



Université de Montréal

**La formation de synapses par les neurones périphériques  
sur des surfaces synthétiques**

par Xiya Ma

Département des sciences biomédicales  
Faculté de médecine

Mémoire présenté  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en sciences biomédicales  
option médecine expérimentale

Août 2018

© Xiya Ma, 2018

## Résumé

**Rationale:** Les électrodes implantables pour la création d'une interface neurotechnologique avec le système nerveux périphérique représentent une solution prometteuse pour pallier aux limitations causées par des blessures ou maladies nerveuses. Leur viabilité à long terme pourrait être améliorée en enrobant l'électrode d'une substance synthétique tolérable par l'hôte. La synaptogenèse sur des matériaux artificiels serait un marqueur indirect de la biocompatibilité, démontrant la reconnaissance de la substance comme étant une cible post-synaptique viable. Notre objectif est de démontrer la propriété synaptogénique de la poly-D-lysine (PDL) et d'un polyglycérol hyperbranché expérimental (dendrimère, DND) dans le système nerveux périphérique humain *in vitro* et murin *in vivo*. Ultimement, nous visons la création d'un enrobage facilitant la synaptogenèse sur un objet synthétique qui sera inséré dans un nerf périphérique dans le but d'augmenter la longévité de l'implant.

**Méthodes:** *In vitro*, des neurones moteurs dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines ont été cultivés avec des microsphères (non-enrobé, enrobé de poly-D-lysine ou de dendrimère) pour 1, 3, 5, 7 ou 9 jours. *In vivo*, le nerf sciatique du rat a été écrasé avant l'injection de microsphères proximale, distale et au site de la blessure qui y demeureront pour 2, 7 ou 14 jours. Les cellules et les nerfs ont été traités à l'immunochimie pour les marqueurs présynaptiques synaptophysine et vesicular acetylcholine transporter (VAChT). Les images acquises à la microscopie confocale ont été analysées pour l'intensité de la fluorescence autour des microsphères sur le logiciel Fiji. Une imagerie en temps réel *in vitro* avec du FM-143 a été réalisée pour vérifier la présence d'exocytose près des sites de contact des microsphères.

**Résultats:** *In vitro*, les résultats démontrent significativement plus de fluorescence pour la synaptophysine ( $p < 0.0001$ ) et le VAChT ( $p < 0.0001$  pour 1, 3, 5, 9 jours ;  $p < 0.001$  pour 7 jours) dans les deux conditions expérimentales par rapport au contrôle pour les cinq durées. Les résultats préliminaires de l'imagerie en temps réel démontrent une exocytose des vésicules marquées au FM-143 plus importante chez les microsphères enrobées de DND que celles de PDL ( $p = 0.006$ ) à 3 jours d'incubation. *In vivo* à 14 jours, la présence de la synaptophysine est

significativement supérieure autour des microsphères de PDL au site d'écrasement et en distal en comparaison avec celle des microsphères non-enrobées. Celle du VAChT est également significativement supérieure au contrôle à 14 jours au site d'écrasement. Les autres conditions expérimentales étudiées demeurent sans différence significative entre les microsphères enrobées et leur contrôle.

**Conclusions:** Notre étude démontre pour la première fois que la poly-D-lysine et le dendrimère sont des matériaux synaptogéniques pour les neurones moteurs humains *in vitro*. In vivo, nos résultats suggèrent que la PDL est synapto-génique pour les neurones périphériques murins. Ces résultats seraient intéressants dans le cadre de l'utilisation future de ces substances pour améliorer la longévité d'électrodes implantables pour diverses applications cliniques en neurosciences, tels que pour la stimulation ou l'enregistrement des nerfs dans diverses pathologies chroniques.

**Mots-clés :** synaptogenèse, microsphère, poly-D-lysine, polyglycérol hyperbranché, synaptophysine, VAChT, cellules souches pluripotentes, neurones moteurs, nerf sciatique, système nerveux périphérique



## Abstract

**Background:** Implantable intraneural electrodes as a neurotechnological interface with the peripheral nervous system are a promising solution to overcome the limitations caused by injury or disease. Their long-term viability could be enhanced by coating electrodes with synthetic substances which are well tolerated by the host. Synaptogenesis onto artificial material can be seen as an indirect marker of biocompatibility as it demonstrates the recognition of the said substance as a viable post-synaptic target. Our objective is to demonstrate the synaptogenic properties of poly-D-lysine (PDL) and an experimental hyperbranched polyglycerol (dendrimer, DND) with human peripheral neurons *in vitro* and rat neurons *in vivo*. Ultimately, we aim to develop coatings that promote synaptogenesis onto a synthetic object embedded in a peripheral nerve with the objective of increasing its longevity.

**Methods:** Uncoated (control) and coated (poly-D-lysine or dendrimer) microspheres were used. *In vitro*, motor neurons derived from human induced pluripotent stem cells (iPSCs) were grown with microspheres for 1, 3, 5, 7 or 9 days. *In vivo*, a nerve crush injury was introduced to adult rat sciatic nerve to induce a regenerative state before injecting microspheres proximally, distally and at the crush site, which were left for 2, 7 and 14 days. Cells and nerves were immunostained for synaptophysin and VAChT (presynaptic markers). All experiments were visualized using confocal microscopy and images were analyzed for staining intensity surrounding the microspheres using Fiji. Live cell imaging of human motor neurons with FM-143 was performed to verify the presence of exocytosis at contact sites with the microspheres.

**Results:** *In vitro*, our results show significantly more staining for synaptophysin ( $p < 0.0001$ ) and VAChT ( $p < 0.0001$ ) in both experimental conditions when compared to the control for all five time points. Preliminary results of live cell imaging show a significantly more important exocytosis of FM-143 labelled vesicles in DND-coated microspheres than PDL-coated ones ( $p = 0.006$ ) at 3 days of incubation. *In vivo*, the presence of synaptophysin is significantly more important at 14 days surrounding PDL-coated microspheres at the crush site and distal to it when compared with controls. VAChT staining is also significantly superior at 14 days at the crush site. Other time points and locations tested do not show significant difference when comparing coated microspheres with respect to its control.

**Conclusions:** Our study shows for the first time that poly-D-lysine and dendrimer are synaptogenic substances for human motor neurons *in vitro* and rat peripheral neurons *in vivo*. These results support the future use of these substances in improving the longevity of implantable electrodes for various clinical uses in neurosciences, such as for nerve stimulation or recording in chronic pathologies.

**Keywords:** synaptogenesis, microsphere, poly-D-lysine, hyperbranched polyglycerol, synaptophysin, VAChT, iPSC, motor neurons, sciatic nerve, peripheral nervous system

# Table des matières

Résumé.....	1
Abstract .....	3
Table des matières.....	5
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures .....	9
Liste des sigles .....	11
Liste des abréviations.....	12
Remerciements.....	14
1. Introduction .....	15
1.1. Contexte clinique.....	15
1.2. Système nerveux périphérique .....	15
1.2.1. Neurones sensitifs .....	18
1.2.2. Neurones moteurs.....	18
1.2.3. Neurones autonomiques .....	18
1.3. Électrodes neurales.....	19
1.3.1 Utilisation dans le système nerveux central .....	21
1.3.2 Utilisation dans le système nerveux périphérique.....	22
1.3.3 Avantages des électrodes intraneurales.....	24
1.3.4 Limitations des modèles existants d'implants intraneurale.....	25
1.4 Biocompatibilité.....	28
1.4.1 Amélioration de la biocompatibilité des électrodes intraneurales .....	29
1.4.2 Mesure indirecte : la synaptogenèse.....	30
1.4.3 Synapse.....	30
1.4.4 Marqueurs synaptiques.....	31
1.4.5 Synaptogenèse sur des surfaces synthétiques <i>in vitro</i> dans le système nerveux central .....	34
1.4.6 Étapes de la synaptogénèse .....	35

1.4.7	Synaptogenèse sur des surfaces synthétiques <i>in vitro</i> dans le système nerveux périphérique.....	38
1.4.8	Substances synaptogéniques .....	38
1.5	Modèles d'études.....	41
1.5.1	<i>In vitro</i> : Cellules souches pluripotentes induites.....	41
1.5.2	Modèle du nerf sciatique du rat.....	42
1.5.3	Imagerie des cellules vivantes.....	43
1.6	Objectifs de recherche .....	44
CHAPITRE 2 .....		46
ABSTRACT.....		47
INTRODUCTION.....		49
METHODS .....		51
RESULTS .....		56
DISCUSSION .....		59
FIGURE AND TABLES.....		67
ACKNOWLEDGEMENTS .....		87
REFERENCES.....		88
CHAPITRE 3 .....		91
3.	Discussion .....	91
3.1	Présence des marqueurs présynaptiques entre les processus neuronaux des neurones moteurs humains et la surface des microsphères enrobées <i>in vitro</i> .....	91
3.2	Exocytose des vésicules marquées au FM-143 autour des microsphères enrobées <i>in vitro</i> .....	94
3.3	Présence des marqueurs présynaptiques entre les neurones du nerf sciatique du rat en régénération et la surface des microsphères enrobées <i>in vivo</i> .....	96
3.4	Validité des méthodes utilisées: motoneurones dérivés des iPSC et nerf sciatique du rat.....	98
3.5	Influence de la réaction à corps étranger sur la synaptogenèse.....	99
3.6	Implications pour les futures applications cliniques .....	100
3.7	Perspectives futures.....	101

4. Conclusion..... 103  
Bibliographie..... i

## Liste des tableaux

Tableau I.	Neuroepithelial (NEP) (STEP 1) media components.....	67
Tableau II.	Motor neuron progenitor (MNP) (STEP 2) media components.....	68
Tableau III.	Early stage motor neuron (EMN) (STEP 3) media components.....	69
Tableau IV.	Motor neuron (MN) (STEP 4) media components.....	70

## Liste des figures

Figure 1.	Anatomie d'un nerf périphérique .....	17
Figure 2.	Différents types d'électrodes extraneurales et intraneurales.....	21
Figure 3.	Principe d'une communication nerveuse bidirectionnelle avec une prothèse du membre supérieur.....	24
Figure 4.	Étapes de la réaction à corps étrangers dans le contexte d'implants neuronaux	28
Figure 5.	Principales classes de protéines présynaptiques, soit associées aux vésicules synaptiques .....	32
Figure 6.	Principales protéines impliquées dans une jonction neuromusculaire.....	33
Figure 7.	Hypothèse sur l'influence des charges acidobasiques dans la formation des nouveaux boutons présynaptiques.....	37
Figure 8.	Polyglycérol hyperbranché, dont fait partie le dendrimère .....	40
Figure 1.	In vitro experiments protocol .....	71
Figure 2.	In vivo experiments protocol.....	71
Figure 3.	Representative images of synaptophysin staining surrounding microspheres with human motor neuron cultures for each condition at 1, 3, 5, 7 and 9 days of incubation .....	72
Figure 4.	Quantification of synaptophysin staining surrounding microspheres with human motor neuron cultures at 1, 3, 5, 7 and 9 days of incubation. ....	73
Figure 5.	Representative images of VAChT staining surrounding microspheres with human motor neuron cultures for each condition at 1, 3, 5, 7 and 9 days of incubation .....	74
Figure 6.	Quantification of VAChT staining surrounding microspheres with human motor neuron cultures at 1, 3, 5, 7 and 9 days of incubation. ....	75
Figure 7.	Three-dimension reconstructions of coated and uncoated microspheres with human motor neuron cultures for each condition at 1, 3, 5, 7 and 9 days.....	78
Figure 8.	Representative images of microspheres incubated for 3 days with human motor neurons stained with FM-143 before and after depolarization with KCl.....	79
Figure 9.	FM-143 fluorescence quantification of microspheres with human motor neuron cultures. ....	80

Figure 10. Representative images of synaptophysin staining surrounding microspheres with regenerating rat sciatic nerve for each condition at 2, 7 and 14 days of incubation ..... 82

Figure 11. Quantification of synaptophysin staining surrounding microspheres in regenerating rat sciatic nerve at 2, 7 and 14 days of incubation. .... 83

Figure 12. Representative images of VAChT staining surrounding microspheres with regenerating rat sciatic nerve for each condition at 2, 7 and 14 days of incubation ..... 85

Figure 13. Quantification of VAChT staining surrounding microspheres in regenerating rat sciatic nerve at 2, 7 and 14 days of incubation..... 86



## Liste des sigles

°C : Celsius

kg : kilogramme

kDa : kilodalton

M : mole

mg : milligramme

ml : millilitre

µg : microgramme

µl : microlitre

µm : micromètre

µM : micromole

nm : nanomètre

## Liste des abréviations

PDL: Poly-D-Lysine

DND: Dendrimère

PBS: Phosphate Buffered Saline

OCT: Optimal Cutting Temperature

PFA : Paraformaldehyde

ddH<sub>2</sub>O : double distilled water

iPSC : induced pluripotent stem cells

VAChT: Vesicular Acetylcholine transporter

CD200: Cluster of Differentiation 200

TIME: transverse intrafascicular multichannel electrodes

LIFE: longitudinal intrafascicular electrodes

SELINER : self-opening intrafascicular neural interface

MEA : micro-electrode arrays

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMEM/F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium with Nutrient Mixture F-12

DMH1: dorsomorphin homolog 1

VPA: Valproic acid sodium salt

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor

CNTF: Ciliary neurotrophic factor

IGF-1: Insulin-like growth factor 1

## **Remerciements**

**Dr Jenny C. Lin**, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ma maîtrise sous sa supervision et d'être une mentore exceptionnelle autant en recherche fondamentale qu'en clinique.

**Dr Timothy E. Kennedy**, pour m'avoir donné les opportunités de collaborer avec les laboratoires et tous ses précieux conseils.

**Dr Laila Al Alwan**, pour m'avoir enseigné les bases de techniques utilisées dans ce mémoire et partagé sa sagesse de ses années en laboratoire.

**Dr Olivier Michaud**, pour sa collaboration et sa présence tout au long de la première année de ma maîtrise.

**Michel Paquet**, pour son aide au niveau technique et scientifique à travers le projet.

**Vincent Weng-Jy Cheung**, pour son enthousiasme à contribuer au projet et à apprendre à devenir l'un des prochains étudiants gradués dans notre laboratoire.

**Mon entourage**, pour leur soutien inconditionnel à travers les hauts et les bas durant les deux dernières années.

# **1. Introduction**

## **1.1. Contexte clinique**

La perte des membres par traumatisme ou par maladie compromet des fonctions importantes et affecte la qualité de vie des individus concernés. Aux États-Unis, en 2005, 1.7 millions de personnes vivaient avec une amputation d'un membre, et ce nombre est projeté d'atteindre 3.6 millions en 2050 (Ziegler-Graham et al, 2008). Afin de pallier aux limitations générées par ces conditions, plusieurs types de reconstructions prothétiques existent dans le but de restaurer une certaine apparence ou fonction du membre amputé. Les prothèses passives, ou cosmétiques, sont conçues pour remplacer l'apparence physique du membre manquant avec une restauration limitée des fonctions (DeLisa et al, 2004; Ovidia et Askari, 2015). En contraste, d'autres prothèses intègrent des câbles et des poulies pour augmenter la gamme de mouvements possibles. Les modèles prothétiques les plus sophistiqués emploient la réinnervation musculaire ciblée en reliant le restant d'un nerf périphérique à un muscle intact, par exemple le muscle grand pectoral, afin de contrôler une prothèse robotique de façon plus intuitive pour le patient (Kuiken et al, 2004; Green et al, 2011). Cependant, les modèles existants ne peuvent offrir toutes les libertés d'un membre biologique, que ce soit l'esthétique visuel du membre, le contrôle par le système nerveux central du patient, la maîtrise de plusieurs mouvements complexes et la conduction des sensations (del Valle et Navarro, 2013). Ce problème est majoritairement dû à la difficulté dans l'établissement d'une interface directe entre le moignon intact du nerf et la prothèse, limitant ainsi la finesse du contrôle volontaire ou la rétroaction sensorielle au système nerveux central (Lotti et al, 2017). Ceci est causé entre autres au potentiel limité dans la régénération du système nerveux périphérique après l'atteinte de sa maturité (Sulaiman and Gordon, 2013).

## **1.2. Système nerveux périphérique**

Le système nerveux périphérique comprend toutes les structures nerveuses à l'exception des structures du système nerveux central (cerveau et moelle épinière). Les nerfs périphériques incluent les 43 paires de nerfs spinaux, provenant de la moelle épinière, les 12 paires de nerfs

crâniens, provenant du tronc cérébral, et les nerfs autonomiques, provenant des ganglions sympathiques et parasympathiques (Goldstein, 2001; Shoja et Oyesiku, 2014). Les nerfs périphériques sont classés selon la fonction qu'ils apportent, soit de transmettre le signal nerveux du système nerveux central vers la périphérie dans le cadre des fonctions motrices ou autonomiques, ou de rapporter l'information de l'environnement vers le système nerveux central pour l'interprétation des sensations (Goldstein, 2001; del Valle et Navarro, 2013; Romero-Ortega, 2014).

Structurellement, un nombre variable d'axones myélinisés et non-myélinisés, entourés de l'endonèvre, une matrice de collagène, sont regroupés en fascicules délimités par la périnèvre, une enveloppe conjonctive (Goldstein, 2001). Plusieurs fascicules avec leurs vaisseaux sanguins associés, enveloppés par l'épinèvre, forment le nerf périphérique. Ce dernier est en contact étroit avec les cellules de Schwann, les fibroblastes et les macrophages, qui entourent le nerf périphérique, le supportant dans l'optimisation de ses fonctions (Stewart, 2003; del Valle et Navarro, 2013).

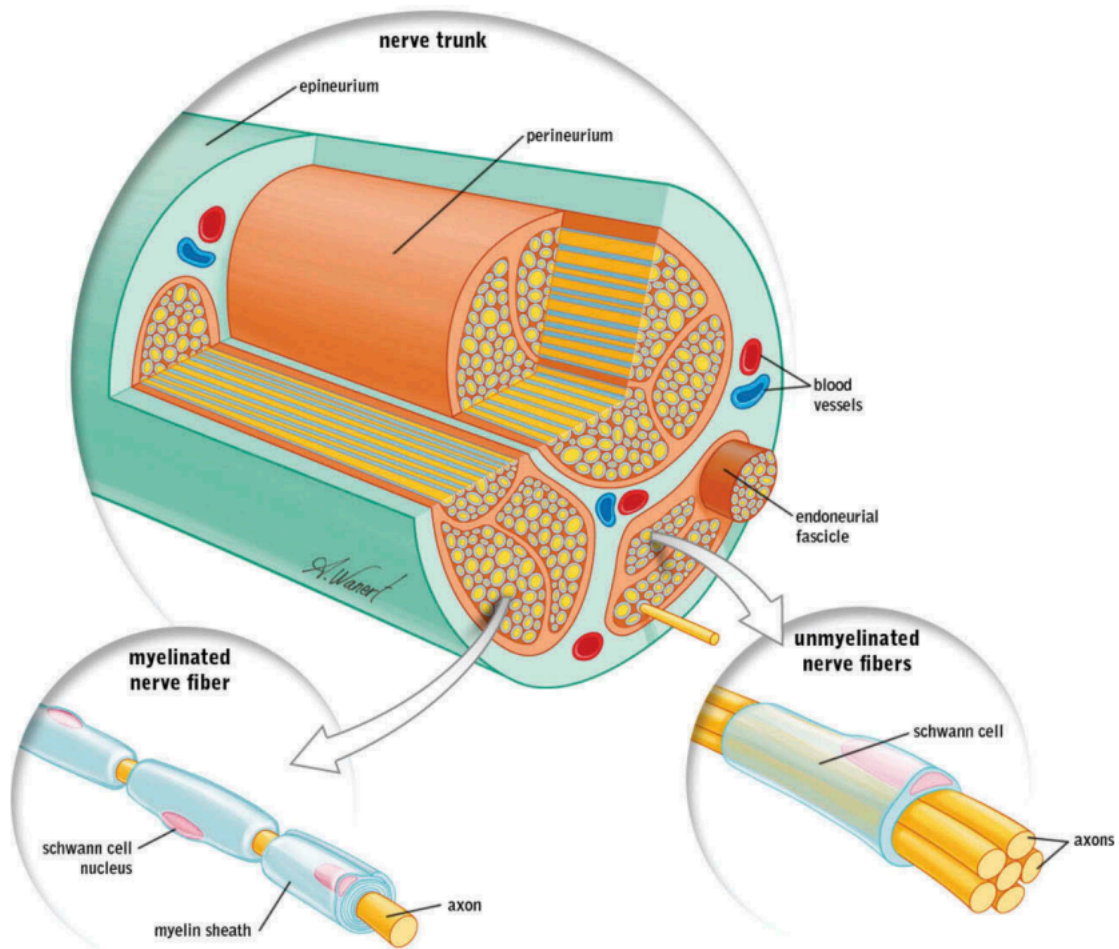


Figure 1. Anatomie d'un nerf périphérique

Le nerf périphérique est délimité par l'épinèvre, qui regroupe les vaisseaux sanguins et les fascicules d'endonèvre rassemblés dans la périnèvre. Chaque fascicule endoneural comporte plusieurs axones. Les fibres myélinisées se distinguent des fibres non-myélinisées par la présence importante de cellules de Schwann, qui permettent une transmission plus rapide de l'influx nerveux. Tiré de Ilfeld et al, *Novel Cryoneurolysis Device for the Treatment of Sensory and Motor Peripheral Nerves* (2016). Reproduction avec permission de Taylor and Francis Group.

### **1.2.1. Neurones sensitifs**

Les neurones sensitifs transmettent l'information provenant de l'environnement détectée par divers récepteurs spécialisés de la peau, des muscles, des articulations et de certains organes vers le système nerveux central pour la perception (Goldstein, 2001). Avec leurs noyaux dans les ganglions spinaux, ils conduisent entre autres la proprioception, les sensations mécaniques de la pression et de la vibration, la température, la douleur et la démangeaison (Goldstein, 2001; Romero-Ortega, 2014). La fréquence des potentiels d'action détermine l'intensité de la sensation (del Valle et Navarro, 2013). Certains neurones spécialisés dit sensoriels facilitent l'acquisition d'information visuelle, auditive, olfactive et gustative.

### **1.2.2. Neurones moteurs**

Les neurones moteurs sont des cellules multipolaires, composés d'un seul axone avec plusieurs dendrites (Kandel et al, 2013). Ces cellules, dont les noyaux se situent dans la région ventrale de la moelle épinière, conduisent l'information nerveuse du système nerveux central vers les organes cibles en périphérie, dont les muscles squelettiques, viscéraux et cardiaques, ainsi que les glandes (del Valle et Navarro, 2013; Kandel et al, 2013; Romero-Ortega, 2014). L'unité motrice est composée d'un neurone moteur et des fibres musculaires qu'il innerve. Un neurone moteur se divisera en plusieurs branches terminales qui innoveront chacune une plaque motrice, soit l'endroit où aurait lieu la transmission neuromusculaire d'acétylcholine qui générera une contraction musculaire, dont la force est modulée par les potentiels d'action du neurone moteur (Goldstein, 2001; Romero-Ortega, 2014).

### **1.2.3. Neurones autonomiques**

Les neurones autonomiques permettent l'exécution des fonctions physiologiques involontaires comme la respiration et la digestion en reliant certaines structures du système nerveux central, soit le bulbe rachidien, le pons et l'hypothalamus, aux organes effecteurs concernés (Romero-Ortega, 2014). Ils se catégorisent soit dans le système sympathique ou parasympathique, deux voies complémentaires qui génèrent des actions autonomiques contraires (Goldstein, 2001).



### 1.3. Électrodes neurales

Une électrode neurale est un conducteur électrique inséré près d'un nerf pouvant stimuler ou enregistrer des courants électriques (Sahyouni et al, 2017). Les électrodes utilisées dans le système nerveux sont généralement composées de matériaux conducteurs résistants et stables sur le niveau biologique ou électrochimique (Lotti et al, 2017). Un exemple serait une électrode composée d'un centre composé de polyimide avec des travées en platine avec ou sans iridium, ou en or (Brummer et al, 1983; Geddes et Roeder, 2003).

L'électrode extraneurale rentre en contact avec les tissus conjonctifs du nerf, soit des électrodes épineurales ou périneurales selon leur emplacement sur l'épinèvre ou sur la périnèvre respectivement (del Valle et Navarro, 2013; Sahyouni et al, 2017). Les électrodes extraneurales se présentent souvent sous forme d'un cylindre autour du nerf avec des sites d'électrodes au centre du tube (Hoffer et Loeb, 1980). Leur implantation est relativement plus sécuritaire par rapport aux autres types d'électrodes neurales, mais la surface recouverte par le manchon limite la spécificité des axones stimulés (Badia et al, 2011) (Figure 2).

L'électrode intraneurale interagit directement avec les axones du nerf (del Valle et Navarro, 2013; Sahyouni et al, 2017). Une variété d'électrodes intraneurales sont présentement employées et étudiées, dont les électrodes intrafasciculaires longitudinaux (longitudinal intrafascicular electrodes ou LIFE) et ses dérivés, des électrodes intrafasciculaires transverses à canaux multiples (*transverse intrafascicular multichannel electrodes* ou TIME), des biopuces linéaires standards (*standard linear microarrays*), des biopuces micro-électrodes (*micro-electrode arrays*, ou MEA), des interfaces neurales intrafasciculaires auto-ouverture (*self-opening intrafascicular neural interface* ou SELINE) ainsi que des biopuces Utah (*Utah Slant Electrode Array*) (Yoshida et Horch, 1993; Lawrence et al, 2004; Boretius et al, 2010; Ortiz-catalan et al, 2012; Cutrone et al., 2015) (Figure 2).

Un troisième type d'électrodes dites régénératives visent à permettre aux axones d'un nerf lésé de recroître à travers l'électrode (del Valle et Navarro, 2013). Leur emplacement intraneural, suite à la régénération axonale à travers les orifices de l'électrode, offre une haute sélectivité des axones pour la stimulation ou l'enregistrement. L'électrode perforée (*sieve electrode*) ou à micro-canaux (*microchannel electrode*) sont des exemples présentement étudiés chez les animaux seulement (Kovacs et al, 1994; Navarro et al, 1996; Navarro et al, 1998; Mensinger et al, 2000; Kawada et al, 2004; Panetsos et al, 2008) (Figure 2).

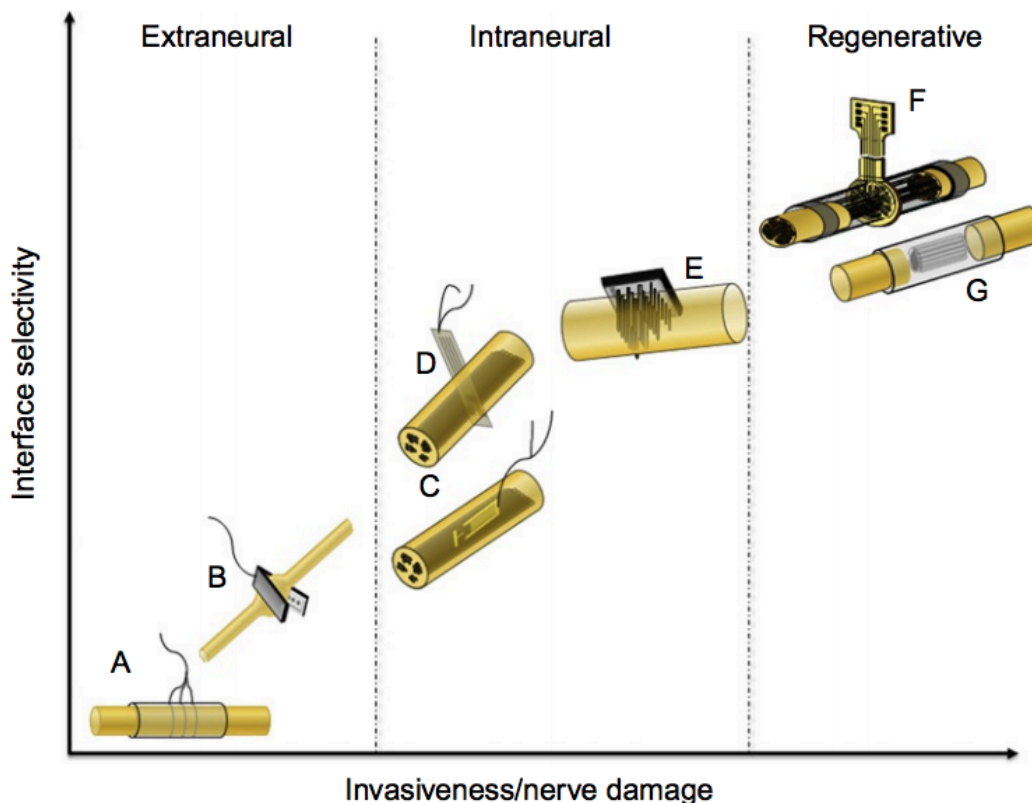


Figure 2. Différents types d'électrodes extraneurales et intraneurales.

Les différents types d'électrodes neurales peuvent être classés selon leur niveau de sélectivité et leur niveau d'intrusion au sein du nerf. A : électrode de type manchon (*cuff electrode*) B : électrode neurale avec une interface plate (*flat interface nerve electrode* ou FINE) C : électrodes intrafasciculaires longitudinales (*longitudinal intrafascicular electrodes* ou LIFE) D : électrodes intrafasciculaires transverses à canaux multiples (*transverse intrafascicular multichannel electrodes* ou TIME) E : Rangée de multiélectrode (*multi-electrode array*) F : électrode perforée (*sieve electrode*) G : électrode à micro-canaux (*microchannel electrode*). Tiré et adapté de del Valle et Navarro, *Interfaces with the Peripheral Nerve for the Control of Neuroprostheses* (2013). Avec permission de Elsevier et Copyright Clearance Center.

### 1.3.1 Utilisation dans le système nerveux central

L'implantation d'électrodes dans le cerveau ou la moelle épinière permettent le traitement de maladies d'origine centrale qui engendrent souvent des conséquences importantes au niveau périphérique. L'implantation d'électrodes dans le noyau subthalamique, le globus pallidus

interne et le thalamus permet de livrer des stimulations électriques pouvant améliorer la locomotion des patients souffrant de la maladie de Parkinson qui sont réfractaires aux médicaments (Lozano et al, 2002). D'autres applications de la stimulation électrique cérébrale s'étendent vers la douleur chronique, les céphalées, la dystonie et les désordres psychiatriques (Kringelbach et al, 2007). D'une perspective plus expérimentale, l'étude par Hochberg et al (2006) a démontré que l'implantation d'une électrode dans le cortex moteur d'un patient paraplégique permet de coder pour des mouvements qui seront générés par une main robotique.

