

PSE Réseau Neuronal - Matériel et méthodes

Antoine Gagelin, Kévin Séropian, Jessie Mosso

15 mai 2017

Les enjeux techniques du projet ont été les suivants : réaliser des électrodes viables pour les cellules et fonctionnelles pour mesurer leur activité électrique, mettre au point un système de puits pour contenir les cellules et leur milieu de culture sur les électrodes et enfin réaliser un système d'amplification qui détecte des variations de très faible amplitude de l'activité électrique des neurones.

1 Réalisation d'électrodes d'or

Pour les électrodes, il était nécessaire d'utiliser un matériau très conducteur qui pouvait capter le moindre petit signal provenant des neurones. De plus, il se devait d'être biocompatible pour que les cellules puissent pousser dessus. L'or est le matériau qui remplissait ces deux conditions.

Matériel

Large bande adhésive, imprimante à découper Graphtec cutting plotter CE6000-40, lame de microscope, système de dépôt d'or Cressington Sputter Coater 108 auto.

Protocole

- Réaliser le design du masque souhaité sur Adobe Illustrator : dans notre cas, nous avons souhaité former de fines bandes afin de laisser de la place aux cellules de pousser sur le verre et sur l'électrode et de pouvoir les observer par transparence au microscope.
- Découper le masque sur une large bande collante sur l'imprimante Graphtec cutting plotter CE6000-40. Paramètres de découpe (Lame : Red blade, V : 15, F : 10, A : 1, Offset : 4).
- Coller le masque sur une lame de microscope 26mm x 76mm.
- Réaliser les dépôt d'or sur les zones découvertes à l'aide de Cressington Sputter Coater 108 auto : cycles de 4 fois 45 secondes pour un dépôt d'une épaisseur finale environ 120 nm.
- Retirer le masque.

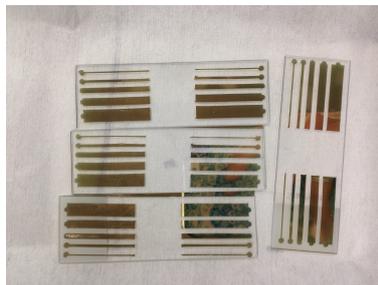


FIGURE 1 – Electrodes d'or

2 Réalisation des puits en PDMS

Pour compartimenter l'espace réservé à la pousse des cellules, il fallait concevoir des puits. Le PDMS s'est révélé être le matériau idéal car il est facile à produire et qui est très maniable une fois formé.

Matériel

PDMS liquide, agent réticulant, dessiccateur, moule.

Protocole

- Placer 50g de PDMS liquide dans un récipient.
- Ajouter 5 g d'un agent réticulant, mélanger les deux.
- Mettre dans le dessiccateur pour enlever les bulles dans le PDMS. Ouvrir la vanne du dessiccateur régulièrement pour chasser les bulles.
- Déverser le mélange dans un moule rectangulaire.
- Laisser sécher puis découper les puits à l'aide d'un scalpel.

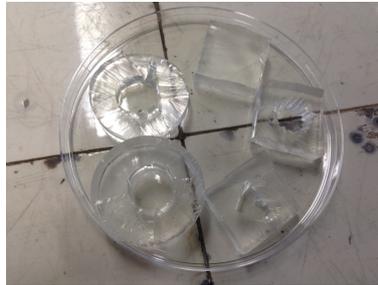


FIGURE 2 – Puits en PDMS

3 Mise en culture des cellules neuronales

Dans le cadre du projet, il a fallu ensuite élaborer une méthode de stérilisation des électrodes et des puits ainsi qu'un protocole viable de mise en culture des cellules neuronales sur ces électrodes.

Matériel

Electrodes d'or, puits en PDMS, graisse de silicone, éthanol, eau milli Q, polylysine, solution tampon de PBS (phosphate buffered saline), milieu de culture DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium : contient des vitamines, des acides aminés, du glucose, des sels, du fer et du rouge de phénol), neurones d'hippocampe de rats embryonnaires (souche Sprague Dawley), milieu de culture NB+ (milieu neuro basal enrichi en pénicilline et glutamine), bleu de trypan, indicateur calcique Rhod1-X (Lifetechnologies), solution de KCL

Protocole

Travailler sous hotte

Stérilisation des électrodes et des puits

- Plonger les électrodes, les puits et les boites de pétris dans un bain d'éthanol pendant environ 30 minutes.
- Laver 3 fois à l'eau milli Q les électrodes, les puits et les boites de pétris puis retirer le liquide.

