser la quantité de B4F, on a fait une calibration de la fluorescence en fonction de la puissance avec une vitesse de 0.05 mm/s.

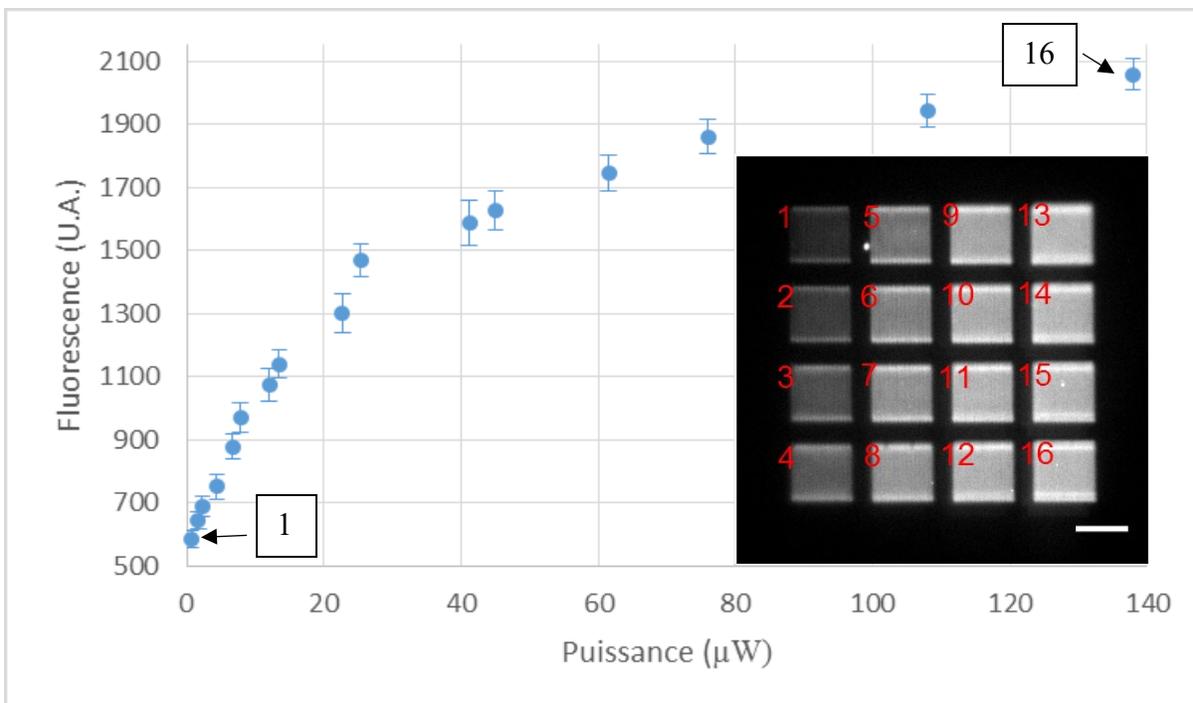


Figure 11. Fluorescence de patrons de B4F sur le verre en fonction de la puissance. Et exemple de patron obtenu. Barre d'échelle de $70\mu\text{m}$. Chaque valeur de fluorescence et puissance croissante entre 0 et 140 μW est associée à un carré numéroté de 1 à 16.

La figure 11 montre que le B4F arrive en saturation autour de 110 μW sur le verre. On utilisera 140 μW pour maximiser la quantité de B4F sur la surface de verre. De plus, la vitesse idéale est de 0.05mm/s pour le verre, mais aussi pour l'or et le nitrate de silicium. Par la suite, des billes recouvertes de streptavidines sont incubées avec les patrons de biotines et rincées.

2.2.5 Patron de B4F et billes recouvertes de streptavidine

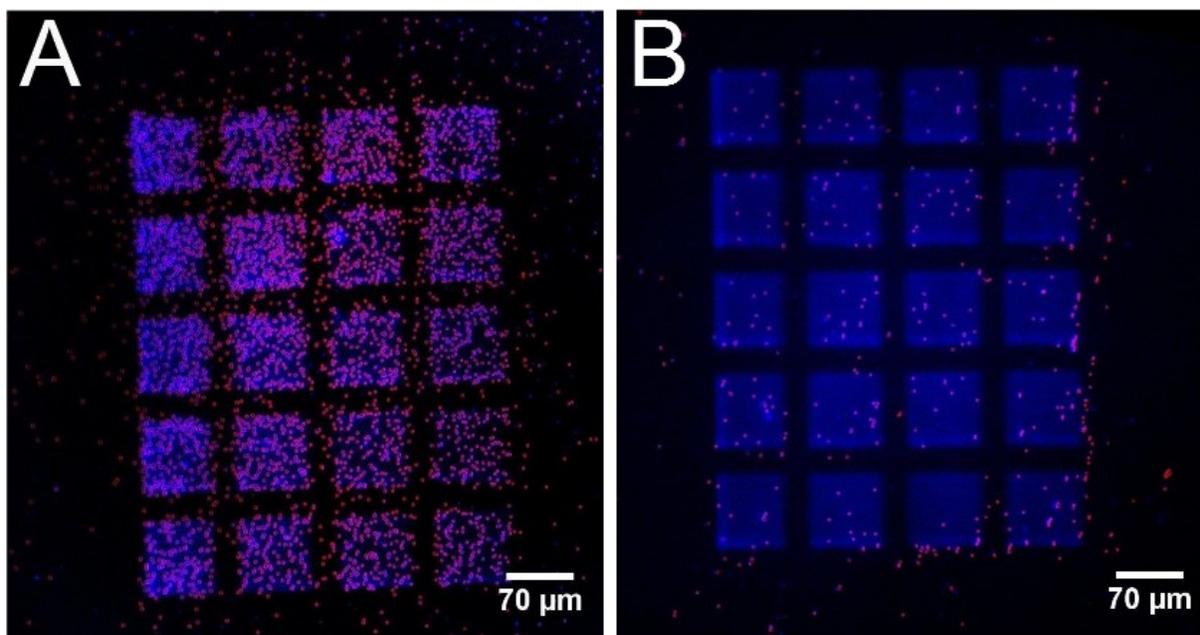


Figure 12. Patrons de B4F (en bleu) avec beaucoup de billes recouvertes de streptavidine (rouge) (A), comparativement à un patron semblable dans les mêmes conditions avec peu de billes (B).

La figure 12 montre que l'utilisation du même protocole pour attacher les billes sur deux patrons de biotine semblables donne des résultats différents. Chacun des carrés a été réalisé avec la même puissance et la même vitesse, donc la même densité de biotines. Le patron A, montre bien que les billes se lient de façon spécifique sur les patrons, mais il y a aussi un certain nombre de billes qui sont toujours présentes après rinçages. Le patron B a peu de billes sur le patron suggérant une faible liaison qui est affectée par la qualité du rinçage, ou d'un rinçage trop prononcé arrachant les billes du patron. On devra par la suite tester la force de liaison des billes avec la biotine. Les billes en rouge de la figure 12 sont les contours des billes qui ne semblent pas bouger et qui sont présumément liées à la biotine. Plus précisément, on utilise une série d'images en transmission obtenue au rythme d'une image par seconde pendant 120 secondes. Les images ont été additionnées pour obtenir une seule image. Les billes qui ne bougent pas ont un contour net et inversement pour celles qui bougent. Ensuite, on inverse l'image, applique un seul moyen et trace les contours en rouge qui se retrouve sur la figure 12.

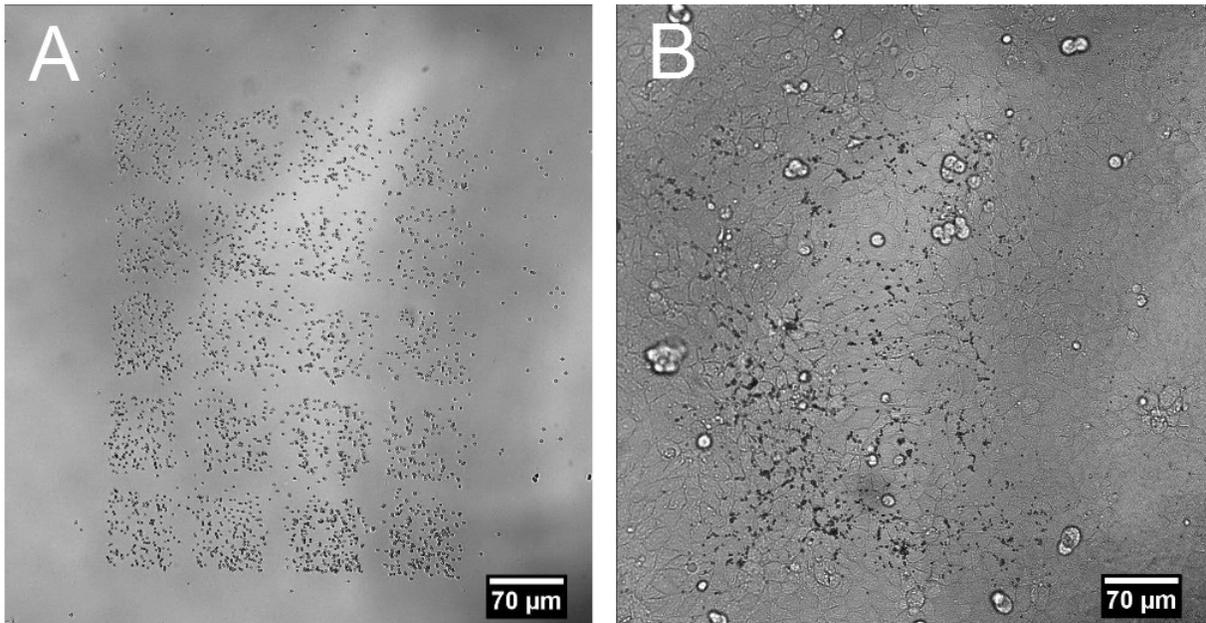


Figure 13. Patron en transmission de biotines avec billes avant culture cellulaire (A) et le même patron 12 heures après être placé en culture cellulaire dense MDCK (B).

Puisque les patrons semblent être sensibles aux rinçages, on a placé le patron de billes en cultures denses avec des cellules adhérentes MDCK pour un test rapide, car les cultures des cellules neuronales sont plus longues. La figure 13 montre qu'après 12 heures le patron est indiscernable. Ceci confirme que les liaisons entre biotine et streptavidine ne sont pas suffisantes ou ne sont pas assez fortes pour résister aux forces que les cellules MDCK en culture exercent sur les billes. Ceci réfute notre première question de recherche : il n'est pas possible de lier des billes micrométriques sur des surfaces et matériaux des électrodes pour ainsi reproduire les connexions observées, car s'ils ne se lient pas sur les patrons sur le verre il est improbable que cela fonctionne sur l'or ou le silicium.

2.3 Discussion

On a été capable de lier des patrons de biotines sur des surfaces d'or et de silicium d'un microprocesseur en utilisant des vitesses entre 0.1 et 0.001 mm/s et des puissances entre 0.2 et 0.8 mW. Ce qui rend leur surface apte à accrocher des billes recouvertes de streptavidines. La puissance pour réaliser les patrons de façon optimale sur l'or et le silicium est de 0.6 mW pour une vitesse de 0.05mm/s. Une puissance 4.3 fois plus élevée comparativement au verre qui est de 0.14mW. Cette puissance supplémentaire est liée à l'absorption de la lumière dans la solution avant d'attendre la surface, car la surface d'or ou de silicium est opaque et on doit illuminer ces surfaces en passant par la solution de biotines.

Les billes dans plusieurs cas s'accrochent bien sur les patrons réalisés sur le verre, et parfois non. La différence provient peut-être de la qualité du rinçage, car la présence de biotine en solution peut se lier aux billes de streptavidine avant qu'elles puissent se lier aux patrons, mais aussi de la propreté de la surface. Il a été possible de lier des billes micrométriques de 1 μ m sur des patrons de biotines qui eux sont réalisables sur différentes surfaces d'or, de silicium et de verre. Cependant, les billes ne sont pas fortement attachées pour résister aux forces des cellules en cultures. Ce qui ne permet pas d'utiliser les caractéristiques déjà établies des billes à créer des jonctions synaptiques sur leur surface. (Batista et coll., 2017; Gopalakrishnan et coll., 2010; Lucido et coll., 2009; Magdesian et coll., 2017) De plus, contrairement aux cellules qui peuvent, par leurs membranes flexibles avoir une plus grande surface en contact avec les billes, la surface de verre est rigide et a seulement une petite région pour lier la biotine à la streptavidine qui est limitée par sa longueur.

3. Structures micrométriques de polymère

Par la suite de la réfutation de notre première question de recherche une seconde a été formulée : est-il possible de recréer des jonctions synaptiques en utilisant d'autres structures similaires aux billes et est-ce que ces structures peuvent être conductrices? On a utilisé d'abord un polymère non conducteur et ensuite différents composites avec des nanoparticules d'argent et nanotubes de carbone et pour ensuite utiliser le nitrate d'argent. Cette section sera divisée en deux sous-sections dépendant de la façon qu'on illuminera la surface, soit directe ou indirecte (objectif inversé en imagerie par microscopie).

3.1 Matériels et méthodes

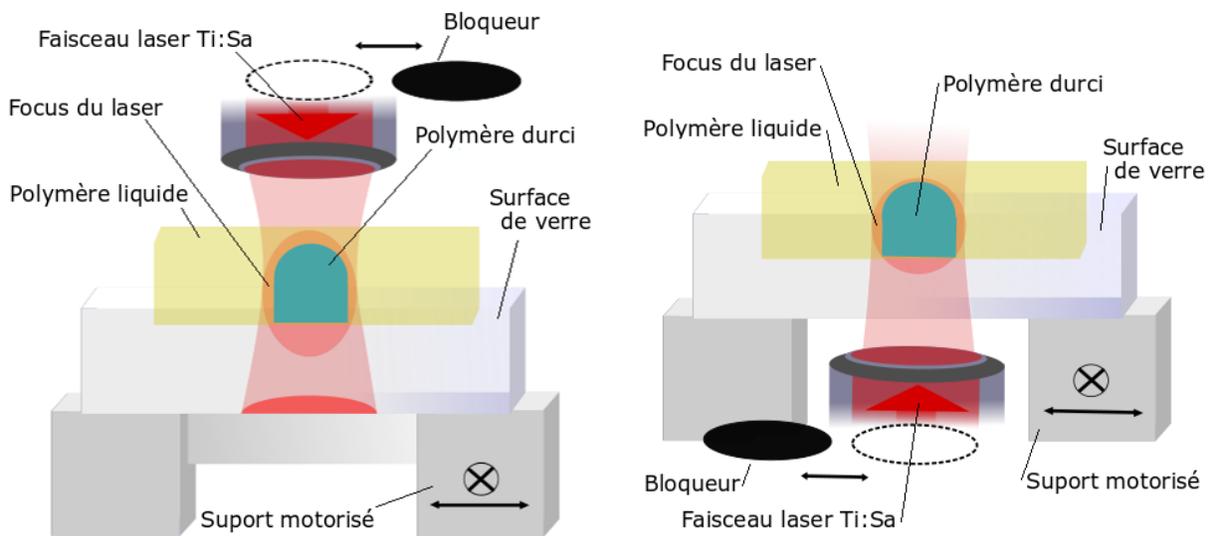


Figure 14. Schéma de montage et illumination directe (gauche), et indirecte (droite).

La configuration normale pour illuminer une surface de verre est la méthode indirecte ou inversée. On illumine la surface à travers le verre et cette technique peut facilement être adaptée avec un microscope inversé. Pour permettre l'illumination sur les surfaces opaques comme les métaux, on utilise une méthode directe où l'on passe par le polymère ou la solution pour focaliser sur la surface. Dans les deux cas, le laser est focalisé sur la surface supérieure entre le verre et le polymère/solution.

3.1.1 Préparation des échantillons de polymères

Il y a deux principaux mélanges de polymères utilisant à la base le polymère NOA61 acheté chez Norland Inc. Ce polymère durcit aux UV, est translucide et s'étend bien par enduction par centrifugation (spin coating).