### **1.3.2 Utilisation dans le système nerveux périphérique**

#### **Nerfs crâniens et autonomiques**

L'implantation d'électrodes dans les nerfs crâniens est présentement utile dans différents contextes. La majorité des applications sont des moyens de stimulation électrique pour moduler la fonction nerveuse d'un organe effecteur. Par exemple, le *Inspire Upper Airway Stimulation system* sert de stimulateur du nerf hypoglosse pour aider la respiration des patients souffrant d'apnée du sommeil (Malhotra, 2014). Les implants cochléaires, qui stimulent le nerf cochléaire, sont répandus pour traiter des problèmes d'audition sévères de type neurosensorielle (Yawn et al, 2015). D'autres implants, comme le *Medtronic InterStim Therapy System* ou le neurostimulateur Finetech-Brindley, peuvent aider les personnes atteintes d'incontinence urinaire ou anale (Holzer et al, 2008; Creasey et Craggs, 2012 ; del Valle et Navarro, 2013). Des contractions diaphragmatiques rythmiques peuvent être induites par une électrode stimulatrice du nerf phrénique (Creasey et al, 1996).

#### **Nerfs périphériques**

Parmi les applications existantes, chez les patients dont la locomotion est atteinte, l'utilisation d'électrodes stimulatrices du nerf péroné permet d'améliorer la contraction des muscles menant à la dorsiflexion du pied lors de la marche, pour pallier au phénomène du pied tombant (Lyons et al, 2002). L'utilisation des électrodes neurales au sein des nerfs périphériques dans le contexte des prothèses demeure majoritairement expérimentale. Les études se concentrent surtout sur

l'interface bidirectionnelle entre l'électrode neurale et le moignon d'un nerf périphérique (Lotti et al, 2017). Le principe serait de permettre une boucle fermée entre les signaux afférents de type mécanique que la prothèse capterait de l'environnement et les signaux efférents que le patient transmettrait à la prothèse en réponse (Figure 3). Ceci requiert une précision et une proximité aux fibres nerveuses pour laquelle une électrode intraneurale pourrait donner, permettant ainsi une rétroaction sensitive dans le but d'ajuster les commandes motrices (Lotti et al, 2017). Parmi les essais, Rossini et al (2010) ont réussi à redonner certaines fonctions motrices des nerfs médian et ulnaire, soit un mouvement de la préhension de la main, de pincement des doigts et de la flexion de l'auriculaire, à un amputé du membre supérieur grâce à quatre électrodes intrafasciculaires longitudinales flexibles implantées dans ces nerfs périphériques. La stimulation sensorielle à travers ces mêmes électrodes a donné une sensation dans les régions de la main dont les nerfs médian et ulnaire desservent. Similairement, Raspopovic et al (2015) ont réussi à redonner une rétroaction sensitive à un amputé de l'avant-bras grâce à quatre électrodes intraneurales dans le nerf ulnaire, permettant ainsi d'ajuster les signaux moteurs selon les informations provenant l'environnement.

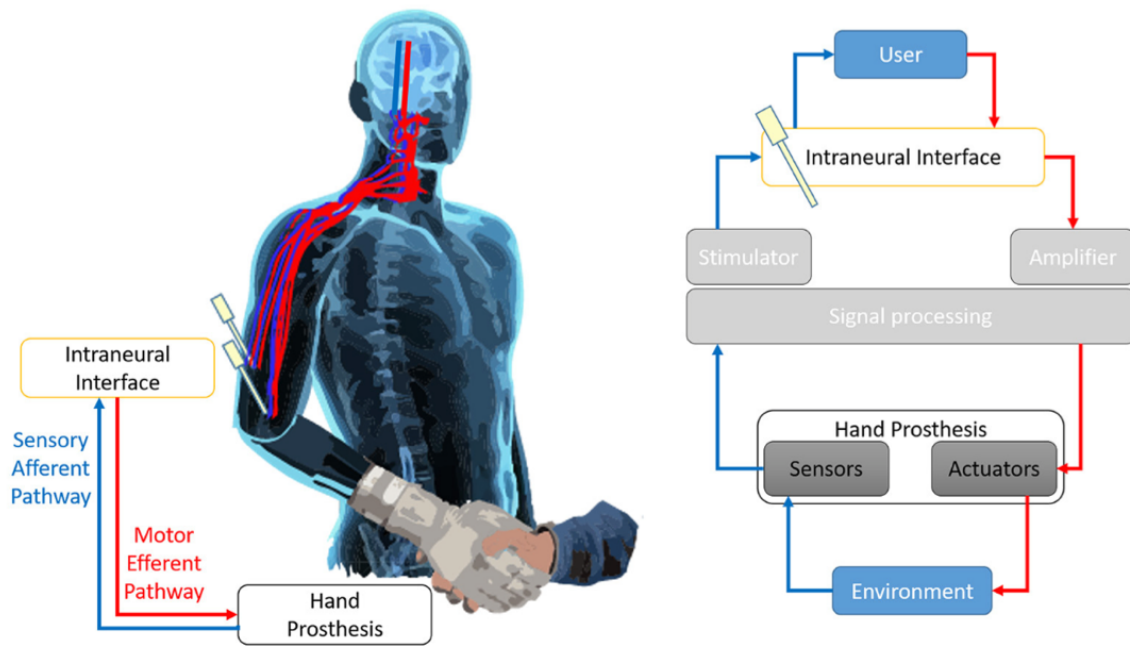


Figure 3. Principe d'une communication nerveuse bidirectionnelle avec une prothèse du membre supérieur.

Le principe d'une communication nerveuse bidirectionnelle implique la continuité entre la voie sensitive afférente (en bleu) et la voie motrice (en rouge). Les informations de l'environnement seraient acheminées aux capteurs (sensors) et transformées en signaux interprétables vers le système nerveux central. Ce dernier réagira en conséquence via des commandes motrices vers les actuateurs qui les traduiront en mouvements de la prothèse robotique. Tiré et adapté de Lotti et al, *Invasive Intraneural Interfaces: Foreign Body Reaction Issues* (2017). Reproduction permise (libre accès).

### 1.3.3 Avantages des électrodes intraneurales

Par rapport aux électrodes épineurales ou périneurales, qui se situent à proximité des enveloppes conjonctives du nerf, soit respectivement l'épinèvre et la périnèvre, les électrodes intraneurales présentent plusieurs avantages par leur contact direct avec les faisceaux nerveux (Sahyouni et al, 2017). Leur emplacement étroit par rapport aux axones donne aux électrodes intraneurales une meilleure précision afin de cibler les faisceaux nerveux d'intérêt et la possibilité d'utiliser un courant d'intensité plus basse, évitant ainsi la stimulation non-spécifique des fibres nerveuses avoisinantes (Rossini et al, 2010; del Valle et Navarro, 2013; Roche et Hansen, 2015; Lotti et

al, 2017). En conséquence, la qualité du signal serait supérieure par rapport aux électrodes extraneurales (del Valle et Navarro, 2013). Les électrodes intraneurales diminuent également la probabilité de cicatrisation à ce niveau puisqu'ils sont peu en contact avec les tissus conjonctifs autour des nerfs (Sayhouni et al, 2017).

### **1.3.4 Limitations des modèles existants d'implants intraneurale**

Malgré des avancées prometteuses, l'implantation intraneurale d'électrodes présente des limitations importantes pour leur utilisation à long terme. Le processus d'implantation d'une électrode au sein des fascicules du nerf peut mener à des dommages nerveux au cours de la chirurgie, ainsi qu'après l'insertion par la présence et les propriétés matérielles de l'électrode intraneurale. D'une perspective mécanique, contrairement aux électrodes épineurales et périneurales qui ne traumatisent pas les axones, l'intrusion de la masse de l'électrode dans le nerf entraîne une déformation de l'architecture neurale, et pourrait induire des dommages de cisaillement si ce dernier se mobilise. À titre d'exemple, une électrode implantée dans un nerf médian dans le bras bougerait significativement plus qu'une électrode implantée dans la partie mastoïdienne du nerf facial (McLellan et Swash, 1976; Sahyouni et al, 2017). Une mauvaise implantation peut également entraîner des symptômes neurologiques tels la douleur, la perte de sensation, des paresthésies, des infections ou des troubles vasculaires comme la formation d'hématomes (Dodick et al, 2015; Lee et al, 2015; Sahyouni et al, 2017). Une autre conséquence significative serait la réaction inflammatoire aux corps étrangers, dont plusieurs autres problèmes, comme la durabilité du matériel ainsi que la qualité du signal transmis ou enregistré, en découleraient (de la Oliva et al, 2017).

Les électrodes régénératives posent également des défis en relation avec leur contact intime avec les axones. Une étude avec les rats a démontré la présence d'axonopathie par compression après six mois dans les axones régénérées (Lago et al, 2005). De plus, les orifices de l'électrode limitent la croissance des plus grosses fibres, modifiant ainsi la topographie du nerf et augmentant la probabilité d'une reconnexion infidèle à la structure nerveuse initiale (Lago et al, 2005). Ainsi, cette méthode demeure encore immature pour une application clinique chez les humains.

## Réaction à corps étranger

Lors de l'introduction d'un corps étranger dans l'hôte de façon chirurgicale, ce dernier déclenche un processus de cicatrisation et une cascade inflammatoire à multiples étapes (Anderson, 2001; Gretzer et al, 2006; Teller et White, 2009; Vert et al, 2012). La présence chronique de l'implant, cependant, génère une persistance de l'état inflammatoire menant à une réaction à corps étranger (*foreign body reaction*, Figure 4). La réaction à corps étranger débute par la sécrétion de substances pro-inflammatoires en réponse à l'insulte des tissus vasculaires et conjonctifs avoisinants (Lotti et al, 2017; Sahyouni et al 2017). La présence de l'implant attire l'adhésion de protéines plasmatiques et des facteurs du complément à sa surface, créant un environnement chimioattractant pour les leucocytes impliqués dans l'activation du complément et de la coagulation (Lotti et al, 2017). L'accumulation de macrophages, ou des cellules gliales dans le système nerveux central, peut perdurer des semaines dû au changement de configuration chimioattractant de la fibronectine par son contact avec l'implant et les cytokines sécrétées (Tang et Eaton, 1999; Keselowsky et al, 2007). Afin de tenter de digérer le corps étranger, ils fusionnent pour former des cellules géantes sécrétant des substances catabolisantes (Anderson, 2000). Les macrophages sécrètent également plusieurs facteurs de croissance qui entraîneront la persistance des monocytes et macrophages auprès du corps étranger, ainsi qu'une transition vers une phase fibrotique par la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Anderson et al, 2008). Éventuellement, la réaction se stabilise par une réorganisation cellulaire impliquant les myofibroblastes et la néovascularisation, formant alors une capsule fibreuse de matrice extracellulaire autour du corps étranger dans l'objectif de l'isoler du reste de l'organisme. La surface, le volume, la forme et les propriétés physiques du corps étranger influencent la magnitude de la réaction et de la réorganisation fibrotique.

La présence et l'activation de cellules inflammatoires peuvent compromettre l'intégrité du matériel et la fonction de l'électrode intraneurale. Les leucocytes activés, retrouvés entre l'électrode et la capsule fibreuse, sécrètent des dérivés réactifs de l'oxygène et différentes enzymes ayant le potentiel de dégrader certains matériaux, entraînant ainsi la défektivité de l'implant (Gretzer et al, 2006). La capsule fibreuse cause également une transduction inefficace du signal entre le système nerveux et l'électrode. Ceci entraînerait une augmentation du seuil électrique et de l'impédance requis afin d'atteindre le niveau d'activité souhaité, qui



demanderait davantage d'ajustements dans les paramètres de stimulation et pourrait endommager les neurones avoisinants à long terme (Lotti et al, 2017; Sahyouni et al, 2017). Au niveau du système nerveux central, des électrodes implantées chroniquement dans le cortex des chats (Schultz et Willey, 1976 ; Liu et al, 1999) démontrent des inconsistances dans la qualité des enregistrements dû à l'isolation électrique causée par la capsule fibrotique. Similairement, dans le système nerveux périphérique, de la Oliva et al (2017) ont démontré que, malgré la préservation de la fonction normale du nerf, la présence de l'objet dans le nerf a maintenu la réaction inflammatoire pour deux semaines après la chirurgie, qui par contraste diminue dans les nerfs sans électrode implantée. À l'histologie, une capsule fibreuse a été observée autour de l'électrode, avec une couche de macrophages en contact direct avec l'objet. La présence de Iba-1, protéine marquant les macrophages, et de cellules géantes, résultant de la fusion de macrophages, dans le nerf demeure significativement plus élevée chez les animaux avec un implant que ceux qui n'en comportaient pas pour les 32 semaines étudiées.

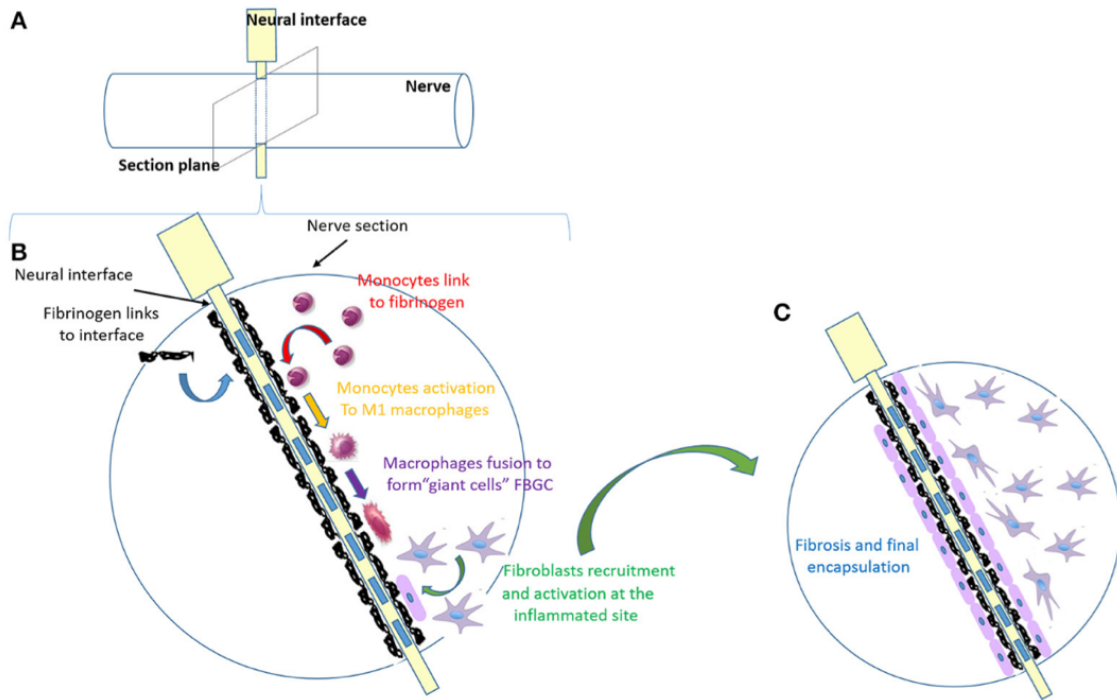


Figure 4. Étapes de la réaction à corps étrangers dans le contexte d’implants neuronaux

A) Emplacement de l’interface neurale dans un nerf, représenté par le cylindre. B) Agrandissement sur une section transverse du nerf. Il y a premièrement l’absorption des protéines plasmatiques sur le corps étranger, suivi du recrutement des monocytes et leur différenciation en macrophages. Ces derniers s’activent et forment des cellules géantes, avant que les fibroblastes soient recrutés et activés pour former un tissu fibrotique. C) La capsule se stabilise sur l’électrode et les fibroblastes forment un tissu dense compact. Tiré et adapté de Lotti et al, *Invasive Intraneural Interfaces: Foreign Body Reaction Issues* (2017). Reproduction permise (libre accès).

## 1.4 Biocompatibilité

Un matériel dit biocompatible possède la capacité d’être toléré par un organisme vivant (Vert et al, 2012). En autres mots, un matériel biocompatible ne suscitera pas de réaction inflammatoire ou de toxicité à l’hôte.

### **1.4.1 Amélioration de la biocompatibilité des électrodes intraneurales**

Une méthode souvent étudiée pour améliorer la biocompatibilité d'implants intraneuraux consiste à les enrober d'une substance biocompatible afin de masquer la présence du corps étranger au système immunitaire de l'hôte. Plusieurs substances synthétiques ont été étudiées pour leur potentiel d'être tolérées par un organisme vivant, témoigné par la préservation des structures nerveuses et l'absence de réaction inflammatoire chronique. Lefurge et al (1991) ont étudié la viabilité chronique des électrodes d'enregistrement intrafasciculaires enrobés de polytétrafluoroéthylène (téflon), une substance hypothétiquement biocompatible, implantées dans les nerfs radiaux des chats. Six des huit électrodes implantées sont restées fonctionnelles après six mois d'études, les deux autres dysfonctionnels étant endommagés pour des raisons mécaniques. Malgré la biocompatibilité fonctionnelle de l'enrobage de téflon, des changements histologiques, tels une réduction significative de la taille des axones par la diminution de la myélinisation et une réaction inflammatoire légère, témoignent d'une perturbation tissulaire locale causée par la présence du corps étranger. Une autre étude similaire a été produite avec des électrodes recouvertes de nylon dans les nerfs tibiaux et péronés de lapins et d'un chat pour neuf semaines et quatre ans respectivement (Bowman et Erickson, 1985). Leurs résultats démontrent de la démyélinisation occasionnelle et des amas conjonctifs bulbeux au site de l'implantation. Plus récemment, des composés organiques comme les polymères conductifs, les hydrogels conductifs et les nanotubes de carbones seraient plus intéressants pour leur meilleure performance en termes de conductivité et la possibilité de les combiner avec d'autres matériaux (Sahyouni et al, 2017; Aregueta-Robles et al, 2014). Néanmoins, certaines de ces substances demeurent toxiques pour les cellules si exposées à des hautes concentrations (Bottini et al, 2006; Tian et al, 2006). À part les substances synthétiques, des molécules anti-inflammatoires et immunomodulatrices, tels le CD200 et la dexaméthasone, ont également été étudiés pour atténuer l'activité des macrophages et le dommage aux neurones (Kim et al, 2014). Des agents anti-fibrotiques comme les inhibiteurs de tyrosine kinase pourraient diminuer l'activation des fibroblastes (Lotti et al, 2017). La méthode de livraison de ces produits à leur site d'action reste un défi à surmonter, puisqu'il faudrait optimiser l'action des agents tout en limitant les effets secondaires d'une administration systémique (Lotti et al, 2017).

## 1.4.2 Mesure indirecte : la synaptogenèse

Notre laboratoire prend une approche novatrice pour améliorer la longévité d'un implant avec la synaptogenèse, dans l'objectif d'induire la formation de nouvelles synapses entre le système nerveux de l'hôte et l'objet étranger. En effet, l'induction d'une connexion biologique, soit une synapse, entre un neurone et une substance synthétique témoignerait de la tolérance du système nerveux par rapport à cette dernière. Ainsi, la synaptogenèse aurait le potentiel d'être aussi indicatif de la biocompatibilité.

## 1.4.3 Synapse

Une synapse décrit une zone spécialisée reliant un neurone et sa cible, soit un autre neurone ou une cellule effectrice (Kandel et al, 2013). Une synapse peut être de nature électrique, médiée par des jonctions communicantes entre deux neurones qui se partagent du cytoplasme, ou de nature chimique, médiée par des molécules organiques ou peptides nommées neurotransmetteurs (Kandel et al, 2013). Les synapses chimiques, soit la majorité des synapses, possèdent une variété d'influence sur leurs cibles. Les structures impliquées dans une synapse incluent 1) la terminaison présynaptique, une région élargie du neurone qui transmet le signal électrique (potentiel d'action), 2) la fente synaptique, un espace étroit où se déversent les neurotransmetteurs, et 3) la partie postsynaptique, soit la dendrite ou le corps d'une autre cellule.

L'arrivée d'un potentiel d'action à la terminaison présynaptique stimule l'exocytose des neurotransmetteurs dans les vésicules synaptiques accumulées dans la zone active de la terminaison présynaptique (Kandel et al, 2013). La fusion des vésicules relâche dans la fente synaptique une quantité de neurotransmetteurs proportionnelle au nombre et à la fréquence des potentiels d'action. Ces derniers s'attachent aux récepteurs de la cellule postsynaptique, générant ainsi une action excitatrice ou inhibitrice selon le type de cellule post-synaptique. La majorité des vésicules seront par la suite rapidement recyclées du côté présynaptique par endocytose et rechargées de neurotransmetteurs en prévision de la prochaine dépolarisation

(Cousin et Robinson, 1999) et ce, majoritairement en deçà d'une minute (Ryan et Smith, 1995; Ryan et al, 1996).

La formation des synapses est un processus dynamique qui débute en période embryonnaire et se poursuit au cours de la vie d'un organisme. La plasticité synaptique, ou le changement de la force d'une synapse selon les besoins, est nécessaire pour renforcer les connexions importantes dans le système nerveux central. Cependant, le potentiel de synaptogenèse du système nerveux périphérique est presque absent dans la majorité des mammifères après leur formation initiale, à l'exception d'un certain potentiel limité de régénération dans les nerfs périphériques endommagés (Sulaiman et Gordon, 2013). En effet, alors que les synapses du système nerveux central possèdent le potentiel de se réorganiser au cours de la vie d'un organisme, la formation des jonctions neuromusculaires, soit la connexion entre un neurone et une fibre nerveuse, se déroule majoritairement au cours de la vie embryonnaire et ces dernières demeureront stables une fois établies (Wu et al, 2010). Les études chez les souris démontrent que la formation d'une synapse neuromusculaire implique la participation de fibres nerveuses terminales indifférenciées, des fibres musculaires à innover et des cellules de Schwann (Wu et al, 2010; Li et al, 2018). Des regroupements de récepteurs à acétylcholine (AChR) commencent par se dispersées au milieu des fibres musculaires et seront premièrement innervés par plusieurs axones. La maturation éventuelle de la jonction neuromusculaire entraînera la formation de plusieurs plis jonctionnels, donnant un réseau arboriforme qui se rapporte vers un seul axone (Wu et al, 2010; Li et al, 2018). La dégénération des synapses neuromusculaires et leur limitation en terme de régénération mènent à plusieurs pathologies comme le syndrome myasthénique congénital et la myasthénie grave (Li et al, 2018).

#### **1.4.4 Marqueurs présynaptiques**

Plusieurs protéines sont indicatrices de la présence de différents éléments d'une synapse. La quantification de leur présence dans certaines cellules ou tissus permettent de mieux comprendre les processus physiologiques dans ces derniers.

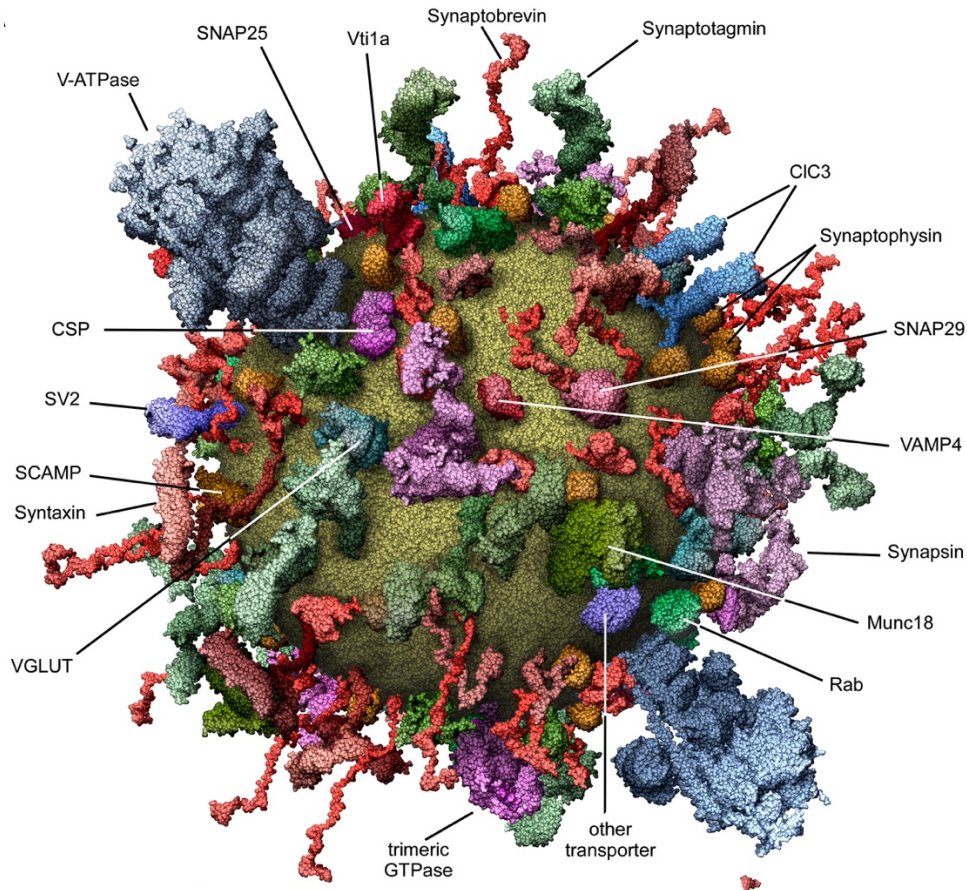


Figure 5. Principales classes de protéines présynaptiques, soit associées aux vésicules synaptiques

Plusieurs protéines présynaptiques identifiées à travers diverses études sont représentées selon leur structures moléculaires. Les familles de synaptophysine, de synapsine et de SV ont été souvent étudiés dans la littérature comme des marqueurs typiques pour la présence de vésicules synaptiques. Tiré et adapté de Takamori et al, *Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle* (2006). Avec permission de Elsevier and Copyright Clearance Center.

## Synaptophysine

La synaptophysine est une glycoprotéine de 38kDa spécifique aux membranes des vésicules présynaptiques qui a déjà été validée comme un marqueur fiable pour quantifier la présence d'éléments présynaptiques (Südhof et al, 1987; Hoog et al, 1988; Leclerc et al, 1989; Calhoun et al, 1996; Lucido et al, 2009). La synaptophysine serait impliquée avec le calcium dans la relâche de certains neurotransmetteurs (Rehm, 1986). Sa présence dans les régions terminales

présynaptiques autant au niveau du système nerveux central que périphérique la rend comme une cible intéressante dans l'étude de la formation synaptique ainsi que les maladies neurodégénératives (Ince et al, 1995; Calhoun et al, 1996 ).

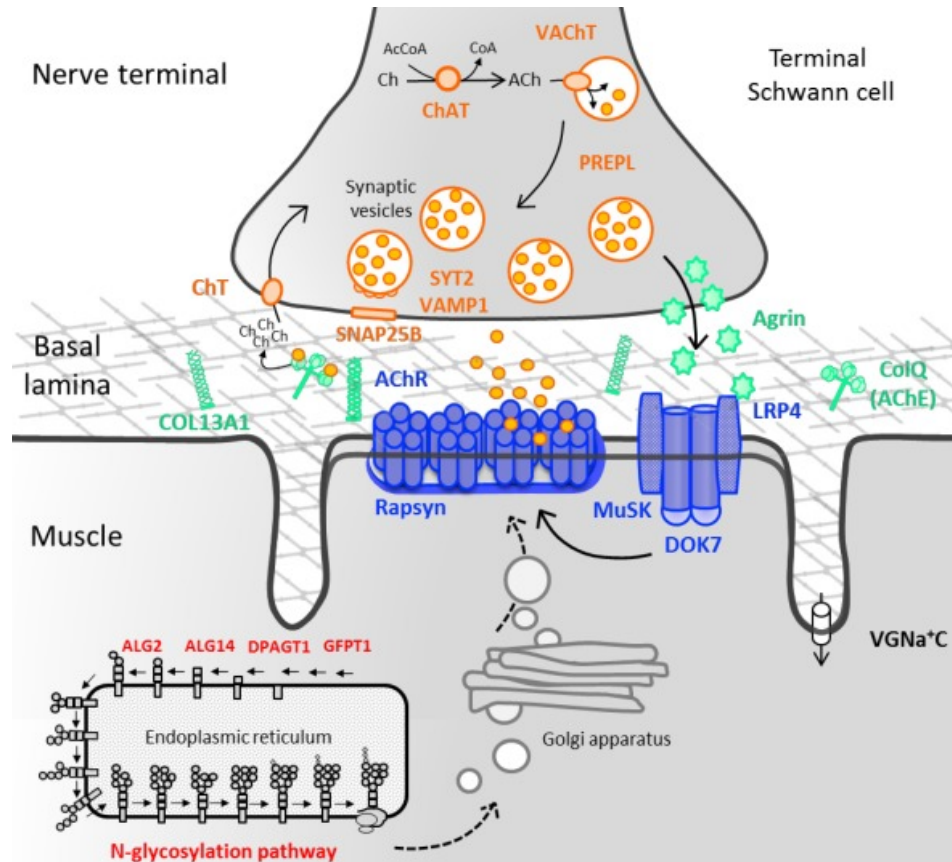


Figure 6. Principales protéines impliquées dans une jonction neuromusculaire

Une jonction neuromusculaire est une connexion retrouvée communément dans le système nerveux périphérique, reliant un neurone moteur terminal et sa cible musculaire. Le VACHT est une protéine responsable de remplir les vésicules synaptiques cholinergiques d'acétylcholine, le neurotransmetteur, dans le but de permettre son exocytose lors d'une dépolarisation. Tiré et adapté de Rodriguez Cruz et al, *Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle* (2006). Reproduction permise (libre accès).

## **V AchT**

Le transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (*Vesicular acetylcholine transporter* ou V AchT) est une protéine qui, contrairement à choline acétyltransférase (*Choline acetyltransferase* ou ChAT), est concentrée surtout aux régions terminales présynaptiques des neurones cholinergiques du système nerveux central et périphérique (Weihe et al, 1996). Leur présence suggère le potentiel d'une certaine fonctionnalité des synapses en question puisqu'elle indique la présence de vésicules présynaptiques contenant le neurotransmetteur acétylcholine.

