

## De l'intérêt de cultiver des cellules sur des supports mous

### Plus de 100 ans d'histoire

La culture *in vitro*, ou le fait de cultiver des cellules ou des tissus en dehors de l'organisme, dans un environnement artificiel propice à leur croissance, a ses origines au début du xx<sup>e</sup> siècle. En 1906, Ross Granville Harrison (1870-1959) réussit pour la première fois à maintenir en vie, hors de son organisme d'origine, des neuroblastes de grenouille [1] et [2]. Ces petits explants étaient alors placés dans un caillot de lymphé déposé sur une lamelle couvre-objet qui, une fois retournée sur une lame de verre concave, a permis l'observation et l'étude de l'échantillon en microscopie. Ce système, dit en suspension, sera repris par Montrose Thomas Burrows (1884-1947) et Alexis Carrel (1873-1944) qui cultivent alors, *in vitro*, des tissus cardiaques embryonnaires de poulet [3]. Ces pionniers, et d'autres (citons Franklin Paine Mall [1862-1917] et le botaniste Gottlieb Haberlandt [1854-1945]), ouvrent ainsi la voie à la culture cellulaire *in vitro* que l'on qualifie de « moderne ». Celle-ci va alors considérablement se développer durant les 100 années suivantes, notamment par l'isolement et la survie de cellules seules [4], le développement des milieux de

### L'essentiel

Le développement de nouveaux systèmes pour la culture cellulaire *in vitro*, basé sur des matériaux mous (hydrogels), capables de mimer la rigidité physiologique des organes et ainsi reproduire l'environnement physiopathologique trouvé *in vivo*, devrait permettre de lever des verrous technologiques et biologiques considérables.

Mots-clés: *in vitro*; *in vivo*; culture TCP; hydrogel

Camille Migdal,  
chercheur CNRS  
Alice Nicolas,  
CR CNRS  
Laboratoire des technologies  
de la microélectronique, Grenoble

culture conditionnés [5] et l'apparition des boîtes de culture en plastique (TCP) traitées au plasma à décharge lumineuse afin de faciliter l'adhérence cellulaire [6]. La culture cellulaire *in vitro* sur boîtes TCP est aujourd'hui l'un des systèmes de culture le plus utilisé en sciences de la vie, pour un très large éventail d'études.

Cependant, et malgré de grandes avancées dans les méthodes et techniques de culture cellulaire, celles-ci restent aujourd'hui toujours réalisées dans des conditions très lointaines de celles des tissus d'origine. En effet, afin d'être pertinent, un bon système de culture cellulaire *in vitro* ne doit pas seulement permettre la survie et la croissance des cellules, il doit également permettre aux cellules d'exprimer les mêmes caractéristiques (on parle alors de phénotypes) que celles qu'elles ont physiologiquement *in vivo*. Bien que de grandes découvertes aient été réalisées grâce à ces systèmes de culture en plastique, il devient maintenant évident que leurs limites sont régulièrement atteintes: le comportement physiopathologique de la cellule observé *in vitro* diffère largement du comportement physiopathologique observé *in vivo* [7]. À l'intérieur du corps, les cellules résident dans des organes, aux propriétés distinctes, où elles reçoivent des signaux biochimiques mais aussi des signaux physiques provenant des autres cellules qui les entourent et de la matrice extracellulaire (MEC) sur laquelle elles évoluent. Parmi ces signaux physiques que perçoivent les cellules et auxquels elles répondent, la rigidité a un rôle prépondérant (on parle de mécano-sensibilité cellulaire). De manière quasi universelle, les cellules adhèrent plus fortement sur des supports durs, s'étalent de toute leur surface, forment des fibres de stress d'acto-myosine et migrent plus vite [8 à 11]. Comportement inobservable lorsque ces mêmes cellules sont cultivées sur des rigidités proches de celles de nos organes (Figure 1A).

Un bon système de culture cellulaire *in vitro* doit permettre aux cellules d'exprimer les mêmes caractéristiques physiologiques qu'*in vivo*.