Il est tout d'abord utilisé dans sa forme normale du fabricant sans aucune modification. Ensuite, pour rendre le polymère conducteur, la première approche est d'utiliser des nanoparticules d'argent de 100nm (Sigma Aldrich Co.). Les nanoparticules sont ajoutées au polymère à différents ratios de masse (3.3, 6.1, 13.2 wt%) et ensuite chauffées graduellement dans un Sonicateur (50kHz) jusqu'à 55°C. De la même façon, on peut ajouter de courts (9.5nm x 1µm) nanotubes de carbone à multiples couches (MWCNT) à 1% de ratio de masse (1 wt%). Dans les deux cas, la solution est opaque d'une couleur grise pour l'agent et noire pour les MWCNT.

La troisième solution utilisée est constituée de deux composants. La solution est initialement produite en mélangeant 200mg de polyvinylpyrrolidone (PVP) de masse moléculaire moyenne 40,000 dissout dans 0.5mL d'éthanol et ensuite 50mg de nitrate d'argent (AgNO₃) (99.9999% Sigma-Aldrich Co.) dissout dans 0.5mL d'eau distillée. Finalement, une goutte (200µL) du mélange du polymère et de l'argent est déposé sur la surface d'une lamelle de verre. Et le tout est séché 12 heures à température pièce. Le résultat est une mince couche transparente de couleur jaune-orangé.

3.1.2 Création des structures de polymère

Pour les préparations des échantillons, on utilise une surface de verre (22x22x0.13-0.6mm) sur laquelle on dépose une goutte du polymère ou composite. La polymérisation est induite par l'absorption à deux photons utilisant un laser Ti:Sa à 800nm. Le laser est focalisé sur la surface de verre en utilisant un objectif d'ouverture numérique (O.N.) de 0.75, 0.8 ou 1.35 et en utilisant la réflexion du laser dans la caméra du microscope pour en ajuster la précision. La puissance est mesurée à la sortie de l'objectif et ajustée entre 200 et 20mW selon l'ouverture numérique utilisée. Un bloqueur (SH04, Thorlab) contrôle le temps d'exposition pour 300 ou 500ms. Un système de moteurs (Thorlab) contrôle la position de la plateforme où

repose la surface de verre et donne la flexibilité de créer des structures de polymère aux positions désirées. Ces moteurs sont contrôlés en utilisant un logiciel programmé avec LabVIEW. Les structures sont ensuite rincées pendant 30 secondes et à plusieurs reprises au besoin avec de l'alcool éthylique à 70% pour enlever la majorité du polymère ou composite non durci. Ensuite, les structures sont plongées dans de l'alcool éthylique pour 30 minutes et finalement rincées en utilisant de l'eau distillée.

De la même façon, en utilisant la solution de polymère à base de PVP, on utilise le même procédé que précédemment. En utilisant le même laser Ti:Sa à 800nm, la photo-réduction de l'argent est induite à l'intérieur de la matrice de PVP et sur la surface de verre. La puissance est mesurée après l'objectif de 0.7 O.N. et est fixée à 17mW avec un temps d'exposition de 500ms.

3.1.3 Culture cellulaire

Les cellules neuronales qu'on utilise pour la culture in vitro sont des cellules provenant de l'hippocampe de rat. Les cellules neuronales de l'hippocampe ont été dissociées et successivement mises en cultures pour la première fois en 1977 par Banker et Cowan. (G. A. Banker & Cowan, 1977) Ces protocoles développés ont ensuite été modifiés pour être utilisés en vue d'études subséquentes. Le protocole employé dans ce mémoire utilise des cellules en faible densité dissociée d'hippocampe de rats ou de souris. Les neurones sont placés en culture sur des lamelles recouvertes de polylysine (Kaech & Banker, 2006). Lorsque cultivés sur ce substrat, selon ce protocole, les neurones deviennent correctement polarisés, ils développent des axones et des arbres dendritiques. Les neurones forment aussi de nombreuses connexions synaptiques fonctionnelles entre eux. Les cultures de neurones provenant de l'hippocampe ont été largement utilisées pour la visualisation des neurones et des protéines exprimées, et pour comprendre le développement des dendrites et de la formation des synapses. Bref, ce qui en fait un choix idéal pour l'étude de la formation et la connexion des synapses.

Avant d'être placés en culture, les échantillons sont stérilisés et couverts de Poly-D-Lysine (PDL). Les échantillons sont stérilisés en deux étapes. Avec de l'éthanol (70%) (rincé 3 fois avec de l'eau deux fois désionisée (ddH₂O)) suivi d'une stérilisation par plasma de 30 secondes. La PDL (100ug/mL) est incubée pendant 2 heures avec les échantillons à

température pièce et l'excédent est rincé avec le ddH₂O. Les cellules sont préparées à partir de cellules corticales de rat embryonnaire E18 selon le protocole de dissection. (G. Banker & Goslin, 1998; Hilgenberg & Smith, 2007) Environ 2000 (300K) à 3300 (500K) cellules par mm² sontensemencées avec du médium (Gibco Neurobasal Medium) à 37°C sur chacun des échantillons par puits de culture. Après 14 jours in vitro les cultures sont fixées utilisant du méthanol à -20°C et conservées dans du PBS à 4°C.

Un autre type de cellules est utilisé dans ce mémoire. Il s'agit de la lignée de cellules MDCK (cellules de chien dérivées du rein) cultivées en utilisant un milieu de culture basé avec le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) avec 1% d'antibiotique et 10% de FBS. Les cellules sont cultivées à 37°C avec 5% de CO₂.

3.1.4 Immunofluorescence

Pour observer la présence de certaines des protéines synaptiques, il existe deux principales méthodes fréquemment utilisées. L'immunofluorescence directe et indirecte. Elles se décrivent comme suit.

Directe : L'immunofluorescence primaire, ou directe utilise un seul anticorps qui est lié à un fluorochrome. L'anticorps reconnaît l'Épitope, une séquence spécifique de l'antigène ciblé. L'anticorps s'attache à la cible, et le fluorochrome peut être détecté par microscopie. Cette technique a l'avantage par rapport à l'indirecte ou secondaire de réduire le nombre d'étapes dans le marquage des antigènes. De plus, on peut réduire le bruit en minimisant les problèmes avec les réactions croisées ou liaisons non-spécifiques de l'anticorps. Cependant, le coût et le temps pour préparer ces anticorps conjugués avec le bon fluorochrome sont élevés. Et étant donné que le nombre de molécules fluorescentes pouvant être liées aux anticorps est limité, l'immunofluorescence directe est généralement moins sensible ou efficace que l'immunofluorescence indirecte.

Indirecte : L'immunofluorescence indirecte ou secondaire est plus souvent utilisée par sa flexibilité et ses coûts pouvant être réduits. Elle utilise deux anticorps, soit l'anticorps primaire, qui ne contient pas de fluorochrome. L'anticorps primaire se lie spécifiquement à l'Épitope, la séquence spécifique de l'antigène. Ensuite, l'anticorps secondaire, contenant le fluorochrome, reconnaît une séquence sur l'anticorps primaire et s'y attache. Cette séquence

peut être présente plus d'une seule fois. Et donc, plusieurs anticorps secondaires peuvent se lier à l'anticorps primaire et pourvoient une amplification du signal en augmentant le nombre de fluorochrome par antigène. Cette méthode est plus complexe et plus longue, mais est plus flexible par sa variété d'anticorps secondaire et de technique d'imagerie pouvant être utilisée. Donc, l'immunofluorescence indirecte sera utilisée dans ce mémoire. Et selon les échantillons, on a réalisé deux marquages. Dans les premiers cas, la synaptophysine et la PSD95 ont été marquées sur un même échantillon. Dans le second cas, la PSD95 ou la synaptophysine ont été marquées sur un échantillon avec la Tubuline.

Premier cas : suivant la culture cellulaire et la fixation, le PBS est remplacé avec une solution de blocage (1xPBS with 5% BSA, 0.25% Triton) et incubé pour une heure à température pièce. L'anticorps primaire est dilué dans la solution de blocage. Les anticorps utilisés sont l'anti-PSD95 (lapin, Cell Signaling D27E11, 1:250) et l'anti-Synaptophysine (souris, SynapticSystems 101011, 1:500). Les anticorps sont incubés pendant toute une nuit à 4°C et rincés 3 fois avec la solution de blocage. Les anticorps secondaires sont préparés avec la solution de blocage, chèvre anti-lapin (Alexa 488, ThermoFisher A11034, 1:500), chèvre anti-souris (Alexa 546, ThermoFisher A11003, 1:250). Les échantillons sont placés avec l'anticorps secondaire pour une heure à température pièce et ensuite rincés deux fois avec la solution de blocage et une fois avec le ddH₂O.

Second cas : de la même façon, on a aussi divisé des échantillons en séparant la synaptophysine et la PSD95. L'anticorps primaire est aussi dilué dans la solution de blocage. Le groupe 1 utilisait anti-PSD95 (lapin, Cell Signaling D27E11, 1:250), anti-Beta 3 Tubulin (souris, Sigma T8660, 1:250). Le groupe 2 utilise anti-Synaptophysin (souris, SynapticSystems 101011, 1:500), anti-Beta 3 Tubuline (lapin, Abcam AB18207, 1:250). Les deux groupes sont aussi incubés avec anti-MAP2 (poulet, GeneTech GTX85455, 1:300). Les anticorps sont incubés pendant toute une nuit à 4°C et rincés 3 fois avec la solution de blocage. Les anticorps secondaires sont préparés avec la solution de blocage, chèvre anti-lapin (Alexa 488, ThermoFisher A11034, 1:500), chèvre anti-souris (Alexa 546, ThermoFisher A11003, 1:250), chèvre anti poulet (Alexa 647, ThermoFisher A21449, 1:250). Les échantillons sont aussi placés avec l'anticorps secondaire pour une heure à température pièce et ensuite rincés deux fois avec la solution de blocage et une fois avec le ddH₂O.

3.1.5 Traitement des images

Pour imager chaque structure, on focalise sur les cultures neuronales en observant la tubuline. Une fois que le focus est déterminé en $z = 0 \mu\text{m}$, une série d'images est prise en $z = -3, -2, -1, 0, 1, 2, 3 \mu\text{m}$ et ce pour les différents fluorochromes. Pour chaque fluorochrome, on somme les 7 images en intensité. Les images résultantes sont ensuite analysées. La première analyse est faite sur l'image en transmission pour déterminer le contour des structures en but d'éliminer l'autofluorescence.

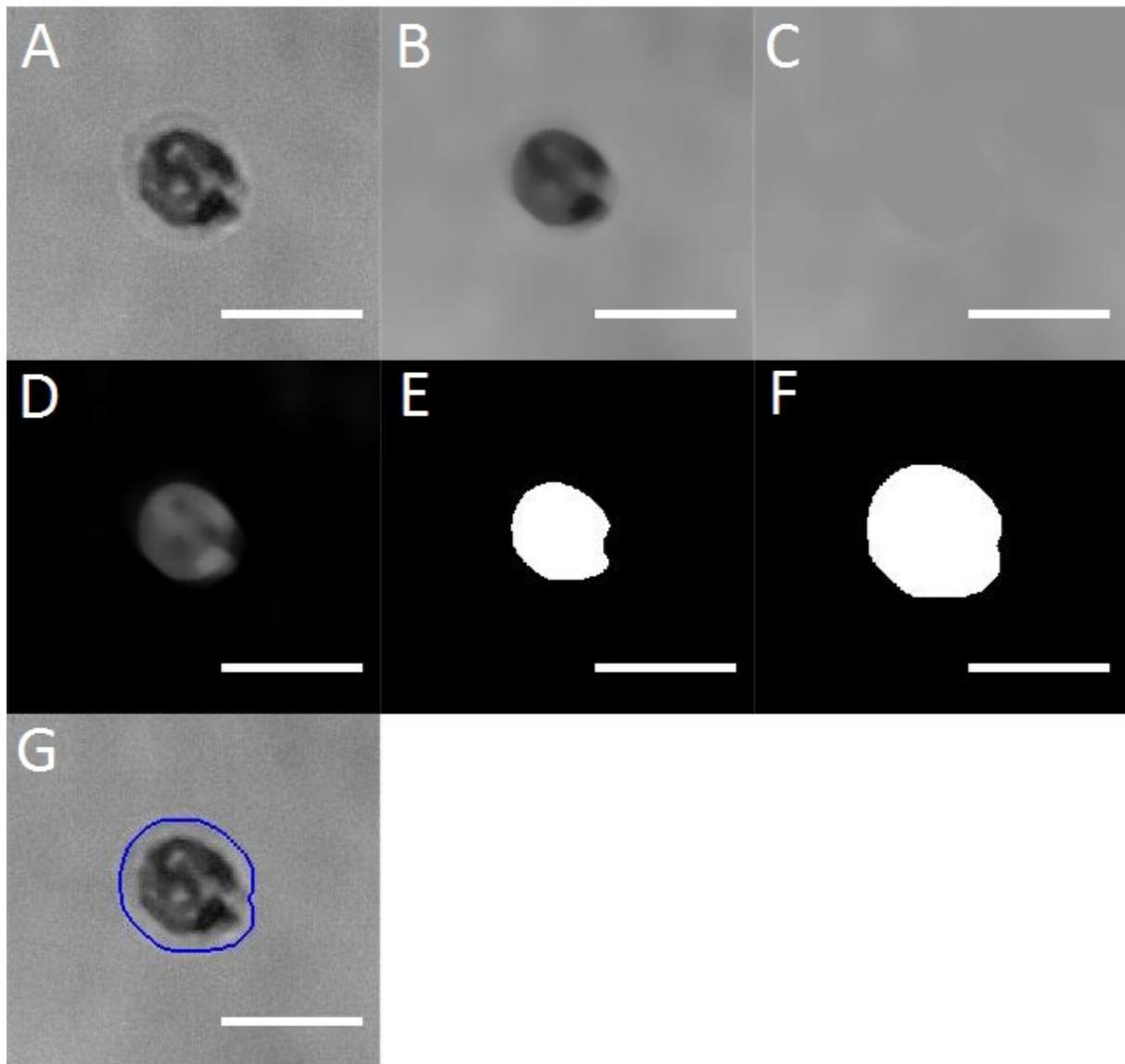


Figure 15. Les différentes étapes de la segmentation des points. Barre d'échelle de $10\mu\text{m}$.

Une des images obtenues par la somme des 7 images originales est l'image A de la figure 40. Cette image est ensuite filtrée avec un filtre médiant (B). Les trous de l'image B sont remplis (C); les trous sont les ensembles de pixels qui ne peuvent être atteints en remplissant l'arrière-plan de l'image à partir du rebord de l'image. Par la suite, on prend la valeur absolue de la soustraction de l'image B et C, et on obtient la figure en D. La figure D est ensuite binarisée (E) et une dilatation est appliquée (F). Finalement, le résultat du contour de F est superposé à l'image A (G).

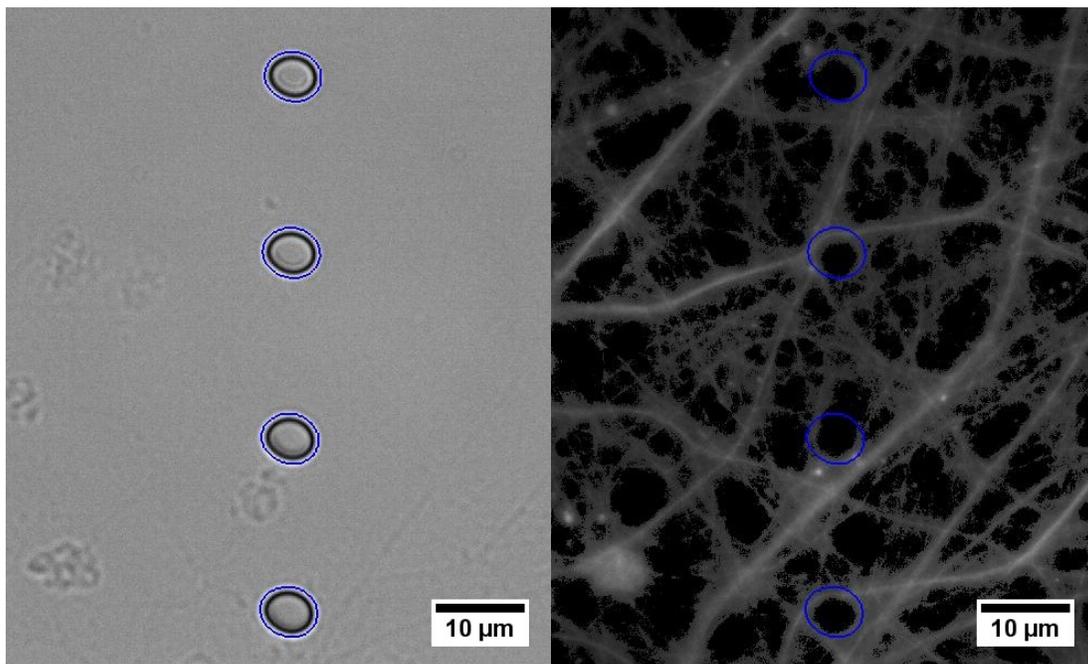


Figure 16. Image en transmission (gauche) et image de la tubuline (droite), les zones en bleu sont la segmentation des contours des structures.