### **1.4.5 Synaptogenèse sur des surfaces synthétiques *in vitro* dans le système nerveux central**

Les études de Burry et Lasher (1978a) ainsi que de Burry et Wood (1978b, 1978c) sont les premières à démontrer la faisabilité d'un modèle de synaptogenèse dans le système nerveux central reproductible *in vitro*. Cet ensemble d'études présentent la possibilité d'induire la formation d'éléments présynaptiques *de novo* sur une variété de surfaces artificielles (Burry et Lasher, 1978a; Burry et Wood, 1978b; Burry et Wood 1978c). Par la suite, Burry (1980) a démontré que, similairement aux études antérieures (Pfenninger, 1971), l'aspect basique d'une substance, comme la poly-L-lysine ou la poly-orthinine, semble attirer les neurones comme une cible post-synaptique potentielle et induire significativement plus la formation d'éléments présynaptiques chez les neurones du cervelet du rat. Les cellules s'attachaient à des microsphères de sepharose recouvertes de substances poly-basiques cationiques aussitôt que 4 heures après l'ajout des microsphères dans la culture. À la microscopie électronique, les processus neuronaux présentaient des renflements d'environ 40nm à la surface des microsphères enrobées après 24 heures, suggérant la formation de nouveaux boutons présynaptiques. L'apparence des renflements dans une section perpendiculaire au plan de contact entre le neurone et la microsphère est similaire à celle des véritables synapses. De plus, un marquage avec la synapsin-I et la SV48, deux protéines présynaptiques, a démontré la présence de ces protéines située dans les accumulations de vésicules ressemblant des vésicules synaptiques (Burry et al, 1986). L'importance des charges acido-basiques dans l'initiation de la synaptogenèse a aussi été soulignée par une étude antérieure de Burry et Lasher (1978a) qui,



grâce à l'utilisation d'acide phosphotungstique éthanolique (*ethanolic phosphotungstic acid* ou E-PTA) pour détecter des éléments basiques, a démontré que les charges positives se situaient surtout près de la membrane post-synaptique d'une synapse en formation. Des expériences du même type réalisées avec des neurones du cervelet néonatal de rat ont donné des résultats similaires (Burry 1983).

La fonctionnalité des nouveaux boutons présynaptiques a été validée dans l'étude par Lucido et al (2009), dans laquelle l'utilisation de l'immunofluorescence et l'imagerie de cellules vivantes confirment l'aspect fonctionnel du côté présynaptique. L'étude, faite sur des neurones de l'hippocampe murin, a démontré l'accumulation de la synaptophysine, une protéine des vésicules présynaptiques, aux sites de contact entre les processus neuronaux et des microsphères enrobées de poly-D-lysine, une substance synthétique similaire mais plus stable que la poly-L-lysine, un phénomène qui est absent dans les billes non enrobées. Comme dans les études de Burry et Burry et al (1978a, 1978b, 1978c, 1980, 1986), la microscopie électronique a démontré des renflements contenant des vésicules d'environ 50nm, une observation absente dans les conditions contrôle. La fonctionnalité des accumulations présynaptiques est appuyée par la présence importante de bassoon, *rab3a-interacting molecule* (RIM), canal calcium de type N, N-cadhérine et F-Actine, des protéines de la zone active, en colocalisation avec la synaptophysine. Les renflements étaient également capables de faciliter l'exocytose et la recapture des vésicules, observés à la microscopie confocale en direct avec le déplacement de la fluorescence FM4-64 lors de la dépolarisation des neurones au KCl. Lucido et al (2009) ont également remarqué que la poly-D-lysine induisait surtout la formation de nouveaux complexes présynaptiques, vu que les parties post-synaptiques, indiquées par le PSD95, n'apparaissent seulement en présence de complexes présynaptiques déjà existants.

#### **1.4.6 Étapes de la synaptogénèse**

Burry et Burry et al (1978a, 1978b, 1978c, 1980) proposent, d'après plusieurs études sur les neurones du cervelet du rat, une théorie pour la séquence d'étapes menant à la formation d'une

nouvelle synapse dans le système nerveux central. Le processus de croissance neuronal commence avec l'expression des composés acides menant à une surface négative sur les endroits concernées de la membrane cellulaire. Ce dernier est attiré par une surface chargée positivement par la présence de composés basiques, qui deviendra la future membrane post-synaptique. L'adhésion serait suivie d'un renflement du côté présynaptique, indiquant l'initiation de la synaptogenèse, qui diminuera en taille avec la maturation des éléments présynaptiques. Des éléments présynaptiques s'accumulent auprès de leur côté alors qu'une augmentation en densité post-synaptique se forme. Finalement, le marquage au E-PTA témoignerait d'une certaine maturité de la synapse, voire possiblement sa fonctionnalité. La maturation pourrait prendre jusqu'à quelques jours, alors que la formation même se réalise probablement en moins de 24 heures. Ces expériences démontrent l'importance des charges dans l'attraction des processus neuronaux et le déclenchement de la synaptogénèse, élément souvent manquant avec les approches présentement employées pour les électrodes intraneurales qui se concentrent surtout sur des matériaux neutres.

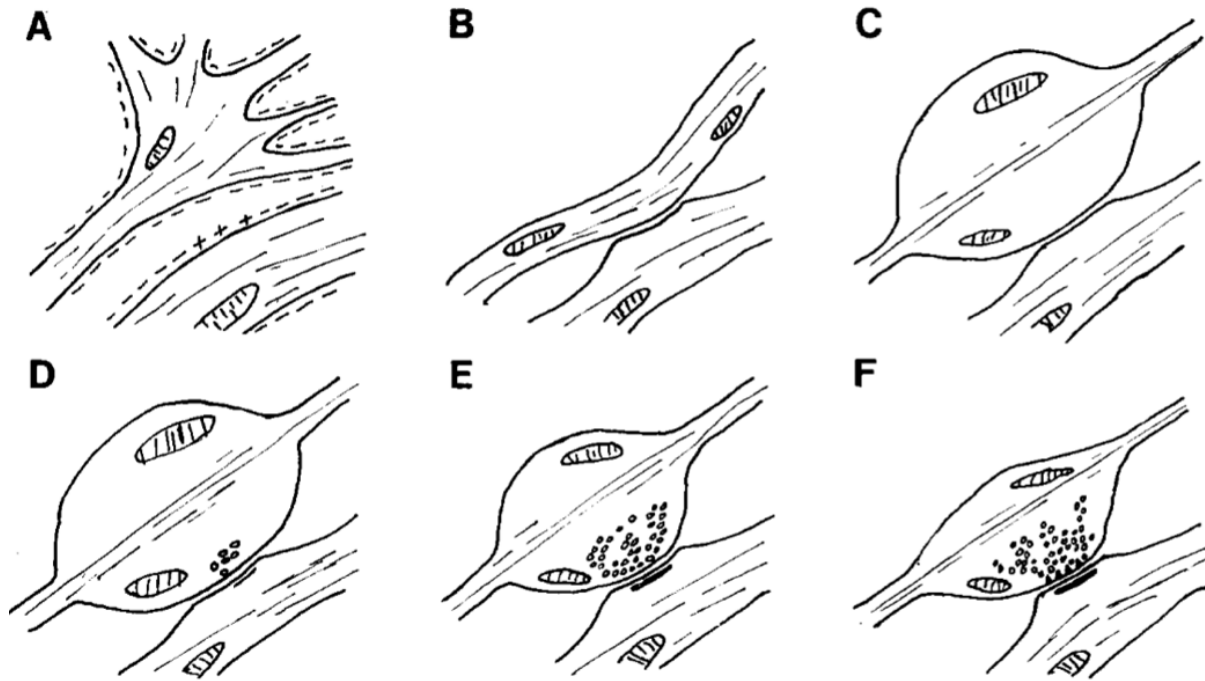


Figure 7. Hypothèse sur l'influence des charges acidobasiques dans la formation des nouveaux boutons présynaptiques

A) État avant la croissance axonale : les « + » indiquent la surface basique chargée positivement vers laquelle le cône de croissance sera attiré, alors que les « - » indiquent les surfaces chargées négativement. B) Adhésion des futures surfaces pré et post-synaptiques. C) Renflement du futur côté présynaptique. D) Accumulation des vésicules synaptiques et augmentation de la densité post-synaptique. E) Augmentation plus importante des phénomènes de l'étape précédente. F) Marquage possible du E-PTA aux surfaces présynaptiques et post-synaptiques. Tiré et adapté de Burry, *Formation of Apparent Presynaptic Elements In Response To Poly-Basic Compounds* (1980). Avec permission de Elsevier and Copyright Clearance Center.

Des recherches plus poussées par Lucido et al (2009) ont démontré l'implication des *heparan sulfate proteoglycans* (HSPGs), une grande famille de molécules transmembranaires chargées négativement impliquées dans le développement des synapses. En effet, l'ajout de l'héparinase II, une enzyme dégradant les HSPGs, ou de l'*heparan sulfate*, une molécule en compétition avec les HSPGs endogènes des neurones hippocampiques, ont diminué la quantité de synaptophysine accumulée de façon proportionnelle à la dose. Plus spécifiquement, le syndecan-2, une protéine de type HSPG, serait une protéine candidate pour déclencher la formation de la synapse sur les microsphères de poly-D-lysine.

### **1.4.7 Synaptogenèse sur des surfaces synthétiques in vitro dans le système nerveux périphérique**

La synaptogenèse sur des surfaces synthétiques a été largement étudiée avec les neurones du système nerveux central (Burry et Lasher, 1978a; Burry et Wood, 1978b; Burry et Wood, 1978c; Burry, 1980; Burry et al, 1986; Lucido et al, 2009; Lucido et al, 2010; Gopalakrishnan et al, 2009), mais a été également exploré dans le système nerveux périphérique moteur par les études de Peng et al (1987). Ils ont cultivé des microsphères de latex enrobées de polylysine ou polyornithine avec des explants des moelles épinières de larves de xenopus, une espèce de grenouille. Une concentration importante de SV48, une protéine des vésicules présynaptiques, a été retrouvée aux contacts entre les processus neuronaux et les microsphères enrobées, alors que cette dernière était absente sur les microsphères non enrobées. À la microscopie électronique, des structures claires de 50 à 60nm de diamètre et denses de 80 à 100nm de diamètre, d'une morphologie identique aux vésicules synaptiques des jonctions neuromusculaires, ont été observées.

### **1.4.8 Substances synaptogéniques**

#### **Polylysine**

La polylysine est une substance chargée très positivement (cationique), utilisée couramment en culture cellulaire pour supporter la croissance des neurones et leur adhésion à leur surface de culture. L'ajout de cette substance dans une culture permet aussi d'améliorer la survie des neurones du cervelet murin, de diminuer la croissance de cellules gliales et d'augmenter la fonction de l'acétylcholinestérase, une enzyme associée avec la fonction synaptique (Kozak, 1978). Deux isomères existent, mais la poly-D-lysine, une version synthétique de la poly-L-lysine, est préférée en laboratoire pour sa meilleure stabilité en présence d'enzymes cellulaires (Lucido et al, 2009). Des études précédentes par Lucido et al (2009) ont déjà établi leur potentiel comme substance synaptogénique dans le système nerveux central.

## Dendrimère

Les polyglycérols hyperbranchés, dont fait partie le dendrimère utilisé dans notre étude, sont des polyéthers aliphatiques entourés de branches d'amines modifiables selon les besoins (Hellmund et al, 2014; Kurniasih et al, 2014). Il a été initialement conçu pour être un nanotransporteur d'ADN pour la transfection des cellules. Ces substances possédant une structure globulaire sont intéressantes pour leur biocompatibilité et stabilité supérieures *in vivo* (Sisson et al, 2009; Sisson et Haag, 2010). D'ailleurs, un défi majeur des substances très cationiques serait leur cytotoxicité, menant à la déstabilisation des membranes cellulaires, l'apoptose et la nécrose (Hellmund et al, 2015). Les polyglycérols hyperbranchés ne comportent aucune toxicité pour les cellules jusqu'à 100 ug mL<sup>-1</sup>, confirmé avec des tests MTT en comparaison au meilleur produit existant, le poluéthylèneimine (Hellmund et al 2014; Hellmund et al, 2015). L'intérêt pour cette substance comme un candidat pour la synaptogenèse se base sur des travaux par Al Alwan et al (données internes), dans lesquels des neurones corticaux de rat cultivés avec des microsphères enrobées de dendrimère ont développé une quantité importante d'éléments présynaptiques aux sites de contact. Cette valeur est significativement supérieure par rapport aux microsphères non-enrobées (contrôle) et diffère également de la condition PDL, qui a déjà été prouvée comme une substance synaptogénique dans le système nerveux central (Lucido et al, 2009; Lucido et al, 2010).

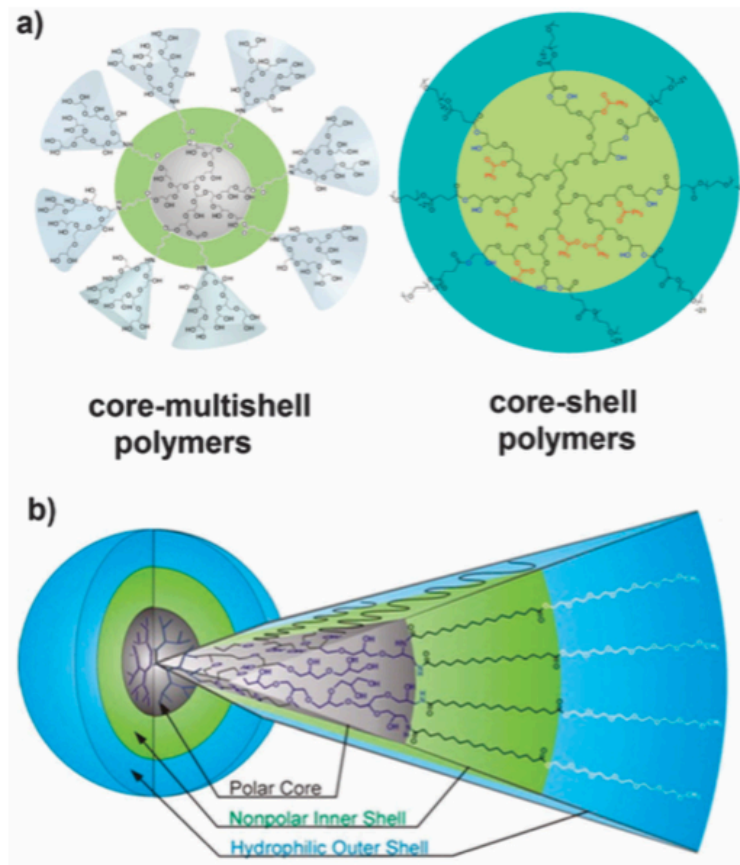


Figure 8. Polyglycérol hyperbranché, dont fait partie le dendrimère

A) Structures possibles du polyglycérol hyperbranché. Étant initialement créé pour être un nanotransporteur pour la livraison de médicaments ou d'autres substances, le polyglycérol hyperbranché peut être modifié selon les besoins. B) Division des couches du polyglycérol hyperbranché, constitué d'un centre polaire, suivi d'une couche interne non-polaire et d'une couche externe hydrophile. Tiré et adapté de Kurniasih et al, *Dendritic nanocarriers based on hyperbranched polymers* (2014). Reproduction permise (libre accès).

### Autres substances synaptogéniques

D'autres substances ont été vérifiées pour leur potentiel synaptogénique dans le système nerveux central en utilisant une méthode similaire à celle de Burry et Lasher (1978a) et Burry et Wood (1978b). Des membranes bilipidiques (*solid supported bilayer lipid membranes*), formées de phospholipides composant les membranes cellulaires, ont donné des résultats

similaires à la poly-D-Lysine avec les neurones de l'hippocampe (Gopalakrishnan et al, 2009). La nétrine-1, protéine impliquée dans le guidage axonal durant le développement embryonnaire, est également synaptogénique lorsqu'en contact avec des neurones corticales du rat et des souris (Goldman et al, 2013).

## 1.5 Modèles d'études

Afin d'étudier la synaptogénèse comme une méthode pour améliorer la biocompatibilité d'une électrode intraneurale, une approche *in vitro* ainsi qu'une *in vivo* seront nécessaires pour valider

- 1) la possibilité de formation d'éléments présynaptiques de novo avec des cellules humaines et
- 2) ce même phénomène dans un modèle animal reproductible.

### 1.5.1 In vitro : Cellules souches pluripotentes induites

L'utilisation des cellules est une méthode commune pour l'étude de phénomènes à un stade préliminaire. Elle est avantageuse car elle implique peu ou pas de sacrifice animal, et les cellules d'une provenance humaine peuvent être intéressantes dans la recherche transitionnelle vers la clinique (Geuna et al, 2016). La pureté des cultures est contrôlable, allant de l'isolation d'un type cellulaire à deux ou plusieurs types de cellules, comme dans la co-culture de neurones et de cellules de Schwann. Les cellules seraient également disponibles en grande quantité et certaines lignées sont répliquables, ce qui serait intéressant pour vérifier la faisabilité d'études déjà décrites dans la littérature.

L'utilisation des cellules souches pluripotentes induites (*induced pluripotent stem cells* ou iPSC) humaines est une méthode novatrice utilisée pour l'étude de maladies neurologiques chez les humains. Cette technique implique la transfection rétrovirale des cellules humaines matures, souvent des fibroblastes, avec les facteurs de transcription Oct3/4, Sox2, c-Myc et Klf4 afin de générer des cellules ayant les mêmes propriétés que des cellules souches embryonnaires (Takahashi et al, 2007). Ces cellules pluripotentes permettraient de générer par différenciation

tous les types de cellules somatiques, menant à la possibilité d'étudier des maladies sur une plateforme humaine sans impliquer des considérations éthiques contrairement à l'utilisation des embryons humains.

Un protocole existant a démontré une procédure reproductible et fiable pour transformer des cellules souches pluripotentes induites en neurones moteurs (Du et al, 2015). En effet, les auteurs ont été capable d'élaborer une méthode pour induire des cellules souches humaines embryonnaires en cellules progénitrices de neurones moteurs à une pureté de plus de 95%, ainsi qu'une population de neurones moteurs fonctionnels matures à une pureté supérieure à 90% en un total de 28 jours. La génération de progéniteurs se fait en coordonnant avec des petites molécules différentes voies de signalisation, alors que la différenciation en neurones moteurs matures s'est produite à l'aide d'un inhibiteur de Notch. Cette méthode permet également de maintenir les progéniteurs pour un minimum de cinq passages, pouvant ainsi produire une population significative de cellules. L'intention serait d'utiliser des cellules provenant de patients atteints de maladies neurodégénératives en niveau moteur afin d'étudier leur maladie, mais la méthode fonctionne également avec des cellules humaines saines.

Cependant, cette méthode comporte certaines critiques. Les cellules, même humaines, ne peuvent représenter de façon efficace tous les comportements de ces mêmes cellules dans les conditions physiologiques (Geuna et al, 2016). Les cellules ne sont cultivées dans l'environnement en trois dimensions d'un nerf, un facteur pouvant exercer de grandes influences sur leurs fonctions cellulaires. Ainsi, un modèle in vivo serait la prochaine étape idéale si des résultats de travaux in vitro sont prometteurs.

### **1.5.2 Modèle du nerf sciatique du rat**

Le nerf sciatique est le plus grand nerf chez les mammifères et la structure idéale pour l'étude des nerfs périphériques. Le modèle du nerf sciatique du rat est très utilisé en recherche sur la pathogenèse des maladies nerveuse périphériques et la régénération nerveuse par sa facilité d'accès et ses coûts modestes (Swett et al, 1986). Dans l'étude des lésions nerveuses périphériques, l'écrasement du nerf sciatique est souvent utilisé pour observer le processus de



régénération du côté proximal de la blessure (del Valle et Navarro, 2013). Cette méthode a été validée dans des études antérieures au sein de notre laboratoire (Pion et al, 2014).

Cette méthode comporte ses limites, comme la difficulté de traduire des résultats d'une population très homogène d'animaux en santé vers une population hétérogènes d'humains (Kaplan et al, 2015). En autres mots, il est souvent difficile de généraliser les réponses physiologiques observées chez les rats pour les humains. Néanmoins, l'étude chez les rats serait la prochaine étape logique après la confirmation du phénomène d'intérêt au niveau cellulaire (Peng et al, 1987), en absence d'alternatives fiables et réalistes. Les expériences *in vivo* représentent une étape essentielle à étudier avant le passage vers la recherche clinique.

### **1.5.3 Imagerie des cellules vivantes**

L'imagerie des cellules vivantes (*live cell imaging*) permet l'acquisition d'une série d'images pouvant illustrer la physiologie des cellules vivantes sous des conditions spécifiques. L'utilisation de colorants comme le FM-143 est intéressante pour observer les phénomènes d'exocytose et d'endocytose des vésicules présynaptiques chez les neurones (Cousin, 2008). L'induction de l'exocytose par une forte concentration de chlorure de potassium ou de stimuli électriques aux neurones en culture permet au FM-143 de marquer les vésicules relâchées et recyclées. Ainsi, les régions terminales présynaptiques de neurones seront fluorescentes, et l'induction d'une deuxième exocytose se traduira par une diminution de fluorescence avec le déplacement des vésicules marquées vers l'extérieur de la cellule (Cousin, 2008). L'observation d'un tel phénomène a été utilisé dans les études de Lucido et al (2009, 2010) pour témoigner de la fonctionnalité des nouveaux complexes présynaptiques observés à l'immunofluorescence.

## 1.6 Objectifs de recherche

Dans cette étude, nous nous concentrons sur la possibilité d'induire la synaptogenèse des neurones du système nerveux périphérique sur des surfaces synthétiques. En effet, la formation de nouvelles synapses permettrait une connexion biologique plus robuste et pourrait contribuer à augmenter la longévité des implants si ces derniers établissaient ce type de lien avec les neurones. Ce concept, soit la formation de nouvelles synapses par contact entre des neurones et des substances synaptogéniques, s'est déjà avéré prometteur dans des expériences précédentes dans le système nerveux central (Burry et Lasher, 1978a; Burry et Wood, 1978b; Burry et Wood, 1978c; Burry, 1980, Burry et al, 1986; Lucido et al 2009; Gopalakrishnan et al, 2009; Goldman et al, 2013) et dans le système périphérique (Peng et al, 1987). Cependant, ces études ont été réalisées exclusivement sur des cellules de provenance animale, et ainsi les résultats ne peuvent être extrapolés pour l'application chez les humains. Aucune étude à présent n'a exploré ce principe dans un modèle animal adulte *in vivo*. Avec le développement des techniques de différenciation des cellules souches pluripotentes humaines, il serait intéressant de voir si les principes décrits dans la littérature sont applicables dans un modèle humain de neurones périphériques *in vitro*. De plus, avec l'élaboration de nouvelles molécules comme les polyglycérols hyperbranchés prouvées d'être synaptogéniques *in vitro* (Al Alwan et al, données internes) et durables *in vivo* (Sisson et al, 2009; Sisson et Haag, 2010), il serait intéressant d'étudier leur potentiel comme substance synaptogénique dans le système nerveux périphérique.

Nos objectifs de recherche sont 1) de démontrer la capacité des neurones moteurs humains (*in vitro*) de former de nouveaux éléments présynaptiques avec des microsphères enrobées de poly-D-lysine (PDL) ou de dendrimère (DND), ainsi que 2) de démontrer la capacité des nerfs sciatiques de rat (*in vivo*) de former des nouveaux éléments présynaptiques avec des microsphères enrobées avec la PDL et le DND. Nous croyons que nous observerons quantitativement plus de nouveaux complexes présynaptiques formés aux lieux de contact entre les neurones et les microsphères enrobées que non enrobées. Plus spécifiquement, nous pensons que le dendrimère sera une meilleure molécule en terme d'induction de synaptogénèse autant pour les neurones périphériques murins que humains par rapport à la poly-D-lysine, qui sera supérieure aux microsphères non-enrobées. De plus, nous projetons qu'une durée plus longue

d'incubation des neurones avec les microsphères se traduira par la formation d'une quantité plus importante d'éléments présynaptiques pour les neurones animales et humaines. Cette étude contribuera à l'objectif ultime d'augmenter la longévité et la durabilité d'implants, dont les électrodes intraneurales, chez les humains qui permettront d'améliorer leur performance dans le cadre du traitement de pathologies chroniques ou l'établissement d'une connexion bidirectionnelle efficace entre le système nerveux périphérique et une prothèse robotique.

Les résultats de ce mémoire sont présentés sous la forme d'un article scientifique qui sera soumis au *Journal of Neuroscience*.

## CHAPITRE 2

Enhancement of neural biocompatibility: Formation of Presynaptic Boutons on Cationic Polymer and Hyperbranched Polyglycerol-coated Microspheres in Peripheral Neurons

Xiya Ma<sup>1,3</sup>, Laila Al-Alwan<sup>2</sup>, Frédérique Larroquette<sup>2</sup>, Jean-Pierre Clément<sup>2</sup>, Daryan Chitsaz<sup>2</sup>, Edward Fon<sup>2</sup>, Thomas M Durcan<sup>2</sup>, Timothy E Kennedy<sup>2</sup> and Jenny C Lin<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup> Research Centre CHU-Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada

<sup>2</sup> Neurology and Neurosurgery, Montreal Neurological Institute, Montreal, Quebec, Canada

<sup>3</sup> Plastic Surgery, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Funding: Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC), Canadian Institutes of Health Research (CIHR), Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal (FESP), Fondation du CHU Sainte-Justine, Département de Chirurgie de l'Université de Montréal

Correspondence address and reprint request:

Jenny C. Lin, MD, PhD, FRCSC

Assistant Professor, Plastic Surgery

Université de Montréal

3175 Côte-Ste-Catherine, #7916

Montréal, Qc, H3T 1C5

Phone : 514-345-4771

Fax : 514-345-4964

E-mail : [jc.lin@umontreal.ca](mailto:jc.lin@umontreal.ca)

## ABSTRACT

**Background:** Implantable intraneural electrodes for a neurotechnological interface with the peripheral nervous system are a promising solution to overcome the limitations caused by injury or disease. Their long-term viability could be improved by coating electrodes with synthetic substances which are well tolerated by the host. Our objective is to demonstrate the synaptogenic properties of poly-D-lysine (PDL) and an experimental hyperbranched polyglycerol (dendrimer, DND) with human peripheral neurons *in vitro* and rat neurons *in vivo*.

**Methods:** Uncoated (control) and coated (poly-D-lysine or dendrimer) microspheres were used. *In vitro*, motor neurons derived from human induced pluripotent stem cells (iPSCs) were grown with microspheres for 1, 3, 5, 7 or 9 days. *In vivo*, a nerve crush injury was introduced to adult rat sciatic nerve to induce a regenerative state before injecting microspheres proximally, distally and at the crush site, which were left for 2, 7 and 14 days. Cells and nerves were immunostained for synaptophysin and VAChT (presynaptic markers). All experiments were visualized using confocal microscopy and images were analyzed for staining intensity surrounding the microspheres using Fiji. Live cell imaging of human motor neurons with FM-143 was performed to verify the presence of exocytosis at contact sites with the microspheres.

**Results:** *In vitro*, our results show significantly more staining for synaptophysin ( $p < 0.0001$ ) and VAChT ( $p < 0.0001$ ) in both experimental conditions when compared to the control for all five time points. Preliminary results of live cell imaging show a significantly more important exocytosis of FM-143 labelled vesicles in DND-coated microspheres than PDL-coated ones ( $p = 0.006$ ) at 3 days of incubation. *In vivo*, the presence of synaptophysin is significantly more important at 14 days surrounding PDL-coated microspheres at the crush site and distal to it. VAChT staining is also significantly superior at 14 days at the crush site. Other time points and locations tested do not show significant difference when comparing coated microspheres with respect to its control.

**Conclusions:** Our study shows for the first time that poly-D-lysine and dendrimer are synaptogenic substances for human motor neurons *in vitro* and rat peripheral neurons *in vivo*.

These results support the future use of these substances in improving the longevity of implantable electrodes for various clinical uses in neurosciences.

**Keywords:** synaptogenesis, microsphere, poly-D-lysine, hyperbranched polyglycerol, synaptophysin, VAChT, iPSC, motor neurons, sciatic nerve, rat model

## INTRODUCTION

Implantable electrodes are known to be useful for various clinical applications in the central and peripheral nervous system, ranging from brain stimulation for refractory Parkinson's disease and chronic pain (Lozano et al, 2002; Kringelbach et al, 2007) to nerve stimulation for sleep apnea (Malhorta, 2014). Recently, there has also been interest for the use of implantable intraneural electrodes as a neuro-technological interface between the peripheral nervous system and a prosthetic (Rossini et al, 2010; Raspopovic et al, 2015). The long-term viability of implantable devices could be improved with the use of synthetic coatings: many groups (Lefurge et al, 1991; Bowman et Erickson, 1985; Aregueta-Robles et al, 2014; Kim et al, 2014; Lotti et al, 2017) have explored the use of both natural and synthetic materials to increase biocompatibility of neural electrodes by reducing the inflammatory response caused by the presence of the implant. However, no study has yet taken the novel approach of enhancing of the longevity of implantable neural electrodes by inducing synaptogenesis onto synthetic coatings. Synaptogenesis onto an artificial material could be an indirect marker of biocompatibility, as it demonstrates the capacity of the said substance to be recognized as an acceptable post-synaptic target by the host.

Previous studies have successfully demonstrated the possibility of inducing synaptogenesis onto synthetic surfaces, which may be eventually developed as a method to establish stronger connections between medical implants and neurons. *In vitro* experiments show that rat central nervous system neurons have the capacity to form functional synapses onto surfaces coated with cationic polypeptides such as polylysine and polyorthinine (Burry and Lasher, 1978a; Burry and Wood, 1978b; Burry and Wood, 1978c; Burry, 1980; Burry et al, 1986; Lucido et al, 2009; Lucido et al, 2010), with bilayer lipids (Gopalarkrishnan et al, 2010) or with axonal guidance proteins such as netrin (Goldman et al, 2013). When rat hippocampal neurons were incubated with polystyrene microspheres coated with cationic polypeptides, synaptophysin, a protein associated with pre-synaptic vesicles, was found to accumulate at contact sites between neurites and microspheres (Lucido et al, 2009; Lucido et al, 2010). Similarly, *in vitro* experiments with peripheral motor neurons in xenopus larvae have also been shown to form pre-synaptic boutons on poly-L-lysine and polyorthinine (Peng et al, 1987). However, no studies have been done on

human cells to date, and the ability of these coatings to induce synaptogenesis has not yet been tested *in vivo*.