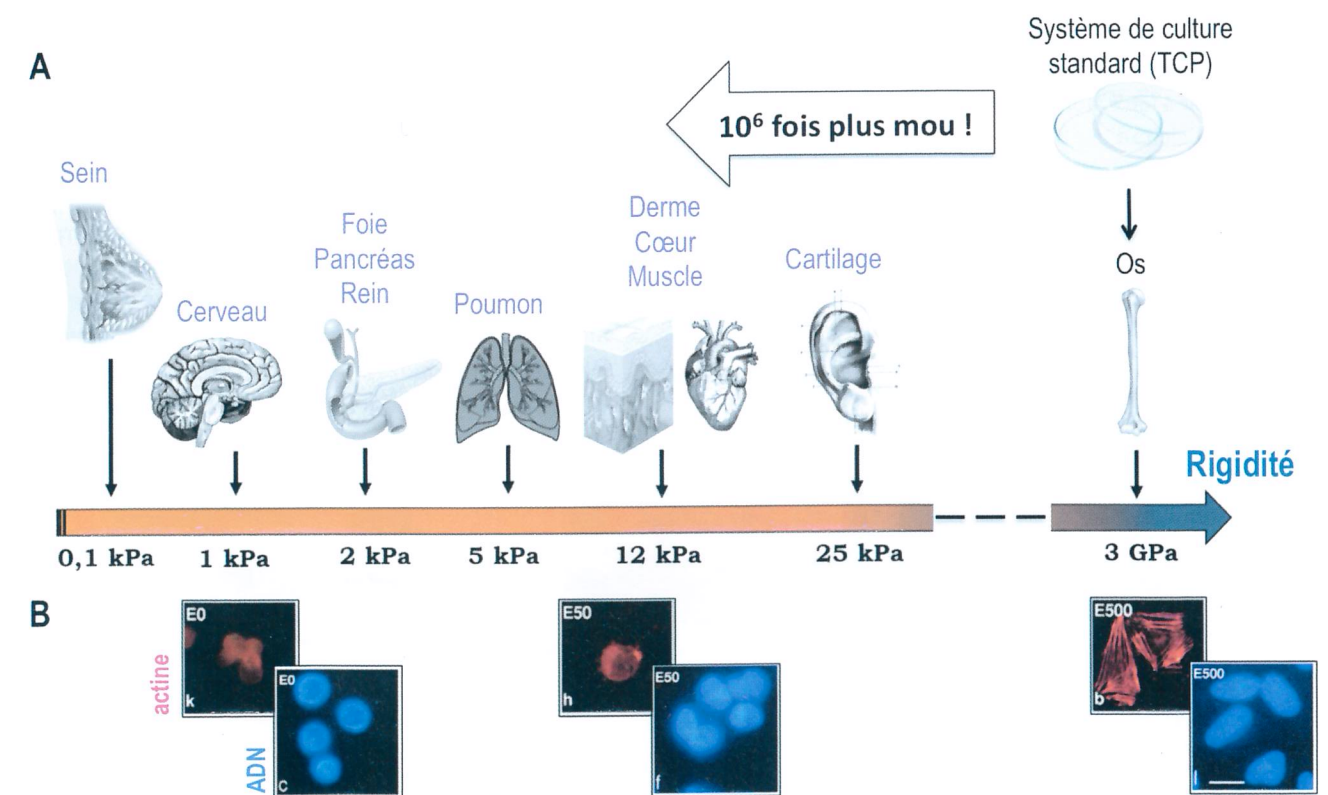
### Des systèmes de culture TCP...

Les systèmes de culture TCP couramment utilisés et sur lesquels sont mises en culture les cellules ont une rigidité de l'ordre du giga pascal (GPa), alors que la quasi-totalité des organes qui nous constituent exhibent une rigidité entre quelques centaines de Pascals (Pa) (cerveau, tissus adipeux) et plusieurs dizaines de kPa (cartilage): soit un million de fois plus dur (Figure 1B)! Aujourd'hui, de plus en plus d'études montrent l'influence de la rigidité sur le comportement cellulaire: 45 publications référencées dans PubMed en 2000 avec le terme mécano-sensibilité contre plus de 750 en 2015 (pour revue 10). La rigidité influence, entre autres choses, le cycle cellulaire, la prolifération, la migration, la synthèse génique et protéique des cellules (Figure 1B) [11] et est également capable

d'orienter la différenciation des cellules-souches: des cellules-souches mésenchymateuses cultivées sur des supports de culture mous (1 kPa) se différencient préférentiellement en neurones, en muscle sur des supports de rigidité intermédiaire (10 kPa) et en os sur substrats durs (35 kPa) [12]. Dans ce contexte, il est facile de comprendre que les méthodes actuelles de culture *in vitro* manquent cruellement de physiologie mécanique.