Une fois que la segmentation des structures est déterminée, on utilise un seuil adaptatif sur l'image de la tubuline. Subséquemment, on binarise cette image pour en créer un masque. Cette image nous donne ensuite les zones où se retrouvent les cellules neuronales. On utilise ensuite le masque de la tubuline sur les images de la synaptophysine ou la PSD95 pour s'assurer de ne pas considérer le bruit des images.

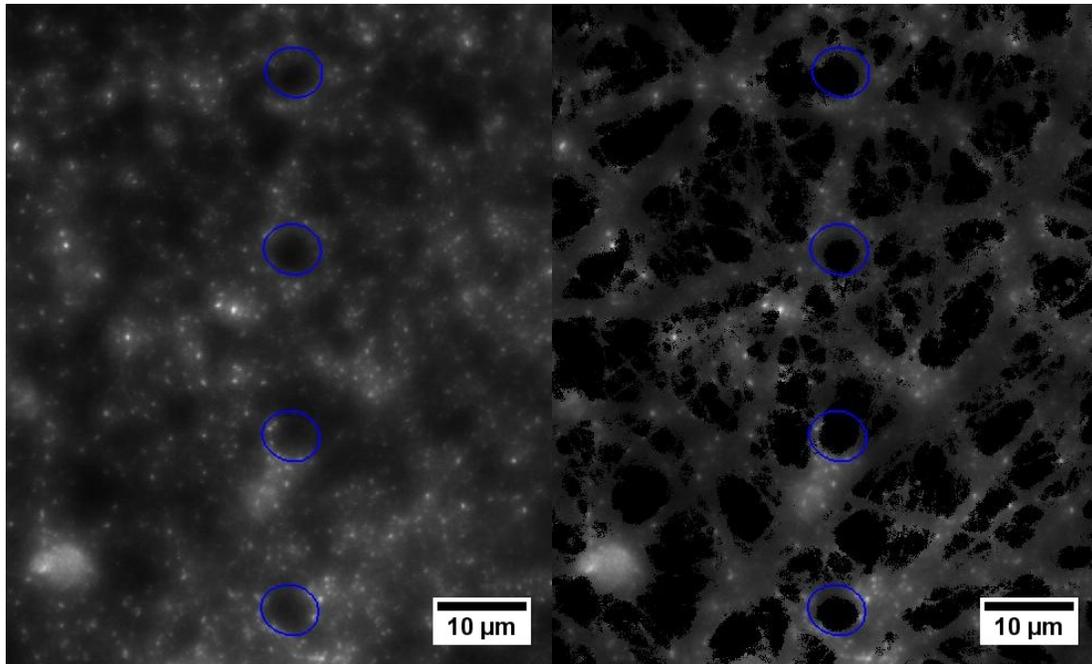


Figure 17. Image de la synaptophysine (gauche) et image de la synaptophysine après application du masque de la tubuline (droite), les zones en bleu sont la segmentation des contours des structures.

3.2.6 Analyse statistique

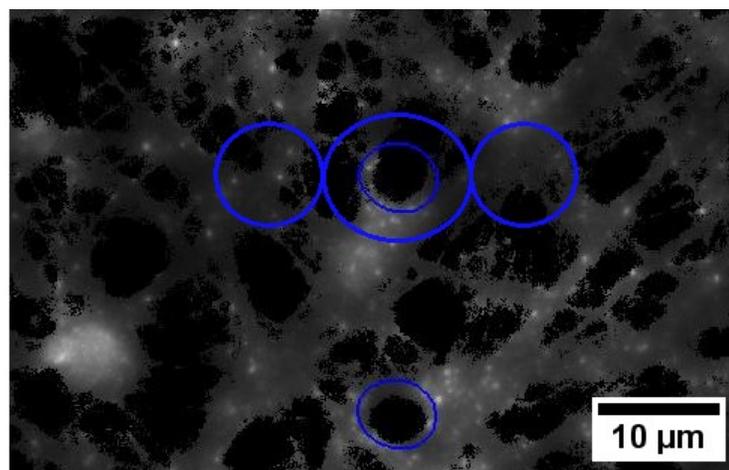


Figure 18. Exemple typique des zones pour l'analyse de la fluorescence.

La fluorescence de la streptavidine ou la PSD95 est analysée en comparant une région (anneau délimité en bleu) directement autour des structures avec une zone de contrôle d'aire similaire adjacent à cet anneau. La fluorescence de chacune des régions est normalisée par le nombre de pixels inclus dans la région correspondante.

Les données statistiques sont réalisées en utilisant un t-test à deux échantillons en considérant que les variances ne sont pas égales. Dans le cas de la comparaison entre les deux contrôles, notre hypothèse nulle est que les deux groupes sont égaux. Et dans le cas de la comparaison entre les zones autour des structures et des contrôles notre hypothèse nulle est que les valeurs autour des structures sont plus grandes. Dans tous les cas, une valeur de $p > 0.1$ (**n.s.**), il n'y a pas de présomption contre l'hypothèse nulle, $0.05 < p \leq 0.1$ (*) une faible présomption contre l'hypothèse nulle, $0.01 < p \leq 0.05$ (**) une forte présomption contre l'hypothèse nulle. Et, une valeur $p \leq 0.01$ (***) désigne une très forte présomption contre l'hypothèse nulle.

3.2 Résultats

3.2.1 Méthode indirecte

La méthode indirecte, qui permet de focaliser la surface en passant par le verre a d'abord été utilisée pour la simplicité d'utilisation et la disponibilité des montages déjà utilisés pour réaliser le LAPAP dans le laboratoire. Et aussi puisque les composites de polymères avec les nanoparticules d'argent et les MWCNT sont opaques, le laser ne peut pas illuminer efficacement les structures de verre de façon directe.

3.2.1.1 Patron de polymère NOA61

La figure 19 montre les structures de polymère (NOA61) réalisées avec un objectif de 1.3 O.N., 20mW de puissance et 500 ms d'exposition par structure et séparées par 10 μ m. Le rinçage du polymère est facilement réalisable, car presque instantané, et demande qu'un seul rinçage. Les structures de NOA61 ont une hauteur de $1,6 \pm 0,7\mu$ m un diamètre de $1,9 \pm 0,7\mu$ m à leurs bases et ils ont été évalués directement en utilisant les images en transmission (figure 15 A). Elles adhèrent sur la surface de verre, car une culture de cellule adhérente MDCK ne les détache pas. La figure 20 montre les structures de NOA61 avec des cellules neuronales. Elles ont été fixées et la synaptophysine et la PSD95 sont immunomarquées sur un même échantillon comme mentionné dans la méthode. Les cultures ont été imagées en fluorescence. Puisque les structures sont fixées sur la surface de verre et que les cellules neuronales placées en cultures sont toujours en vie après 14 jours et qu'elles prolifèrent autour et sur les points de polymère NOA61, on utilisera ce polymère comme base pour réaliser des composites avec des nanoparticules d'argent et des nanotubes de carbones. Pour ainsi rendre le polymère conducteur tout en cherchant à créer des structures permettant de stimuler des jonctions synaptiques autour d'elles.

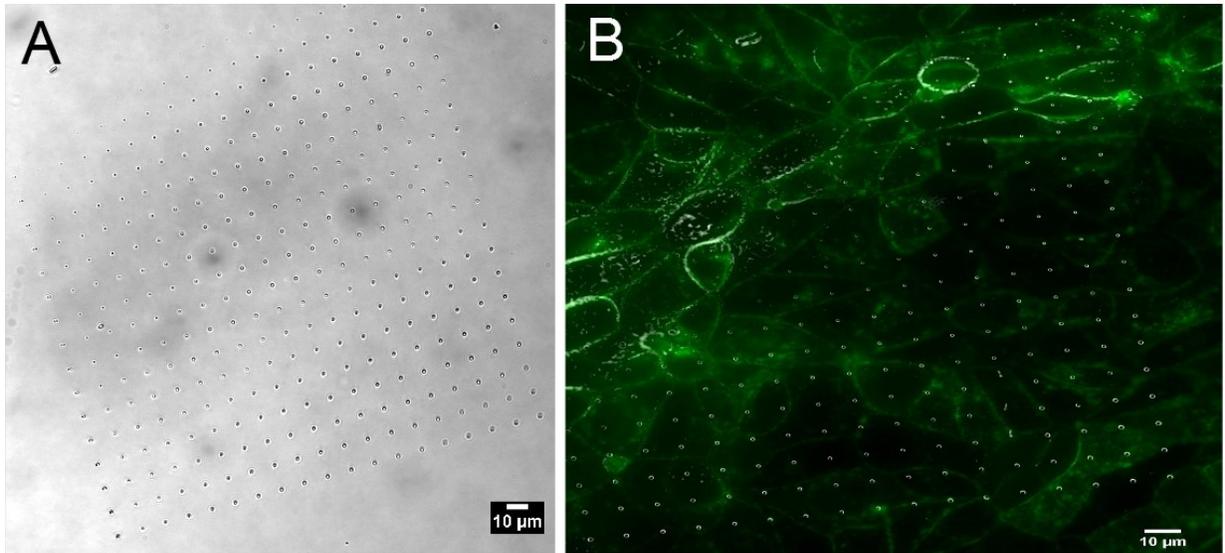


Figure 19. Quadrillage 20x20 de structures de polymère en transmission (A). Même patron en fluorescence placé avec des cellules MDCK, et enmarquant la membrane des cellules avec du WGA (vert).

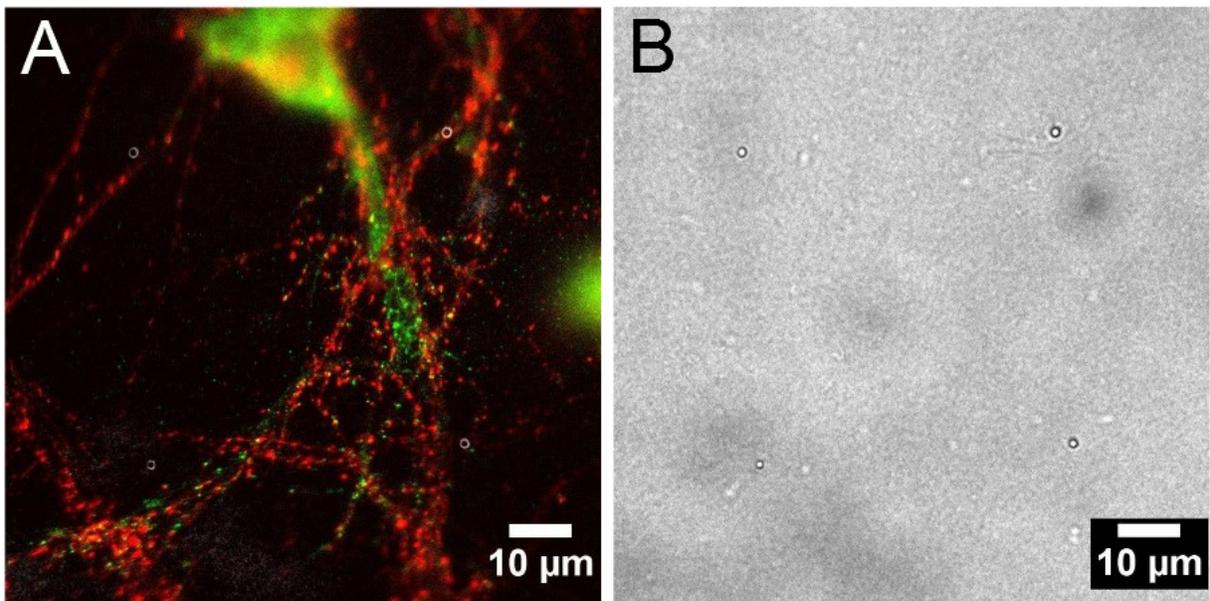


Figure 20. Structure de polymère (NOA61) en culture avec des cellules neuronales (A). En vert la PSD95 et en rouge la synaptophysine. Image en transmission en (B).

3.2.1.2 NOA61 et nanoparticules d'argent



Figure 21. Structures de polymère NOA61 et de nanoparticules d'argent.

Sur la figure 21, les structures de polymère et d'argent sont réalisées avec un objectif de 0.95 O.N., 30 mW de puissance et 300 ms d'exposition par structure. Les structures ont un diamètre de $7.7 \pm 1.8\mu\text{m}$ à leurs bases et ont été évaluées en utilisant les images en transmission. Et comme les structures précédentes, elles sont placées en culture avec des cellules neuronales pendant 14 jours avant d'être fixées et marquées par immunofluorescence.

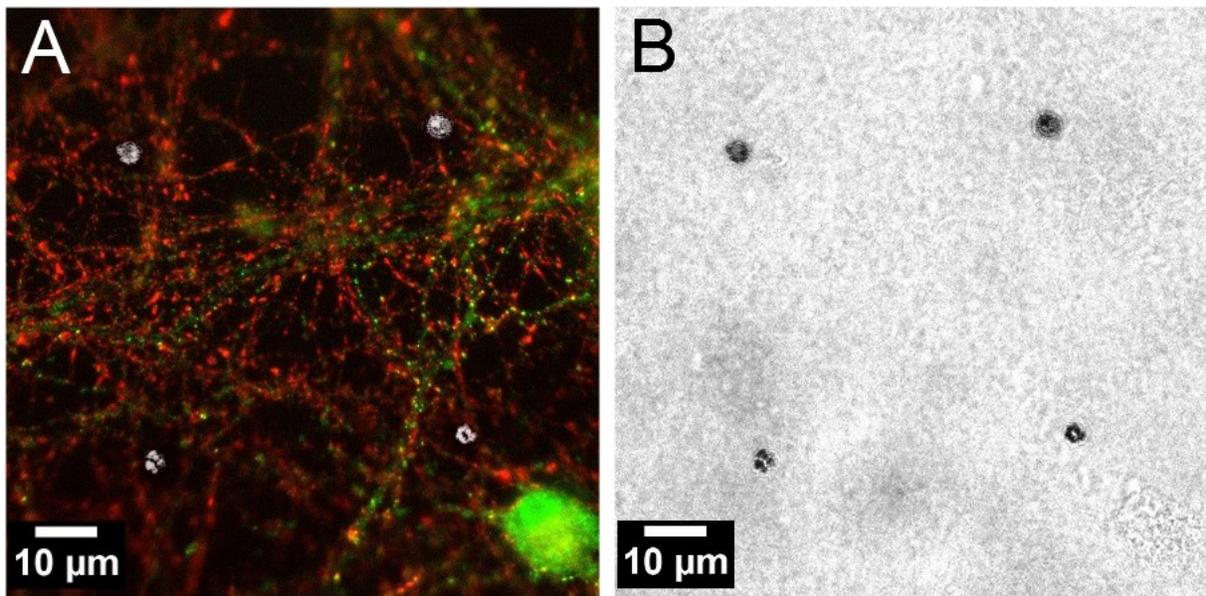


Figure 22. Structures de polymère et d'argent en culture avec des cellules neuronales (A). En vert la PSD95 et en rouge la synaptophysine. Image correspondante en transmission en (B).