Préparation des électrodes

- Coller les puits en PDMS sur les électrodes d'or avec de la graisse de silicone.
- Décongeler la polylysine au bain marie à 37°C.
- Remplir les puits de polylysine puis laisser 60 minutes à l'incubateur à 60°C.
- Laver les puits 3 fois au PBS pour retirer la polylysine non fixée au fond puis retirer le PBS.

Préparation des cellules

- Prélever 8 ml de milieu de culture DMEM et les placer dans un flacon.
- Ajouter 2 ml de cellules et agiter avec la pipette.
- Retirer la suspension du flacon centrifugé, les cellules étant au fond.
- Centrifuger pendant quelques minutes.
- Prélever environ 1ml de milieu de culture NB+ et l'ajouter au tube contenant les cellules.
- Homogénéiser le milieu avec la pipette.
- Compléter le tube jusqu'à 10ml avec du milieu NB+ et homogénéiser le milieu avec la pipette. (1)
- Déposer environ 0,5 ml du produit obtenu dans chaque puits.
- Renouveler le milieu de culture tous les 3 jours.

Dénombrer des cellules

- Prélever 10 μl de bleu de trypan dans un petit tube.
- Ajouter 10 μl de la solution (1) au trypan.
- Prélever 10 μl du mélange précédent et les déposer sur une lame de numération KOVA.



FIGURE 3 – Lame de numération KOVA

- Observer au microscope et compter : 1 petit carré contient 0.01 μl de liquide.

Test de l'activité des cellules

- Ajouter dans le puits le senseur calcique dilué à 0.5 μl .
- Ajouter du KCl et observer au microscope inversé.

4 Amplificateur différentiel à deux étages à gain variable

Enfin, un amplificateur différentiel a été construit pour mesurer l'activité de la culture de neurones, pouvant ainsi détecter des variations de signaux de l'ordre de 100 μV .

Matériel

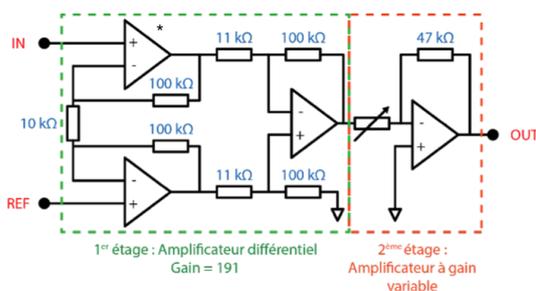
Générateur basses fréquences, oscilloscope, cage de Faraday : boîte en carton entourée de papier aluminium, piles 9V

Composants électroniques Résistances (10 k Ω , 11 k Ω , 100 k Ω , 47 k Ω), potentiomètres variables 20 k Ω et 100 k Ω (Bourns 3266W1-203LF et 3296W1-104LF), capacités (100 nF), amplificateurs opérationnels (Texas Instruments OP07CP et LM318N/NOPB), connecteurs BNC Coaxial (Greenpar – TE Connectivity 1-1337542-0), supports à amplificateurs opérationnels femelle 8 broches (HARWIN D2608-42)

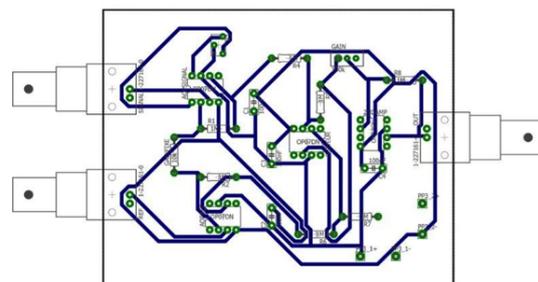
Circuit imprimé Plaque de verre epoxy recouverte d'une couche de cuivre pré-sensibilisée aux UVs, 2 feuilles de papier calque, machine à insoler double face Hellas (Bernier Electronik), révélateur positif – hydroxyde de sodium (Bernier electronik), bassine en plastique, machine à pulvérisation de perchlorure de fer (Socem – Elec), acétone, perceuse et forets, fer à souder et étain

Protocole

- Réaliser le trypan à partir du schéma du circuit électrique fait sur le logiciel Eagle.