A recent study (Al Alwan et al, unpublished data) using a novel hyperbranched polyglycerol, hereby referred to as dendrimer, has shown promise as a synaptogenic molecule when applied as a durable synthetic coating. Dendrimer (DND), an aliphatic polyether with customizable amine terminals, was originally designed as a DNA nanocarrier for transfecting cells (Hellmund et al, 2014). This compound, contrary to some cytotoxic cationic substances, has shown no toxicity for cells up to  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Hellmund et al 2014; Hellmund et al, 2015). This was confirmed with MTT tests, showing that hyperbranched polyglycerols presented higher half maximal inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) compared to branched polyethylenimine, a highly cationic polyamine (Hellmund et al 2014). Al Alwan et al (unpublished data) have found that microspheres coated with dendrimer show more synaptophysin staining at contact sites with rat cortical neuron neurites than microspheres coated with poly-D-lysine (PDL), which has previously been shown to be a synaptogenic compound.

The goal of this study is to explore this novel concept of synaptogenesis onto synthetic surfaces in peripheral neurons as a means to enhance the longevity of implantable devices, notably intraneural electrodes. We believe that the establishment of organic connections between an implant and the host's peripheral nervous system will reinforce its validity in the long term. We have studied the ability of human motor neurons *in vitro* and regenerating adult rat sciatic nerves *in vivo* to form new pre-synaptic elements when in contact with microspheres coated with the synthetic cationic polymer poly-D-lysine (PDL) or with the novel hyperbranched polyglycerol dendrimer (DND). Our results show that human motor neurons derived from healthy human induced pluripotent stem cells (iPSC) can form new and potentially functional pre-synaptic boutons on both PDL and DND surfaces. We also show that regenerating adult rat sciatic nerves begin to show more staining for pre-synaptic proteins at contact sites with PDL surfaces at 14 days of incubation.



## METHODS

*iPSC derived human motor neurons.* Healthy human motor neurons derived from induced pluripotent stem cells were produced at the Montreal Neurological Institute iPSC platform (figure 1). A protocol was designed and adapted from a study by Du et al (2015). Accurate differentiation from induced pluripotent stem cells to motor neurons was previously confirmed with immunofluorescence for Homeobox 9 (Hb9), also known as Motor neuron and pancreas homeobox 1 (MNX1) and Islet 1, as well as depolarization responses to KCl and Glutamate (Durcan and Seguela, unpublished data). iPSCs were split 3 times for 6 days each onto Matrigel (Thermo-Fisher (Corning)) coated dishes, for a total of 18 days, using neuroepithelial media (STEP1, table I), motor neuron progenitor media (STEP2, table II) and then early stage motor neuron media (STEP3, table III). At day 18, cells were stored in liquid nitrogen in FBS/10% DMSO medium until use. For these experiments, cultures were grown in motor neuron media (STEP4, table IV) on round coverslips (Fisher Scientific) coated with poly-ornithine (Sigma-Aldrich, 10 $\mu$ g/ml) and laminin (Sigma-Aldrich, 5 $\mu$ g/ml) in 24-well dishes (Falcon (Corning)) until day 24.

*Coated Microspheres.* Polystyrene microspheres (7.32  $\mu$ m, Bangs Laboratories) were used to mimic the presence of a foreign object within the human motor neuron cultures and rat sciatic nerves. Three types of microsphere conditions (uncoated, PDL-coated, DND-coated) were prepared for both *in vitro* and *in vivo* experiments under sterile conditions. Microspheres were purchased in an aqueous solution containing sodium azide (100mg/mL). The quantity of microsphere suspension needed for each round of experiments was determined as 1 $\mu$ L per well for *in vitro* experiments and 100 $\mu$ L per nerve for *in vivo* experiments. The suspension was washed three times with PBS and centrifugation. The pellet was then resuspended in 100 $\mu$ L of PBS. The resulting solution was diluted as follows for the three conditions: 1:1 in PBS for the control condition, in 1:9 in 1mg/mL PDL in PBS for the PDL condition and 1: 9 in 1mg/mL DND in PBS for the DND condition. The final microsphere suspensions were left to incubate overnight at 4 $^{\circ}$ c on a rotating device until use the next day. Before use, all microspheres were washed three times with PBS by centrifugation and then resuspended in 200 $\mu$ L of PBS for *in vitro* experiments and 500 $\mu$ L of PBS for *in vivo* experiments. The resulting suspension was

diluted 1:10 with motor neuron media (STEP4) for *in vitro* experiments and in 1:10 with 0.9% NaCl for *in vivo* experiments.

*Microspheres in vitro experiments.* 5  $\mu$ L of the microspheres suspension in STEP4 media were added to each respective well for all three conditions. Microspheres were left with motor neuron cultures for either 1, 3, 5, 7 or 9 days before the experiment was stopped. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde/10% sucrose for 20 minutes and washed three times with PBS.

*Immunocytochemistry.* Fixed motor neurons were blocked using 5% bovine serum albumin/0.3% Triton-X in PBS for 1 hour. Cells were incubated overnight at 4°C with 1:500 chicken anti-neurofilament (Aves labs), 1:200 mouse anti-VAcHt (NeuroMab) and 1:200 synaptophysin (ThermoFisher) in blocking solution. Cells were then washed twice with blocking solution before being incubated with 1:000 Goat anti-chicken 647 (Thermo-Fisher), 1:000 Donkey anti-mouse 555 (Thermo-Fisher), or 1:000 Goat anti-rabbit 488 (cross-absorbed, Thermo-Fisher) in blocking solution for 1 hour at room temperature. Cells were washed once with 0.3% Triton-X/PBS, twice with PBS and once with ddH<sub>2</sub>O before mounting with Fluoro-Gel mounting media (Electron Microscopy Sciences). Coverslips were left to dry overnight at room temperature before imaging.

*Live cell imaging.* Motor neurons were grown on 35mm glass-bottomed dishes (MatTek) using the same method as described previously for motor neurons grown for immunocytochemistry purposes (see *iPSC derived human motor neurons*). 10  $\mu$ L of microspheres suspension, using the same preparation method as previously described (see *Coated Microspheres*), was added to each dish and left for three days. Before imaging, culture media was replaced by fluorobrite DMEM for 10 minutes. The solution was then changed to 10  $\mu$ M of FM-143 (Molecular Probes) and 100mM of KCl in fluorobrite DMEM for 90 seconds to induce depolarization and dye loading of the motor neurons, which was then replaced by 10  $\mu$ M of FM-143 (Molecular Probes) in fluorobrite DMEM for an additional two minutes. The dishes were washed twice for five minutes each using fluorobrite DMEM with 100mM of tetrodotoxin and once for five minutes using only fluorobrite DMEM. After localizing an area of interest, images were taken continuously for six minutes using an LSM880 inverted confocal microscope using a 63x 1.4NA Plan-Apochromat objective with an Airyscan detector array and DefiniteFocus.2

stabilizer module (Carl Zeiss). Stacks of five 0.75  $\mu\text{m}$  optical slices were acquired using Airyscan Fast Mode at 5-second intervals. At the two minute mark, KCl solution was added to the dish for a final concentration of 100mM for a second depolarization to track the decline in fluorescence as a proxy for synaptic vesicle release. Two wells per condition were imaged for two minutes to establish the baseline fluorescence prior to pipetting in 10X 100M KCl solution, after which they were imaged for four minutes. Airyscan files were processed in Zen Black and then exported to ImageJ for analysis with a custom script.

*Animal surgeries.* Protocols for animal experimentation were approved by the Institution's animal care facility, which conforms to the guidelines of the Canadian Council of Animal Care. A total of 27 sciatic nerves from 27 male Lewis rats were used for 3 time points and 3 different type of microspheres (uncoated, PDL-coated, DND-coated), each condition repeated thrice. Rats were anesthetized using isoflurane and placed in ventral position with the right hind leg angled at 45° with respect to the body. The leg was shaved from the knee to the lumbar spine. The surgical field was sterilized using proviodine followed by 70% ethanol. An incision was made between the knee and the ischial tuberosity to reach the sciatic nerve (figure 2). A nerve crush was performed for 20 seconds using a non-serrated needle holder to induce the sciatic nerve to enter a regenerative state. The crush site was marked with India ink. 100 $\mu\text{L}$  of microsphere suspension from one condition was injected into the sciatic nerve using a Hamilton syringe and 30cc needle approximately 5mm proximally to the crush site, 5mm distally to the crush site and at the crush site itself, for all three conditions (figure 2). The needle was inserted diagonally and reoriented horizontally before gradually pulled out as the microspheres solution was injected to ensure an even distribution of the microspheres along the needle's trajectory. The surgical incision was closed using nylon 4-0 sutures. 5-10 mg/kg of Enrofloxacin (Baytril), 0.05-0.1 mg/kg of buprenorphine (Vetergesic) and 1.0mL of sterile saline (0.9% NaCl) were administered subcutaneously immediately following the procedure and again in the following 24 hours.

*Nerve harvesting.* 2 days, 7 days or 14 days after the surgery, rats were euthanized using isoflurane and CO<sub>2</sub>. The nerves were harvested and fixed by immersion in 4% PFA (pH 7.0) for five hours with slight agitation at 4°C. The nerves were then cryoprotected in 30% sucrose for 40 hours with slight agitation 4°C before changing for a 1:1 30% sucrose in optimal cutting

temperature compound (OCT, Sakura). The nerves were embedded in OCT and frozen on dry ice with ethanol. Blocks were stored at -80°C until cut using a cryostat at 14µm in thickness.

*Immunohistochemistry.* Slides of frozen nerve samples were warmed up to room temperature for 1 hour before washing three times with PBS. The slides were blocked for 1 hour with 5% bovine serum albumin, 0.3% Triton-X in PBS. Primary antibodies 1:500 chicken anti-neurofilament (Aves labs), 1:500 guinea pig anti-VAChT (Synaptic Systems) and 1:200 anti-rabbit Synaptophysin (ThermoFisher) were incubated overnight at 4°C. Slides were washed for three times with PBS before adding 1:1000 Alexa Fluor Goat anti-chicken 647 (Thermo-Fisher), 1:1000 Alexa Fluor anti-Guinea Pig 555 (Thermo-Fisher) and 1:1000 Alexa Fluor Goat anti-rabbit 488 (cross-absorbed, Thermo-Fisher) at room temperature for one hour with light agitation. Slices were washed three times with PBS before mounting using Fluoro-gel mounting media (Electron Microscopy Sciences) and coverslip slide before they were left to dry overnight at room temperature for future imaging.

*Confocal microscopy for in vitro and in vivo immunostaining.* Imaging was done using confocal microscopy (Olympus Fluoview 1000) at 60x oil with a 2.6x magnification. Lasers 488nm, 546nm and 633nm, corresponding respectively to the green, red and infrared were used. Parameters for high voltage (HV), gain and offset have been kept consistent across all *in vitro* experiments imaging and all *in vivo* experiment imaging. Images were taken randomly on sections of the coverslip where microspheres were present.

*Fluorescence analysis for in vitro and in vivo immunostaining.* Analysis was done using image processing package Fiji. A minimum of 25 microspheres for *in vitro* experiments and 10 microspheres for *in vivo* experiments, were analyzed from each stained coverslip for both synaptophysin and VAChT. For *in vitro* experiments, the mean staining intensity for the marker of interest within the circular area occupied by a microsphere, and within the identical area on an adjacent axon where the microsphere was located were measured. After adjusting both values for background noise by taking the average of three randomly selected background areas, the staining of the microsphere was compared to the staining on the adjacent axon, yielding a ratio to be compared across conditions. For *in vivo* experiments, microspheres with synaptophysin and VAChT staining were identified and the z-stack collapsed to maximum projection mode

using the option “sum slides”. The intensity of the fluorescence was measured in a ring selection of 1µm surrounding a microsphere, and in the same area in a neighboring axon. Both measures were then adjusted for background and compared to yield a ratio of microsphere-induced protein accumulation to circulating protein accumulation. Using GraphPad Prism version 7, One-way ANOVAs were done on the data sets with Dunnett's multiple comparisons test to compare each experimental condition to its respective control. A Sidak's multiple comparisons test was done to compare between the experimental conditions.

*Three-dimensional reconstruction of microspheres.* Pictures taken using Zeiss LSM 710 confocal microscope showing microspheres from in vitro experiments were reconstructed using Imaris software (Bitplane). The resulting image is a graphic representation of the three-dimensional structure of the interaction between the fluorescent labelled antibodies, which labels the presynaptic elements (synaptophysin, VAChT) and axons (neurofilament).

*Fluorescence analysis for live cell imaging.* The FM143 channel stacks were summed (via Z-projection) and aligned with the "Linear Stack Alignment with Sift" plugin (Lowe, 2004). The bead channel was used to manually draw regions of interest, along with 1 equal-sized region to measure the background intensity. These regions were expanded into a 2µm-thick band and measured across all time points with the mean background intensity subtracted. All values were normalized to the mean intensity of the 2-minute baseline period in Excel 2016, and plotted in GraphPad Prism version 7.

## RESULTS

### **PDL and DND-coated microspheres induce the accumulation of synaptophysin at contact sites with human motor neuron neurites *in vitro***

Human motor neurons derived from iPSCs were incubated for 1, 3, 5, 7 or 9 days with either uncoated (control), poly-D-lysine-coated (PDL) or dendrimer-coated (DND) microspheres, two synthetic substances which have previously shown promise in inducing the assembly of pre-synaptic elements with neurons from the central nervous system (Lucido et al, 2009; Lucido et al, 2010; Al Alwan et al, unpublished data). The resulting fixed cells were immunostained for pre-synaptic markers synaptophysin and VAChT, along with neurofilament as a positive control, and visualized using confocal microscopy. The intensity of the synaptophysin staining surrounding each microsphere was quantified, compared to its intensity in a neighboring axon and compared across conditions for each timepoint. The accumulation of synaptophysin at the contact sites between a coated microsphere and a neurite has been described previously with rat central nervous system neurons by Lucido et al (2009), Lucido et al (2010) and Gopalakrishnan et al (2010). Our results show that for all five time points, the presence of synaptophysin surrounding PDL-coated microspheres is significantly more important than with uncoated microspheres ( $p < 0.0001$  for all time points) (figure 3, figure 4). A similar observation can be made with DND-coated microspheres ( $p < 0.0001$  for day 1, 3, 5 and 7;  $p < 0.001$  for day 9) (figure 3, figure 4). When comparing ratios between PDL and DND within each time point, there is a significant difference at 5 days ( $p < 0.05$ ; figure 4C) and 9 days ( $p < 0.0001$ ; figure 4E), but no difference was found for 1 day (figure 4A), 3 days (figure 4B) and 7 days (figure 4C).

### **PDL and DND-coated microspheres induce the accumulation of VAChT at contact sites with human motor neuron neurites *in vitro***

While synaptophysin is present in all pre-synaptic vesicles, vesicular acetylcholine transporter (VAChT) is a protein which is specific to and concentrated at cholinergic neuron terminals, which includes motor neurons in the peripheral nervous system (Weihe et al, 1996). VAChT

marks the presynaptic vesicles containing acetylcholine, the neurotransmitter in motor neurons, which may be seen as an indirect marker for functionality of the synapse. Results from the same human motor neuron experiments as described previously show that VAChT is also significantly more enriched surrounding coated microspheres (PDL and DND) than uncoated ones. The presence of VAChT is significantly greater surrounding PDL-coated microspheres compared to control ( $p < 0.0001$  for 1, 3, 5 and 9 days;  $p < 0.001$  for 7 days; figure 5, figure 6) and DND-coated microspheres compared to control ( $p < 0.0001$  for 1, 3, 5 and 9 days;  $p < 0.001$  for 7 days; figure 5, figure 6). When comparing the experimental conditions, similarly to synaptophysin, there is no statistical difference between PDL and DND at 1, 3, and 7 days, although the presence of VAChT is significantly greater in PDL than in DND at 5 ( $p < 0.05$ ) and 9 days ( $p < 0.0001$ ) (figure 6).

### **Three-dimensional image reconstruction of synaptophysin staining between human motor neuron neurites and microspheres *in vitro***

Previous studies have used electron microscopy to appreciate the appearance of synaptic vesicles that are contained in the neurite swellings at the contact of the coated microspheres (Burry and Lasher, 1978a; Burry and Wood, 1978b; Burry and Wood, 1978c; Burry, 1980; Burry et al, 1986; Peng et al, 1987). Electron microscopy produced detailed images of the contact sites between neurites and microspheres, although limited to a two-dimensional representation. In this study, immunostained human motor neurons were incubated with microspheres and imaged using confocal microscopy before representative microspheres from each condition were reconstructed using Imaris to visualize the three-dimensional distribution of synaptophysin (green) and neurofilament (red). VAChT staining was unable to be reconstructed given the diffuse distribution of the staining, which made the processing difficult to produce clear images. As shown in figure 7, although the axons, marked with neurofilament, only touch microspheres on its base, in experimental conditions, synaptophysin staining is present beyond the few two-dimensional layers on which the neurons are located, giving the appearance of new presynaptic boutons climbing up the surface of the microspheres. In contrast, uncoated microspheres show little to none of this accumulation on its surface, which is consistent with the pictures that were taken with confocal microscopy (figure 7). Consistently with the synaptophysin quantification, the synaptophysin distribution in the PDL condition is

slightly more extensive than in the DND condition at 5 days (figure 7C), and more importantly so at 9 days (figure 7E).

### **Exocytosis of FM-143 tagged vesicles is observed surrounding PDL and DND-coated microspheres *in vitro***

Human motor neurons incubated with microspheres were also subject to live cell imaging, where they were depolarized twice with KCl to allow capture and subsequent release of FM-143, a vesicle staining fluorescent dye. This method was used in a previous study with cortical neurons (Lucido et al 2009; Lucido et al, 2010) with a similar dye (FM4-64), where it has been used to successfully show the exocytosis of the dye at newly formed pre-synaptic elements. In this study, the green fluorescence of FM-143 was observed at the expected locations of presynaptic terminals after the first depolarization and recapture of vesicles. A two-micron thickness surrounding microspheres (blue) was identified and the intensity of the FM-143 dye measured in the area bordered by the two red circles (figure 8). After the second depolarization with KCl, a gradual decrease in the intensity of the fluorescence surrounding the coated microspheres can be observed. At 3 days, preliminary results show that, although PDL-coated microspheres have a comparable decrease in staining intensity as the control, DND-coated microspheres show a more distinguishable decrease in intensity than the two other conditions (figure 9A). Given the number of microspheres imaged ( $n=2$  for control microspheres), statistics cannot be performed on current data. However, we observe a trend in the ratio of measured fluorescence post-depolarization to pre-depolarization where the average for PDL and DND-coated microspheres is lower than for control (figure 9B). Furthermore, when comparing the fluorescence changes between PDL-coated and DND-coated microspheres after 2 minutes after the second depolarization, the difference was found to be significant ( $p=0.006$ ) with 2-tailed Mann-Whitney (the default non-parametric t-test) (figure 9C).

### **Synaptophysin staining seems to be enriched later in contacts between regenerating rat axons and PDL or DND-coated microspheres *in vivo***

Peripheral nerves in adult mammals have limited capacity for synaptogenesis, unless they are induced to enter a regenerative state after injury (Sulaiman and Gordon, 2013; Huebner and



Strittmatter, 2009). In this study, adult Lewis rat sciatic nerves were crushed before microspheres were injected approximately 5mm proximal, 5mm distal and at the crush site. Microspheres were left for 2, 7 and 14 days before nerves were harvested and stained using the same antibodies as with the *in vitro* experiment (synaptophysin, VAChT and neurofilament). Our results demonstrate synaptophysin staining, which is suggestive of the presence of presynaptic boutons, at the contact sites between the axons and the coated microspheres (figure 10). The staining of synaptophysin is nevertheless not significantly different between the experimental conditions and the control condition in the majority of the time points and locations tested (figure 11A, B, D, E, F, G). A significant increase in the ratio is found at 2 days in the area distal to the crush site when comparing PDL to control ( $p<0.01$ ) and when comparing PDL to DND ( $p<0.05$ ) (figure 11C). This exact finding is also present at 14 days at the crush site, where synaptophysin staining is significantly greater in PDL than in control ( $p<0.01$ ) and in DND ( $p<0.05$ ) (figure 11H). At 14 days distally to the crush site, synaptophysin staining is significantly greater in the PDL condition when compared to control ( $p<0.05$ ) but not significantly different from DND (figure 11I).

### **VAChT staining seems to be enriched later in contacts between regenerating rat axons and PDL or DND-coated microspheres *in vivo***

Similarly to synaptophysin *in vivo* data, VAChT staining showed no significant difference between any of the experimental conditions compared to the control for the majority of the different time points and locations (figure 12A, B, C, D, E, F, G, I). However, VAChT staining surrounding PDL-coated microspheres at the crush site at 14 days of incubation were found to be significantly greater than in its control ( $p<0.001$ ) and compared to DND ( $p<0.05$ ) (figure 12H).

## **DISCUSSION**

The purpose of this study consisted of verifying whether human motor neurons can form new presynaptic elements on synthetic surfaces coated with the highly cationic polymer poly-D-lysine (PDL), a substance known to be synaptogenic only in animal peripheral neurons, or an

experimental hyperbranched polyglycerol dendrimer (DND), a potentially synaptogenic compound which is believed to be non-toxic with a longer half-life. This study also aimed to explore whether this same phenomenon occurs *in vivo* using a regenerating adult rat nerve. We have shown for the first time that motor neurons of a human origin do have the capacity to form new pre-synaptic elements onto both PDL and DND, as shown by the increase of synaptophysin and VAChT staining. Preliminary data from live cell imaging suggests that new pre-synaptic elements formed at contact sites between coated microspheres and neurites are functional, especially with regards to DND-coated microspheres. Our results also demonstrate that *in vivo*, the same phenomenon seems to occur at a slower rate, with PDL-coated microspheres being a potentially better substrate at inducing the presence of synaptophysin and VAChT at 14 days, specifically at the crush site of the nerve.

### **PDL and DND-coated microspheres induce the accumulation of both synaptophysin and VAChT at contact sites with human motor neuron neurites *in vitro***

Our results have shown that, as in previous studies with neurons from the central nervous system (Burry and Lasher, 1978a; Burry and Wood, 1978b; Burry and Wood, 1978c; Burry, 1980; Burry et al, 1986; Peng et al, 1987; Lucido et al, 2009; Gopalakrishnan et al, 2009; Lucido et al, 2010), neurons from the human peripheral nervous system also form new pre-synaptic elements on synthetic coated surfaces, as demonstrated by the significant presence of both synaptophysin and VAChT in experimental conditions. For both markers, at all the five time points that were studied (1, 3, 5, 7 and 9 days), the quantity of staining was significantly more important surrounding the PDL-coated and the DND-coated microspheres than the uncoated microspheres (figures 3, 4, 5, 6). Furthermore, when comparing PDL and DND coatings for both pre-synaptic markers, PDL-coated microspheres show significantly higher microsphere-to-axon staining ratio at 5 days ( $p < 0.05$  for both) and 9 days ( $p < 0.0001$ ) (figures 4C, 4E, 6C, 6E). These observations demonstrate that PDL and DND coatings both have synaptogenic properties that recruit elements to form a pre-synaptic terminal. VAChT, being significantly more present at contact sites in experimental conditions suggests that the pre-synaptic areas may be functional, as VAChT marks the vesicles containing the motor neuron neurotransmitter acetylcholine (Weihe et al, 1996).

We hypothesized that dendrimer would be superior in terms of performance compared to PDL, as the staining for synaptophysin in the study by Al Alwan et al (unpublished data) was more important in surrounding DND-coated microspheres than in PDL-coated ones. In this study, while both coatings were comparable for 1 day, 3 days and 7 days *in vitro*, the staining surrounding the dendrimer-coated microspheres becomes significantly lower than that observed in PDL at 5 days ( $p < 0.05$ ) and at 9 days ( $p < 0.0001$ ) for both synaptophysin and VAChT (figures 4C, 4E, 6C, 6E). These results could imply either that the DND is a less stable substance to coat polystyrene microspheres or that new presynaptic elements formed on DND-coated microspheres may be less stable over time. However, although there is a significant difference suggesting that dendrimer-coated microspheres could be less effective at inducing the accumulation of pre-synaptic proteins than with PDL-coated microspheres, the quantity found surrounding DND-coated microspheres retains significantly higher microsphere-to-axon staining ratio than in the control condition for all the time points studied, supporting the hypothesis that dendrimer is a synaptogenic compound for human motor neurons. What remains unknown is whether synaptophysin staining surrounding PDL-coated and DND-coated microspheres will continue to decrease with incubation times longer than 9 days. However, these experiments are not possible, given that beyond a total of 15 days following the initial splitting, the viability of the motor neurons used decline significantly as demonstrated by their morphology. In other words, the true longevity of synaptophysin and VAChT staining surrounding coated microspheres cannot be assessed past 9 days of incubation due to progressive cell death. Our results confirm that pre-synaptic proteins synaptophysin and VAChT are present in a significantly higher amount surrounding coated microspheres in this study than surrounding the uncoated ones, from as soon as 1 day of incubation up to 9 days. The speed at which pre-synaptic elements assemble at the contact sites between neurites and microspheres is comparable to the one observed in similar experiments with central nervous system neurons (Burry and Lasher, 1978a; Burry and Wood, 1978b; Burry and Wood, 1978c; Burry, 1980; Burry et al, 1986; Lucido et al, 2009; Lucido et al 2010). The stability of PDL and DND as coatings beyond 9 days of incubation needs to be studied further in order to establish their full potential in the *in vitro* setting.

### **Three-dimensional image reconstruction of interactions between human motor neuron neurites *in vitro***

Using the Imaris software, we were able to visualize the distribution of presynaptic elements present at the contact sites between human motor neurons and the microspheres from a three-dimensional perspective, which has never been shown before in previous similar studies (Burry and Lasher, 1978a; Burry and Wood, 1978b; Burry and Wood, 1978c; Burry, 1980; Burry et al, 1986; Peng et al, 1987; Lucido et al, 2009; Gopalakrishnan et al, 2009; Lucido et al, 2010). Three-dimensional reconstructions of microspheres show the distribution and shapes formed by clusters of synaptophysin surrounding the microspheres, which has only been demonstrated before using two-dimensional images with electron microscopy (Burry and Lasher, 1978a; Burry and Wood, 1978b; Burry and Wood, 1978c; Burry, 1980; Burry et al, 1986; Peng et al, 1987). In concordance with the confocal pictures (figure 3), we observed a greater distribution of synaptophysin staining in both PDL and DND conditions than in control conditions for all time points (figure 7). These visualizations allow a more comprehensive appreciation of the way pre-synaptic elements form, where clusters are created by the potential stacking of many pre-synaptic sets, a phenomenon that was mentioned in other studies (Lucido et al, 2009; Al Alwan et al, unpublished data). Interestingly, microspheres from the same condition show uneven distributions of synaptophysin staining at their contact sites with different neurites, which shows the heterogeneity of pre-synaptic elements formation. This could be explained if the assembly needed for new presynaptic elements to form are only selectively available on certain areas within the neurite (Burry, 1980).

### **Exocytosis of FM-143 labelled vesicles is observed surrounding PDL and DND-coated microspheres *in vitro***

Live cell imaging of human motor neurons incubated with either coated and uncoated microspheres for 3 days all showed a decrease in FM-143 fluorescence observed surrounding the microspheres after a second depolarization, which is consistent with previous experiments done with hippocampal neurons by Lucido et al (2009) and Lucido et al (2010). Therefore, these results supports our hypothesis that vesicles tagged with FM-143 were indeed endocytosed after

the first depolarization into the pre-synaptic terminal and released again during a second depolarization, which explains the decrease in fluorescence observed after the addition of the second high KCl solution. These phenomenon are indicative that pre-synaptic elements formed onto microspheres can function like a naturally-occurring synapse. However, the decrease in fluorescence, which is seen across all three conditions, seems only more prominent in DND-coated microspheres by the end of the live cell imaging, while PDL-coated microspheres and uncoated microspheres show close to no difference (figure 9A). The lack of difference between the control and the PDL condition could be explained by the small number of samples for the control condition (n=2) and the presence of an outlier data point for the same condition, as hinted by the irregular tracing of fluorescence over time in the control curve (figure 9A). Given the preliminary nature of this experiment, it is difficult to perform statistics and to determine whether the differences observed are significant. However, we do observe that the mean fluorescence surrounding PDL and DND-coated microspheres after the second depolarization is lower than in the control (figure 9B). The importance of the loss in fluorescence after the second depolarization correlates with the level of exocytosis achieved, which supports the hypothesis that these newly formed pre-synaptic elements are functional. We also observe that, towards the end of the live cell imaging recording, DND-coated microspheres present a significantly more important decrease in fluorescence than PDL-coated microspheres, suggesting that more functional presynaptic boutons could be present at contact sites with DND-coated microspheres (figure 9C).

Lucido et al (2009) and Lucido et al (2010) have shown the functionality of the newly-formed pre-synaptic elements in rat hippocampal neurons with FM-484, a vesicle labelling dye similar to the one used in our study. Since more than 95% of synaptic vesicles are recycled after exocytosis, we are confident that our observations are an indicator of the functionality of the newly formed presynaptic terminal, as supported by the exocytosis of synaptic vesicles (Cousin, 2008). This suggests that the presence of PDL or DND coating surrounding the microspheres may serve as a synthetic post-synaptic target and re-creates a system similar to the one found in a neuromuscular junction. Thus, our preliminary live cell imaging results suggests that the accumulation of pre-synaptic proteins at the contact sites between PDL-coated of DND-coated microspheres and human motor neuron neurites are functional synapses.