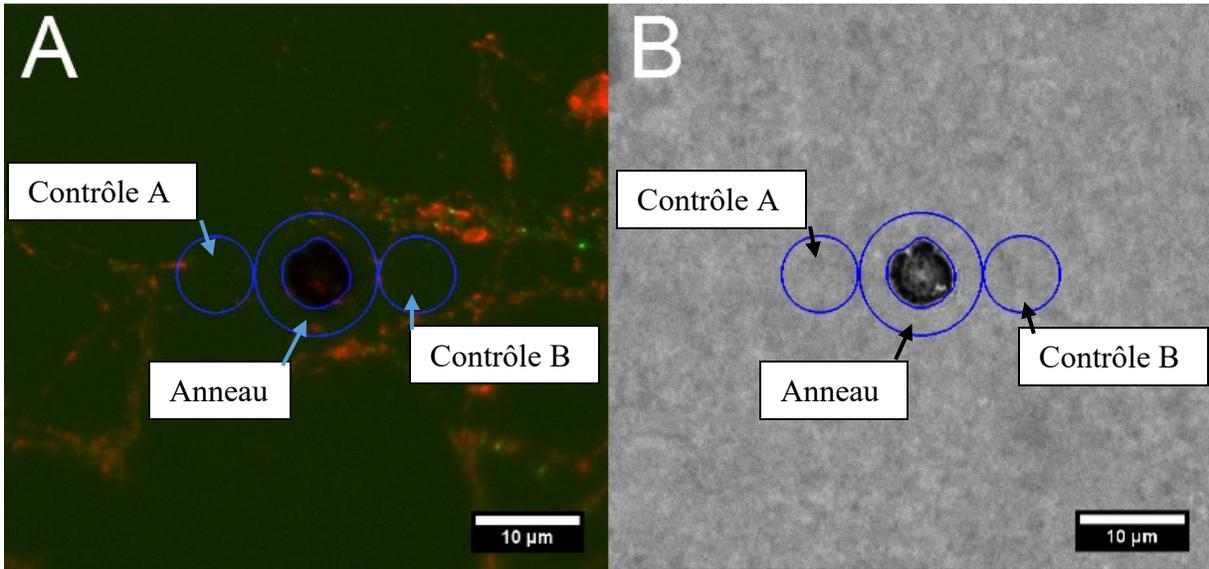


Figure 23. Exemple de zones pour l'analyse de la fluorescence. Fluorescence en A et transmission en B.

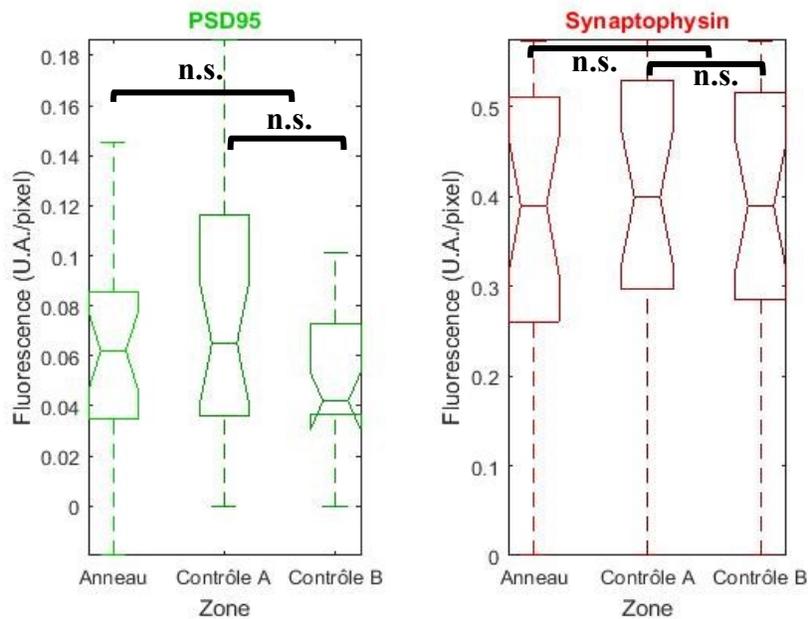


Figure 24. Comparaison de la fluorescence entre les anneaux et les zones de contrôle en fonction de la protéine associée, (n.s. : $p > 0.1$).

Les échantillons imagés et présentés sur la figure 22 sont analysés en comparant la fluorescence entre différentes zones autour des structures. Démontré sur la figure 23. Elle montre un exemple de la technique d'analyse. Plus précisément, la fluorescence est analysée en comparant une région (anneau délimité en bleu) directement autour des structures d'argent et de polymère avec une zone de contrôle d'aire similaire adjacent à cet anneau. La fluorescence de chacune des régions est normalisée par le nombre de pixels inclus dans la région correspondante, et ce pour la fluorescence associée à la streptavidine et la PSD95. Dans chacun des cas, les valeurs ne sont pas significatives (Figure 24). Une faible proportion des points ou structures sont analysables soit 25 sur 113, car beaucoup sont trop petits ou endommagés et ne sont pas visibles ou partiellement visibles pour la reconnaissance d'image. L'introduction des nanoparticules d'argent rend le polymère plus opaque et rend ainsi plus difficile la polymérisation homogène du polymère NOA61. De plus, avec les nanoparticules d'argent, le rinçage est très difficile et demande un premier rinçage beaucoup plus important et vigoureux pour enlever la majorité du polymère excédant. Cela augmente les risques de dommages aux structures.

3.2.1.3 NOA61 et MWCNT

Objectif de 0.95 O.N.

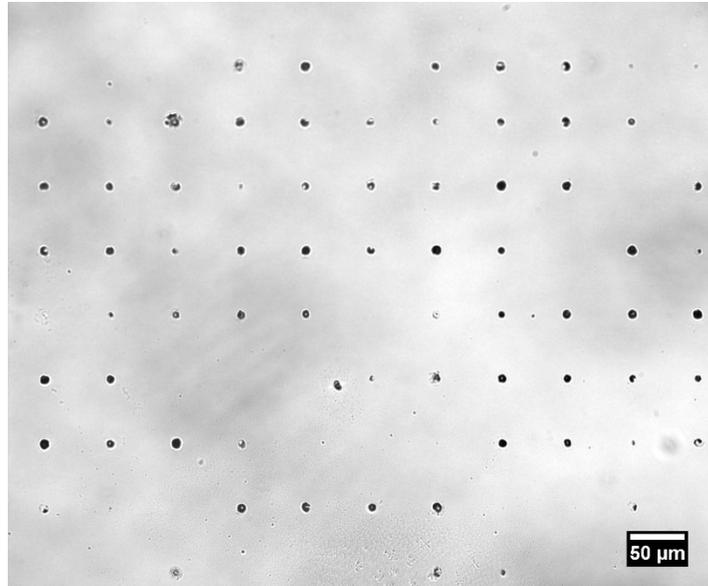


Figure 25. Structures de polymère NOA61 et de nanotube de carbone (MWCNT, 1wt%). Objectif de 0.95 O.N.

La figure 25 dévoile les structures de polymère et nanotubes de carbone (1wt%) utilisant un objectif de 0.95 O.N., 25mW de puissance et 300 ms d'exposition par structure. Les structures ont un diamètre de $5.0 \pm 0.5 \mu\text{m}$ et une hauteur de $4 \pm 1 \mu\text{m}$. Ces structures sont ensuite mises en culture avec des cellules neuronales.

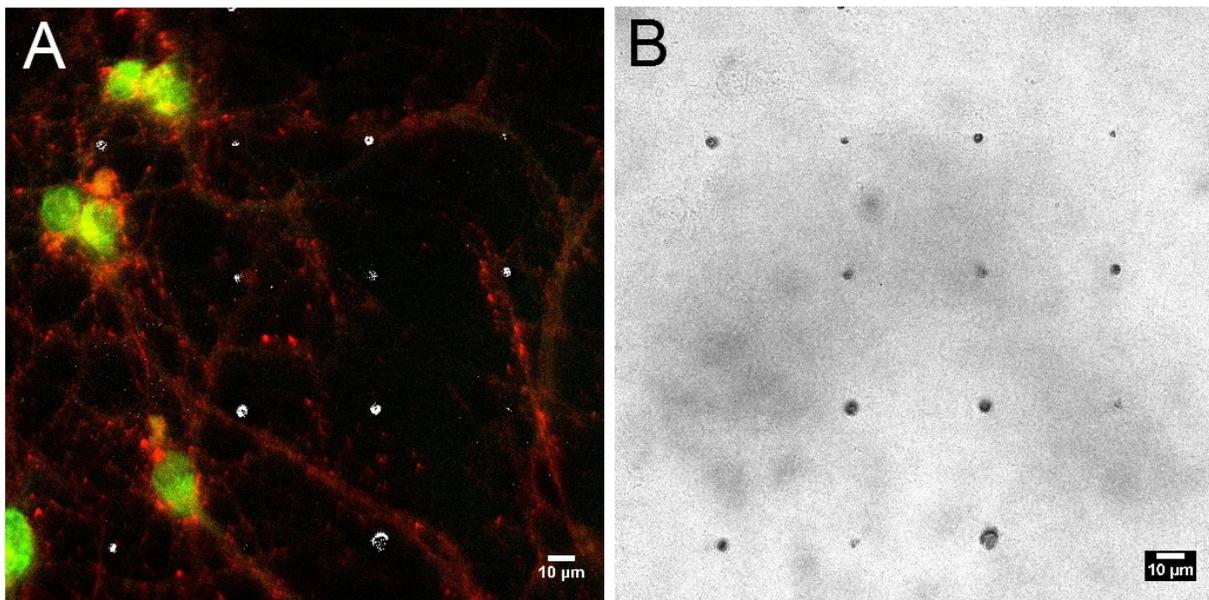


Figure 26. Structure de polymère avec MWCNT en culture avec des cellules neuronales (A). En vert la PSD95 et en rouge la synaptophysine. Image en transmission en (B).

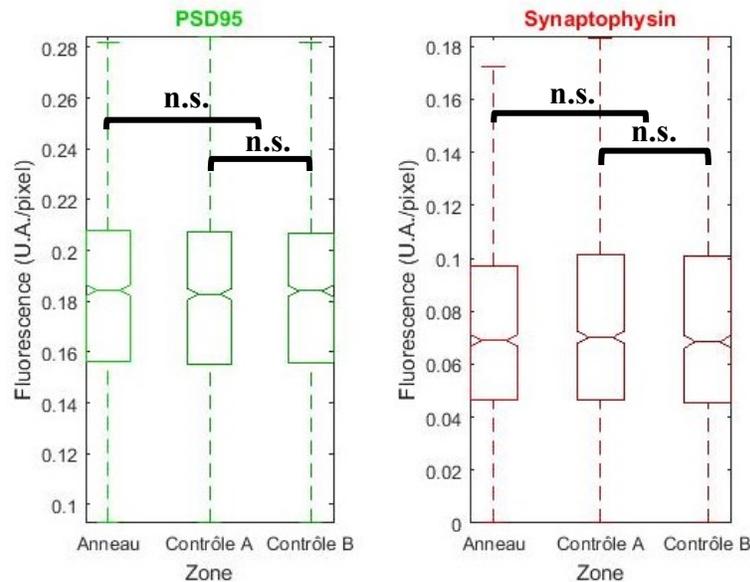


Figure 27. Comparaison de la fluorescence entre les anneaux et les zones de contrôle en fonction de la protéine associée, (n.s. : $p > 0.1$).

Les fluorescences ont été analysées de la même façon que précédemment en comparant toujours une région (anneau) directement autour des structures d'argent et de polymère (figure 22 A, B) avec une zone de contrôle d'aire similaire adjacente à cet anneau. La fluorescence de chacune des régions est toujours normalisée par le nombre de pixels inclus dans la région correspondante, et ce pour la fluorescence associée à la streptavidine et la PSD95. Ici aussi, dans chacun des cas les valeurs ne sont pas significatives (Figure 27). Une proportion acceptable des points sont analysables, soit 1232 sur 3384, et beaucoup sont trop petits ou endommagés et ne sont pas visibles ou partiellement visibles pour la segmentation. Le rinçage est encore ici très difficile et demande un premier rinçage beaucoup plus important et vigoureux pour enlever la majorité du polymère excédant.

Objectif de 0.75 O.N.

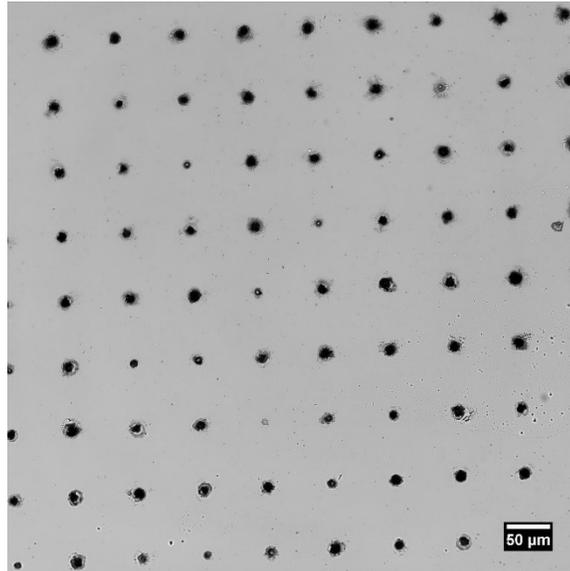


Figure 28. Structures de polymère NOA61 et de nanotube de carbone (MWCNT), 1wt%) avec un objectif de 0.75 O.N.

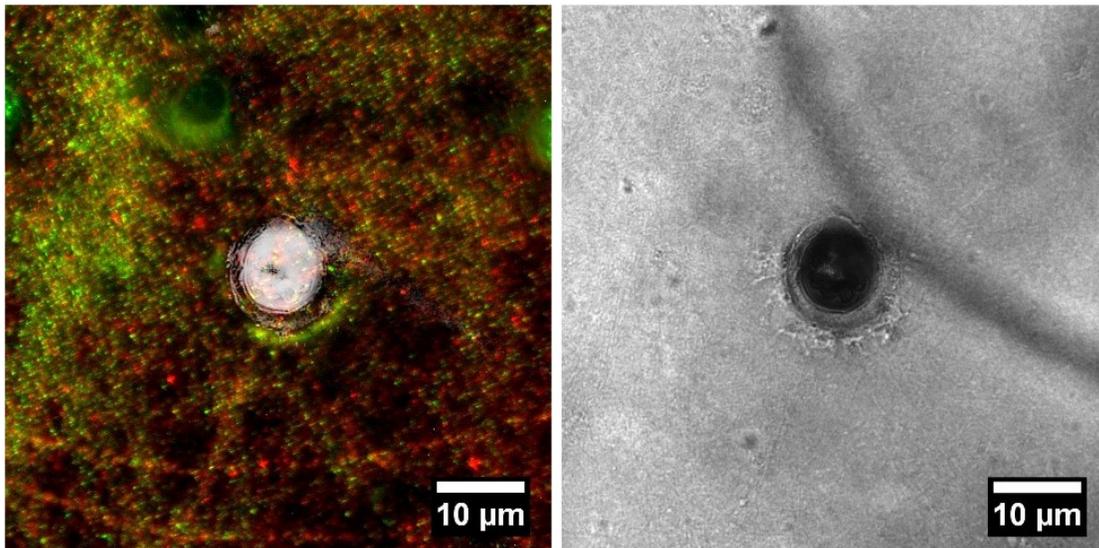


Figure 29. Structure de polymère et MWCNT en culture avec des cellules neuronales (gauche). En vert la PSD95 et en rouge la synaptophysine. Image en transmission (droite).

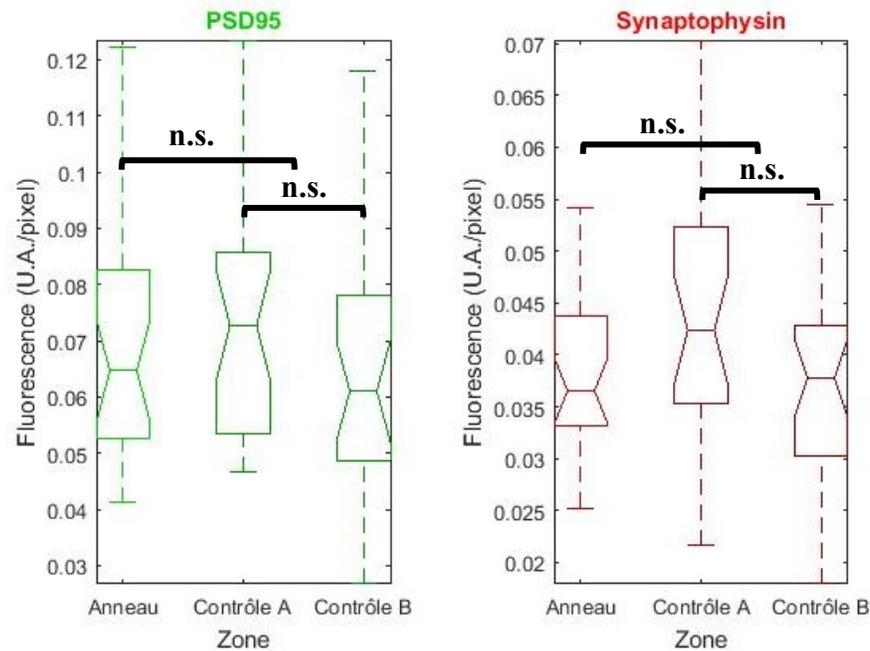


Figure 30. Comparaison de la fluorescence entre les anneaux et les zones de contrôle en fonction de la protéine associée, (n.s. : $p > 0.1$).