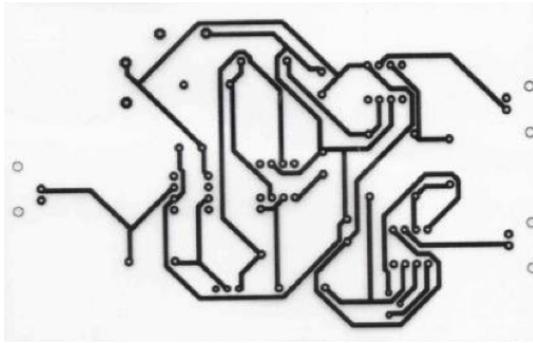


(a) Schéma du circuit électronique : * Un potentiomètre non représenté sur ce schéma est ajouté sur l'AO (*) afin de régler l'offset , ** Un condensateur de 100nF non représenté sur ce schéma est ajouté sur chaque AO pour découpler l'alimentation

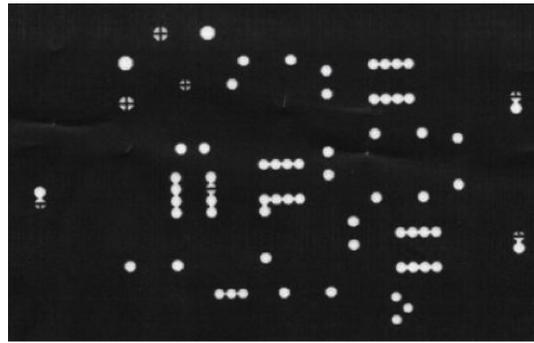


(b) Schéma du circuit imprimé

- Imprimer les deux faces du typon sur du papier calque avec une imprimante à jet d'encre.



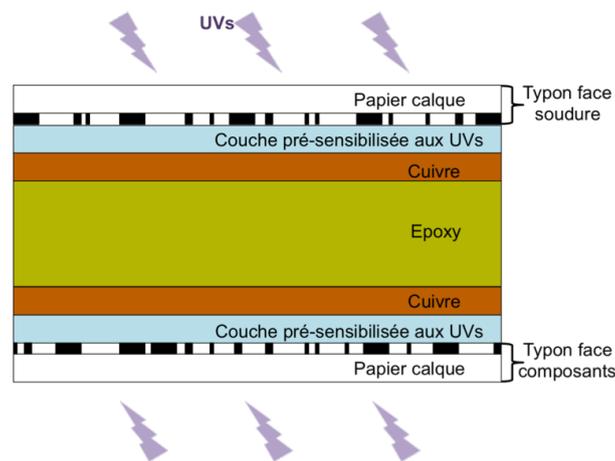
(c) Typon face soudures



(d) Typon face composants

Insolation

- Scotcher la plaque d'epoxy entre les 2 papiers calques en orientant les faces imprimées vers la plaque.
- Exposer le tout aux UVs dans la machine à insoler pendant quelques minutes.



Développement

- Placer la plaque dans un bain de révélateur dans une bassine jusqu'à ce que le circuit de cuivre apparaisse.
- Rincer à l'eau et sécher avec un chiffon.



Gravure chimique

- Passer la plaque dans la machine à pulvérisation de perchlorure de fer (Socem – Elec) puis rincer à l'eau.
- Rincer avec de l'acétone sur un chiffon pour enlever le reste de la résine photosensible.
- Percer la plaque aux endroits souhaités avec un foret adapté.
- Souder les composants comme indiqué sur le schéma réalisé avec le logiciel Eagle.
- Placer le tout dans une cage de Faraday pour minimiser le bruit extérieur.