Figure 1 - Rigidité moyenne des organes et d'une boîte de culture cellulaire en plastique (TCP).

(A) Rigidité moyenne des organes et d'une boîte de culture cellulaire en plastique (TCP). La quasi-totalité des organes (hors l'os) affichent une rigidité moyenne comprise entre une centaine de Pascals (Pa) et une dizaine de kilo Pascals (kPa) alors que les systèmes de culture en plastique couramment utilisés pour la culture *in vitro* ont une rigidité de l'ordre du giga Pascals (GPa). (B) La rigidité influence le comportement cellulaire. Une même cellule est cultivée sur des supports de rigidité croissante. Est montré à titre d'exemples: l'actine, protéine intracellulaire, qui s'organise en pelote sur du mou, en périphérie sur des rigidités moyennes et sous forme de fibres d'acto-myosine sur des boîtes en plastique. Le marquage de l'ADN, dont l'intensité reflète la synthèse génique, est lui aussi modulé par la rigidité (11).



... aux hydrogels

Pour tenter de pallier ce manque, notamment en termes d'élasticité/rigidité, de nouveaux systèmes de culture sont apparus. Ainsi, les hydrogels sont une classe de matériaux dont les propriétés physiques miment l'élasticité des tissus, faisant d'eux des candidats idéaux pour imiter la MEC. De plus, grâce à leur clarté optique, ils permettent d'imager sans difficulté les cellules au moyen de microscopes « standards ». Ces hydrogels peuvent être synthétisés à partir de polymères naturels (collagène, fibrine, acide hyaluronique, dextran, matrigel) ou synthétiques (dérivés de polyéthylène glycol, d'acrylamide ou d'alcool polyvinylique) employant différentes méthodes de réticulation [13]. Les polymères naturels, biocompatibles, bioactifs et biodégradables, souffrent d'un manque cruel de reproductibilité inter-lots mais surtout de l'incapacité de découpler les signaux chimiques et physiques envoyés perçus par les cellules. Les hydrogels à base de polymères synthétiques sont quant à eux fabriqués avec des monomères dont la réticulation est finement contrôlée [14]. Ce contrôle précis de la réticulation permet de réaliser des hydrogels aux propriétés élastiques définies et reproductibles, capables de mimer la rigidité physiologique des organes dont sont issues les cellules. Le taux de réticulation gouverne ainsi la taille du

réseau de polymères, son contenu en eau et ses propriétés mécaniques (mesurées en kPa). Bio-incompatibles, ces hydrogels synthétiques sont fonctionnalisés avec des protéines de la MEC, qui assurent l'adhérence et la survie cellulaire tout en découplant les signaux chimiques des propriétés physiques de l'hydrogel. En utilisant des hydrogels capables de mimer la rigidité physiopathologique des organes qui nous constituent et dont les propriétés mécaniques et chimiques sont modulables indépendamment, ces nouveaux systèmes de culture devraient permettre de lever des verrous technologiques et biologiques considérables, que ce soit en thérapie cellulaire, ingénierie des cellules-souches, transplantation, mais également dans l'industrie de la découverte du médicament. En effet, l'industrie pharmaceutique souffre aujourd'hui d'un fort taux d'échec dans le développement de nouveaux médicaments : en 2010, le taux de succès du développement d'un médicament, i.e. du passage de la molécule jusqu'à sa commercialisation, était de seulement 6 % [15]. À titre d'exemple, pour une nouvelle molécule identifiée dans un test *in vitro*, le taux d'échec lors du passage chez l'homme est de 89 % [16]. Enfin, plusieurs travaux ont aujourd'hui démontré que l'efficacité d'une drogue est dépendante de la rigidité du micro-environnement sur lequel sont cultivées les cellules [17]. Ainsi, la