La figure 24 dévoile les structures de polymère et nanotubes de carbone (1wt%) réalisées avec un objectif de 0.75 O.N., 200mW de puissance et 300 ms d'exposition par structure. Les structures ont un diamètre de $13 \pm 2\mu\text{m}$ et d'une hauteur de $6 \pm 1\mu\text{m}$. Ces structures sont ensuite mises en culture avec des cellules neuronales. La fluorescence a été analysée toujours de la même façon que précédemment en comparant une région (anneau) directement autour des structures d'argent et de polymère (figure 29 A, B) avec une zone de contrôle d'aire similaire adjacent à cet anneau. La fluorescence de chacune des régions est normalisée par le nombre de pixels inclus dans la région correspondante, et ce pour la fluorescence associée à la streptavidine et la PSD95. Dans chacun des cas, les valeurs ne sont pas significatives, et ce même si certaines structures montrent une accumulation de streptavidine et PSD95 (figure 30). Encore une fois, une faible proportion des points sont analysables soit 26 sur 44, car beaucoup sont trop petits ou endommagés et ne sont pas

visibles ou partiellement visibles pour la segmentation. Le rinçage est toujours ici très difficile.

Les structures polymères réalisées avec différentes ouvertures numériques ont une relation avec leurs tailles. La figure 31 montre que si l'ouverture numérique augmente, la taille des points diminue. Ce qui est logique puisque la taille de la surface illuminée est inversement proportionnelle à l'ouverture numérique.

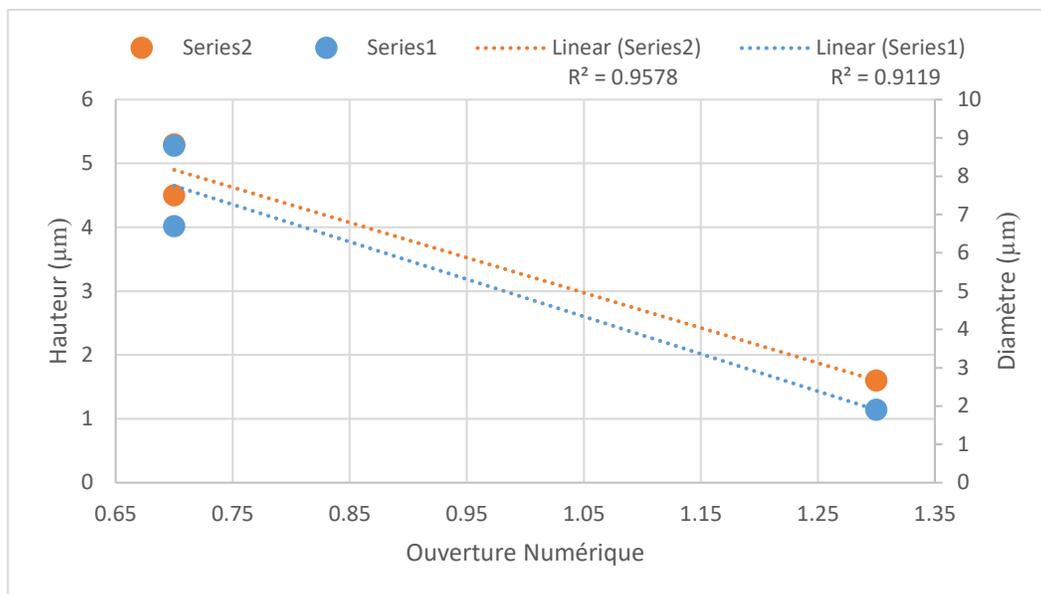


Figure 31. Taille moyenne des structures de NOA61 en fonction de l'ouverture numérique.

3.2.1.4 Résistivités des composites, méthode directe

Pour s'assurer que les matériaux sont conducteurs on estimera la résistance utilisant : $\rho = R \cdot A / L$. La résistivité (ρ) est mesurée sur une ligne de polymère durci aux U.V. Et en mesurant la longueur (L), la section (A) et la résistance (R) par contact d'un ohmmètre connecté à un ordinateur et en utilisant un programme LabVIEW.

Tableau I. Estimation des résistivités des composites des polymères dopés avec différents matériaux et concentrations

Matériaux	Concentration wt.%	Résistivité S·m
Argent	13.2	<0.005
Argent	6.1	<0.005
Argent	3.3	<0.01
MWCNT	1	<0.005

Les valeurs de résistivité sont obtenues suite à une estimation de la longueur et de la section des lignes de polymères mesurés des images en transmissions. Et elles ont été réalisées à titre indicatif pour déterminer si les composites sont conducteurs ou non. Les valeurs sont majorées et imprécises, mais elles nous permettent de savoir l'ordre de grandeur des résistivités.

3.2.2 Méthode directe

En parallèle à la méthode indirecte, la méthode directe était toujours à l'esprit. Éventuellement, on veut réaliser des structures sur des matériaux des électrodes neuronales comme l'or ou le silicium, deux matériaux non transparents.

3.2.2.1 Patron de polymère NOA61

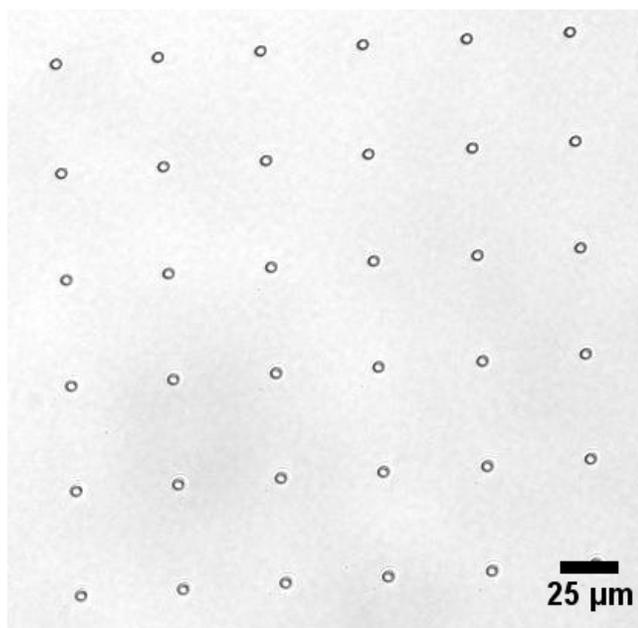


Figure 32. Structures de polymère NOA61 réalisé avec un objectif de 0.7 d'ouverture numérique.

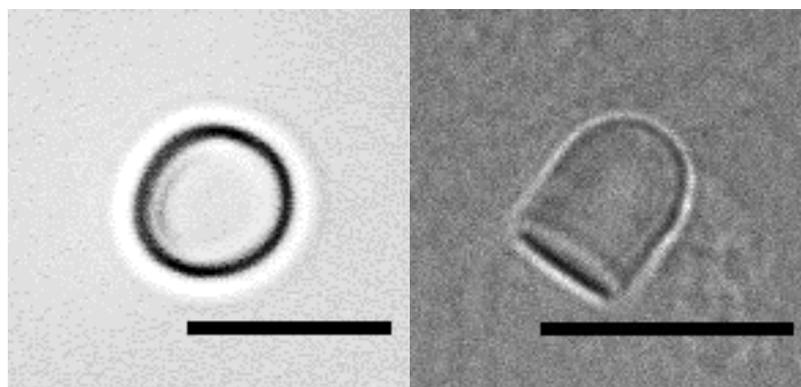


Figure 33. Structure de polymère NOA61 vue de haut (gauche) et de côté (droite) en transmission, barre d'échelle de 10μm

Les structures réalisées avec le polymère NOA61 (figure 32, 33) et 500 mW ont une hauteur moyenne de $6.7 \pm 0.8 \mu\text{m}$ et un diamètre à mi-hauteur moyen de $5.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$. Les dimensions ont été évaluées en utilisant les images de microscopie en transmission (figure 33). Une grande proportion des points sont analysables soit 1076 sur 1089. Le rinçage du polymère est facilement réalisable et est presque instantané, et il demande qu'un seul rinçage. Les points sont encore ici placés en cultures avec les cellules neuronales pendant 14 jours. De plus, on a divisé les échantillons en deux sections selon ce qui est immunomarcqué : Tubuline/Synaptophysine ou Tubuline/PSD95.

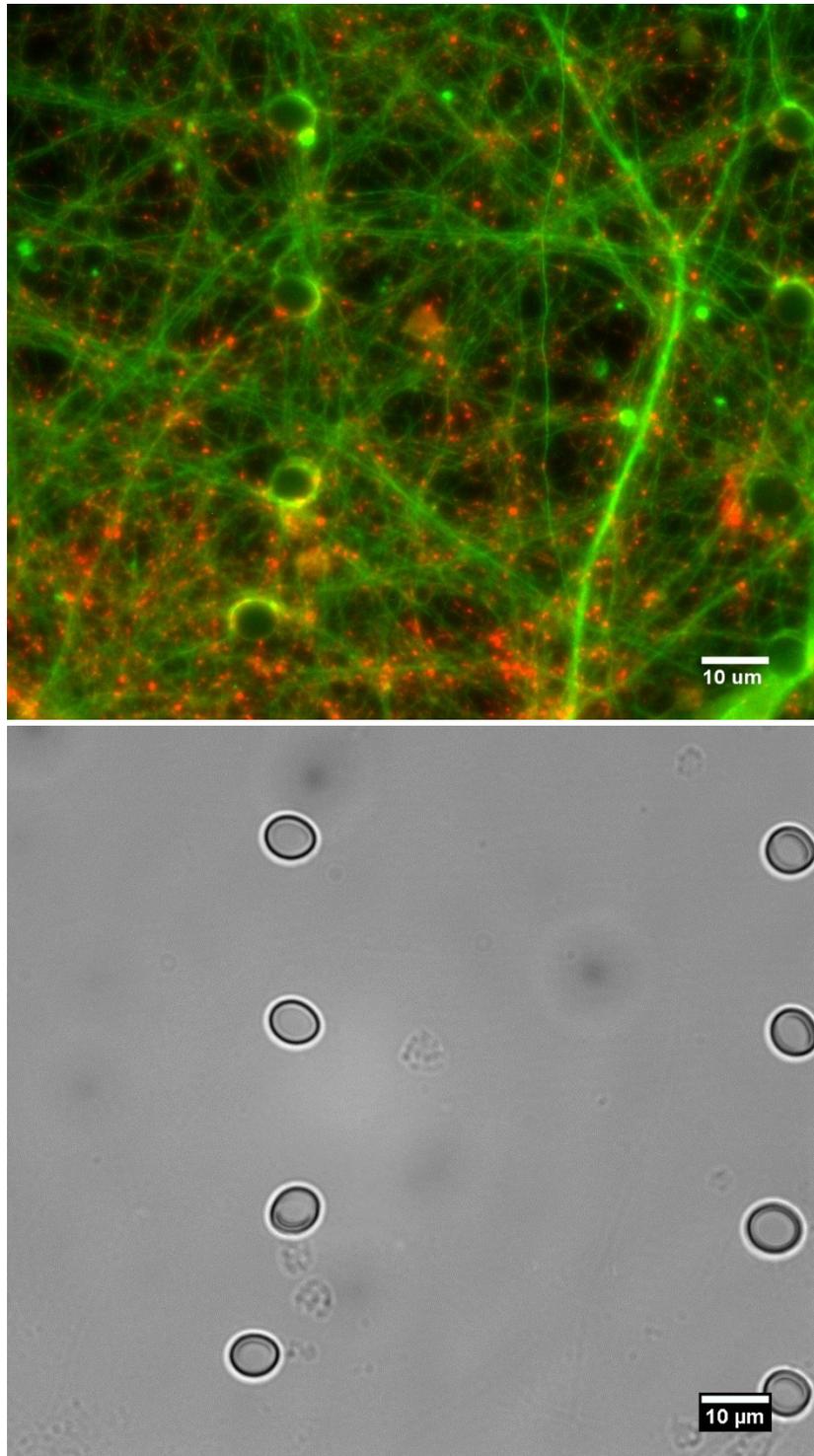


Figure 34. Fluorescence de la tubuline en vert et de la synaptophysine en rouge. Image en transmission associée en gris.

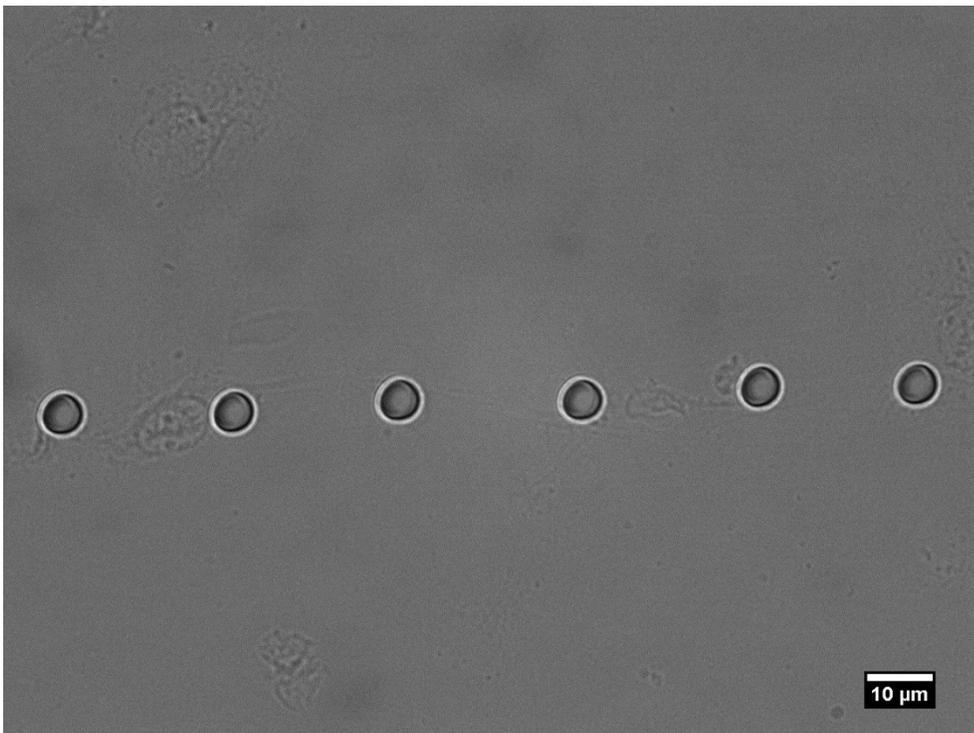
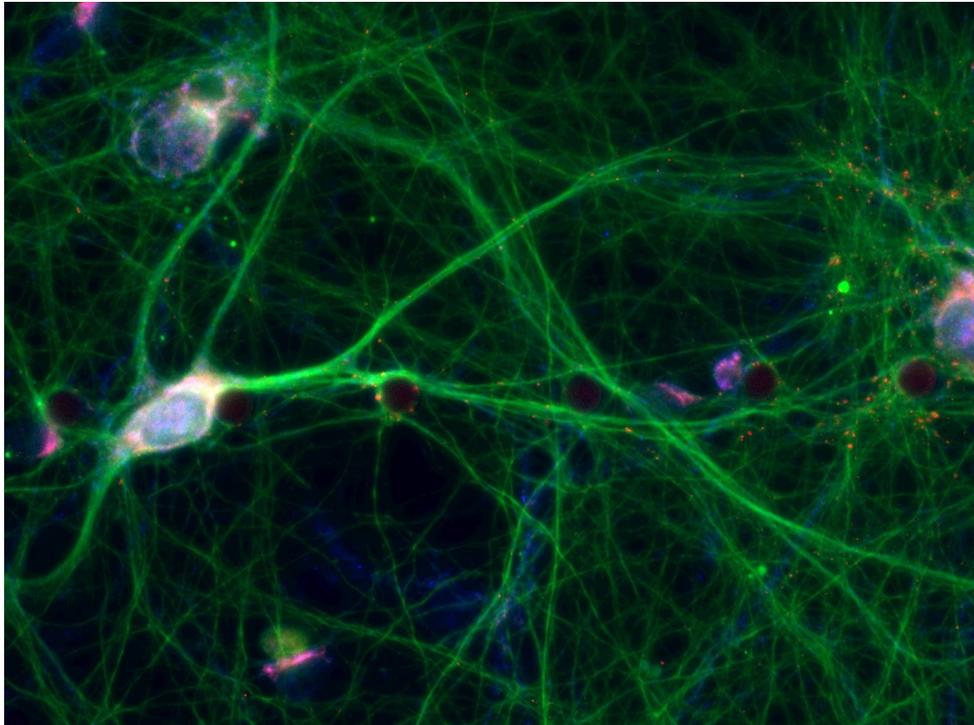


Figure 35. Fluorescence de la tubuline en vert, de la PSD95 en rouge et de MAP2 en bleu. Image en transmission associée en gris.

