

Matériels et Méthodes PSE

Cellules MDCK

Milieu de culture :

Produits	Matériel
<ul style="list-style-type: none">✓ Milieu de culture cellulaire : DMEM (Dulbecco/Vogt modified Eagle's Minimal Essential Medium)✓ Sérum de veau fœtal✓ Antibiotiques	<ul style="list-style-type: none">✓ Falcon de 50mL✓ Hotte à flux laminaire

Protocole : Tout réaliser sous la hotte, pour maintenir des conditions stériles. Dans un Falcon de 50 mL, insérer 40mL de DMEM. Ajouter 2mL de sérum de veau fœtal, puis 400µL d'antibiotiques. Bien homogénéiser et conserver au réfrigérateur à 4°C.

Ensemencement des cellules dans les piscines :

Produits	Matériel
<ul style="list-style-type: none">✓ Tampon PBS (Phosphate-buffered saline)✓ Milieu de culture préparé précédemment✓ Trypsine✓ Cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) dans une boîte de surface 25cm²	<ul style="list-style-type: none">✓ Bain-marie à 37°C✓ Hotte à flux laminaire✓ Micropipettes✓ Centrifugeuse✓ Incubateur✓ Boîte de culture cellulaire propre de surface 25cm²

Calcul de la quantité de cellules à ensemercer dans les piscines :

Nous souhaitons que les cellules soient à confluence d'une semaine à l'autre. Comme nous ne savons pas trop comment les cellules allaient se comporter sur les hydrogels, nous visons une confluence au bout de 4 jours. Les cellules sont à confluence pour une concentration de 3 millions pour 25cm². On considère qu'il y a une duplication toutes les 24h. Pour être à confluence au bout de 4 jours, il faut donc partir d'une concentration initiale de $3 \cdot 10^6 / (2^4) = 187500$ cellules pour 25cm².

Protocole : Tout réaliser sous la hotte pour maintenir des conditions stériles. Chauffer au bain-marie à 37°C le PBS, le milieu de culture, et la trypsine. Enlever le milieu dans lequel sont les cellules, rincer avec 8mL de PBS en veillant à bien nettoyer les parois. Enlever le PBS, et répéter le rinçage 3 fois. Mettre 5mL de trypsine, en veillant à bien mouiller la paroi. Aspirer la trypsine et la réinjecter en répétant 2 ou 3 fois. Mettre à l'incubateur à 37°C pendant 10 à 15mn. Les cellules doivent s'être décollées des parois, mais il ne faut pas laisser trop longtemps pour éviter de les tuer. Enlever la trypsine, et rincer avec 8mL de milieu de culture. Répéter le rinçage 2 à 3 fois. Compter les cellules. Culotter 5mn à la centrifugeuse. Aspirer le milieu pour ne garder que le culot, et remettre la quantité de milieu propre pour obtenir la dilution souhaitée. Mélanger.

Ensemencer :

- 1mL de ce mélange dans les grandes piscines (surface $\approx 3\text{cm}^2$) du set-up n°1 ;
- 330 μL dans les petites piscines (surface $\approx 0,75\text{cm}^2$) du set-up n°1 ;
- 100 μL dans la piscine du set-up n°2.

Mettre le reste des cellules dans une nouvelle boîte de culture, en diluant éventuellement pour obtenir la concentration souhaitée lors de la culture.

Placer le tout à l'incubateur avec les réglages suivants :

- Température : 37°C ;
- Atmosphère à 5% de CO₂ ;
- Pression de vapeur saturante en H₂O (toujours s'assurer que le plateau dans l'incubateur est rempli d'eau).

Changement du milieu cellulaire : à effectuer tous les 2 à 3 jours

Produit	Matériel
✓ Milieu de culture préparé précédemment	✓ Bain-marie à 37°C ✓ Hotte à flux laminaire ✓ Micropipettes ✓ Incubateur

Protocole : Tout réaliser sous la hotte pour maintenir des conditions stériles. Chauffer le milieu de culture au bain-marie à 37°C. Enlever le milieu dans lequel sont les cellules, et le remplacer par la même quantité de milieu propre.

Remettre à l'incubateur.

NOTE : Il est important de vérifier régulièrement que le milieu (propre et celui dans lequel sont les cellules), ne change pas de couleur car le milieu contient un indicateur coloré qui témoigne d'un changement de pH lorsque sa couleur varie.

Synthèse des hydrogels et coulage dans les piscines de PDMS

Protocole de fabrication des piscines en polydiméthylsiloxane

- *Fabrication des moules en plexiglas*

Coller sur le fond d'une boîte de Pétri de diamètre 5cm un cylindre de plexiglas d'épaisseur 8mm et de diamètre 20mm. Coller sur l'intérieur du couvercle de cette boîte de Pétri un deuxième cylindre de plexiglas d'épaisseur 2mm et de diamètre 20mm en prenant garde à ce qu'il se trouve en face du premier cylindre lorsque la boîte est fermée.

- *Coulage du polydiméthylsiloxane*

Produits	Matériel
• Polydiméthylsiloxane (PDMS) • Agent réticulant	• Cloche à vide • Balance • Etuve à 70°C

Protocole

Mélanger 10 g d'agent réticulant à 100g de PDMS liquide jusqu'à obtenir un ensemble homogène. Débuller ce mélange à l'aide d'une cloche à vide puis laisser réticuler dans l'étuve à 70°C pendant 2 heures.