## **Synaptophysin and VAChT staining seems to be enriched later in contacts between regenerating rat axons and PDL or DND-coated microspheres *in vivo***

For *in vivo* experiments, regenerating adult rat sciatic nerves were used to evaluate their ability to form pre-synaptic elements onto PDL-coated or DND-coated microspheres, similar to those observed *in vitro*. Our results showed that, for the majority of the time points (2, 7 or 14 days) and locations (proximal to the crush site, at the crush site or distal to the crush site) for both pre-synaptic markers, there were no significant differences between each of the experimental conditions and its respective control. However, for synaptophysin, PDL-coated microspheres at 2 days of incubation (DOI) distally to the crush site (figure 11C), as well as at 14 DOI at the crush site (figure 11H) and distally to the crush site (11I), have shown to be significantly superior in fluorescence compared to its control ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$  respectively). Furthermore, for VAChT, one time point and location, PDL-coated microspheres 14 days at the crush site, was found to be significantly different from its control (figure 13H) ( $p < 0.001$ ). These results demonstrate that, as with human motor neurons *in vitro*, regenerating adult rat sciatic nerve are capable of forming new pre-synaptic elements onto PDL-coated microspheres. Unlike *in vitro* neurons where the same phenomenon occurs as soon as 1DOI (figure 4, figure 6; Lucido et al, 2009; Gopalakrishnan et al, 2009), *in vivo* experiments may need a minimum of 14 days before significant difference can be observed between the experimental conditions and the control (figure 11).

The significant finding at 2 DOI for synaptophysin (figure 11C) is unexpected, as the trend seems to suggest that longer time points are needed in order to observe a significant difference between the control and an experimental condition. A hypothesis may be that, following an acute injury such as a nerve crush, the activity of macrophages and Schwann cells lead to an initial peak of regeneration-related events that could increase the amount of synaptophysin staining surrounding PDL-coated microspheres (Sulaiman and Gordon, 2013; Huebner and Strittmatter, 2009). As the distal part of the nerve undergoes Wallerian degeneration and reorganization of the damaged tissue, the presence of synaptophysin decreases, as observed at 7 days, before returning to a more progressive state of regeneration when undamaged proximal axons attempt to reinnervate its original target. In this situation, some axons would choose PDL-

coated microspheres as a compatible post-synaptic target, which would explain the results at 14 days at the crush site.

Similar to *in vitro* experiments, when comparing between PDL-coated and DND-coated microspheres, PDL ones appear to be superior at inducing the accumulation of pre-synaptic elements than DND, as it is significantly different from DND at 2 DOI distally to the crush site (figure 11C) and 14 DOI at the crush site (figure 11H) for synaptophysin ( $p < 0.05$  for both), as well as 14 DOI at the crush site (figure 13H) for VAChT ( $p < 0.05$ ). Thus, these observations suggest that, in both human and rat peripheral neurons, PDL could be a more synaptogenic substrate than DND in terms of the quantity of newly-formed pre-synaptic elements, contrarily to what has been shown in the central nervous system (Al Alwan et al, unpublished data). However, while the number may be greater, the stability of newly formed pre-synaptic elements surrounding PDL-coated microspheres may not necessarily be superior to those formed surrounding DND-coated ones. Thus, incubation time points longer than 14 days should be explored in future experiments *in vivo* in order to better understand the development of new pre-synaptic elements in the long term.

### **Significance of formation of new pre-synaptic elements for clinical applications**

This study has shown that human motor neurons can form new potentially functional pre-synaptic elements onto synthetic surfaces such as poly-D-lysine and dendrimer. Our findings have interesting implications since, for the first time, we have demonstrated that human peripheral motor neurons can form functional synapses onto artificial surfaces, recognizing them as a post-synaptic target. We believe that establishing synapse-like connections could indicate that foreign objects coated with PDL or DND are better tolerated by neurons, which may lead to increasing the structural and functional longevity of the foreign object. In the context of implantable devices like intraneural electrodes, using a synaptogenic compound such as PDL or DND as a coating could potentially provide a better performance of the device by establishing a more durable connection, a better signal to noise ratio and a decrease of the host's adverse reaction towards the invasiveness of the implant. This improvement would solve many challenges that current implantable intraneural electrodes face, where its physical and chemical

properties cause an inflammatory response and compromise its integrity in the long term (Lotti et al, 2017). This issue is particularly important given that most current applications of recording or stimulating electrodes are meant to be a permanent solution for chronic diseases or disabilities.



## FIGURES AND TABLES

	Stock concentration	Final concentration	50ml medium
DMEM/F12,			24ml
Neurobasal			24ml
N2	100x	1x	500 $\mu$ l
B27	50x	1x	1ml
L-Glutamax	200x	1x	250 $\mu$ l
Antibiotic-Antimycotic	100x	1x	500 $\mu$ l
Ascorbic acid	200mM	100 $\mu$ M	25 $\mu$ l
CHIR99021	3mM	3 $\mu$ M	50 $\mu$ l
DMH1	4mM	2 $\mu$ M	25 $\mu$ l
SB431542	10mM	2 $\mu$ M	10 $\mu$ l

Tableau I. Neuroepithelial (NEP) (STEP 1) media components

	Stock concentration	Final concentration	50ml medium
DMEM/F12,			24ml
Neurobasal			24ml
N2 supplement	100x	1x	500µl
B27 supplement	50x	1x	1ml
L- Glutamax	100x	1x	250µl
Antibiotic-Antimycotic	100x	1x	500µl
Ascorbic acid	200mM	100µM	25µl
CHIR99021	3mM	1µM	16.7µl
DMH1	4mM	2µM	25µl
SB431542	10mM	2µM	10µl
Retinoic acid	1mM	0.1µM	5µl
Purmorphamine	2mM	0.5µM	12.5µl

Tableau II. Motor neuron progenitor (MNP) (STEP 2) media components

	Stock concentration	Final concentration	50ml medium
DMEM/F12,			24ml
Neurobasal			24ml
N2 supplement	100x	1x	500µl
B27 supplement	50x	1x	1ml
L- Glutamax	100x	1x	250µl
Antibiotic-Antimycotic	100x	1x	500µl
Ascorbic acid	200mM	100µM	25µl
CHIR99021	3mM	3µM	50µl
DMH1	4mM	2µM	25µl
SB431542	10mM	2µM	10µl
Retinoic acid	1mM	0.1µM	5µl
Purmorphamine	2mM	0.5µM	12.5µl
VPA	0.5M	0.5mM	50µl

Tableau III. Early stage motor neuron (EMN) (STEP 3) media components

	Stock concentration	Final concentration	50ml medium
DMEM/F12,			24ml
Neurobasal			24ml
N2 supplement	100x	1x	500µl
B27 supplement	50x	1x	1ml
L- Glutamax	200x	1x	250µl
Antibiotic-Antimycotic	100x	1x	500µl
Ascorbic acid	200mM	100µM	25µl
Retinoic acid	1mM	0.5µM	25µl
Purmorphamine	2mM	0.1µM	2.5µl
Compound E	0.1mM	0.1µM	50µl
BDNF	10µg/ml	5ng/ml	25µl
CNTF	10µg/ml	10ng/ml	50µl
IGF-1	10µg/ml	10ng/ml	50µl

Tableau IV. Motor neuron (MN) (STEP 4) media components

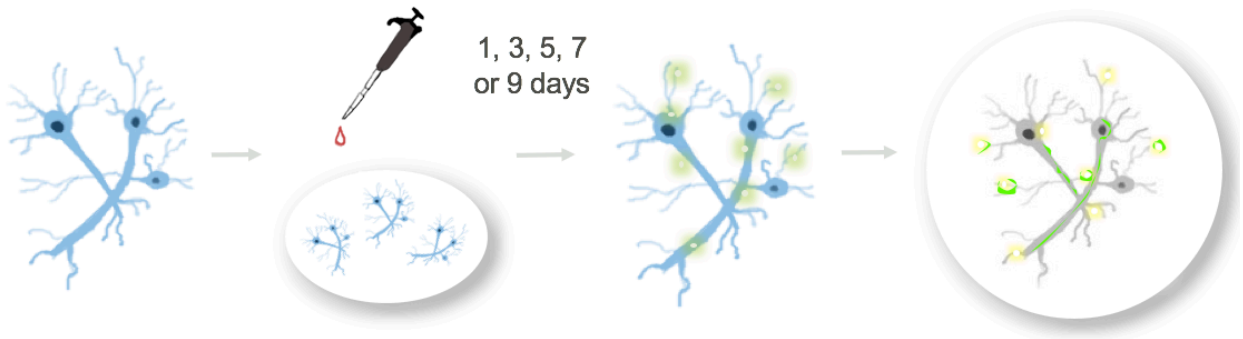


Figure 1. In vitro experiments protocol

1) Motor neurons were differentiated from human iPSCs until synaptic maturity 2) Microspheres were added to the culture 3) Motor neurons were fixed 4) Motor neurons were immunostained and imaged in confocal microscopy.

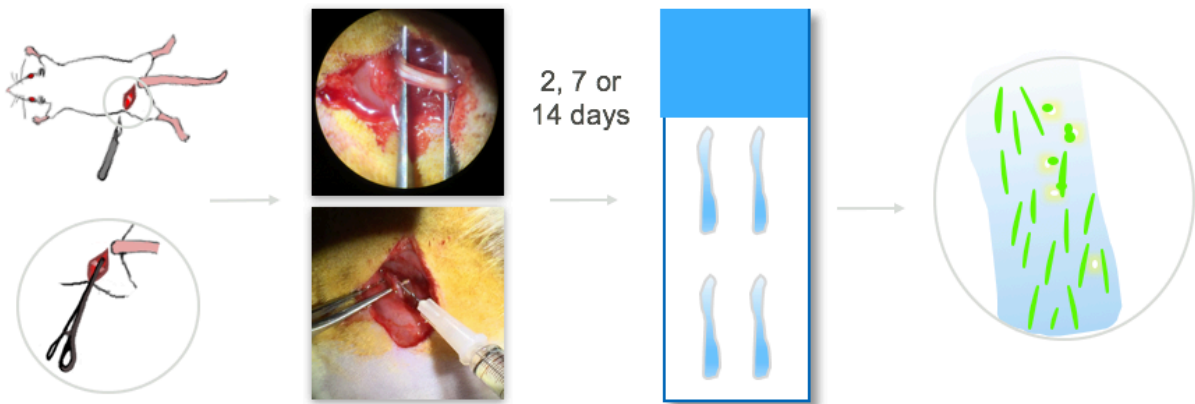


Figure 2. In vivo experiments protocol

1) Sciatic nerve was dissected and a 20 second nerve injury was introduced 2) Sciatic nerve was isolated and microspheres were injected 3) Sciatic nerves were fixed and cut with a cryostat 4) Nerve slices were immunostained and imaged in confocal microscopy.

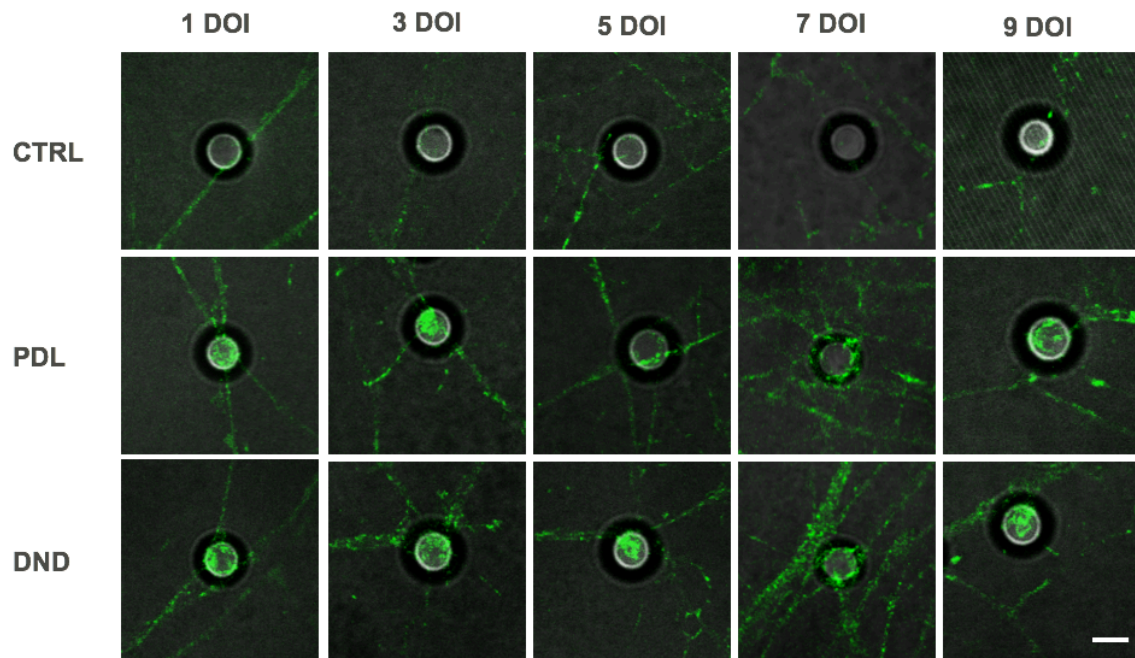


Figure 3. Representative images of synaptophysin staining surrounding microspheres with human motor neuron cultures for each condition at 1, 3, 5, 7 and 9 days of incubation

Rows; Control = CTRL, Poly-D-Lysine = PDL, Dendrimer = DND at different time points  
 Columns; DOI = Days of incubation. Scale bars: 5  $\mu$ m.

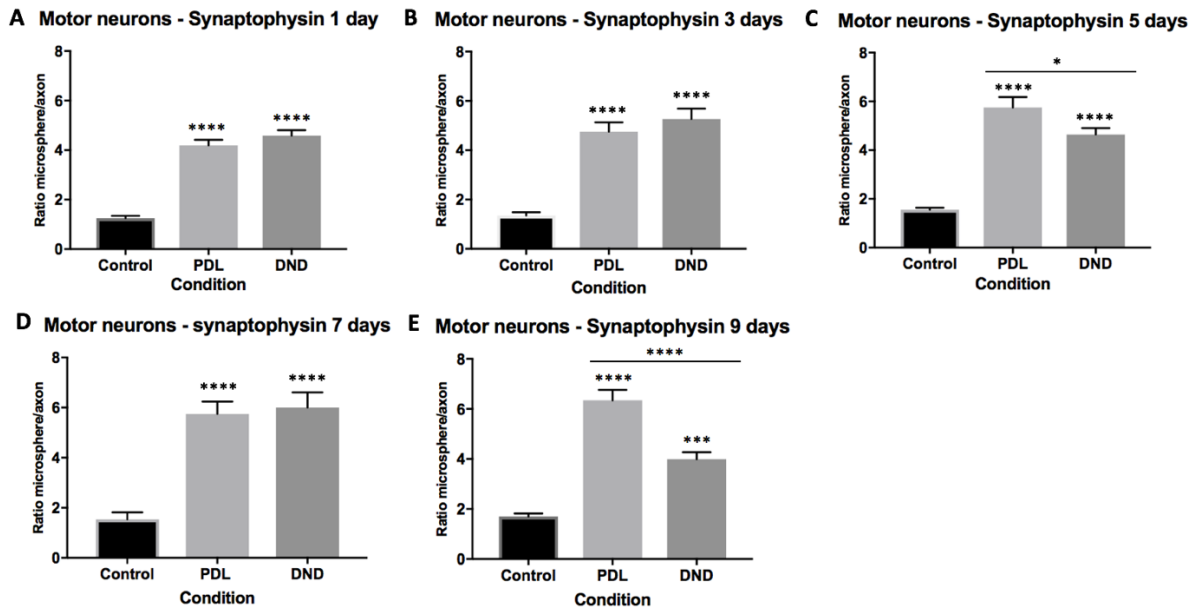


Figure 4. Quantification of synaptophysin staining surrounding microspheres with human motor neuron cultures at 1, 3, 5, 7 and 9 days of incubation.

Ratio of synaptophysin staining surrounding a microsphere to synaptophysin circulating in the adjacent axon (adjusted for background) after being cultured with microspheres for A) 1 day (Control n = 68, PDL n = 107, DND n = 143) B) 3 days (Control n = 44, PDL n = 57, DND n = 72) C) 5 days (Control n = 80, PDL n = 123, DND n = 133) D) 7 days (Control n = 37, PDL n = 119, DND n = 74) E) 9 days (Control n = 75, PDL n = 147, DND n = 75). One-way ANOVA (Average  $\pm$  SEM), \* p<0.05, \*\*\* p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001

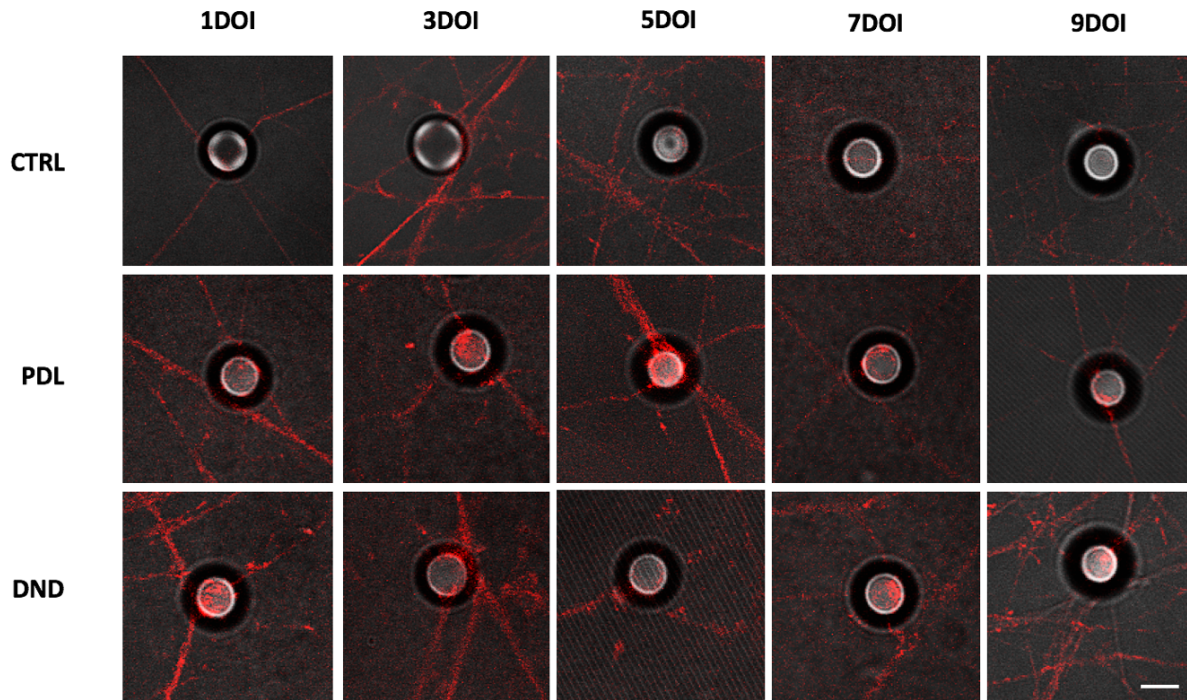


Figure 5. Representative images of VachT staining surrounding microspheres with human motor neuron cultures for each condition at 1, 3, 5, 7 and 9 days of incubation

Rows; Control = CTRL, Poly-D-Lysine = PDL, Dendrimer = DND at different time points  
 Columns; DOI = Days of incubation. Scale bars: 5  $\mu$ m.



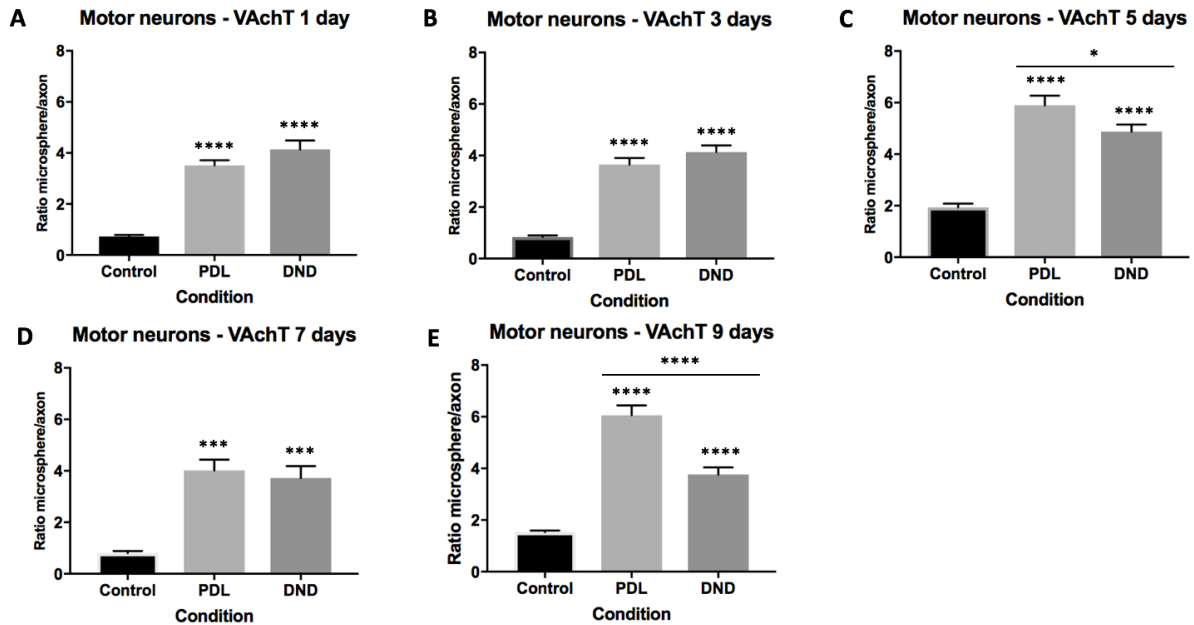
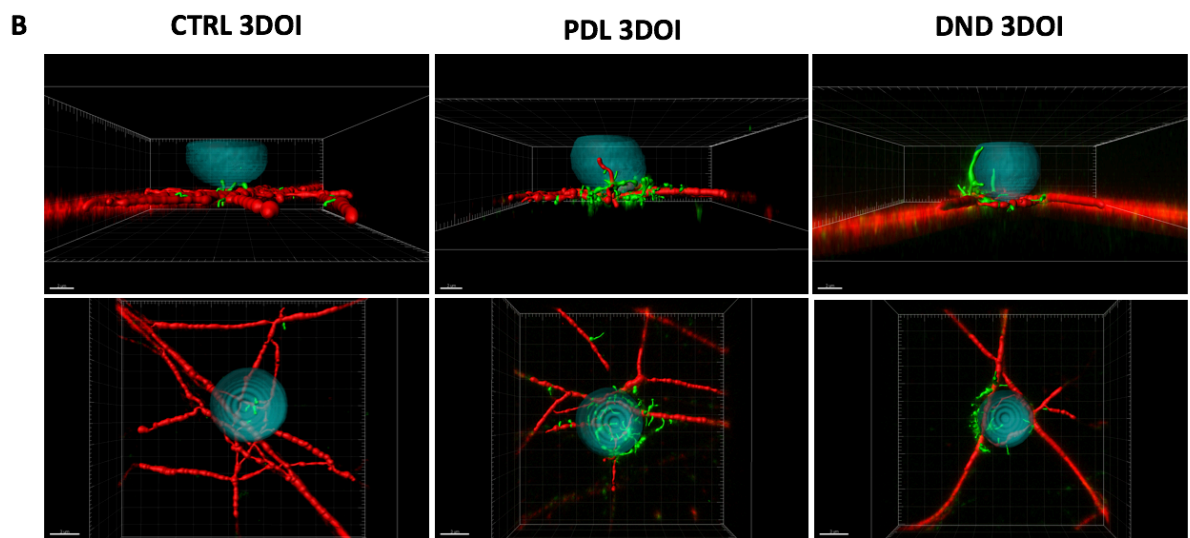
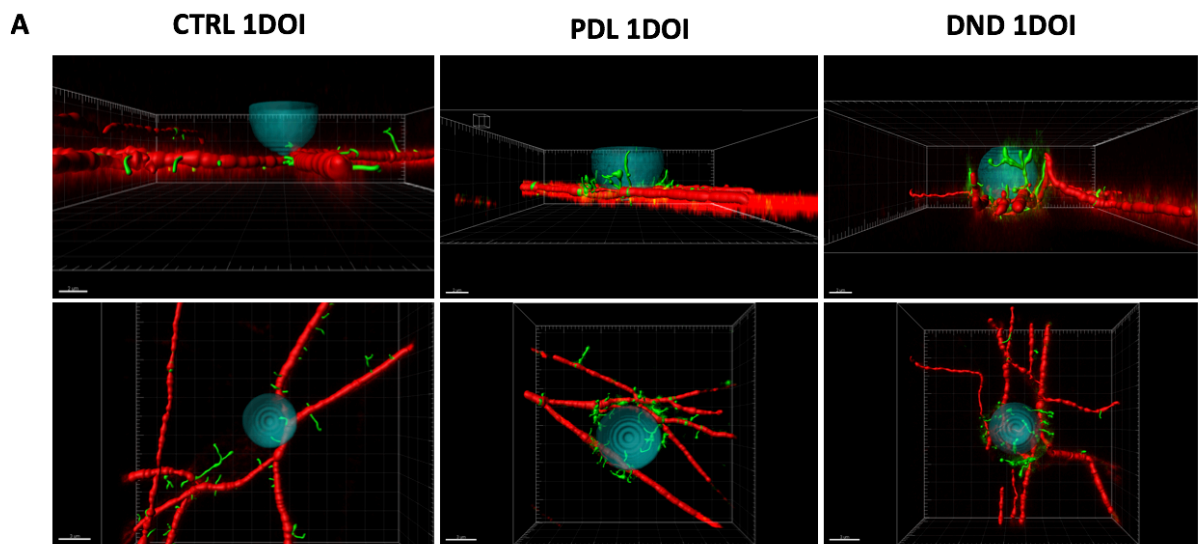
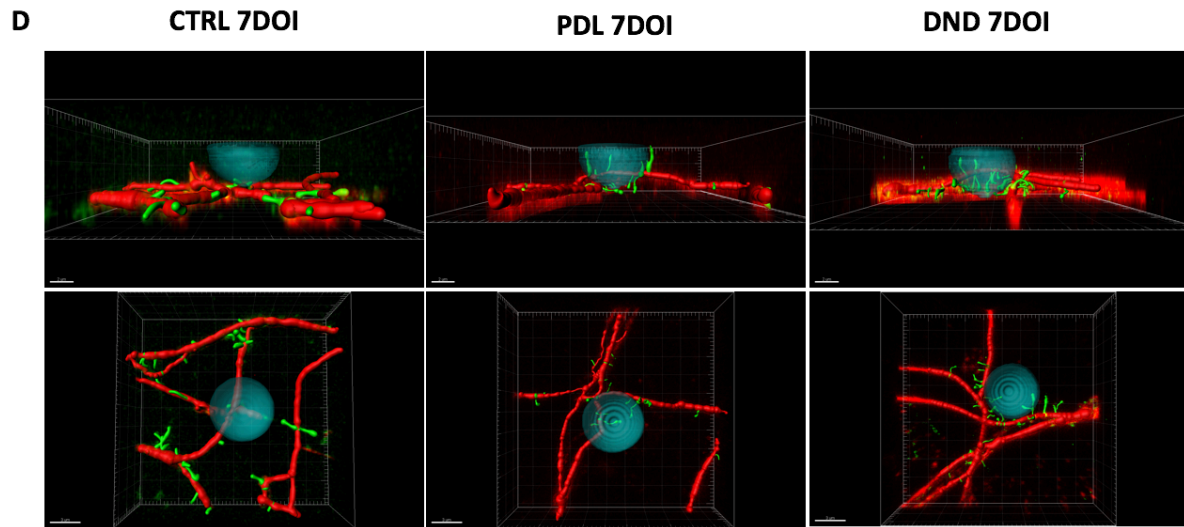
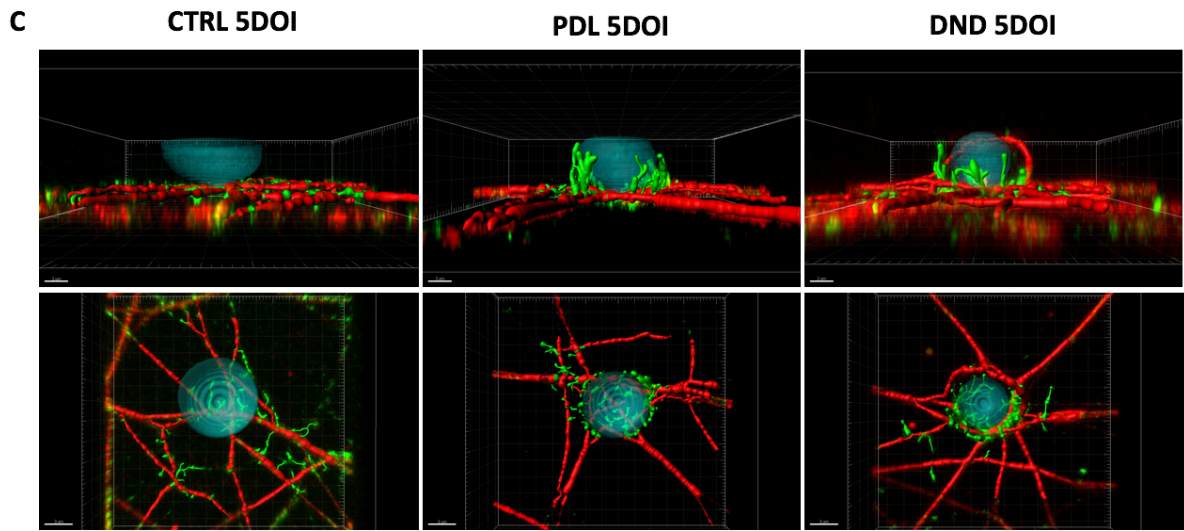


Figure 6. Quantification of VAcHT staining surrounding microspheres with human motor neuron cultures at 1, 3, 5, 7 and 9 days of incubation.

Ratio of VAcHT staining surrounding a microsphere to VAcHT circulating in the adjacent axon (adjusted for background) after being cultured with microspheres for A) 1 day (Control n = 69, PDL n = 99, DND n = 88) B) 3 days (Control n = 64, PDL n = 105, DND n = 104) C) 5 days (Control n = 89, PDL n = 146, DND n = 134) D) 7 days (Control n = 27, PDL n = 87, DND n = 67) E) 9 days (Control n = 76, PDL n = 159, DND n = 157). One-way ANOVA (Average  $\pm$  SEM), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .





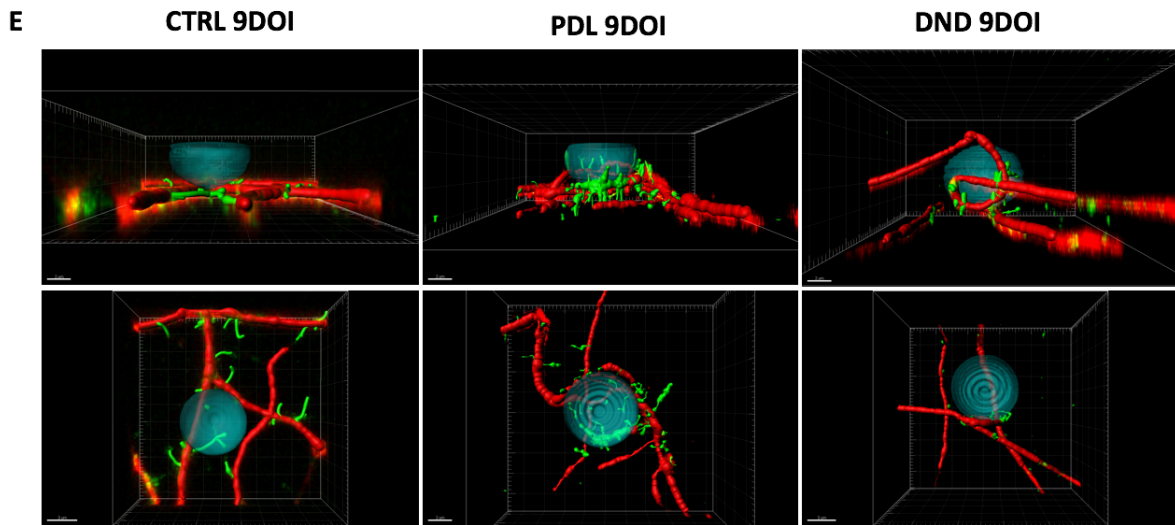


Figure 7. Three-dimension reconstructions of coated and uncoated microspheres with human motor neuron cultures for each condition at 1, 3, 5, 7 and 9 days.

A: 1DOI, B: 3DOI, C: 5DOI, D: 7DOI and E: 9DOI. DOI = days of incubation, Green = synaptophysin, Red = neurofilament, Blue = microsphere. Scale bars = 3  $\mu$ m.

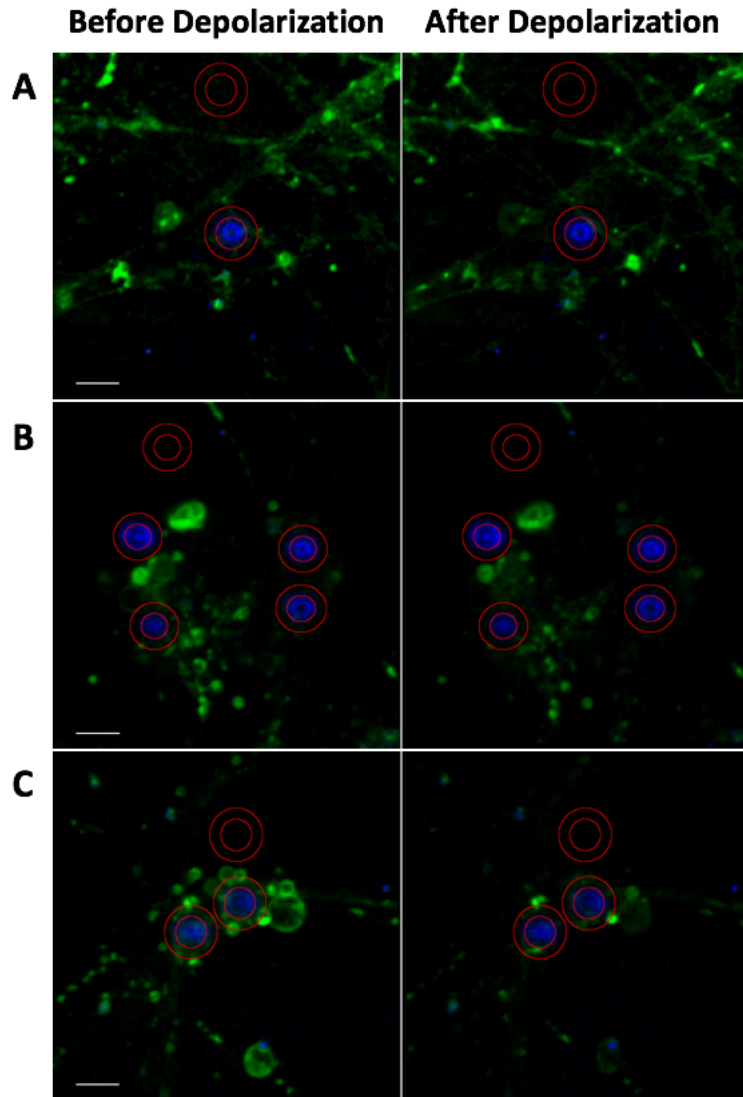


Figure 8. Representative images of microspheres incubated for 3 days with human motor neurons stained with FM-143 before and after depolarization with KCl

A: Control condition (n=2), B: PDL (n=5), C: DND (n=3). All microspheres were left for 3 days. Inner red circle indicates the limits of the microspheres, while outer red outlines a 2 micron rings surrounding the microspheres. Scale bars = 5  $\mu$ m.

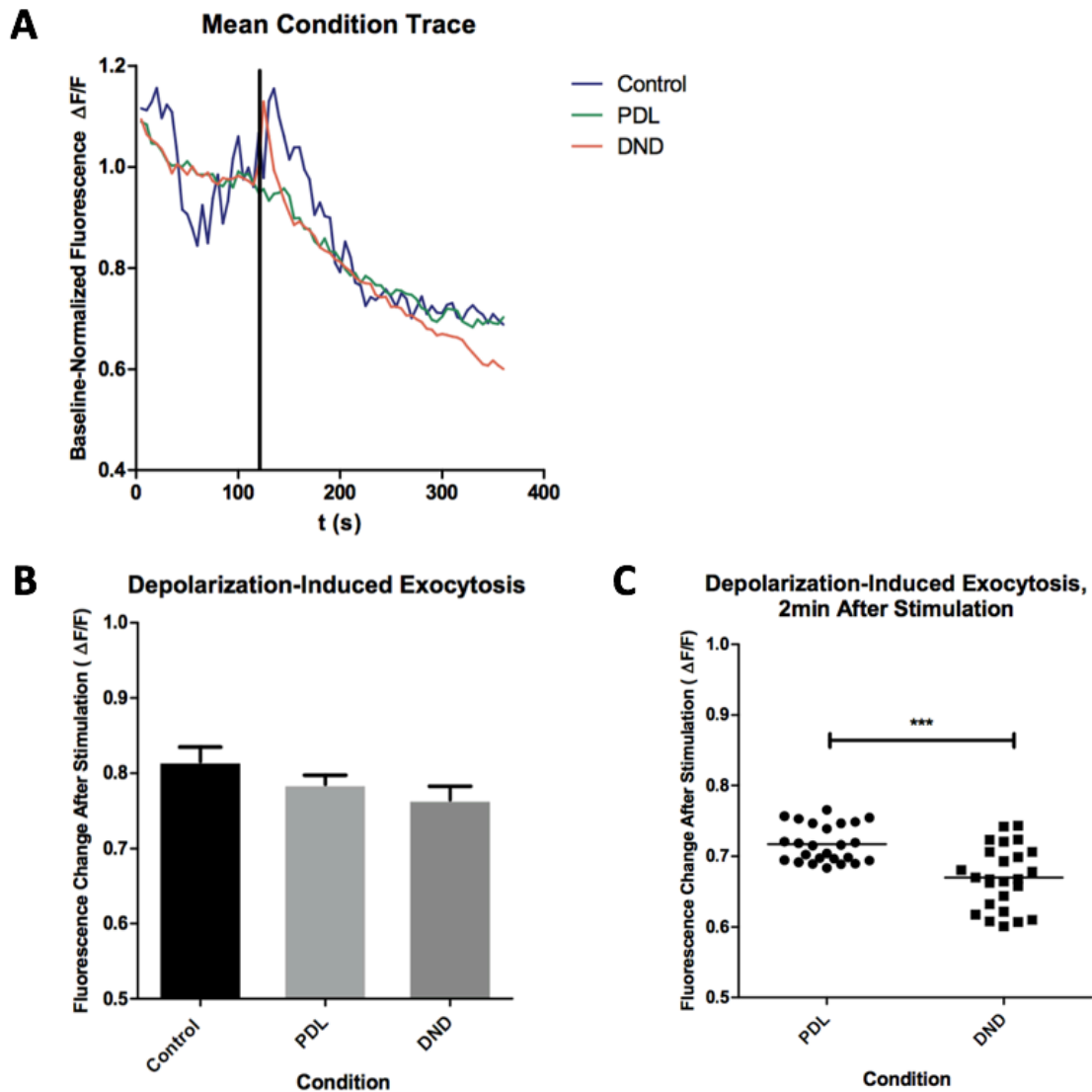
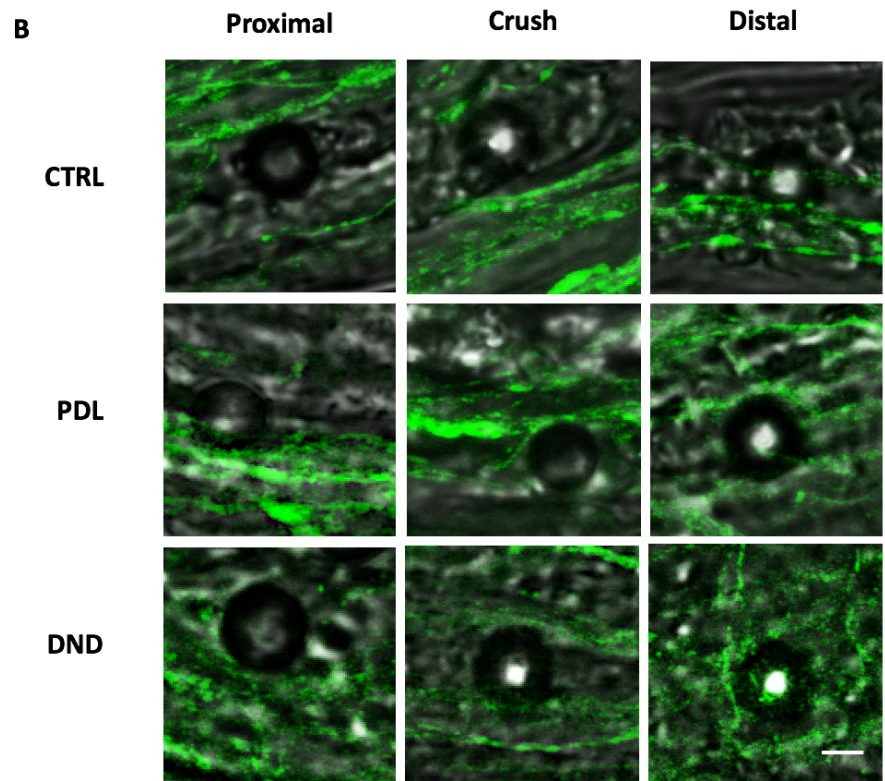
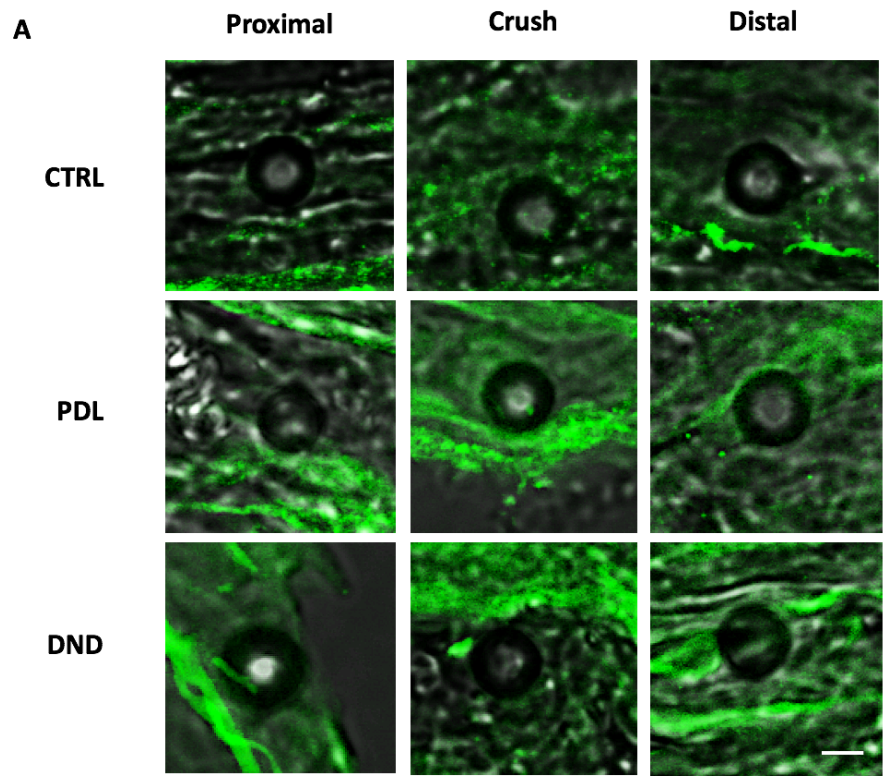


Figure 9. FM-143 fluorescence quantification of microspheres with human motor neuron cultures.

A: Average baseline-normalized intensity for each condition plotted against time. The line ( $t=120s$ ) indicates then moment KCl was added to the dish (second depolarization). All values were normalized to the average of the baseline. B: Ratio of average intensity of all timepoints after adding KCl/baseline average. C: Ratio of average intensity of all timepoints after adding KCl/baseline average after 2 minutes. Difference found to significant ( $p=0.006$ ) with 2-tailed Mann-Whitney (the default non-parametric t-test).





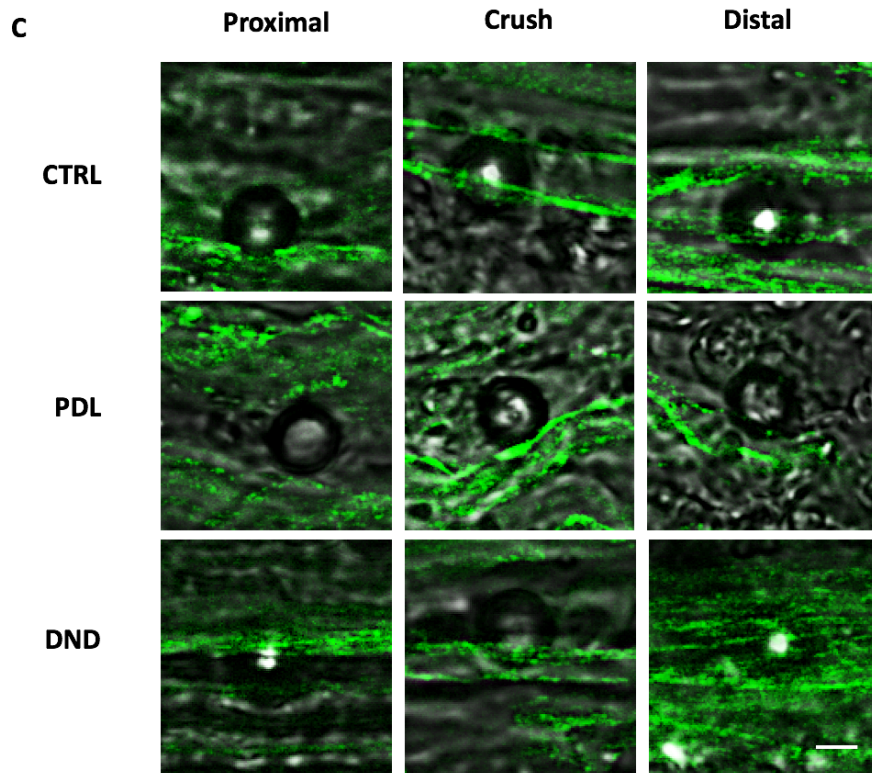


Figure 10. Representative images of synaptophysin staining surrounding microspheres with regenerating rat sciatic nerve for each condition at 2, 7 and 14 days of incubation

Rows; Control = CTRL, Poly-D-Lysine = PDL, Dendrimer = DND at A: 2DOI, B: 7DOI, C: 14DOI. DOI = days of incubation, Scale bars: 5  $\mu$ m.



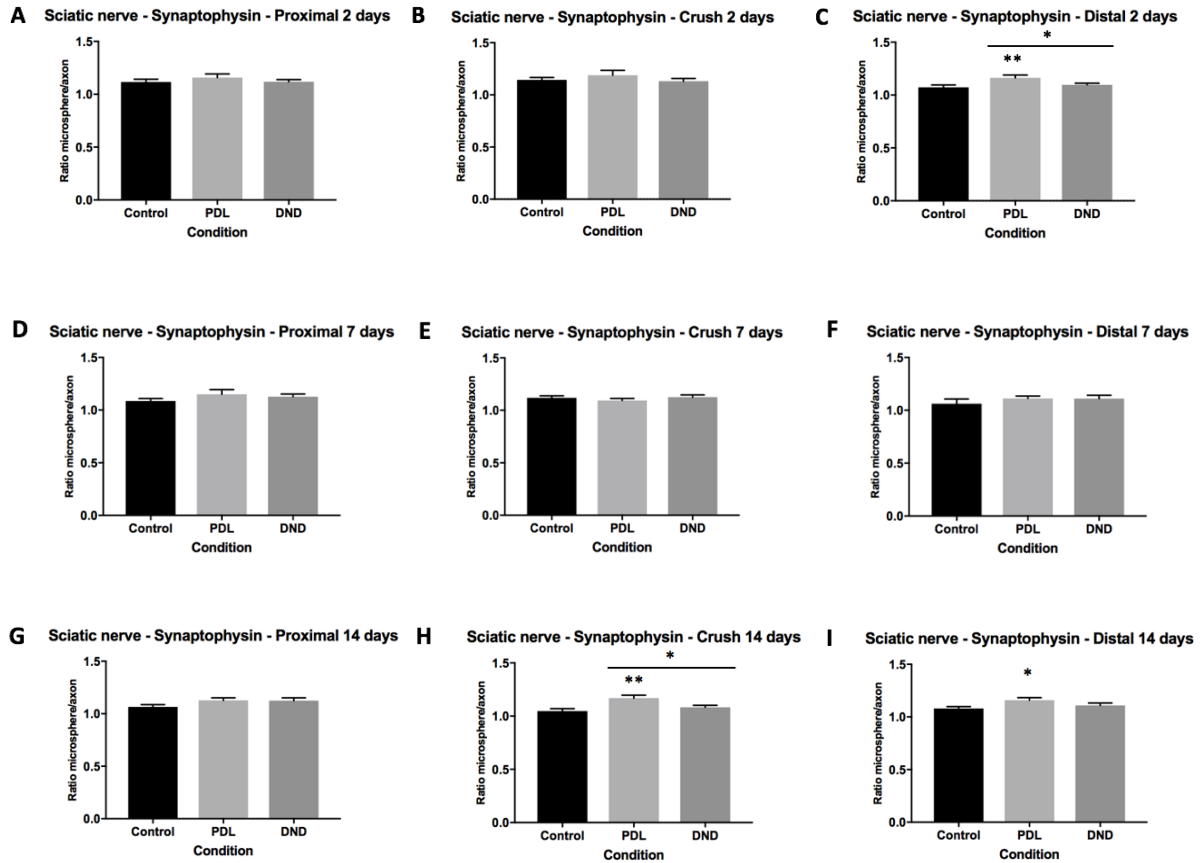
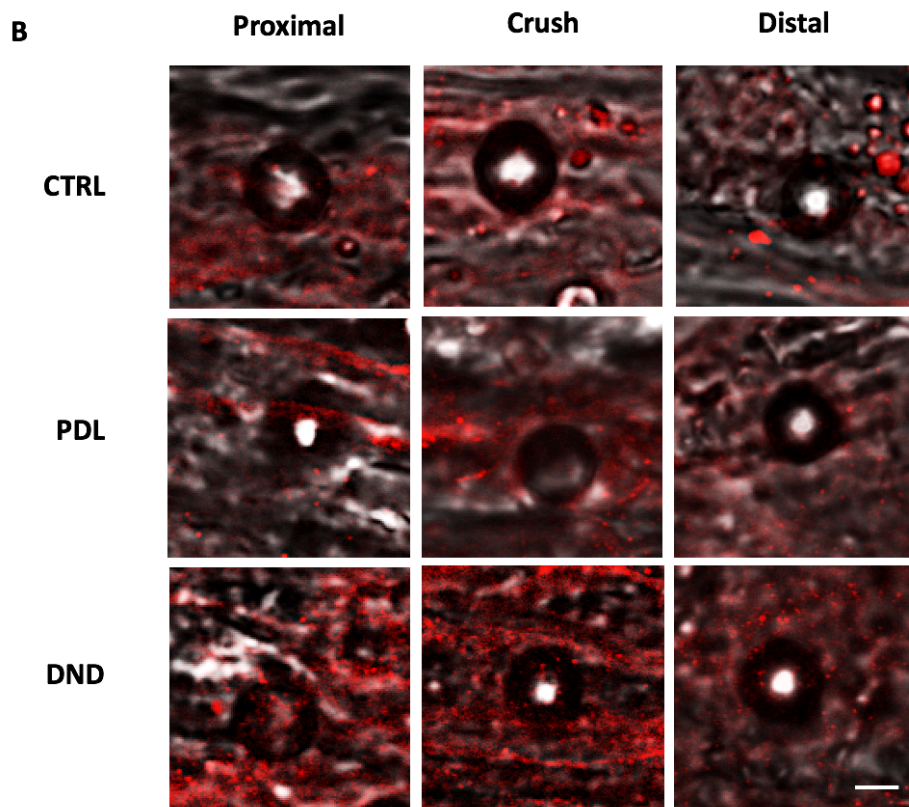
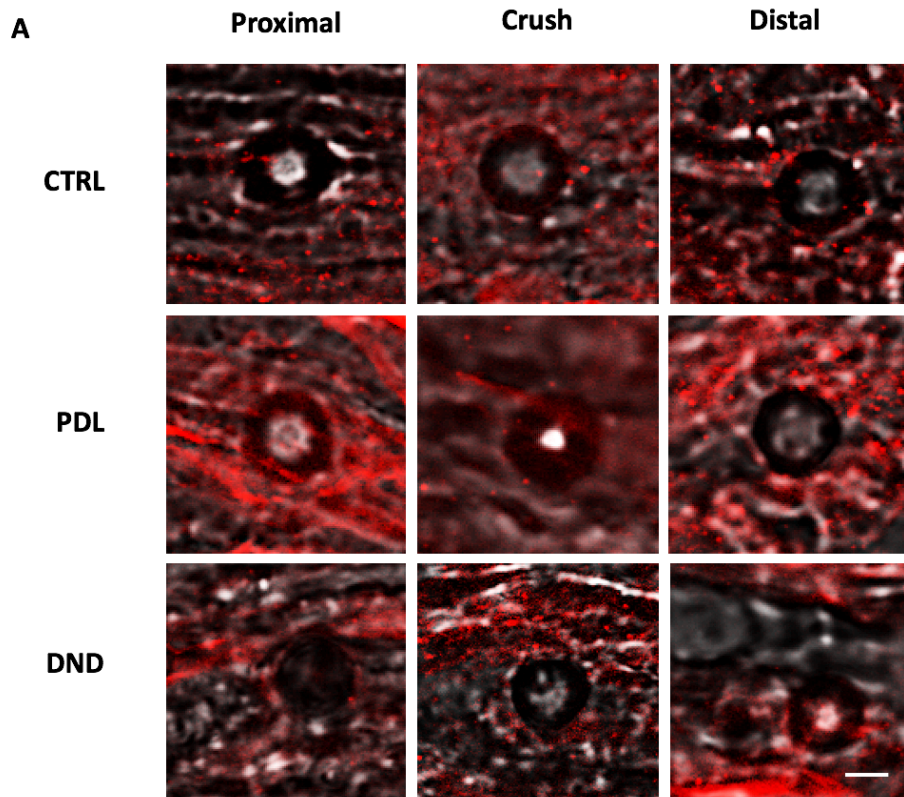


Figure 11. Quantification of synaptophysin staining surrounding microspheres in regenerating rat sciatic nerve at 2, 7 and 14 days of incubation.

Ratio of synaptophysin staining surrounding a microsphere to synaptophysin circulating in the adjacent axon (adjusted for background) in a regenerating rat sciatic nerve after being incubated for A) 2 days proximal to the crush site (Control n = 33, PDL n = 41, DND n = 37) B) 2 days at the crush site (Control n = 32, PDL n = 35, DND n = 36) C) 2 days distal to the crush site (Control n = 34, PDL n = 31, DND n = 30) D) 7 days proximal to the crush site (Control n = 24, PDL n = 28, DND n = 45) E) 7 days distal to the crush site (Control n = 29, PDL n = 30, DND n = 33). F) 7 days distal to the crush site (Control n = 29, PDL n = 28, DND n = 21) G) 14 days proximal to the crush site (Control n = 34, PDL n = 34, DND n = 30) H) 14 days at the crush site (Control n = 27, PDL n = 33, DND n = 31) I) 14 days distal to the crush site (Control n = 31, PDL n = 32, DND n = 30). One-way ANOVA (Average  $\pm$  SEM), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



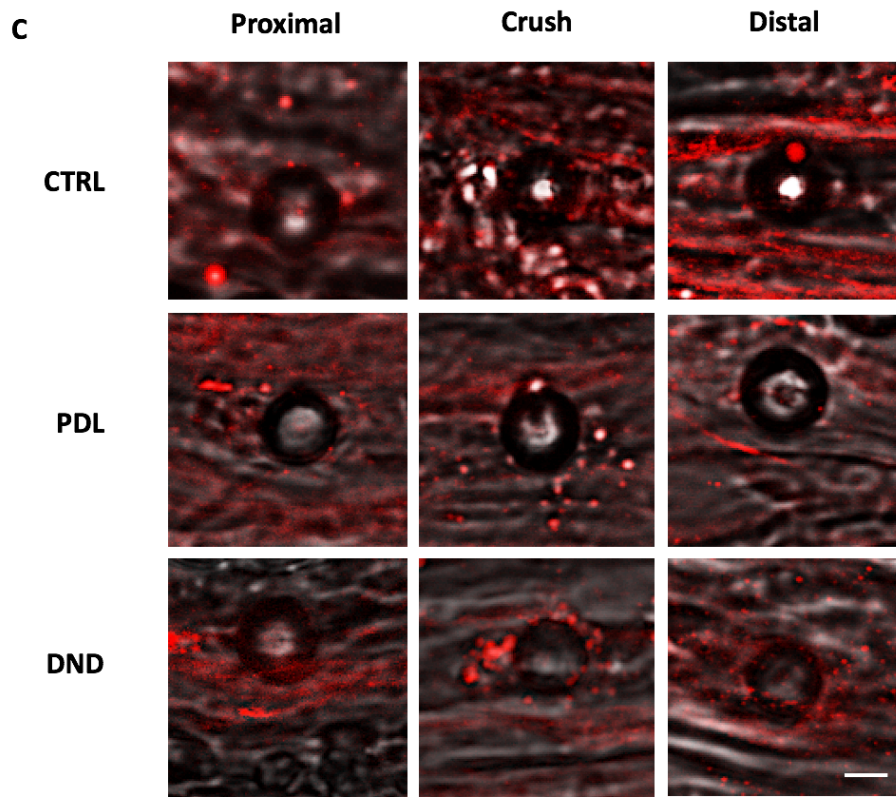


Figure 12. Representative images of VachT staining surrounding microspheres with regenerating rat sciatic nerve for each condition at 2, 7 and 14 days of incubation

Rows; Control = CTRL, Poly-D-Lysine = PDL, Dendrimer = DND at A: 2DOI, B: 7DOI, C: 14DOI. DOI = days of incubation, Scale bars: 5  $\mu$ m.

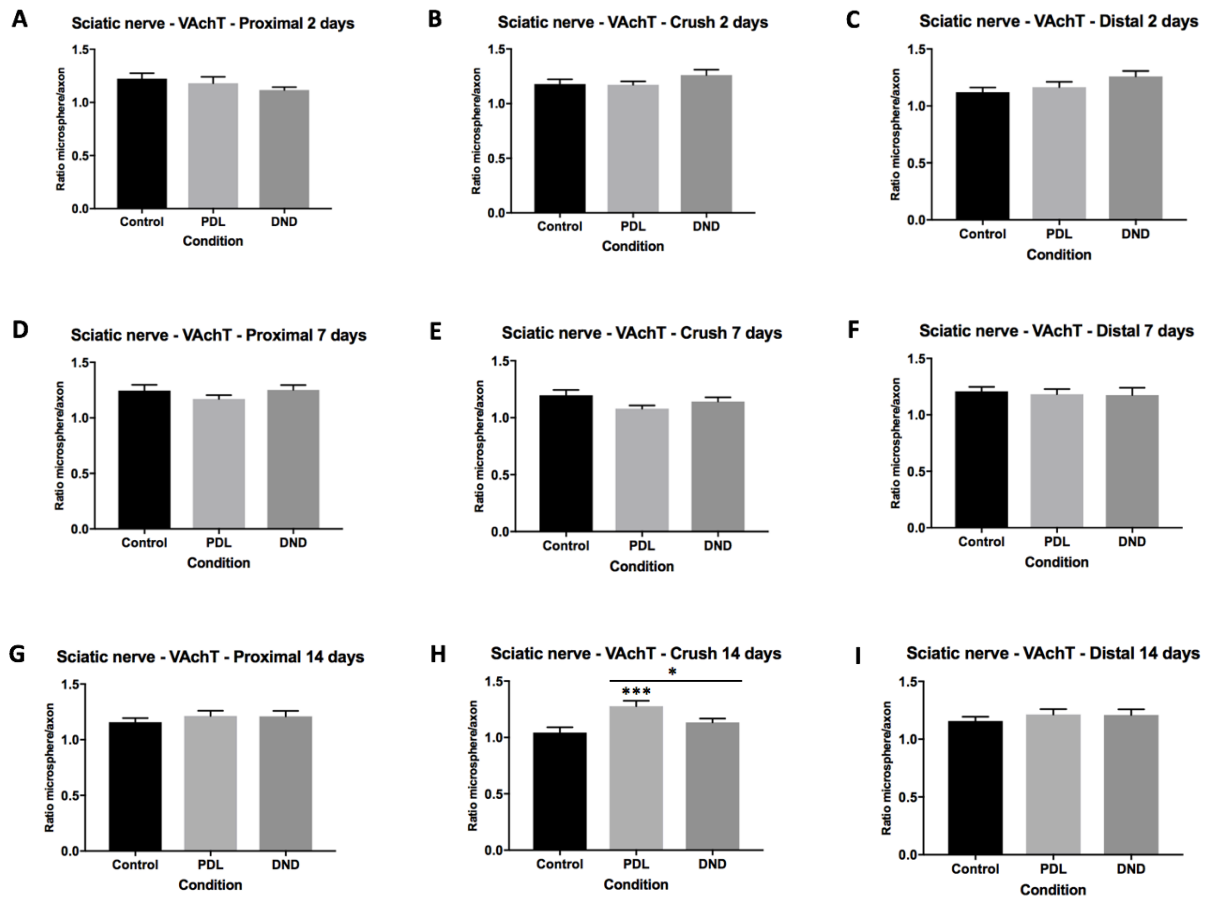


Figure 13. Quantification of VAchT staining surrounding microspheres in regenerating rat sciatic nerve at 2, 7 and 14 days of incubation.