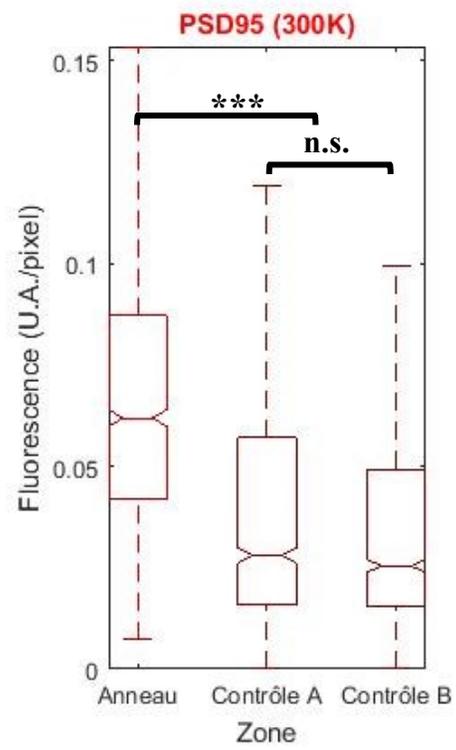
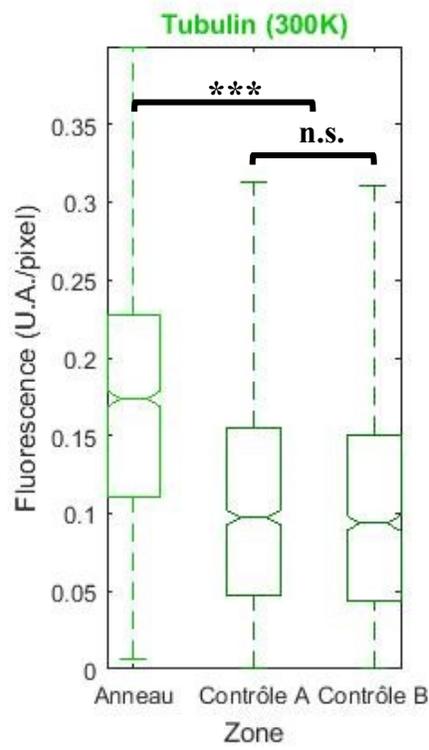
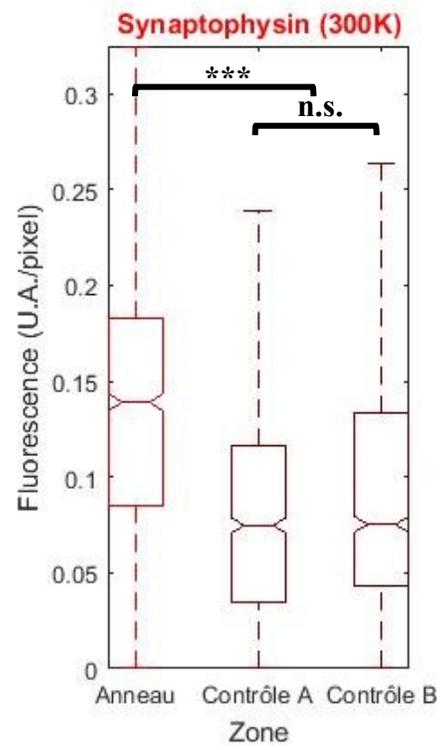
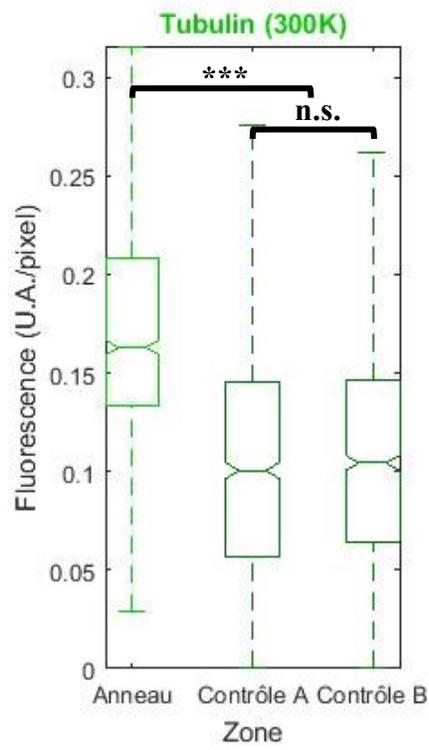


Figure 36. Comparaison de la fluorescence entre les anneaux et les zones de contrôle en fonction de la protéine associée pour la synaptophysine, la PSD95 et la tubuline, (n.s. : $p > 0.1$), (***) : $p \leq 0.01$).

Nos premières observations sur la figure 34 sont les anneaux fluorescents en vert pour la tubuline et l'addition en jaune avec la synaptophysine en rouge. Elles sont plus importantes que celles des structures longiformes correspondantes aux synapses entre neurones ou aux éléments correspondants à l'intérieure des cellules. La figure 35 représente l'échantillon sur lequel la PSD95 a été marquée, on observe plus difficilement la présence de la PSD95. Comme expliqué dans la méthode, pour s'assurer de la présence de PSD95 et de synaptophysine s'accumulant autour des structures, on utilise la même technique d'analyse que précédemment. On a utilisé le masque de la fluorescence de la tubuline pour s'assurer que la fluorescence de la synaptophysine et la PSD95 provient que des neurones. La figure 36 sont les résultats de l'analyse des fluorescences autour des structures, dans les cas de la synaptophysine, de la tubuline et de la PSD95. Les valeurs sont ici toutes statistiquement significatives avec $p \leq 0.01$, traduisant une stimulation de la formation de jonctions synaptiques.

3.2.2.2 Structure de PVP et d'argent

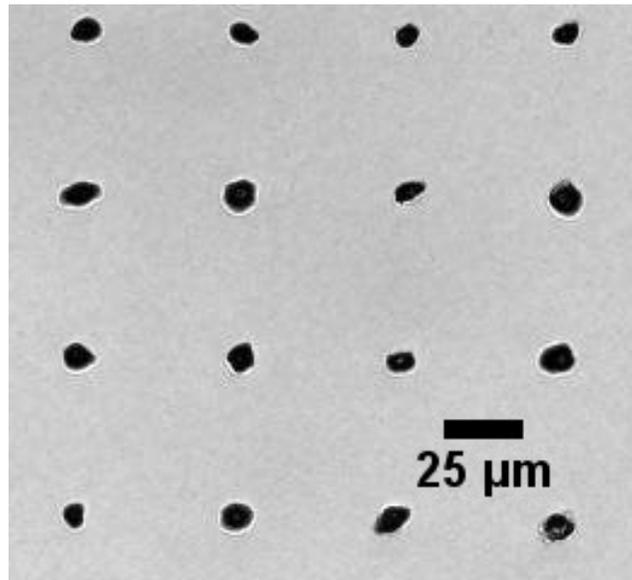


Figure 37. Structure de PVP et nitrate d'argent.

Mesure de la conductivité

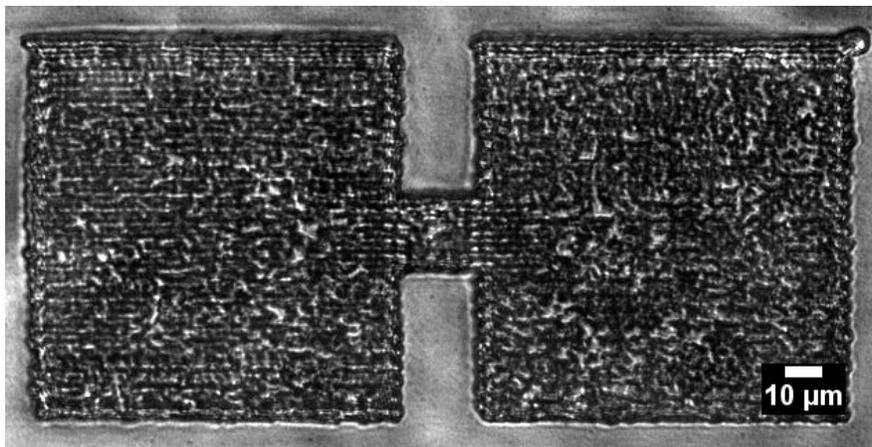


Figure 38. Patron typique utilisé pour mesurer la conductivité du polymère de PVP et argent.

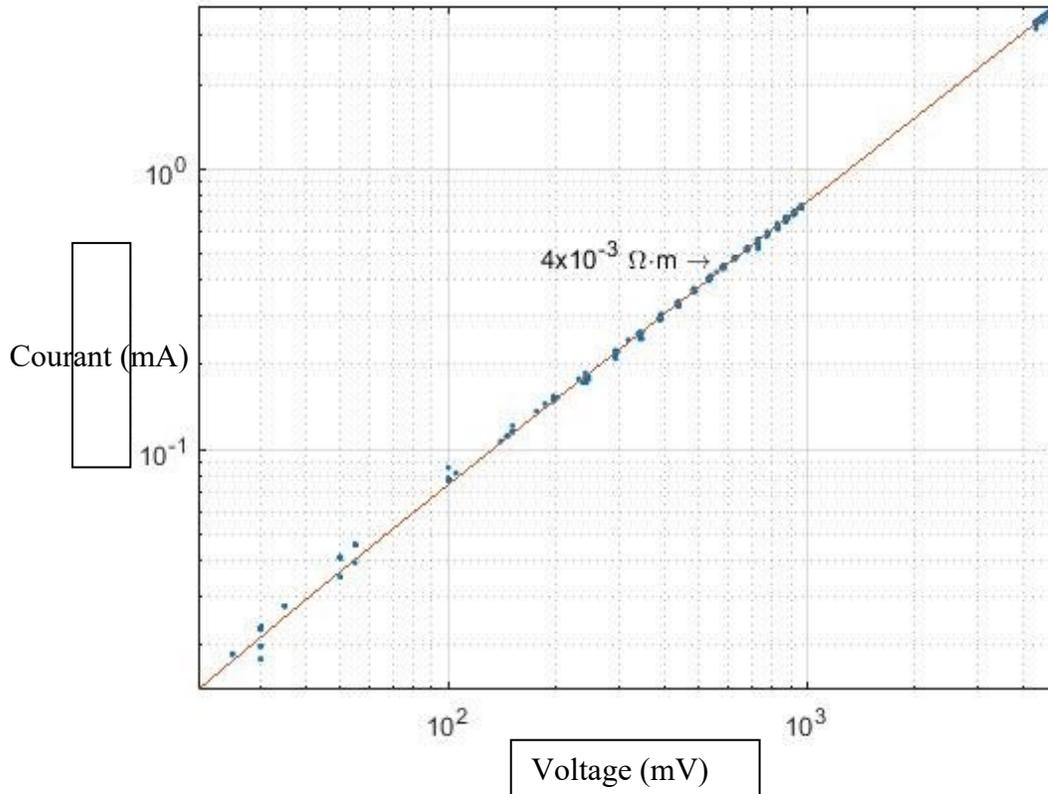


Figure 39. Courbe I-V pour le polymère de PVP et argent.

La résistivité du polymère de PVP et d'argent a été évaluée en mesurant le courant et le voltage dans une structure connue de dimension connue liée par deux électrodes faites des mêmes matériaux (figure 38) réalisée dans la méthode indirecte. La vitesse de traçage a été ajustée à 0.005 mm/s avec un objectif de 0.7 O.N et la puissance à 17mW. Le pont a une longueur et largeur de 20 μ m et une épaisseur de 3.0 \pm 0.5 μ m, mesuré par l'autofluorescence du PVP avec un microscope confocal. Le PVP a la caractéristique d'avoir une faible fluorescence si assez de lumière est appliquée entre 400 et 600nm. Le voltage est mesuré avec un convertisseur analogique numérique (Labjack, U3-HV), un système d'acquisition automatique des données qui permet une entrée et une sortie de 0 à 5 volts. Aussi, une résistance variable a été utilisée pour mesurer une grande variété de courant. La courbe courant-voltage (I-V) est obtenue (figure 39) en variant le voltage et en mesurant le courant. Et en connaissant les dimensions du pont et le taux de variation de cette droite on calcule la conductivité qui est de

$4 \times 10^{-3} \Omega \cdot m$. Cette valeur est plus grande que celle de l'argent à $1.59 \times 10^{-8} \Omega \cdot m$ (Maruo & Saeki, 2008).

Structures en culture

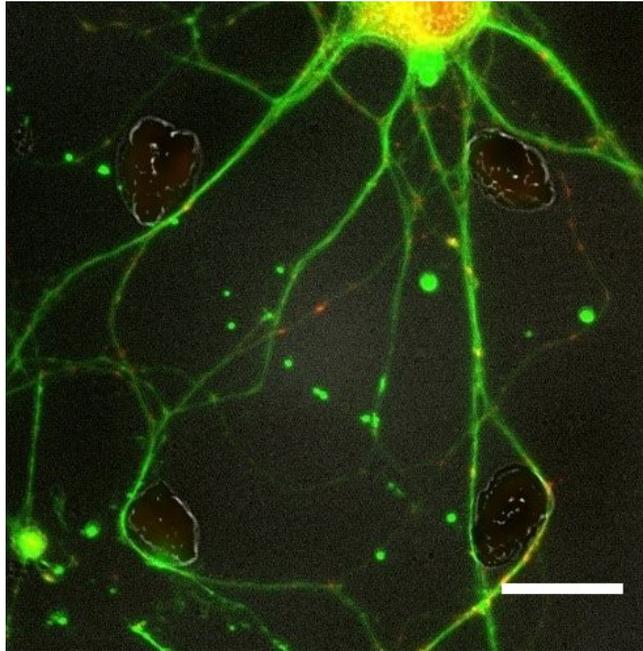


Figure 40. Fluorescence de la tubuline en vert, de la synaptophysine en rouge et transmission en gris. Barre d'échelle de $10 \mu m$.

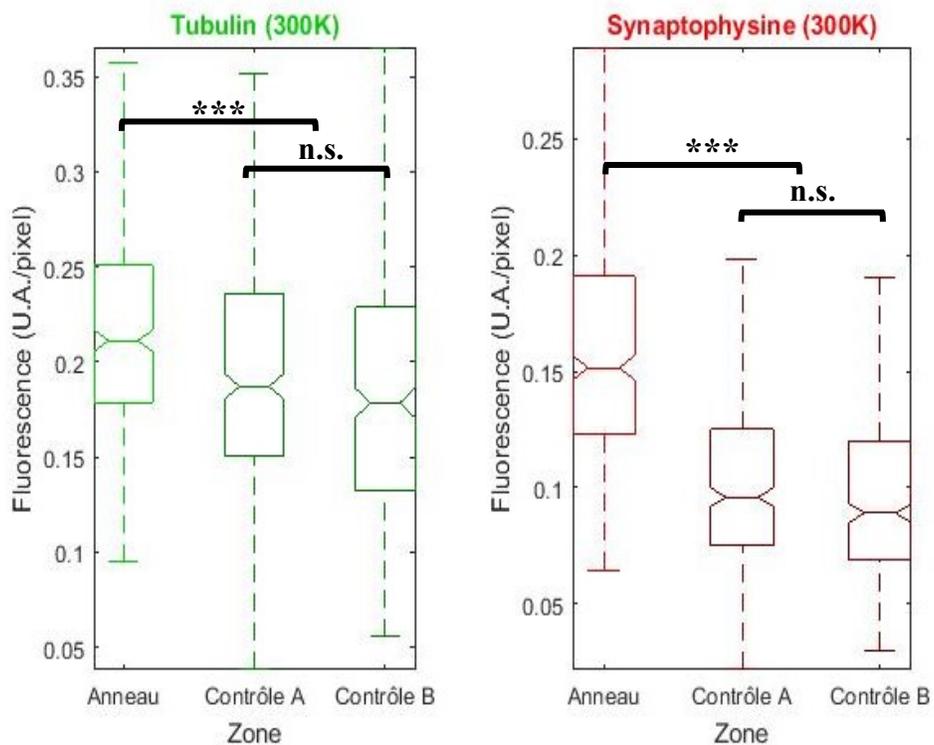


Figure 41. Comparaison de la fluorescence entre les anneaux et les zones de contrôle en fonction de la protéine associée pour la synaptophysine et la tubuline, (n.s. : $p > 0.1$), (***) : $p \leq 0.01$).