- *Fixation des piscines de PDMS sur une lame de verre*

Nettoyer les lames de verre et les piscines de PDMS. Les passer au four à plasma, puis positionner chaque piscine sur une lame de verre en prenant soin de ne pas laisser de bulle d'air entre la surface de la lame de verre et celle de la piscine en PDMS. Passer cet ensemble à l'étuve à 64°C pendant 2 minutes.

Protocole du traitement du PDMS

Afin que le polyacrylamide, utilisé en tant d'hydrogel dans le montage, adhère à la piscine en PDMS, il est nécessaire de traiter ce PDMS selon le protocole suivant.

Produits	Matériel
<ul style="list-style-type: none">• 3-Aminopropyltriéthylloxane à 10% dans de l'éthanol (APTES)• Tampon phosphate salin (PBS)• Glutaraldéhyde à 1,5% dans le PBS	<ul style="list-style-type: none">• four à plasma

Protocole :

Passer les piscines de PDMS dans le four à plasma pendant 1 minute. Recouvrir la piscine de PDMS avec de l'APTES pendant 1 heure à 65°C. Rincer au PBS. Recouvrir la piscine de PDMS avec le glutaraldéhyde pendant 25 minutes à température ambiante. Rincer au PBS et laisser sécher à l'air libre.

Protocole de synthèse d'un gel de polyacrylamide

Produits	Matériel
<ul style="list-style-type: none">• Solution d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) à 10 mM• Solution d'acrylamide-bisacrylamide (rapport 37,5 :1) à 30%• Tetraméthyléthylènediamine (TEMED) dilué 100 fois dans de l'HEPES• Ammonium persulfate	<ul style="list-style-type: none">• matériel usuel

Protocole :

Dans un tube de 15 mL, ajouter dans cet ordre et rapidement : 4,35 mL d'HEPES, 4 mL de la solution d'acrylamide-bisacrylamide, 650 μ L de TEMED, 50 mg d'ammonium persulfate préalablement dilué dans 1 mL d'HEPES. Attention la réaction étant très rapide il est conseillé de mettre ce tube dans un bain de glace. Déposer ensuite 600 μ L (respectivement 100 μ L) de ce mélange dans les grandes piscines (respectivement petites piscines) de PDMS

et laisser réticuler quelques minutes à l'air libre et à température ambiante. Ajouter régulièrement du PBS sur l'hydrogel afin qu'il ne sèche pas.

Protocole de synthèse du polydiméthylacrylamide

Produits	Matériels
<ul style="list-style-type: none"> • N,N-diméthylacrylamide (DMA) • N,N'-méthylène-bis-acrylamide (MBA) • Persulfate de Potassium (KPS) • N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED) • Eau Milli-Q 	<ul style="list-style-type: none"> • Cloche sous atmosphère d'azote • Four à plasma • Matériel usuel

Protocole :

Pour un ratio 5x4 de monomère x réticulant.

Préparer deux tubes de 4,75 mL d'eau Milli-Q chacun. Dans l'un ajouter 0,5g de DMA et 29,2 mg de MBA. Dans l'autre, ajouter 13,6 mg de KPS et 7,5µL de TEMED. Débuller les deux solutions dans la cloche à azote. En parallèle, préparer les piscines sur lesquelles l'hydrogel polymérisera et s'accrochera. Pour cela, passer les au four à plasma et mettez les directement après dans la cloche à azote. Attention, il faut manipuler rapidement pour ne pas perdre l'activation des silanes.

Mélanger dans un même tube les deux solutions préparées précédemment et déposer le mélange à l'aide d'une seringue dans les piscines. Laisser poser une journée.

Protocole de coulage du Collagène dans les piscines de PDMS

Deux collagènes de concentrations différentes ont été testés car les propriétés mécaniques des collagènes n'étaient pas connues précisément.

Essai 1- collagène à 4 mg/mL dans de l'acide acétique à 17 mmol/L

Essai 2 – collagène à 10 mg/mL dans de l'acide acétique à 17 mmol/L

Produits	Matériels
<ul style="list-style-type: none"> • Alizarine • Acide acétique à 0,2 M • Collagène à 4 ou 10 mg/mL 	<ul style="list-style-type: none"> • Dessiccateur • Four à plasma

Protocole :

Verser quelques gouttes d'alizarine et d'acide acétique dans un bécher (rôle d'indicateur de pH). Passer les piscines de PDMS dans le four à plasma. Sortir les piscines du four à plasma et couler rapidement 100 µL (respectivement 600 µL) de collagène dans la petite (respectivement grande) piscine de PDMS. Placer les piscines de PDMS avec le collagène ainsi que le bécher dans un dessiccateur sous atmosphère saturée en ammoniacque. Fermer hermétiquement le dessiccateur. À partir du moment où pH est d'environ 11 (indicateur coloré devenu rouge), atteindre 3 h au dessiccateur. Rincer abondamment les piscines de PDMS avec collagène au tampon phosphate salin (PBS) jusqu'à ce que le pH redevienne neutre. Veiller à ajouter du PBS sur le collagène si celui commence à sécher.

Protocole de coating de collagène sur les piscines de PDMS

Produits	Matériel
• Collagène à 50 $\mu\text{g}/\text{L}$	• matériel usuel

Protocole :

Verser 200 μL (respectivement 1 mL) de collagène dans la petite (respectivement grande) piscine de PDMS puis, à l'aide d'une pipette, aspirer le collagène déposé. Il ne reste alors qu'un mince film de collagène sur le fond de la piscine de PDMS qui sèche très rapidement à l'air libre.