Ratio of VAchT staining surrounding a microsphere to VAchT circulating in the adjacent axon (adjusted for background) in a regenerating rat sciatic nerve after being incubated for A) 2 days proximal to the crush site (Control n = 33, PDL n = 41, DND n = 37) B) 2 days at the crush site (Control n = 33, PDL n = 35, DND n = 36) C) 2 days distal to the crush site (Control n = 34, PDL n = 31, DND n = 30) D) 7 days proximal to the crush site (Control n = 24, PDL n = 28, DND n = 45) E) 7 days distal to the crush site (Control n = 29, PDL n = 30, DND n = 33). F) 7 days distal to the crush site (Control n = 29, PDL n = 28, DND n = 21) G) 14 days proximal to the crush site (Control n = 34, PDL n = 34, DND n = 30) H) 14 days at the crush site (Control n = 27, PDL n = 33, DND n = 31) I) 14 days distal to the crush site (Control n = 31, PDL n = 32, DND n = 30). One-way ANOVA (Average  $\pm$  SEM), \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank Michel Paquet and Nathalie Marçal for their technical assistance, as well as Olivier Michaud and Vincent Weng-Jy Cheung for their contribution in experiment optimization and data analysis. We are also grateful to Dr. Xiuqing Chen and Dr. Thomas Durcan for providing us with the human motor neuron differentiation protocol and access to the Montreal Neurological Institute's iPSC platform. This work was supported by a joint grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). XM was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), Fondation du CHU-Sainte Justine and Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal (FESP).

## REFERENCES

1. Aregueta-Robles UA, Woolley AJ, Poole-Warren LA, Lovell NH, Green RA. Organic electrode coatings for next-generation neural interfaces. *Front. Neuroeng.* 2014; 7:15.
2. Bowman BR, Erickson RC. Acute and chronic implantation of coiled wire intraneural electrodes during cyclical electrical stimulation. *Ann Biomed Eng* 1985; 13, 75.
3. Burry RW, Lasher RS. A quantitative electron microscopic study of synapse formation in dispersed cell cultures of rat cerebellum stained either by Os-UL or E-PTA. *Brain Res* 1978a; 147, 1-15.
4. Burry RW, Wood JG. Apparent presynaptic elements formed on poly-basic coated beads, *Neurosci. Abstr.*, 1978b; 4, 329.
5. Burry RW, Wood JG. Contributions of lipids and proteins to surface charge of membranes: an electron microscopic study with cationized and anionized ferritin, *J. Cell Biol.* 1978c; 82, 726-741.
6. Burry RW. Formation of apparent presynaptic elements in response to poly-basic compounds. *Brain Res* 1980; 184, 85-98.
7. Burry RW, Ho RH, Matthew WD. Presynaptic elements formed on polylysine-coated beads contain synaptic vesicle antigens. *J. Neurocytol.* 1986; 15, 409-419.
8. Cousin MA. Use of FM1-43 and Other Derivatives to Investigate Neuronal Function. *Curr Protoc Neurosci.* 2008 Apr;Chapter 2:Unit 2.6.
9. Goldman JS, Ashour MA, Magdesian MH, Tritsch NX, Harris SN, Christofi N, Chemali R, Stern YE, Thompson-Steckel G, Gris P, Glasgow SD, Grutter P, Bouchard JF, Ruthazer ES, Stellwagen D, Kennedy TE. Netrin-1 Promotes Excitatory Synaptogenesis between Cortical Neurons by Initiating Synapse Assembly. *The Journal of Neuroscience* 2013; 33(44), 17278 –17289.
10. Gopalakrishnan G, Thostrup P, Rouiller I, Lucido AL, Belkaïd W, Colman DR, Lennox RB. Lipid Bilayer Membrane-Triggered Presynaptic Vesicle Assembly. *ACS Chem. Neurosci.* 2010; 1, 86–94.
11. Hellmund M, Zhou H, Samsonova O, Welker P, Kissel T, Haag R. Functionalized Polyglycerol Amine Nanogels as Nanocarriers for DNA, *Macromolecular Bioscience* 2014; 1215-1221.

12. Hellmund M, Achazi K, Neumann F, Thota BNS, Ma N, Haag R. Systematic adjustment of charge densities and size of polyglycerol amines reduces cytotoxic effects and enhances cellular uptake, *Biomater. Sci.*, 2015; 4, 1459.
13. Huebner EA, Strittmatter SM. Axon Regeneration in the Peripheral and Central Nervous Systems. In: Koenig E. (eds) *Cell Biology of the Axon. Results and Problems in Cell Differentiation* 2009; vol 48. Springer, Berlin, Heidelberg.
14. Kim YK, Que R, Wang SW, Liu WF. Modification of biomaterials with a self-protein inhibits the macrophage response. *Adv Healthc Mater* 2014; 3(7), 989–994.
15. Kringelbach ML, Jenkinson N, Owen SL, Aziz TZ. Translational principles of deep brain stimulation. *Nat Rev Neurosci.* 2007 Aug;8(8), 623-35.
16. Lefurge T, Goodall E, Horch K, Stensaas L, Schoenberg A. Chronically Implanted Intrafascicular Recording Electrodes. *Annals of Biomedical Engineering* 1991; Vol. 19, 197-207.
17. Lotti F, Ranieri F, Vadalà G, Zollo L, Di Pino G. Invasive Intraneural Interfaces: Foreign Body Reaction Issues. *Front. Neurosci.* 2017; 11:497.
18. Lozano AM, Dostrovsky J, Chen R, Ashby P. Deep brain stimulation for Parkinson's disease: disrupting the disruption. *Lancet Neurol.* 2002; Aug;1(4), 225-31.
19. Malhotra A. Hypoglossal-nerve stimulation for obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 2014; 370(2), 170–171.
20. Lucido AL, Suarez Sanchez F, Thostrup P, et al. Rapid Assembly of Functional Presynaptic Boutons Triggered by Adhesive Contacts. *The Journal of Neuroscience.* 2009;29(40),12449-12466.
21. Lucido AL, Gopalakrishnan G, Yam PT, Colman DR and Lennox RB. Isolation of Functional Presynaptic Complexes from CNS Neurons: A Cell-Free Preparation for the Study of Presynaptic Compartments In Vitro. *ACS Chem. Neurosci.* 2010; 1, 535–541.
22. Peng HB, Markey DR, Muhlach WL, Pollack ED. Development of presynaptic specializations induced by basic polypeptide-coated latex beads in spinal cord cultures. *Synapse.* 1987;1(1),10-9.
23. Raspopovic S, Capogrosso M, Petrini F, Bonizzato M, Rigosa J, Di Pino G, Carpaneto J, Controzzi M, Boretius T, Fernandez E, Granata G, Oddo CM, Citi L, Ciancio AL, Cipriani C, Carrozza MC, Jensen W, Guglielmelli E, Stieglitz T, Rossini PM, Micera S.

Restoring Natural Sensory Feedback in Real-Time Bidirectional Hand Prostheses. *Science Translational Medicine* Feb 2014; Vol. 6, Issue 222, 222ra19.

24. Rossini PM, Micera S, Benvenuto A, Carpaneto J, Cavallo G, Citi L, Cipriani C, Denaro L, Denaro V, Di Pino G, Ferreri F, Guglielmelli E, Hoffmann KP, Raspopovic S, Rigosa J, Rossini L, Tombini M, Dario P. Double nerve intraneural interface implant on a human amputee for robotic hand control. *Clin Neurophysiol.* 2010 May;121(5), 777-83.
25. Sulaiman W, Gordon T. Neurobiology of Peripheral Nerve Injury, Regeneration, and Functional Recovery: From Bench Top Research to Bedside Application. *The Ochsner Journal.* 2013;13(1):100-108.
26. Weihe E, Tao-Cheng JH, Schafer MKH, Erickson JD, Eiden LE. Visualization of the vesicular acetylcholine transporter in cholinergic nerve terminals and its targeting to a specific population of small synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; Vol.93 3547-3552.



## CHAPITRE 3

### 3. Discussion

L'objectif de mon étude consistait à déterminer si les neurones moteurs humains formeraient des nouveaux éléments présynaptiques sur des surfaces synthétiques enrobées d'un polymère hautement cationique déjà prouvé synaptogénique chez les neurones animales, la poly-D-lysine (PDL), ou d'un polyglycérol hyperbranché expérimental potentiellement synaptogénique qui serait non-toxique avec une meilleure demi-vie, le dendromère (DND). L'autre objectif visait à vérifier ce même phénomène dans le contexte d'un nerf sciatique du rat adulte en régénération. En concordance avec notre hypothèse, nos résultats démontrent pour la première fois que l'enrobage de PDL ou de DND autour des microsphères induit la formation de nouveaux éléments présynaptiques *in vitro* en contact avec des neurones moteurs humains. Nos résultats révèlent également que les nerfs sciatiques de rat en régénération rentrant en contact avec des microsphères enrobées de PDL commenceraient à former des nouveaux éléments présynaptiques à la région de l'écrasement (synaptophysine et VAChT) et en distal (synaptophysine) à 14 jours d'incubation.

#### 3.1 Présence des marqueurs présynaptiques entre les processus neuronaux des neurones moteurs humains et la surface des microsphères enrobées *in vitro*

Nos résultats démontrent que, similairement aux études précédentes (Burry et Lasher, 1978a; Burry et Wood, 1978b; Burry et Wood, 1978c; Burry, 1980; Burry et al, 1986; Peng et al, 1987; Lucido et al, 2009; Lucido et al, 2010; Gopalarkrishnan et al, 2009), les neurones du système nerveux périphérique humain peuvent également former de nouveaux éléments présynaptiques sur des surfaces synthétiques, témoigné par la présence significative de synaptophysine et de VAChT dans les conditions expérimentales pour toutes les durées étudiées (voir chapitre 2: figures 3, 4, 5, 6). Ces observations indiquent que la PDL et le DND possèdent tous les deux

des propriétés permettant le recrutement des éléments essentiels à la formation de la région présynaptique d'une synapse.

La présence moindre de la synaptophysine dans les conditions DND par rapport aux conditions PDL contredit des résultats précédents dans une étude de nos collaborateurs (Al Alwan et al, données internes). En effet, alors que les deux substances étaient comparable à 1, 3 et 7 jours, le DND était significativement inférieure en terme de fluorescence pour la synaptophysine à 5 jours ( $p < 0.05$ ) et à 9 jours ( $p < 0.0001$ ). Nous suggérons quelques explications possibles qui pourraient expliquer cette différence. Il est possible que, malgré que le dendrimère soit appréciée par les neurones du système nerveux central, cette substance aurait un effet différent avec les neurones du système nerveux périphérique. La présence moins importante de la synaptophysine indique possiblement une moins bonne stabilité de certaines nouvelles connexions formées en réponse à la présence de dendrimère. La provenance des cellules, soit humaine dans cette étude comparativement à celle du rat dans l'étude de Al Alwan et al (données internes), pourrait également être un facteur expliquant cette différence. La confirmation de cette hypothèse demandera des études plus poussées sur les différences entre les modèles d'étude murins et humains en réalisant, par exemple, une étude similaire avec des neurones moteurs de rat. Il en demeure que la présence de synaptophysine autour des microsphères de DND reste significativement supérieure au contrôle pour toutes les durées d'incubation étudiées. Idéalement, la présence de synaptophysine et de VAChT devrait être étudiée au-delà de 9 jours d'incubation pour confirmer la pertinence des substances étudiées pour les neurones moteurs humains. Cependant, il est difficile d'augmenter les temps d'incubation avec les microsphères au-delà de la durée maximale dans cette étude, puisque la viabilité des cellules chuterait de façon importante. Ce déclin est observable par la morphologie des motoneurones humains: les noyaux de ces derniers auraient alors tendance à s'agglutiner ensemble et former des câbles avec leurs axones, soit des signes de détresse cellulaire. Ils finiront par la suite par décoller du plateau de culture, témoignant ainsi de la mort cellulaire. Ainsi, il est difficile d'évaluer si la présence des marqueurs présynaptiques continue à diminuer avec l'augmentation de la durée d'incubation ou se stabilise et, dans le cas échéant, si cette dernière demeurera significativement plus élevée que dans la condition contrôle.

Dans un organisme vivant, les neurones moteurs rejoignent leur cible musculaire par la plaque motrice, une région sans myéline où l'axone se divise en plusieurs branches (Kandel et al, 2013). À l'extrémité, des boutons synaptiques se positionnent sur une région de la fibre musculaire présentant des plis du sarcolemme (*junctional folds*) avec les récepteurs d'acétylcholine. La zone active délimitant la région où se retrouve une accumulation de vésicules présynaptiques contenant l'acétylcholine est indicatrice de la maturité de la synapse (Peng et al, 1987). Nos expériences *in vitro* visent à explorer cette connexion neuro-musculaire avec une cible post-synaptique synthétique, représentée par les microsphères enrobées d'une substance synaptogénique. Nos résultats suggèrent que le recouvrement des microsphères avec la PDL et le DND entraîne une reconnaissance de la surface synthétique comme l'équivalent des plis d'un sarcolemme d'une fibre musculaire. Ainsi, nous observons *in vitro* une accumulation des protéines présynaptiques synaptophysine et VAChT aux sites de contact entre les processus neuronaux des neurones moteurs et la surface des microsphères enrobées des substances expérimentales de notre étude. En concordance avec les observations de Peng et al (1987) avec le SV48 dans le système nerveux périphérique de la grenouille, les images démontrent la capacité d'un processus neuronal de former des éléments présynaptiques avec plusieurs microsphères qui rentrent en contact avec ce dernier.

Les images indiquent la présence plus importante de synaptophysine et de VAChT sur la majorité mais pas la totalité des microsphères expérimentales analysées. Ceci pourrait être expliqué par la présence d'éléments cellulaires nécessaires à la formation d'un nouveau bouton synaptique sélectivement à certains endroits dans les processus neuronaux (Burry, 1980). Il serait également possible que les microsphères concernées seraient en contact avec des cellules autres que les neurones moteurs, vu que la pureté des cellules n'est pas absolue (Du et al, 2015). Il est peu probable qu'un mauvais protocole d'enrobage des microsphères ou de manipulation a créé une hétérogénéité au sein des microsphères, puisque cette même méthode a été employée avec succès dans une étude similaire avec des neurones corticaux du rat (Al Alwan et al, données internes). De plus, vu les temps d'incubation et la stabilité reconnue des substances expérimentales utilisées, il est aussi peu probable que les enrobages soient dégradés par les activités cellulaires enzymatiques ou oxydatives. Ainsi, il est possible que certains facteurs non-évalués aient influencé l'assemblage d'un complexe présynaptique à un certain site.

Un défi des expériences *in vitro* était l'adhérence des microsphères contrôle au plateau de culture. En effet, similairement à l'étude de Lucido et al (2009), les microsphères non-enrobées (contrôle) étaient beaucoup moins adhérents que les microsphères enrobées, expliquant ainsi leur faible densité au sein des cultures. En effet, les manipulations, particulièrement l'aspiration et l'ajout de liquide, contribuaient à déloger les microsphères non-enrobées de la lamelle de culture. Parmi les restants, plusieurs se retrouvent accolés sur les corps cellulaires et ont été exclus de l'analyse vu qu'ils ne sont pas représentatifs du phénomène à observer. Ceci explique la disparité en termes de nombre de microsphères analysées dans les conditions contrôles par rapport aux conditions expérimentales (Voir chapitre 2, figure 4 et 6). Le nombre de microsphères analysées par plateau de culture a été maximisé mais n'atteint pas nécessairement 25 par série de culture, ce qui expliquerait les disparités entre du nombre d'analyses (n) des différentes conditions. Cependant, nous observons tout de même des différences significatives avec des n plus petites, ce qui renforce la forte signifiante de nos résultats.

### **3.2 Exocytose des vésicules marquées au FM-143 autour des microsphères enrobées *in vitro***

Les résultats préliminaires de l'imagerie à cellules vivantes des neurones moteurs humains ont démontré après 3 jours d'incubation avec des microsphères une diminution de la fluorescence du FM-143 après la deuxième dépolarisation (Voir chapitre 2, figure 9), des observations en ligne avec celles de Lucido et al (2009) et Lucido et al (2010). Ceci suggère que l'endocytose des vésicules marquées avec le FM-143 a eu lieu avant d'être relâchées à nouveau, expliquant la diminution de la fluorescence lors de la deuxième dépolarisation au KCl. Ainsi, ces observations nous indiquent que les nouveaux éléments présynaptiques formés sur les microsphères fonctionneraient comme de réelles synapses. Cependant, nous remarquons que la fluorescence entre la condition PDL et le contrôle ne comportent pas de différence significative (Voir chapitre 2, figure 9A), alors que seul le DND se distingue visuellement des deux autres conditions. Cette observation peut être expliquée par le petit nombre de microsphères analysées pour la condition contrôle (n=2) dû au décollement important des microsphères non-enrobées

suite aux manipulations. Nous notons également qu'une des microsphères analysées dans la condition contrôle serait une donnée aberrante qui aurait grandement influencée la tendance de la courbe. Ceci peut être notée par l'apparence générale de la courbe contrôle qui paraît différente des deux autres courbes, surtout avant la dépolarisation à 120s (Voir chapitre 2, figure 9A). Ainsi, nous ne pouvons réaliser des tests statistiques sur nos données et ne pouvons conclure sur les comparaisons entre les conditions expérimentales et la condition contrôle. Cependant, en comparant la fluorescence entre la PDL (n= 5) et le DND (n=3), nous pouvons remarquer que celle autour des microsphères enrobées de DND est significativement inférieure à celle de la PDL (Voir chapitre 2, figure 9C;  $p= 0.006$ ). Puisque la variation de fluorescence est proportionnelle au niveau d'exocytose observée, ces résultats suggèrent qu'à 3 jours d'incubation, les microsphères de DND auraient induit la formation de plus de nouveaux éléments présynaptiques fonctionnels. Ceci ne contredirait pas les observations à l'immunocytochimie, puisque la présence d'éléments présynaptiques témoignée par la présence de synaptophysine et de VAChT n'implique pas nécessairement leur fonctionnalité (Burry, 1980). Ainsi, il est possible que les microsphères de PDL et de DND induisent la formation d'une quantité comparable de protéines présynaptiques, mais que celles de DND seraient plus efficaces à permettre leur maturation. Des expériences identiques additionnelles devraient être réalisées afin de conclure avec plus de confiance ces observations préliminaires, ainsi que de vérifier la fonctionnalité des éléments présynaptiques pour les autres durées (1, 5, 7 et 9 jours).

L'étude de Lucido et al (2009) a démontré la fonctionnalité des nouveaux complexes présynaptiques formés par les cellules de l'hippocampe du rat grâce au colorant FM-484, une substance similaire au FM-143 utilisé dans notre étude. D'ailleurs, des études (Ryan et Smith, 1995; Ryan et al, 1996) ont remarqué que la majorité des vésicules synaptiques recyclés chez les neurones hippocampiques redeviennent prêts pour la prochaine exocytose une minute après leur recapture. Le reste, soit le quart des vésicules recapturées, redeviennent compétentes après 10 minutes, soit le délai utilisé dans notre étude avant la deuxième dépolarisation. Pourtant, il est difficile de déterminer si les vésicules synaptiques, marquées au FM-143 et prêtes pour une deuxième dépolarisation, contiennent des neurotransmetteurs. L'étude de Cousin et Nicholls (1997) a souligné à travers leurs expériences qu'autant les vésicules avec que sans neurotransmetteurs peuvent être marquées au FM-143. Ainsi, il serait possible que la diminution

de la fluorescence correspond à l'activité de vésicules ne comportant pas de neurotransmetteurs, ce qui ne serait preuve de la fonctionnalité des nouveaux boutons synaptiques formés autour des microsphères. Cependant, deux études par Cousin et Nicholls (1997) et Prior et Clague (1997) ont démontré de façon indépendante que le remplissage des vésicules après la relâche de leur contenu se fait très rapidement après l'endocytose de ces derniers dans les cellules, soit en moyenne moins de 60 secondes. Ainsi, avec les durées d'attente de nos expériences, ces études nous permettent d'être confiants que le changement de fluorescence observé sont non seulement les mêmes vésicules relâchées à la première dépolarisation, mais également que la probabilité qu'elles contiennent réellement des neurotransmetteurs sont très fortes.

### **3.3 Présence des marqueurs présynaptiques entre les neurones du nerf sciatique du rat en régénération et la surface des microsphères enrobées *in vivo***

Nos résultats *in vivo* démontrent que dans la majorité des durées et des localisations, les microsphères enrobées ne présentent pas de différence significative avec leur contrôle respectif pour les deux marqueurs présynaptiques étudiés. Cependant, pour la synaptophysine, les conditions PDL à 2 jours au niveau distal (Voir chapitre 2, figure 11C), ainsi qu'à 14 jours au site de l'écrasement (Voir chapitre 2, figure 11H) et en distal (Voir chapitre 2, figure 11I), sont significativement supérieur à leur contrôle ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$  respectivement). Quant au VAchT, nous remarquons qu'une seule condition, PDL à 14 jours au site de l'écrasement, est significativement différent de son contrôle (Voir chapitre 2, figure 13H) ( $p < 0.001$ ). Ainsi, il semble avoir une tendance où la quantité de synaptophysine et de VAchT autour des microsphères de PDL commencent à devenir significativement plus important par rapport au contrôle vers 14 jours.

Une différence significative à 2 jours pour la synaptophysine (Voir chapitre 2, figure 11C) constitue un résultat inattendu, vu que la tendance suggérait qu'une durée plus significative d'incubation serait nécessaire à l'observation d'une différence significative entre la condition

contrôle et celle de la PDL. Une explication possible serait que, suite à une blessure tel un écrasement du nerf, l'activité des macrophages et des cellules de Schwann entraînerait une poussée initiale de régénération nerveuse pouvant entraîner l'augmentation de la quantité de synaptophysine autour des microsphères enrobées de PDL (Sulaiman et Gordon, 2013; Huebner et Strittmatter, 2009). Avec la dégénération Wallerienne de la partie distale du nerf et la reorganization du tissu endommagé, la présence de synaptophysine diminue, tel qu'observé à 7 jours, avant de retourner progressivement à un état de régénération durant laquelle les axones intacts du côté proximal tentent de réinnover leurs cibles respectives. Selon cette hypothèse, certaines axons choisiront les microsphères de PDL comme une cible post-synaptique compatible, expliquant ainsi les résultats à 14 jours.

Une différence significative à 14 jours à deux sites différents semblerait impliquer que, chez le nerf sciatique en régénération du rat, la formation de nouveaux éléments présynaptiques se déroulerait à un rythme plus lent que dans les expériences *in vitro*, dans lesquelles ce phénomène survient qu'après 1 journée d'incubation avec des microsphères enrobées (Voir chapitre 2, figure 4 et 6; Lucido et al, 2009; Gopalarkrishnan et al, 2009). Similairement aux expériences *in vitro*, l'enrobage au PDL semble être supérieur au DND en termes de recrutement de protéines présynaptiques, puisque la différence entre les deux conditions expérimentales est significative pour la synaptophysine ( $p < 0.05$ ) à 2 jours en distal au site d'écrasement (Voir chapitre 2, figure 11C) et à 14 jours au site d'écrasement (Voir chapitre 2, figure 11H), ainsi qu'à 14 jours au site de l'écrasement (Voir chapitre 2, figure 13H) pour VAChT ( $p < 0.05$ ). Ainsi, nos résultats indiquent que, autant pour les motoneurones humains que celles du rat, la performance de la PDL en tant que substance synaptogénique serait potentiellement supérieure à celle du DND en terme de la quantité d'éléments présynaptiques, contrairement à ce qui a été démontré dans le système nerveux central (Al Alwan et al, données internes).

La visualisation longitudinale des axones a été un défi à réaliser. L'organisation longitudinale des nerfs périphérique a été très débattue dans la littérature (Stewart, 2003) : alors que les études de Stoffel (1913) supportent une distribution rectiligne des faisceaux nerveux, celles de Langley et Hashimoto (1917) démontrent plutôt une structure plexiforme dans l'orientation des faisceaux, surtout dans les nerfs plus proximaux. Le nerf sciatique ici étudié, soit le plus grand nerf chez les mammifères, pourrait comporter une structure plexiforme, ce qui expliquerait notre

difficulté à avoir de façon consistante une image longitudinale rectiligne du nerf dans les expériences *in vivo*.

Similairement aux expériences *in vitro*, il n'est présentement pas possible de se prononcer sur la présence des protéines présynaptiques au-delà de 14 jours *in vivo*. Il serait alors intéressant de reproduire ces expériences avec des durées plus importantes, surtout puisque la PDL semble être une candidate prometteuse pour les neurones du système nerveux périphérique. L'avantage du modèle du nerf sciatique des rats par rapport aux cellules en culture serait la possibilité d'évaluer des durées plus longues, de plusieurs semaines à des mois.

### **3.4 Validité des méthodes utilisées: motoneurones dérivés des iPSC et nerf sciatique du rat**

Malgré leur potentiel à représenter un modèle *in vitro* représentatif pour les humains, Du et al (2015) souligne la difficulté d'utiliser des cellules différenciées des iPSCs pour des études fiables. Les études requièrent une quantité importante de cellules avec une pureté importante afin de donner des résultats comparables et reproductibles. Plusieurs méthodes pré-établies pour l'obtention de neurones moteurs humains possèdent une efficacité faible en pureté cellulaire, demandent un temps significatif de travail et représentent un processus laborieux. Cependant, la méthode décrite par Du et al (2015), duquel s'est inspiré notre protocole de différenciation des neurones moteurs, permet une production très efficace avec plus de 90% de pureté de neurones moteurs matures. Ainsi, nous sommes confiants qu'au moins 90% des cellules qui ont été en contact avec des microsphères seraient en effet des motoneurones. De plus, vu l'incapacité des fibroblastes ou cellules précurseurs des motoneurones à former la synaptophysine et le VAChT, leur contact avec des microsphères ne génèreraient pas de fluorescence à l'immunocytochimie. Si ces derniers étaient par hasard inclus dans l'analyse, ils contribueraient à diminuer le ratio de la fluorescence de la microsphère comparé à celle circulant dans un axone avoisinant. Ainsi, notre approche par rapport à l'analyse était conservatrice, et nous avons malgré tout trouvé des différences significatives.



Afin d'arriver ultimement à des applications cliniques, il est primordial de confirmer, après les expériences *in vitro*, les observations avec des expériences *in vivo*. L'utilisation des rats est un modèle très répandu dans la littérature pour l'étude en neurosciences et comporte des coûts raisonnables (Swett et al, 1986).

### **3.5 Influence de la réaction à corps étranger sur la synaptogenèse**

La présence de Iba-1, et par conséquent de macrophages, dans le nerf sciatique serait une observation attendue, vu le traumatisme de la chirurgie avec l'écrasement du nerf et l'injection des microsphères engendraient une réaction inflammatoire importante. Dans le système nerveux central, Burry et al (1983b) ont remarqué que les astrocytes en culture, l'équivalent du système monocytes-macrophages, étaient responsables de la destruction d'éléments présynaptiques. En effet, lors des expériences sur le cervelet néonatal du rat, après l'augmentation initiale du nombre d'éléments présynaptiques autour des microsphères enrobées, cette quantité diminue jusqu'à être presque nulle à partir de 14 jours. De plus, l'administration de drogues anti-mitotiques comme la cytosine arabinooside permettait au nombre d'éléments présynaptiques d'augmenter avec l'augmentation des durées d'incubation. Cependant, une étude récente par Weinhard et al (2018) nuance les observations de Burry en appuyant un rôle de modérateur de la microglie dans la synaptogenèse du système nerveux central. Plus précisément, l'étude décrit un phénomène de trogocytose, soit une phagocytose partielle, d'éléments présynaptiques par la microglie dans des cultures de neurones de l'hippocampe. Ce processus serait essentiel dans la sélection des bonnes synapses selon l'étape du développement, sans lequel un excès de connexions non efficaces ne permettrait un fonctionnement optimal du système nerveux central.

Malgré que le rôle des macrophages dans la synaptogenèse n'ait pas été adressée dans cette étude, nous pensons qu'un phénomène similaire pourrait se produire dans le système nerveux périphérique. Une explication alternative de l'absence de différence significative pour les deux marqueurs présynaptiques entre les microsphères enrobées et celles non-enrobées lors de 2 jours et de 7 jours d'incubation pourrait être influencé par l'activité importante des macrophages suite

à l'écrasement du nerf qui contribuerait à ralentir la formation de nouveaux éléments présynaptiques. Ainsi, nous pensons que la présence des macrophages ne serait pas nécessairement néfaste, mais influencerait le processus de sélection des connexions les plus performantes. Une expérience intéressante à réaliser serait de comparer la réponse inflammatoire du nerf à la présence de microsphères non-enrobées et à celle des microsphères enrobées. Ces résultats permettront une meilleure compréhension multifactorielle sur la formation des synapses dans le système nerveux périphérique.