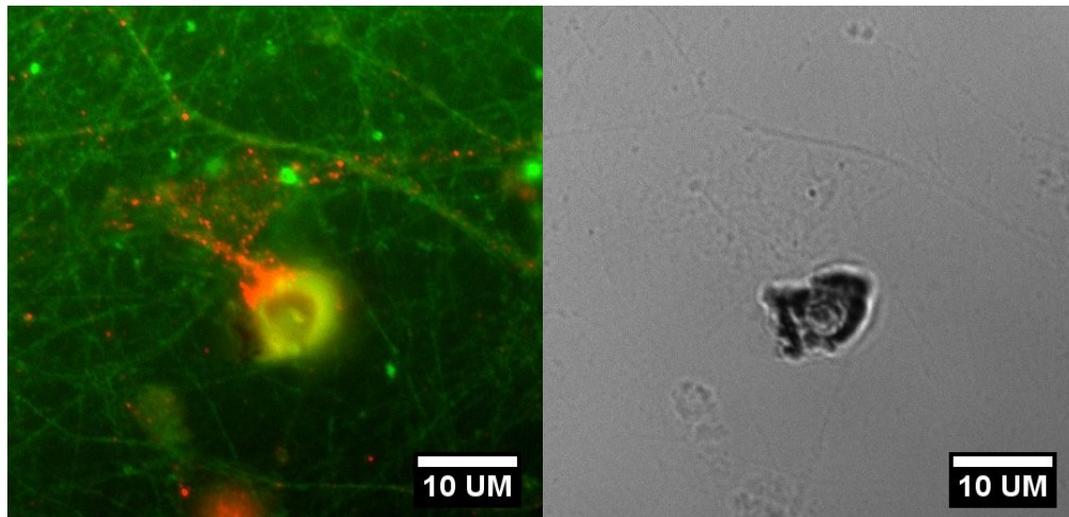


Figure 42. Fluorescence de la tubuline en vert et de la PSD95 en rouge, et image en transmission associée.

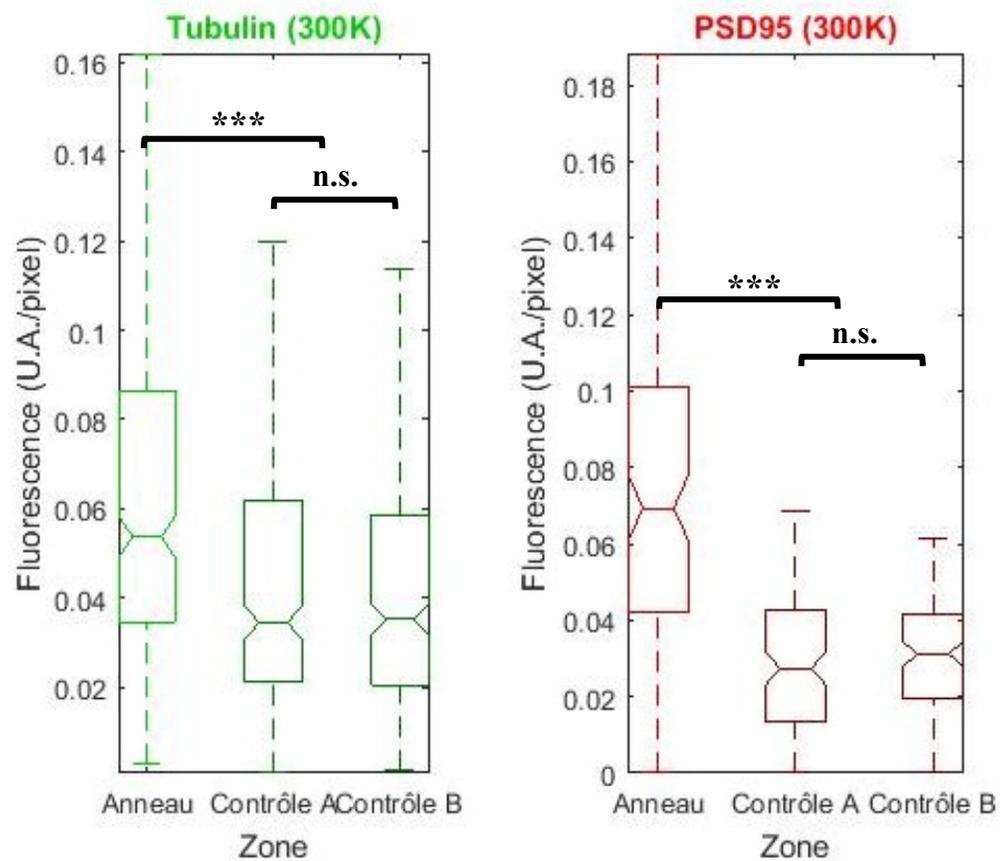


Figure 43. Comparaison de la fluorescence entre les anneaux et les zones de contrôle en fonction de la protéine associée pour la PSD95 et la tubuline, (n.s. : $p > 0.1$), (***) : $p \leq 0.01$).

Les points de structures réalisés avec le composite d'argent et de PVP et un objectif de 0.7 O.N. ont une hauteur moyenne de $4.5 \pm 0.6 \mu\text{m}$ et un diamètre moyen à mi-hauteur de $8.8 \pm 1.6 \mu\text{m}$. Les cultures cellulaires sur les points de structures ont été imagées en utilisant un microscope Zeiss motorisé avec une caméra monochrome AxioCam MRm. Les différentes fluorescences ont été analysées en comparant une région (anneau) directement autour des structures avec une zone de contrôle. La fluorescence de chacune des régions a été normalisée par le nombre de pixels inclus dans cette région et la fluorescence pour la synaptophysine et la PSD95 sont limitées par le masque des régions de fluorescence de la tubuline mesurée par un seuil adaptatif. Une quasi parfaite proportion des points sont analysables soit 369 sur 400 en moyenne. Les données pour chaque échantillon de polymère ont 1089 structures, et pour les structures de PVP et d'argent 400 structures ont été initialement créées. Dans chacun des cas, on observe une différence significative de la fluorescence pour la tubuline, la synaptophysine représentant les jonctions présynaptiques et la PSD95 les jonctions post-synaptiques.

Le PVP et le nitrate d'argent se détachent bien avec un court rinçage et suivi d'un rinçage de 30 minutes pour s'assurer de bien éliminer les résidus. Ce rinçage est plus facilement réalisable comparativement au polymère NOA61 avec les nanoparticules d'argent ou les MWCNT.

3.3 Discussion

3.3.1 Méthode indirecte

La méthode indirecte pour réaliser des structures de polymère nous a permis de réaliser différentes structures de plusieurs tailles selon les différentes caractéristiques utilisées. Les structures de polymère NOA61 ont un diamètre à leurs bases de $1,9 \pm 0,70\mu\text{m}$ avec un objectif d'ouverture numérique de 1.3. Les structures de NOA61 avec des nanoparticules d'argent de $1\mu\text{m}$ à 6wt% ont un diamètre de $7.7 \pm 1.8\mu\text{m}$ avec un objectif de 0.95 O.N. Le polymère NOA61 avec des MWCNT à 1wt% nous donnent des structures de $5.0 \pm 0.5\mu\text{m}$ de diamètre avec un objectif de 0.95 O.N. et un diamètre de $13 \pm 2\mu\text{m}$ avec une O.N. de 0.75. Ces différentes valeurs ont été représentées sur la figure 31 et ils traduisent que la taille est inversement proportionnelle à l'ouverture numérique utilisée. Celle-ci est liée à la limite de diffraction qui limite la résolution, soit la plus petite surface possible à illuminer. Donc, il est possible de créer des structures de la taille des billes utilisées pour les expériences dans le but de stimuler la formation de jonctions synaptiques. (Batista et al., 2017; Gopalakrishnan et al., 2010; Lucido et al., 2009; Magdesian et al., 2017) Ces billes ont une taille rapportée autour de $5\mu\text{m}$.

Pour les structures d'argent et de MWCNT on obtient une résistivité évaluée à $< 0.005 \text{ S}\cdot\text{m}$. Ce qui confirme en partie notre seconde hypothèse. Cependant, cette résistivité limite la capacité de nos électrodes pour la stimulation, mais surtout pour l'enregistrement de signaux électriques, car un circuit avec une grande résistance est généralement plus sensible au bruit. Du fait qu'un faible courant produira un plus grand bruit sur le voltage dans une grande résistance.

Toutes les structures réalisées semblent être adhérentes aux surfaces et biocompatibles pour permettre l'analyse après 14 jours en culture avec des cellules neuronales. La capacité des structures à créer des jonctions synaptiques a été évaluée en utilisant la synaptophysine et la PSD95 comme composant pré et post-synaptique. Cependant, dans tous les cas des structures réalisées directement, il n'y a pas d'accumulation considérable de la synaptophysine et de la PSD95. Ce qui invalide notre seconde hypothèse dans cette configuration. La capacité

des points à créer des jonctions synaptiques semble être liée à la qualité des points. Seulement les structures réalisées avec les MWCNT et l'objectif de 0.75 O.N. semblent montrer certaines interactions, mais ne sont pas significatifs statistiquement ($p > 0.1$) par cause d'une trop faible population des points analysables et analysés au total. De plus, le rinçage de ces composites de nanoparticules d'argent et de MWCNT est plus difficile comparativement au polymère NOA61 utilisé seul. Ces rinçages sont nécessaires pour éliminer le polymère non durci. La demande de rinçage plus nombreux peut expliquer une dégradation des structures. Cela se voit lorsque l'on analyse les structures, soit une proportion trop petite ou trop endommagée pour être reconnue et analysée par notre segmentation. Bref, l'étude statistique de la fluorescence autour de ces structures en regard avec les différentes zones de contrôle ne sont pas significatives ($p > 0.1$) dans le respect que les zones de contrôle sont invariantes entre elles.

3.3.2 Méthode directe

Les structures de NOA61 réalisées de façon directe avec un objectif de 0.7 O.N. ont une hauteur moyenne de $6.7 \pm 0.8 \mu\text{m}$ et un diamètre à mi-hauteur moyen de $5.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$. Les structures de PVP et d'argent réalisés avec la même O.N. ont une hauteur moyenne de $4.5 \pm 0.6 \mu\text{m}$ et un diamètre moyen à mi-hauteur de $8.8 \pm 1.6 \mu\text{m}$. Dans les deux cas, les proportions des structures retrouvées pour analyse sont très grandes. Ce qui se traduit par une qualité des points et un faible nombre de points ou structures endommagés. Et ce parce que les rinçages sont très simples et facilement réalisables. Mais, la variabilité dans la taille est plus importante pour les structures de PVP que pour le polymère NOA61. Comparativement au NOA61, la puissance est beaucoup plus faible pour le PVP, 17mW contre 500mW. La variabilité de la taille des structures d'argent est liée à la qualité de la photo-réduction et à la concentration de nitrate d'argent. Cette concentration est variable à l'intérieur du PVP entraînant des variations sur la taille des points. La puissance est très importante pour la polymérisation ou la photo-réduction. L'utilisation d'une trop grande puissance limiterait la capacité de créer les structures sur ces surfaces sans les endommager.

Pour ce qui est de la résistivité, celle du composite de PVP et d'argent a été évaluée précisément avec une structure bien déterminée et caractérisée avec une courbe I-V. La

résistivité est déterminée par la pente de la courbe I-V et est de $4 \times 10^{-3} \Omega \cdot m$. Elle est plus grande que celle de l'argent à $1.59 \times 10^{-8} \Omega \cdot m$ (Maruo & Saeki, 2008). Mais aussi, elle est plus grande que Maruo et coll. obtenue avec un protocole similaire: $1.81 \times 10^{-6} \Omega \cdot m$. Et, elle est plus grande du fait que le polymère a séché à température pièce plutôt que d'être cuit au four à haute température. Cela se traduit par une concentration plus faible de l'argent dans notre protocole, car l'eau restante dans la solution de PVP et de nitrate d'argent est plus importante. Donc, la variation dans la taille des structures de PVP et d'argent peut être attribuable à la quantité et la distribution du nitrate d'argent à l'intérieur de la matrice de PVP. Cette résistivité limite l'utilisation de ces électrodes, car une grande résistivité demande pour un même courant d'appliquer un voltage plus grand, qui est limité par le circuit utilisé. Et de même, une grande résistivité augmente le bruit des signaux électriques recueillis comme mentionné précédemment; un circuit avec une grande résistance est généralement plus sensible au bruit, car un faible courant au travers une grande résistance produira un plus grand bruit sur le voltage.

Dans la configuration directe, les structures conductrices et ainsi que les structures non conductrices ont toutes deux la capacité de créer des jonctions synaptiques sur leur surface. Ce qui confirme notre seconde question de recherche. En effet, l'analyse des régions adjacentes des structures vis-à-vis deux zones de contrôles nous apporte une augmentation significative de tubuline, de la synaptophysine et de la PSD95. Ceci signifie que les structures stimulent les neurones par un remodelage du cytosquelette qui inclut la tubuline, mais aussi la création de jonction pré et post-synaptique indiquée par l'accumulation de la synaptophysine et de la PSD95. Cette analyse se limite à la fluorescence autour des points et non sur les points. Cette configuration permet d'éviter d'inclure l'auto fluorescence du NOA61 ou du PVP dans l'analyse. Mais en même temps, cette analyse sous-estime la fluorescence dans le cas où il y a de la fluorescence sur les structures.

La stimulation et la formation de jonctions synaptiques sur les différentes structures ne semblent pas être liées à la taille, mais à la qualité des structures réalisées. En effet, avec le polymère d'argent ou de nanotubes de carbone, les structures ont des tailles irrégulières et variables, mais aussi beaucoup de ces points semblent endommagés. La difficulté du rinçage

et le besoin d'en réaliser un plus grand nombre affectent la qualité des structures et accentuent leurs dégradations.

Pour les structures réalisées avec le polymère NOA61 seul, les structures ont une taille qui varie peu en comparaison aux composites de nanoparticules d'argent et nanotube. Le fait d'ajouter des particules dans le polymère limite la capacité du laser à illuminer efficacement un volume résultant en une variation de la forme et de la qualité des structures qui dépendent aussi de la qualité de l'homogénéité des particules à l'intérieur de la matrice du polymère.

Ces structures de NOA61 et de PVP/argent semblables aux billes dans leurs tailles sont différentes dans leur forme. Elles montrent qu'il est possible de stimuler la formation de jonctions synaptiques sur des structures autres que des sphères. Cela est une observation plus détaillée de l'interaction des neurones avec différentes topographies, car des formes comme les nanofils ou piliers agissent comme une terminaison plutôt qu'une prolongation de l'élongation des axones. Ces structures peuvent spécifier les sites de contact sur les billes à être dense en zones d'adhérences. (Kang et al., 2016; Micholt et al., 2013; Xie et coll., 2010) Dans notre cas, elles permettent aussi la formation de jonctions synaptiques.