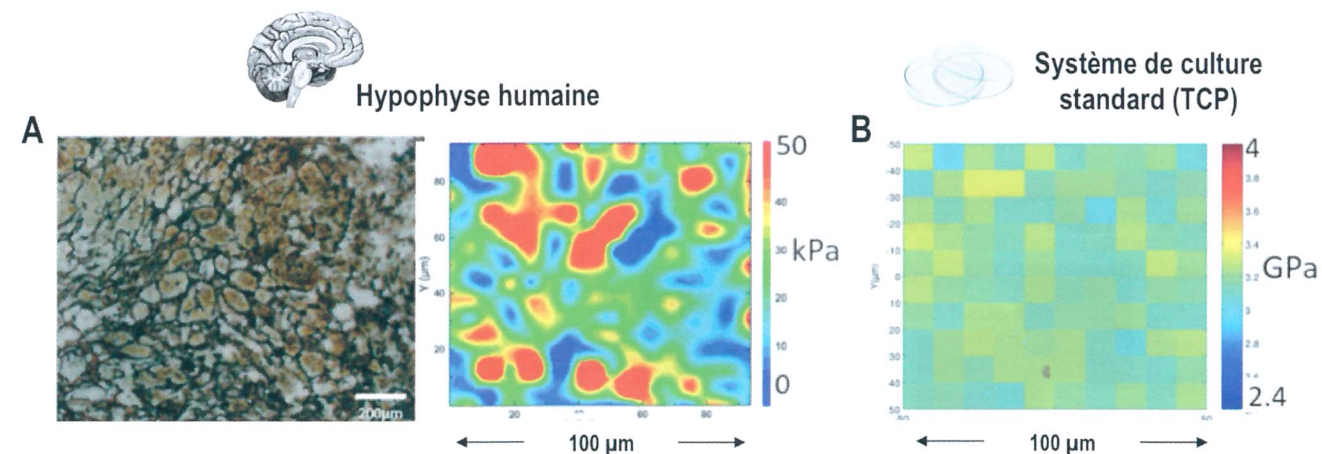
culture *in vitro* sur boîtes TCP, telle qu'elle est menée actuellement dans l'industrie pharmaceutique, peut conduire à sélectionner des molécules non pertinentes et à ignorer d'autres molécules d'intérêt. Les réponses cellulaires obtenues à partir de cribles menés sur des supports de culture « standards » sont biaisées par le manque de physiologie de l'environnement physique imposé par ces systèmes.

Derniers développements

Au laboratoire des technologies de la microélectronique, au sein de l'équipe « Micro et nano-technologies pour la santé », des chercheurs ont développé des hydrogels innovants pour la culture cellulaire *in vitro* : basés sur des techniques issues de la photolithographie, ces hydrogels synthétiques sont photo-polymérisés à travers un masque de chrome dont le niveau de gris contrôle le taux de réticulation de la solution de polyacrylamide [18]. À l'inverse des techniques classiques de polymérisation chimique, cette technologie brevetée permet de créer des systèmes de culture dont la rigidité varie de 0,5 à 200 kPa, mais aussi de créer des systèmes de culture de rigidité variable, présentant des gradients (kPa/μm) ou des motifs de rigidité contrôlés, au plus proche de la physiopathologie des tissus. En effet, en plus d'afficher une rigidité moyenne bien loin de celle du plastique, nos organes se révèlent être hétérogènes en rigidité, affichant des modulations à l'échelle du micromètre (Figure II) [19]. Ces hydrogels sont pré-fonctionnalisés avec des protéines de la MEC selon un protocole développé au sein du laboratoire et garantissant une chimie de surface rigidité-indépendante, robuste, reproductible et quantifiable. Ces hydrogels fonctionnalisés offrent un dispositif de culture cellulaire bidimensionnel dans des conditions biomécaniques au plus proches de celles observées *in vivo*. In fine, ce sont des systèmes de culture prêt à l'emploi, possédant une bonne ergonomie d'utilisation et capables de supporter de longues cultures sans dégradation ni modification de leurs propriétés physico-chimiques. Cette technologie innovante est actuellement en phase de maturation au sein de la société d'accélération du transfert de technologies Grenoble Linksiium dans l'optique de leur commercialisation via la création d'une start-up (<http://www.linksium.fr/projet/mecachips/>). L'objectif ? Que ce nouvel outil soit utilisé pour répondre à des questions que la culture cellulaire classique ne permet pas d'aborder, en apportant plus de physiologie et de pertinence à l'ensemble des cultures et tests cellulaires. Que ces cultures soient réalisées en recherche fondamentale ou appliquée, dans les industries qui développent et commercialisent des cellules ou travaillent à la découverte de médicaments. ■