### **3.6 Implications pour les futures applications cliniques**

Notre étude a démontré pour la première fois que les motoneurons humains sont capables de former des éléments présynaptiques potentiellement fonctionnelles sur des surfaces synthétiques comme la poly-D-lysine et le dendrimère. Ces résultats auraient des implications importantes pour la littérature puisqu'ils démontrent la reconnaissance de substances non-biologiques comme une cible post-synaptique par les cellules humaines. Nous pensons que la création de connexions ressemblant à des synapses avec des objets étrangers recouverts de PDL ou de DND permettraient à ces derniers à être mieux tolérés par les cultures cellulaires ou le corps de l'animal, contribuant ainsi à assurer la longévité et fonctionnalité. La formation de nouvelles connexions nerveuses biologiques aurait une probabilité plus faible de faire réagir le système immunitaire de l'hôte, et éviterait la persistance de l'état inflammatoire causé par une incompatibilité biochimique. Dans le contexte des implants, dont font partie les électrodes intraneurales, l'utilisation d'un enrobage comme la PDL ou le DND aurait le potentiel d'induire la formation de nouvelles synapses fonctionnelles et de permettre une meilleure performance par cette connexion plus durable. Ceci impliquerait une meilleure qualité du signal transmis et une diminution de l'activité immunitaire de l'hôte envers la présence de l'électrode implantée. Cette amélioration résoudrait un obstacle majeur qu'heurtent les modèles existants d'électrodes intraneurales, où leurs propriétés physiques et chimiques causeraient une réponse inflammatoire qui compromettrait leur intégrité à long terme (Lotti et al, 2017). Ce défi est particulièrement important puisque plusieurs applications cliniques des électrodes, soit pour l'enregistrement ou la stimulation, auraient besoin d'être idéalement implantées dans le corps de façon permanente pour pallier à des pathologies chroniques. De plus, si les résultats futurs des expériences *in vivo*

seraient significatifs, il serait possible que la blessure nerveuse, pour la régénération du nerf sciatique chez le rat et conséquemment la formation de nouvelles synapses, soit nécessaire à induire chez l'humain pour obtenir le même effet.

Lotti et al (2017) ont identifié deux méthodes principales pour résoudre le phénomène de la réaction à corps étranger dû à l'introduction des électrodes intraneurales, soit 1) améliorer les caractéristiques intrinsèques de l'implant ou 2) agir sur le micro-environnement inflammatoire. Cependant, malgré des avancées intéressantes dans chacune des pistes de solution, la modification des propriétés d'une électrode serait plus réaliste et efficace que de moduler des cascades moléculaires complexes, dont plusieurs demeurent mal comprises. De plus, une difficulté importante dans l'étude de la biocompatibilité des matériaux serait l'absence d'un modèle fiable *in vitro* pouvant imiter les phénomènes physiologiques dans les tissus nerveux (Lotti et al, 2017). Ainsi, face à ces enjeux, nos résultats s'inscrivent dans la modification des propriétés d'une nouvelle approche à travers la formation de nouveaux éléments présynaptiques fonctionnels sur les surfaces synthétiques. Malgré que plusieurs facteurs comme l'implication du système immunitaire dans la synaptogenèse restent à élucider, notre étude démontre la possibilité de deux nouveaux candidats pour la création ultime d'électrodes intraneurales biocompatibles et durables. La surface arrondie des microsphères est plus intéressante pour minimiser l'insulte physique au sein des fascicules, en contraste avec un objet plus pointu (Groothuis, 2014, Veiseh, 2015). Ainsi, le choix d'utiliser des microsphères pour les expériences *in vitro* et *in vivo* seraient un modèle intéressant pour étudier la biocompatibilité des substances.

### **3.7 Perspectives futures**

Pour les expériences *in vitro*, mise à part l'imagerie des cellules vivantes à répéter, il serait intéressant d'explorer la possibilité de synaptogenèse des neurones sensitifs sur des surfaces synthétiques, une question qui n'a encore été adressée dans la littérature existante. Les neurones sensitifs se présentent sous une variété de morphologies et de fonctions (Romero-Ortega, 2014), et leur réponse à la présence des microsphères *in vitro* pourrait nous fournir des informations intéressantes dans l'objectif d'une utilisation clinique future. La culture de neurones sensitifs à partir des cellules pluripotentes humaines a déjà été documentée dans la littérature (Schwab et

Ebert, 2015). Un marqueur intéressant serait l'advillin, une protéine spécifique aux neurones sensitifs périphérique impliquée dans la croissance axonale et la régénération (Hasegawa et al, 2007). Ainsi, l'accumulation d'advillin au site de contact avec une microsphère pourrait indiquer la croissance cellulaire sur une surface synthétique. L'advillin pourrait également être utile pour observer comment les neurones sensitifs interagissent avec les microspheres dans un modèle *in vitro*, et comparer leur comportement avec les neurones moteurs.

Pour les expériences *in vivo*, la prochaine étape serait d'observer comment l'accumulation de protéines présynaptiques autour des microsphères enrobées varie au-delà de 14 jours d'incubation. Notre étude suggère que la synaptophysine et le VAChT commencent à s'accumuler significativement à certains endroits sur le nerf sur des microsphères de PDL par rapport à leur contrôle. Nous pensons que cette accumulation sera plus importante avec l'augmentation des durées d'incubation pour les deux marqueurs, jusqu'à sa stabilisation à long terme. Une autre idée à explorer serait l'influence des macrophages sur la nouvelle formation de nouveaux éléments présynaptiques, mentionné ci-dessus.

Finalement, afin d'assurer l'utilisation sécuritaire de la PDL et du DND pour de futures applications cliniques, il faudrait aussi trouver l'équilibre entre l'efficacité de ces substances et la toxicité qu'ils pourraient entraîner à l'hôte (Lotti et al, 2017). La toxicité du DND a déjà été adressée par Hellmund et al (2014) et Hellmund et al (2015), mais il n'existe encore d'étude sur celle de la PDL dans le contexte *in vivo*. Une expérience possible serait d'injecter différentes concentrations de la PDL dans le nerf sciatique du rat afin de déterminer la concentration maximale avant l'apparition de signes cliniques et histologiques de toxicité, tels que les changements morphologiques du nerf, de la cinétique de la jambe affectée ou de sa réponse aux stimuli (Costa, 1998). Il serait alors important dans cette situation de mesurer le moment d'apparition des signes et suivre leur progression dans le temps (Costa, 1998).

## 4. Conclusion

En conclusion, les résultats ont démontré pour la première fois la possibilité des cellules humaines saines, soit des motoneurones dérivés de cellules humaines pluripotentes induites, de former des nouveaux boutons synaptiques avec des microsphères enrobées de substances synthétiques. Les microsphères enrobées de poly-D-lysine (PDL) ou de dendrimère (DND) sont tous les deux significativement supérieures en termes d'accumulation de synaptophysine et de VAChT par rapport à leur contrôle jusqu'à 9 jours. Entre la PDL et le DND, la présence de synaptophysine et de VAChT était similaire à 1, 3 et 7 jours, alors que les microsphères enrobées de DND comportaient significativement moins de synaptophysine par rapport aux microsphères PDL à 5 jours et à 9 jours. Les résultats préliminaires de l'imagerie de cellules vivantes suggèrent la fonctionnalité des nouveaux complexes présynaptiques formés à partir de 3 jours d'incubation dans la condition DND, et potentiellement avec la PDL. De plus, *in vivo*, la présence significative de synaptophysine à 14 jours au site de l'écrasement et en distal, ainsi que la présence significative de VAChT à 14 jours au site de l'écrasement suggèrent que les nerfs sciatiques des rats commencent la formation des nouveaux éléments présynaptiques sur des microsphères enrobées de PDL, et potentiellement autour des microsphères enrobées de DND avec des durées d'incubation plus longues que celles étudiées ici.

Parmi les études similaires, plusieurs auteurs (Peng et al, 1981; Lucido et al, 2009) ont également exploré la présence d'éléments post-synaptiques dans le contexte de microsphères enrobées. Peng et al (1981) ont remarqué la présence de récepteurs pour l'acétylcholine qui se forment aux sites de contact entre des microsphères enrobées de poly-L-lysine et des cellules musculaires d'embryons de *Xenopus laevis*. Dans le système nerveux central, la protéine post-synaptique PSD95 étaient présente en moindre quantité, et exclusivement aux sites de contact où la synaptophysine était aussi présente, indiquant la nécessité d'avoir une composante présynaptique préétablie pour une différenciation post-synaptique (Lucido et al, 2009). La possibilité des substances étudiées d'induire des éléments post-synaptiques n'a pas été adressé, mais représenterait une prochaine étape intéressante à réaliser pour une meilleure compréhension du phénomène.

Cette étude vise à vérifier la capacité de synaptogenèse des neurones du système nerveux périphérique sur des surfaces synthétiques. La confirmation de cette possibilité ouvre de nouvelles pistes de possibilités pour l'amélioration de la longévité et éventuellement de la biocompatibilité des implants, tels les électrodes intraneurales. Si les résultats futurs sont significatifs, cette méthode pourrait faciliter la création éventuelle d'une électrode-transmetteur implantable durable et révolutionner les neurosciences cliniques en permettant la récupération de fonctions nerveuses après une lésion dans le système nerveux périphérique.

## Bibliographie

1. Anderson JM. Multinucleated giant cells. *Curr. Opin. Hematol.* 2000; 7, 40–47.
2. Anderson JM. Biological response to materials. *Annu Rev Mater Res* 2001; 31, 81–110.
3. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin. Immunol.* 2008; 20, 86–100.
4. Aregueta-Robles UA, Woolley AJ, Poole-Warren LA, Lovell NH, Green RA. Organic electrode coatings for next-generation neural interfaces. *Front. Neuroeng.* 2014; 7:15.
5. Badia J, Boretius T, Pascual-Font A, Udina E, Stieglitz T, Navarro X. Biocompatibility of chronically implanted transverse intrafascicular multichannel electrode (TIME) in the rat sciatic nerve. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2011; 58, 2324–2332.
6. Boretius T, Badia J, Pascual-Font A, Schuettler M, Navarro X, Yoshida, K, Stieglitz T. A transverse intrafascicular multichannel electrode (TIME) to interface with the peripheral nerve. *Biosens. Bioelectron.* 2010; 26, 62–69.
7. Bottini M, Bruckner S, Nika K, Bottini N, Bellucci S, Magrini A, Bergamaschi A, Mustelin T. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicol. Lett.* 2006; 160, 121–126.
8. Bowman BR, Erickson RC. Acute and chronic implantation of coiled wire intraneural electrodes during cyclical electrical stimulation. *Ann Biomed Eng* 1985; 13, 75.
9. Burry RW, Lasher RS. A quantitative electron microscopic study of synapse formation in dispersed cell cultures of rat cerebellum stained either by Os-UL or E-PTA. *Brain Res* 1978a; 147, 1-15.
10. Burry RW, Wood JG. Apparent presynaptic elements formed on poly-basic coated beads, *Neurosci. Abstr.*, 1978b; 4, 329.
11. Burry RW, Wood JG. Contributions of lipids and proteins to surface charge of membranes: an electron microscopic study with cationized and anionized ferritin, *J. Cell Biol.* 1978c; 82, 726-741.
12. Burry RW. Formation of apparent presynaptic elements in response to poly-basic compounds. *Brain Res* 1980; 184, 85-98.

13. Burry RW, Ho RH, Matthew WD. Presynaptic elements formed on polylysine-coated beads contain synaptic vesicle antigens. *J. Neurocytol.* 1986; 15, 409-419.
14. Brummer SB, Robblee LS, Hambrecht FT. Criteria for selecting electrodes for electrical stimulation: theoretical and practical considerations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1983; 405, 159–171.
15. Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, Price DL, Mouton PR. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *J Neurocytol* 1996; 25, 821.
16. Cousin MA, Nicholls DG. Synaptic vesicle recycling in cultured cerebellar granule cells: role of vesicular acidification and refilling. *J Neurochem.* 1997 Nov; 69(5),1927-35.
17. Cousin MA, Robinson JP. Mechanisms of Synaptic Vesicle Recycling Illuminated by Fluorescent Dyes. *J. Neurochem.* 1999; Vol. 73, No. 6, 2227-2239.
18. Cousin MA. Use of FM1-43 and Other Derivatives to Investigate Neuronal Function. *Curr Protoc Neurosci.* 2008 Apr;Chapter 2:Unit 2.6.
19. Creasey G, Elefteriades J, DiMarco A, Talonen P, Bijak M, Girsch W, Kantor C. Electrical stimulation to restore respiration. *Journal of Rehabilitation Research and Development* 1996; Apr;33(2),123-132.
20. Creasey GH, Craggs MD. Functional electrical stimulation for bladder, bowel, and sexual function. *Handb Clin Neurol* 2012;109, 247–257.
21. Cutrone A, Del Valle J, Santos D, Badia J, Filippeschi C, Micera S, Navarro X, Bossi S. A three-dimensional self-opening intraneural peripheral interface (SELINE). *J. Neural Eng.* 2015; 12:016016.
22. de la Oliva N, Navarro X, del Valle J. Time course study of long-term biocompatibility and foreign body reaction to intraneural polyimide-based implants. *J Biomed Mater Res A.* 2018; Mar;106(3), 746-757.
23. del Valle J, Navarro X. Interfaces with the Peripheral Nerve for the Control of Neuroprostheses. *Int Rev Neurobiol.* 2013;109, 63-83.
24. DeLisa JA, Gans BM, Walsh NE. Upper and lower extremity prosthetics. In: DeLisa JA, Gans BM, Bockenek WL, et al, eds. *Physical Medicine and Rehabilitation: Principles and Practice.* Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2004:1325–1354.



25. Du ZW, Chen H, Liu H, Lu J, Qian K, Huang CTL, Zhong X, Fan F, Zhang SC. Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 2015; 6:6626.
26. Geddes LA, Roeder R. Criteria for the selection of materials for implanted electrodes. *Ann. Biomed. Eng.* 2003; 31, 879–890.
27. Geuna S, Raimondo S, Fregnan F, Haastert-Talini K, Grothe C. In vitro models for peripheral nerve regeneration, *European Journal of Neuroscience* 2016; Vol 43, 287-296.
28. Goldman JS, Ashour MA, Magdesian MH, Tritsch NX, Harris SN, Christofi N, Chemali R, Stern YE, Thompson-Steckel G, Gris P, Glasgow SD, Grutter P, Bouchard JF, Ruthazer ES, Stellwagen D, Kennedy TE. Netrin-1 Promotes Excitatory Synaptogenesis between Cortical Neurons by Initiating Synapse Assembly. *The Journal of Neuroscience* 2013; 33(44), 17278 –17289.
29. Goldstein B. Anatomy of the peripheral nervous system. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2001; May;12(2), 207-36.
30. Gopalakrishnan G, Thostrup P, Rouiller I, Lucido AL, Belkaïd W, Colman DR, Lennox RB. Lipid Bilayer Membrane-Triggered Presynaptic Vesicle Assembly. *ACS Chem. Neurosci.* 2010; 1, 86–94.
31. Green DP, Wolfe SW. *Green's Operative Hand Surgery.* Philadelphia, PA: Elsevier/Churchill Livingstone; 2011.
32. Gretzer C, Emanuelsson L, Liljensten E, Thomsen P. The inflammatory cell influx and cytokines changes during transition from acute inflammation to fibrous repair around implanted materials. *J Biomater Sci Polym Ed* 2006;17(6), 669–687.
33. Groothuis J, Ramsey NF, Ramakers GM, van der Plasse G. Physiological challenges for intracortical electrodes. *Brain Stimul.* 7, 1–6.
34. Hellmund M, Zhou H, Samsonova O, Welker P, Kissel T, Haag R. Functionalized Polyglycerol Amine Nanogels as Nanocarriers for DNA, *Macromolecular Bioscience* 2014; 1215-1221.
35. Hellmund M, Achazi K, Neumann F, Thota BNS, Ma N, Haag R. Systematic adjustment of charge densities and size of polyglycerol amines reduces cytotoxic effects and enhances cellular uptake, *Biomater. Sci.*, 2015; 4, 1459.

36. Hochberg LR, Serruya MD, Friehs GM, Mukand JA, Saleh M, Caplan AH, Branner A, Chen D, Penn RD, Donoghue JP. Neuronal ensemble control of prosthetic devices by a human with tetraplegia. *Nature*. 2006 Jul 13;442(7099), 164-71.
37. Hoffer JA, Loeb GE. Implantable electrical and mechanical interfaces with nerve and muscle. *Ann Biomed Eng* 1980; 8, 351.
38. Holzer B, Rosen HR, Novi G, Ausch C, Hölbling N, Hofmann M, Schiessel R. Sacral nerve stimulation in patients with severe constipation. *Dis Colon Rectum* 2008;51(5), 524–529.
39. Hoog A, Gould VE, Grimelius L, Franke WW, Falkmer S, Chejfec G. Tissue fixation methods alter the immunohistochemical demonstrability of synaptophysin. *Ultrastructural Pathology* 1988; 12, 673–8.
40. Huebner EA, Strittmatter SM. Axon Regeneration in the Peripheral and Central Nervous Systems. In: Koenig E. (eds) *Cell Biology of the Axon. Results and Problems in Cell Differentiation* 2009; vol 48. Springer, Berlin, Heidelberg.
41. Ilfeld BM, Preciado J, Trescot AM. Novel cryoneurolysis device for the treatment of sensory and motor peripheral nerves, *Expert Review of Medical Devices* 2016; 13:8, 713-725.
42. Ince PG, Slade J, Chinnery RM, McKenzie J, Royston C, Roberts GW, Shaw PJ. Quantitative study of synaptophysin immunoreactivity of cerebral cortex and spinal cord in motor neuron disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 1995; 54, 673–9.
43. Kandel ER, Barres BA, Hudspeth AJ. *Principles of Neural Science* 5<sup>th</sup> edition. McGraw-Hill; 2013.
44. Kawada T, Zheng C, Tanabe S, Uemura T, Sunagawa K, Sugimachi M. A sieve electrode as a potential autonomic neural interface for bionic medicine. In 26<sup>th</sup> Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society 2004; Vol. 2, 4318–4321.
45. Keselowsky BG, Bridges AW, Burns KL, Tate CC, Babensee JE, LaPlaca MC, Garcia AJ. Role of plasma fibronectin in the foreign body response to biomaterials. *Biomaterials* 2007; 28, 3626–3631.

46. Kim YK, Que R, Wang SW, Liu WF. Modification of biomaterials with a self-protein inhibits the macrophage response. *Adv Healthc Mater* 2014; 3(7), 989–994.
47. Kovacs GT, Storment CW, Halks-Miller M, Belczynski CR, Jr., Santina CD, Lewis ER, Maluf NI. Silicon-substrate microelectrode arrays for parallel recording of neural activity in peripheral and cranial nerves. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 1994; 41, 567–577.
48. Kozak LP, Eppig JJ, Hahl D, Bignami A. Enhanced Neuronal Expression in Reaggregating Cells of Mouse Cerebellum Cultured in the Presence of Poly-L-lysine. *Dev Biol* 1978; 64, 253-264.
49. Kringelbach ML, Jenkinson N, Owen SL, Aziz TZ. Translational principles of deep brain stimulation. *Nat Rev Neurosci.* 2007 Aug;8(8), 623-35.
50. Kuiken TA, Dumanian GA, Lipschutz RD, Miller LA, Stubblefield KA. The use of targeted muscle reinnervation for improved myoelectric prosthesis control in a bilateral shoulder disarticulation amputee. *Prosthet Orthot Int* 2004;28(3), 245-253.
51. Kurniasih IN, Keilitz J, Haag R. Dendritic nanocarriers based on hyperbranched polymers *Chem. Soc. Rev.* 2015; 44, 4145.
52. Lago N, Yoshida K, Koch KP, Navarro X. Assessment of biocompatibility of chronically implanted polyimide and platinum intrafascicular electrodes. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 2007; 54, 281–290.
53. Langley JN, Hashimoto M. On the suture of separate nerve bundles in a nerve trunk and on internal nerve plexuses. *J Physiol (Lond)* 1917;51:318–345.
54. Lawrence SM, Dhillon GS, Jensen W, Yoshida K, Horch KW. Acute peripheral nerve recording characteristics of polymer-based longitudinal intrafascicular electrodes. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* 2004; 12, 345–348.
55. Leclerc N, Beesley PW, Brown I, Colonnier M, Gurd JW, Paladino T, Hawkes R. Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex. *Journal of Comparative Neurology* 1989; 280, 197–202.
56. Lefurge T, Goodall E, Horch K, Stensaas L, Schoenberg A. Chronically Implanted Intrafascicular Recording Electrodes. *Annals of Biomedical Engineering* 1991; Vol. 19, 197-207.
57. Li L, Xiong WC, Mei L. Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders. *Annu Rev Physiol.* 2018 Feb 10;80:159-188.

58. Liu X, McCreery DB, Carter RR, Bullara LA, Yuen TG, Agnew WF. Stability of the interface between neural tissue and chronically implanted intracortical microelectrodes. *IEEE Trans. Rehabil. Eng.* 1999; 7, 315–326.
59. Lotti F, Ranieri F, Vadalà G, Zollo L, Di Pino G. Invasive Intraneural Interfaces: Foreign Body Reaction Issues. *Front. Neurosci.* 2017; 11:497.
60. Lowe DG. Distinctive Image Features from Scale-Invariant Keypoints. *International Journal of Computer Vision* 2004; 60: 91.
61. Lozano AM, Dostrovsky J, Chen R, Ashby P. Deep brain stimulation for Parkinson's disease: disrupting the disruption. *Lancet Neurol.* 2002; Aug;1(4), 225-31.
62. Lyons GM, Sinkjaer T, Burridge JH, Wilcox DJ. A review of portable FES-based neural orthoses for the correction of drop foot. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng.* 2002 Dec; 10(4), 260-79.
63. Lucido AL, Suarez Sanchez F, Thostrup P, et al. Rapid Assembly of Functional Presynaptic Boutons Triggered by Adhesive Contacts. *The Journal of Neuroscience.* 2009;29(40),12449-12466.
64. Lucido AL, Gopalakrishnan G, Yam PT, Colman DR and Lennox RB. Isolation of Functional Presynaptic Complexes from CNS Neurons: A Cell-Free Preparation for the Study of Presynaptic Compartments In Vitro. *ACS Chem. Neurosci.* 2010; 1, 535–541.
65. Malhotra A. Hypoglossal-nerve stimulation for obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 2014; 370(2), 170–171.
66. Mclellan DL, Swash M. Longitudinal sliding of the median nerve during movements of the upper limb. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1976;39(6), 566–570.
67. Mensinger AF, Anderson DJ, Buchko CJ, Johnson MA, Martin DC, Tresco PA, Silver RB, Highstein SM. Chronic recording of regenerating VIIIth nerve axons with a sieve electrode. *Journal of Neurophysiology* 2000; 83, 611–615.
68. Navarro X, Calvet S, Buti M, Gomez N, Cabruja E, Garrido P, Villa R, Valderrama E. Peripheral nerve regeneration through microelectrode arrays based on silicon technology. *Restorative Neurology and Neuroscience* 1996; 9, 151–160.
69. Navarro X, Calvet S, Rodriguez FJ, Stieglitz T, Blau C, Buti M, Valderrama E, Meyer JU. Stimulation and recording from regenerated peripheral nerves through polyimide sieve electrodes. *Journal of the Peripheral Nervous System* 1998; 3, 91–101.

70. Ortiz-catalan M, Branemark R, Hakansson B, Delbeke J. On the viability of implantable electrodes for the natural control of artificial limbs: review and discussion. *Biomed Eng Online* 2012; 11:33.
71. Ovadia SA, Askari M. Upper Extremity Amputations and Prosthetics. *Semin Plast Surg* 2015; 29, 55–61.
72. Panetsos F, Avendaño C, Negredo P, Castro J, Bonacasa V. Neural prostheses: Electrophysiological and histological evaluation of central nervous system alterations due to long-term implants of sieve electrodes to peripheral nerves in cats. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering* 2008; 16, 223–232.
73. Peng HB, Cheng PC, Luther PW. Formation of ACh Receptor clusters induced by positively charged latex beads. *Nature* 1981; Vol 292, 831-834.
74. Peng HB, Markey DR, Muhlach WL, Pollack ED. Development of presynaptic specializations induced by basic polypeptide-coated latex beads in spinal cord cultures. *Synapse*. 1987;1(1),10-9.
75. Pfenninger KH. The cytochemistry of synaptic densities II. Proteinaceous components and mechanisms of synaptic connectivity, *J. Ultrastruct. Res.* 1971; 35, 451-475.
76. Pion AM, Roy A, Lin JC. La régénération axonale suivant l'axotomie du nerf sciatique et stimulation électrique directe et transcutanée chez la souris. *Mémoire de maîtrise en Sciences biomédicales, Université de Montréal*, 2014.
77. Prior IA, Clague MJ. Glutamate uptake occurs at an early stage of synaptic vesicle recycling. *Curr Biol.* 1997 May 1;7(5):353-6.
78. Raspopovic S, Capogrosso M, Petrini F, Bonizzato M, Rigosa J, Di Pino G, Carpaneto J, Controzzi M, Boretius T, Fernandez E, Granata G, Oddo CM, Citi L, Ciancio AL, Cipriani C, Carrozza MC, Jensen W, Guglielmelli E, Stieglitz T, Rossini PM, Micera S. Restoring Natural Sensory Feedback in Real-Time Bidirectional Hand Prostheses. *Science Translational Medicine* Feb 2014; Vol. 6, Issue 222, 222ra19.
79. Rehm H, Wiedenmann B, Betz H. Molecular characterization of synaptophysin: A major calcium binding protein of the synaptic vesicle membrane. *EMBO J* 1986; 5, 535-541.
80. Roche JP, Hansen MR. On the horizon: cochlear implant technology. *Otolaryngol Clin North Am* 2015; 48(6),1097–1116.

81. Rodríguez Cruz PM,Palace J, Beeson D. The Neuromuscular Junction and Wide Heterogeneity of Congenital Myasthenic Syndromes. *Int J Mol Sci.* 2018 Jun; 19(6): 1677.
82. Romero-Ortega M. Peripheral Nerves, Anatomy and Physiology of. In: Jaeger D., Jung R. (eds) *Encyclopedia of Computational Neuroscience.* Springer, New York, NY; 2014.
83. Rossini PM, Micera S, Benvenuto A, Carpaneto J, Cavallo G, Citi L, Cipriani C, Denaro L, Denaro V, Di Pino G, Ferreri F, Guglielmelli E, Hoffmann KP, Raspopovic S, Rigosa J, Rossini L, Tombini M, Dario P. Double nerve intraneural interface implant on a human amputee for robotic hand control. *Clin Neurophysiol.* 2010 May;121(5), 777-83.
84. Ryan TA, Smith SJ. Vesicle pool mobilization during action potential firing at hippocampal synapses. *Neuron* 1995; 14, 983–989.
85. Ryan TA, Smith SJ, Reuter H. The timing of synaptic vesicle endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93, 5567–5571.
86. Sahyouni R, Chang DT, Moshtaghi O, Mahmoodi A, Djalilian HR, Lin HW. Functional and Histological Effects of Chronic Neural Electrode Implantation. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology* 2017; 2, 80-93.
87. Schultz RL, Willey TJ. The ultrastructure of the sheath around chronically implanted electrodes in brain. *J. Neurocytol.* 1976; 5, 621–642.
88. Shoja MM, Oyesiku NM. Clinical anatomy of the cranial nerves. *Clin Anat.* 2014 Jan;27(1), 2-3.
89. Sisson AL, Steinhilber D, Rossow T, Welker P, Licha K, Haag R. Biocompatible functionalized polyglycerol microgels with cell penetrating properties. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009; 48(41), 7540-5.
90. Sisson AL, Haag R. Polyglycerol nanogels: highly functional scaffolds for biomedical applications. *Soft Matter* 2010; 6, 4968-4975.
91. Stewart JD. Peripheral Nerve Fascicles: Anatomy and Clinical Relevance. *Muscle Nerve* 2003; 28, 525–541.
92. Stoffel A. Beitrage zu einer rationellen Nerven Chirurgie. 82. Wolf JK. Segmental neurology. Baltimore: University Park Munchen Med Wehnschr 1913;60:175–179. En allemand.

93. Südhof TC, Lottspeich F, Greengard P, Mehl E, Jahn, R. The cDNA and derived amino acid sequences for rat and human synaptophysin. *Nucleic Acids Research* 1987; 15(22), 9607.
94. Sulaiman W, Gordon T. *Neurobiology of Peripheral Nerve Injury, Regeneration, and Functional Recovery: From Bench Top Research to Bedside Application*. The Ochsner Journal. 2013;13(1):100-108.
95. Swett JE, Wikholm RP, Blanks RH, Swett AL, Conley LC. Motoneurons of the Rat Sciatic Nerve. *Exp Neurol*. 1986 Jul;93(1):227-52.
96. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5). 861-72.
97. Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F, Jahn R. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*. 2006 Nov 17;127(4):831-46.
98. Tang L, Eaton JW. Natural responses to unnatural materials: a molecular mechanism for foreign body reactions. *Mol. Med*. 1999; 5, 351–358.
99. Tian F, Cui D, Schwarz H, Estrada GG, Kobayashi H. Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. *Toxicol. In Vitro* 2006; 20, 1202–1212.
100. Veiseh O, Doloff JC, Ma M, Vegas AJ, Tam HH, Bader AR, et al. Size- and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and non-human primates. *Nat. Mater*. 14, 643–651.
101. Vert M, Doi Y, Hellwich KH, Hess M, Hodge P, Kubisa P, Rinaudo M, Schué F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012) *Pure Appl. Chem*. 2012; Vol. 84, No. 2, 377–410.
102. Weihe E, Tao-Cheng JH, Schafer MKH, Erickson JD, Eiden LE. Visualization of the vesicular acetylcholine transporter in cholinergic nerve terminals and its targeting to a specific population of small synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; Vol.93 3547-3552.
103. Wu H, Xiong WC, Mei L. To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development*. 2010 Apr 1; 137(7): 1017–1033.

104. Yawn R, Hunter JB, Sweeney AD, Bennett ML. Cochlear implantation: a biomechanical prosthesis for hearing loss. *F1000 Prime Reports* 2015; 7, 45.
105. Yoshida K, Horch K. Selective stimulation of peripheral nerve fibers using dual intrafascicular electrodes. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1993; 40, 492–494.
106. Ziegler-Graham K, MacKenzie EJ, Ephraim PL, Travison TG, Brookmeyer R. Estimating the Prevalence of Limb Loss in the United States: 2005 to 2050. *Arch Phys Med Rehabil.* 2008 Mar; 89(3), 422-9.