4. Conclusion

Pour pouvoir améliorer la connexion des neurones sur les surfaces ou les électrodes, il était envisagé d'utiliser des structures micrométriques rondes en forme de billes. On a démontré ici que l'utilisation directe de méthode optique peut être utilisée pour implémenter des surfaces transparentes ou opaques de différentes structures, par nécessairement rondes, micrométriques qui sont conductrices, biocompatibles avec les neurones et qui permettent la création de jonctions pré et post-synaptiques à leur surface. Cependant, on ne sait toujours pas pourquoi les structures micrométriques accroissent la formation de jonction synaptique à leur surface. De plus, cette technique est limitée aux électrodes utilisées *in vitro* comme les électrodes dans une boîte de Pétri et n'est pas adaptée pour des électrodes complexes utilisées pour être implantées dans les expériences *in vivo*. Par la panoplie de différentes combinaisons de polymères et de matériaux possible pour la photo-réduction, il serait possible de créer des structures mieux adaptées, avec une meilleure conductivité et plus précise en taille. Pour ainsi être plus efficace à lier et connecter les neurones. La prochaine étape sera d'améliorer la qualité des structures par leurs formes, mais aussi leurs conductivités. De plus, il sera pertinent de réaliser ces structures sur des ensembles d'électrodes planaires et d'évaluer leurs capacités à communiquer avec les neurones.

Bibliographie

- Arnold, M., Cavalcanti-Adam, E. A., Glass, R., Blummel, J., Eck, W., Kantschler, M., . . . Spatz, J. P. (2004). Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. *Chemphyschem*, 5(3), 383-388. doi: 10.1002/cphc.200301014
- Banker, G., & Goslin, K. (1998). *Culturing nerve cells* (2nd ed.). Cambridge, Mass.: MIT Press.
- Banker, G. A., & Cowan, W. M. (1977). Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res*, 126(3), 397-342.
- Batista, A. F. R., Martinez, J. C., & Hengst, U. (2017). Intra-axonal Synthesis of SNAP25 Is Required for the Formation of Presynaptic Terminals. *Cell Reports*, 20(13), 3085-3098. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.097
- Belisle, J. M., Correia, J. P., Wiseman, P. W., Kennedy, T. E., & Costantino, S. (2008). Patterning protein concentration using laser-assisted adsorption by photobleaching, LAPAP. *Lab Chip*, 8(12), 2164-2167. doi: 10.1039/b813897d
- Belisle, J. M., Kunik, D., & Costantino, S. (2009). Rapid multicomponent optical protein patterning. *Lab Chip*, 9(24), 3580-3585. doi: 10.1039/b911967a
- Belisle, J. M., Mazzaferri, J., & Costantino, S. (2014). Laser-assisted adsorption by photobleaching. *Methods Cell Biol*, 119, 125-140. doi: 10.1016/B978-0-12-416742-1.00007-X
- Bell, J. H. A., & Haycock, J. W. (2012). Next Generation Nerve Guides: Materials, Fabrication, Growth Factors, and Cell Delivery. *Tissue Engineering Part B-Reviews*, 18(2), 116-128.
- Bhandari, R., Negi, S., & Solzbacher, F. (2010). Wafer-scale fabrication of penetrating neural microelectrode arrays. *Biomedical Microdevices*, 12(5), 797-807.
- Bhatti, A., Lee, K. H., Garmestani, H., & Chee, P. L. (2017). *Emerging trends in neuro engineering and neural computation Series in bioengineering* (pp. 1 online resource (x, 264 pages)). Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-3957-7> MIT Access Only
- Burky, R. W. (1980). Formation of apparent presynaptic elements in response to poly-basic compounds. *Brain Res*, 184(1), 85-98.

- Burry, R. W. (1982). Development of apparent presynaptic elements formed in response to polylysine coated surfaces. *Brain Res*, 247(1), 1-16.
- Burry, R. W. (1983). Postnatal rat neurons form apparent presynaptic elements on polylysine-coated beads in vivo. *Brain Res*, 278(1-2), 236-239.
- Cao, Y. Y., Takeyasu, N., Tanaka, T., Duan, X. M., & Kawata, S. (2009). 3D Metallic Nanostructure Fabrication by Surfactant-Assisted Multiphoton-Induced Reduction. *Small*, 5(10), 1144-1148. doi: 10.1002/sml.200801179
- Chia, P. H., Li, P. P., & Shen, K. (2013). Cellular and molecular mechanisms underlying presynapse formation. *Journal of Cell Biology*, 203(1), 11-22.
- Cho, S. H., Lu, H. M., Cauller, L., Romero-Ortega, M. I., Lee, J. B., & Hughes, G. A. (2008). Biocompatible SU-8-Based Microprobes for Recording Neural Spike Signals From Regenerated Peripheral Nerve Fibers. *Ieee Sensors Journal*, 8(11-12), 1830-1836.
- Cogan, S. F., Guzelian, A. A., Agnew, W. F., Yuen, T. G. H., & McCreery, D. B. (2004). Over-pulsing degrades activated iridium oxide films used for intracortical neural stimulation. *Journal of Neuroscience Methods*, 137(2), 141-150.
- Coordinators, N. R. (2017). Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*, 45(D1), D12-D17. doi: 10.1093/nar/gkw1071
- Dent, E. W., & Gertler, F. B. (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron*, 40(2), 209-227.
- Flanagan, L. A., Ju, Y. E., Marg, B., Osterfield, M., & Janmey, P. A. (2002). Neurite branching on deformable substrates. *Neuroreport*, 13(18), 2411-2415.
- Georges, P. C., & Janmey, P. A. (2005). Cell type-specific response to growth on soft materials. *Journal of Applied Physiology*, 98(4), 1547-1553.
- Georges, P. C., Miller, W. J., Meaney, D. F., Sawyer, E. S., & Janmey, P. A. (2006). Matrices with compliance comparable to that of brain tissue select neuronal over glial growth in mixed cortical cultures. *Biophysical Journal*, 90(8), 3012-3018.
- Ghane-Motlagh, B., & Sawan, M. (2013). A Review of Microelectrode Array Technologies: Design and Implementation Challenges. *2013 2nd International Conference on Advances in Biomedical Engineering (Abme 2013)*, 38-41.

- Gomez, N., Chen, S., & Schmidt, C. E. (2007). Polarization of hippocampal neurons with competitive surface stimuli: contact guidance cues are preferred over chemical ligands. *J R Soc Interface*, 4(13), 223-233. doi: 10.1098/rsif.2006.0171
- Gopalakrishnan, G., Thostrup, P., Rouiller, I., Lucido, A. L., Belkaid, W., Colman, D. R., & Lennox, R. B. (2010). Lipid bilayer membrane-triggered presynaptic vesicle assembly. *ACS Chem Neurosci*, 1(2), 86-94. doi: 10.1021/cn900011n
- Goppert-Mayer, M. (2009). Elementary processes with two quantum transitions. *Annalen Der Physik*, 18(7-8), 466-479. doi: 10.1002/andp.200910358
- Gray, E. G. (1959). Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J Anat*, 93, 420-433.
- Gray, E. G., & Whittaker, V. P. (1962). The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J Anat*, 96, 79-88.
- Gurwell, J., Quintero, J., Lamm, J., Slevin, J., Gerhardt, G., & van Horne, C. (2017). Programming Deep Brain Stimulation in the globus pallidus internus for treatment of idiopathic Parkinson's disease: experience at the University of Kentucky. *Movement Disorders*, 32.
- Hada, H., Yonezawa, Y., Yoshida, A., & Kurakake, A. (1976). Photoreduction of Silver Ion in Aqueous and Alcoholic Solutions. *Journal of Physical Chemistry*, 80(25), 2728-2731. doi: DOI 10.1021/j100566a003
- Hafizovic, S., Heer, F., Ugniwenko, T., Frey, U., Blau, A., Ziegler, C., & Hierlemann, A. (2007). A CMOS-based microelectrode array for interaction with neuronal cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, 164(1), 93-106. doi: 10.1016/j.jneumeth.2007.03.006
- Hilgenberg, L. G., & Smith, M. A. (2007). Preparation of dissociated mouse cortical neuron cultures. *J Vis Exp*(10), 562. doi: 10.3791/562
- Hochberg L. R., Bacher D., Jarosiewicz B., Masse N. Y., Simeral J. D., Vogel J., et al. . (2012). Reach and grasp by people with tetraplegia using a neurally controlled robotic arm. *Nature* 485, 372–375. 10.1038/nature11076

- Ishikawa, A., & Tanaka, T. (2012). Two-Photon Fabrication of Three-Dimensional Metallic Nanostructures for Plasmonic Metamaterials. *Journal of Laser Micro Nanoengineering*, 7(1), 11-15. doi: 10.2961/jlmn.2012.01.0002
- Jin, Y., & Garner, C. C. (2008). Molecular Mechanisms of Presynaptic Differentiation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 24, 237-262.
- Juodkazis, S., Mizeikis, V., Seet, K. K., Miwa, M., & Misawa, H. (2005). Two-photon lithography of nanorods in SU-8 photoresist. *Nanotechnology*, 16(6), 846-849.
- Kaech, S., & Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc*, 1(5), 2406-2415. doi: 10.1038/nprot.2006.356
- Kaiser W, G. C. B. (1961). Two-photon excitation in CaF₂:Eu²⁺. *Physical Review Letters*, 7, 229–232.
- Kalil, K., & Dent, E. W. (2005). Touch and go: guidance cues signal to the growth cone cytoskeleton. *Curr Opin Neurobiol*, 15(5), 521-526. doi: 10.1016/j.conb.2005.08.005
- Kang, K., Park, Y. S., Park, M., Jang, M. J., Kim, S. M., Lee, J., . . . Choi, I. S. (2016). Axon-First Neuritogenesis on Vertical Nanowires. *Nano Letters*, 16(1), 675-680.
- Kawata, S., Sun, H. B., Tanaka, T., & Takada, K. (2001). Finer features for functional microdevices. *Nature*, 412(6848), 697-698. doi: 10.1038/35089130
- Khan, S., & Newaz, G. (2010). A comprehensive review of surface modification for neural cell adhesion and patterning. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 93a(3), 1209-1224.
- Khodagholy, D., Doublet, T., Gurfinkel, M., Quilichini, P., Ismailova, E., Leleux, P., . . . Malliaras, G. G. (2011). Highly Conformable Conducting Polymer Electrodes for In Vivo Recordings. *Advanced Materials*, 23(36), H268-+.
- Kim, D. H., Viveri, J., Amsden, J. J., Xiao, J. L., Vigeland, L., Kim, Y. S., . . . Rogers, J. A. (2010). Dissolvable films of silk fibroin for ultrathin conformal bio-integrated electronics. *Nature Materials*, 9(6), 511-517.
- Kim, E., & Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(10), 771-781. doi: 10.1038/nrn1517
- Lee, S. E., Jun, S. B., Lee, H. J., Kim, J., Lee, S. W., Im, C., . . . Kim, S. J. (2012). A Flexible Depth Probe Using Liquid Crystal Polymer. *Ieee Transactions on Biomedical Engineering*, 59(7), 2085-2094.

- Lee, S. H., & Sheng, M. (2000). Development of neuron-neuron synapses. *Current Opinion in Neurobiology*, *10*(1), 125-131.
- Li, L., Hong, M. H., Schmidt, M., Zhong, M. L., Malshe, A., in'tVeld, B. H., & Kovalenko, V. (2011). Laser nano-manufacturing - State of the art and challenges. *Cirp Annals-Manufacturing Technology*, *60*(2), 735-755. doi: 10.1016/j.cirp.2011.05.005
- Li, L. J., Gattass, R. R., Gershgoren, E., Hwang, H., & Fourkas, J. T. (2009). Achieving $\lambda/20$ Resolution by One-Color Initiation and Deactivation of Polymerization. *Science*, *324*(5929), 910-913. doi: 10.1126/science.1168996
- Lodish, H. F. (2000). *Molecular cell biology* (4th ed.). New York: W.H. Freeman.
- Lucido, A. L., Suarez Sanchez, F., Thostrup, P., Kwiatkowski, A. V., Leal-Ortiz, S., Gopalakrishnan, G., . . . Colman, D. R. (2009). Rapid assembly of functional presynaptic boutons triggered by adhesive contacts. *Journal of Neuroscience*, *29*(40), 12449-12466. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1381-09.2009
- Magdesian, M. H., Anthonisen, M., Lopez-Ayon, G. M., Chua, X. Y., Rigby, M., & Grutter, P. (2017). Rewiring Neuronal Circuits: A New Method for Fast Neurite Extension and Functional Neuronal Connection. *J Vis Exp*(124). doi: 10.3791/55697
- Marcus, M., Baranes, K., Park, M., Choi, I. S., Kang, K., & Shefi, O. (2017). Interactions of Neurons with Physical Environments. *Adv Healthc Mater*, *6*(15). doi: 10.1002/adhm.201700267
- Maruo, S., Nakamura, O., & Kawata, S. (1996). Three-dimensional microfabrication with two-photon absorbed photopolymerization. *17th Congress of the International Commission for Optics: Optics for Science and New Technology, Pts 1 and 2*, 2778, 165-166.
- Maruo, S., Nakamura, O., & Kawata, S. (1997). Three-dimensional microfabrication with two-photon-absorbed photopolymerization. *Opt Lett*, *22*(2), 132-134.
- Maruo, S., & Saeki, T. (2008). Femtosecond laser direct writing of metallic microstructures by photoreduction of silver nitrate in a polymer matrix. *Optics Express*, *16*(2), 1174-1179. doi: Doi 10.1364/Oe.16.001174
- McAllister, A. M. (2007). Dynamic aspects of CNS synapse formation. *Annual Review of Neuroscience*, *30*, 425-450.

- Metallo, C., White, R. D., & Trimmer, B. A. (2011). Flexible parylene-based microelectrode arrays for high resolution EMG recordings in freely moving small animals. *Journal of Neuroscience Methods*, 195(2), 176-184.
- Micholt, L., Gartner, A., Prodanov, D., Braeken, D., Dotti, C. G., & Bartic, C. (2013). Substrate Determines Neuronal Polarization and Growth In Vitro. *Plos One*, 8(6).
- Min Gu, Z. G., Yaoyu Cao. (2016). Fabricating Nano and Microstructures Made by Narrow Bandgap Semiconductors and Metals using Multiphoton Lithography. *Multiphoton Lithography(Book)*, 297-313.
- Missler, M., Sudhof, T. C., & Biederer, T. (2012). Synaptic Cell Adhesion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(4). doi: ARTN a005694
10.1101/cshperspect.a005694
- Okabe, S. (2007). Molecular anatomy of the postsynaptic density. *Mol Cell Neurosci*, 34(4), 503-518. doi: 10.1016/j.mcn.2007.01.006
- Pawlicki, M., Collins, H. A., Denning, R. G., & Anderson, H. L. (2009). Two-Photon Absorption and the Design of Two-Photon Dyes. *Angewandte Chemie-International Edition*, 48(18), 3244-3266. doi: 10.1002/anie.200805257
- Sanes, J. R., & Yamagata, M. (2009). Many Paths to Synaptic Specificity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25, 161-195. doi: 10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175402
- Spira, M. E., & Hai, A. (2013). Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology. *Nature Nanotechnology*, 8(2), 83-94.
- Steward, O., & Levy, W. B. (1982). Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, 2(3), 284-291.
- Subbaroyan, J., Martin, D. C., & Kipke, D. R. (2005). A finite-element model of the mechanical effects of implantable microelectrodes in the cerebral cortex. *Journal of Neural Engineering*, 2(4), 103-113.
- Tabrizi, S., Cao, Y. Y., Lin, H., & Jia, B. H. (2017). Two-photon reduction: a cost-effective method for fabrication of functional metallic nanostructures. *Science China-Physics Mechanics & Astronomy*, 60(3). doi: ARTN 034201
10.1007/s11433-016-0447-6

- Tessier-Lavigne, M., & Goodman, C. S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science*, 274(5290), 1123-1133.
- Turner, J. N., Shain, W., Szarowski, D. H., Andersen, M., Martins, S., Isaacson, M., & Craighead, H. (1999). Cerebral astrocyte response to micromachined silicon implants. *Experimental Neurology*, 156(1), 33-49. doi: DOI 10.1006/exnr.1998.6983
- Waites, C. L., Craig, A. M., & Garner, C. C. (2005). Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annual Review of Neuroscience*, 28, 251-274.
- Wiedenmann, B., & Franke, W. W. (1985). Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell*, 41(3), 1017-1028.
- Xie, C., Hanson, L., Xie, W. J., Lin, Z. L., Cui, B. X., & Cui, Y. (2010). Noninvasive Neuron Pinning with Nanopillar Arrays. *Nano Letters*, 10(10), 4020-4024.
- Zuber, B., Nikonenko, I., Klauser, P., Muller, D., & Dubochet, J. (2005). The mammalian central nervous synaptic cleft contains a high density of periodically organized complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(52), 19192-19197. doi: 10.1073/pnas.0509527102