Figure 2 - Cartes de rigidité d'une biopsie d'hypophyse humaine (A) et d'une boîte de culture cellulaire en plastique (B), mesurées par microscopie à force atomique (AFM).

Cartes de rigidité d'une biopsie d'hypophyse humaine (A) et d'une boîte de culture cellulaire en plastique (B), mesurées par microscopie à force atomique (AFM). A l'échelle d'une centaine de micromètre, la carte de l'hypophyse révèle une rigidité moyenne pour cette partie du cerveau de l'ordre d'une dizaine de kPa mais surtout une hétérogénéité de rigidité pouvant varier de plusieurs kPa par μm. A l'inverse, la carte d'une boîte de culture standard en plastique montre une rigidité homogène de l'ordre de quelques GPa. Collaboration LTM, Clinattec et CHU Grenoble (19).



Références

- (1) Harrison RG. Observations on the living developing nerve fiber. Proc Soc Exp Biol Med. 1906. 4:140-43.
- (2) Harrison RG. Observations on the living developing nerve fiber. Anat Rec. 1907. 1:116-18.
- (3) Carrel A and Burrows MT. Cultivation of adult tissues and organs outside of the body. JAMA. 1910. 55:1379-81.
- (4) Sanford KK, Earle WR, Likely GD. The growth *in vitro* of single isolated tissue cells. J Natl Cancer Inst. 1948. 9(3):229-46.
- (5) Eagle H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science. 1955. 16;122(3168):501-14.
- (6) Amstein CF and Hartman PA. Adaptation of plastic surfaces for tissue culture by glow discharge. J Clin Microbiol. 1975 2(1):46-54.
- (7) Horvath P, Aulner N, Bickle M, Davies AM, Nery ED, Ebner D, Montoya MC, Ostling P, Pietiainen V, Price LS, Shorte SL, Turcatti G, von Schantz C, Carragher NO. Screening out irrelevant cell-based models of disease. Nat Rev Drug Discov. 2016. 15:751-69.
- (8) Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. Science. 2005. 18;310(5751):1139-43.
- (9) Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. Biophys J. 2000. 79(1):144-52.
- (10) Wells RG. The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. Hepatology. 2008 47(4):1394-400.
- (11) Kocgozlu L, Lavalle P, Koenig G, Senger B, Haikel Y, Schaaf P, Voegel JC, Tenenbaum H, Vautier D. Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the regulation of replication and transcription in epithelial cells. J Cell Sci. 2010. 1;123(Pt 1):29-39.
- (12) Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. Cell. 2006. 126:677-89.
- (13) Lee KY and Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. Chem Rev. 2001. 101(7):1869-79.
- (14) DeForest CA and Anseth KS. Advances in bioactive hydrogels to probe and direct cell fate. Annu Rev Chem Biomol Eng. 2012. 3:421-44.
- (15) Khanna I. Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends. Drug discovery today. 2012. 17:1088-1102.
- (16) Kola I and Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? Nat Rev Drug Discov. 2004. 3:711-5.
- (17) Zusiak SP. The Role of Matrix Compliance on Cell Responses to Drugs and Toxins: Towards Predictive Drug Screening Platforms. Macromol Biosci. 2015. 15:589-99.
- (18) Mgharbel A, Gulino D, Nicolas A. A method for preparing a hydrogel matrix by photopolymerization. Patent 2013 WO 2013079231.
- (19) Bouchonville N, Meyer M, Gaude C, Gay E, Ratel D, Nicolas A. AFM mapping of the elastic properties of brain tissue reveals kPa μm(-1) gradients of rigidity. Soft Matter. 2016. 20;12(29):6232-9.

Ces nouveaux systèmes de culture doivent permettre de lever des verrous technologiques et biologiques considérables.