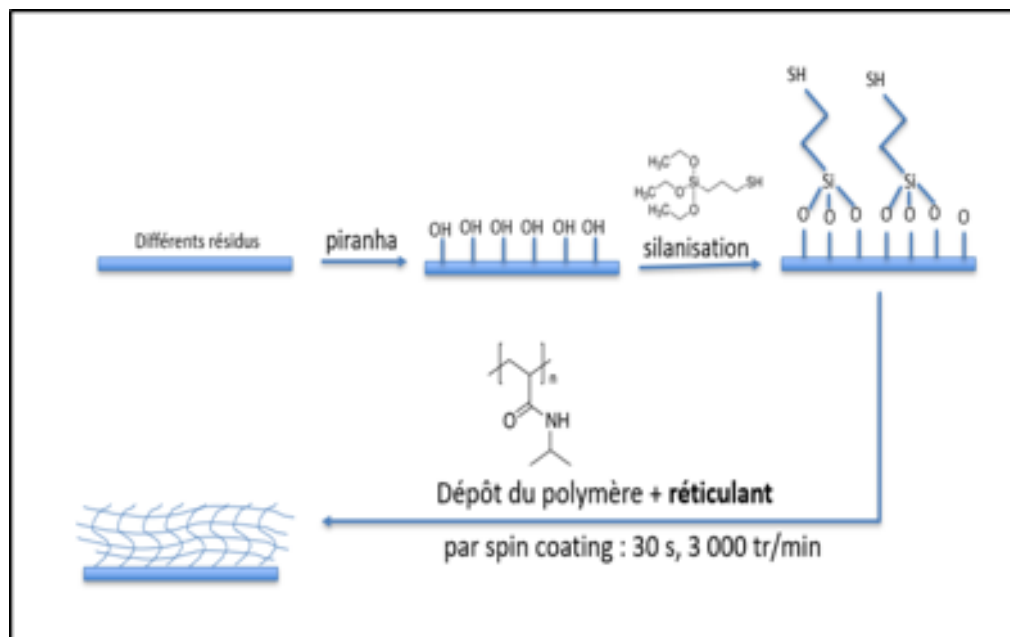
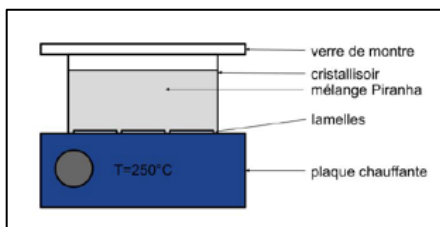


Figure 1 : Préparation des substrats

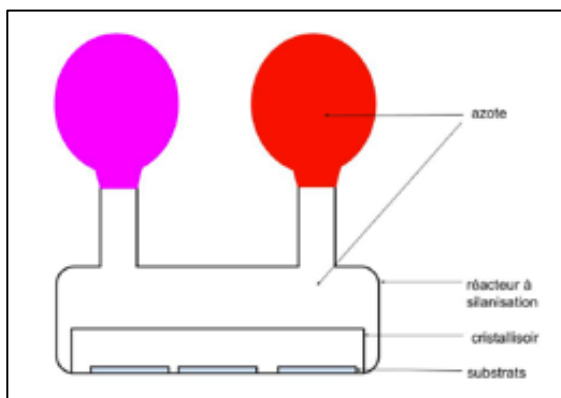
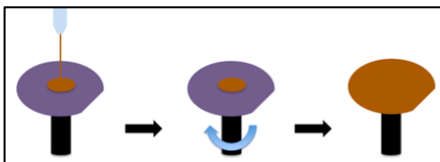


1

1.1



1.2



1.3

1. : Procédure globale de fabrication des lamelles

1.1 : Lavage dans un mélange piranha qui est du H_2SO_4 et du H_2O_2 (7:3 en volume) chauffé à $250^\circ C$ pour laver les lamelles de tout résidu.

1.2 : Silanisation : au substrat est accroché des molécules de silane qui laissent paraître des groupement SH pendants. Ces substrats vont servir à accrocher les chaînes de polymère de manière covalente. Le silane étant très réactif avec l'eau, ne serait-ce que celle présente dans l'air, la réaction est faite dans un réacteur sous azote. Les lamelles sont déposés dans le réacteur qui est ensuite fermé hermétiquement et rempli d'azote. Le silane qui est du 3-mercaptopropyltriméthoxysilane à 3% dans du toluène sec est ensuite chargé dans le réacteur par pression d'azote dans sa bouteille et par le biais d'une longue aiguille déformable.

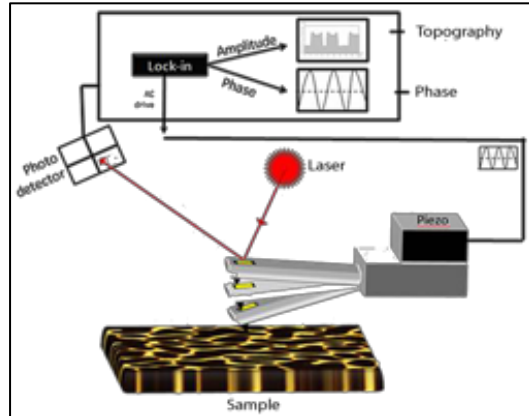
1.3 Dépôt du polymère par spin-coating : il est ajouté à la solution de polymère un réticulant : le 1,4-dithioerytritol à 60% en masse de polymère. Cette solution est déposée sur la lamelle silanisée par spin-coating qui permet d'avoir un film fin et uniforme.

Les lamelles sont ensuite mises dans un four à $150^\circ C$ sous vide pendant 48h pour permettre favoriser la réticulation. Les chaînes de polymère sont accrochés au substrat par le biais des silanes et liées entre elles grâce au réticulant. Ce qui permet d'avoir à la fin un réseau de polymère thermosensible attaché de manière covalente à la lamelle. Le substrat est fin prêt pour la culture cellulaire.

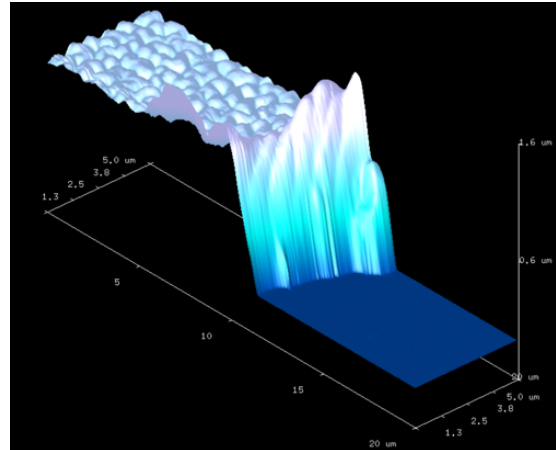
Polymère thermosensible : Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)
Température de transition hydrophobe-hydrophile : $32^\circ C$

Figure 2 : Caractérisation des substrats

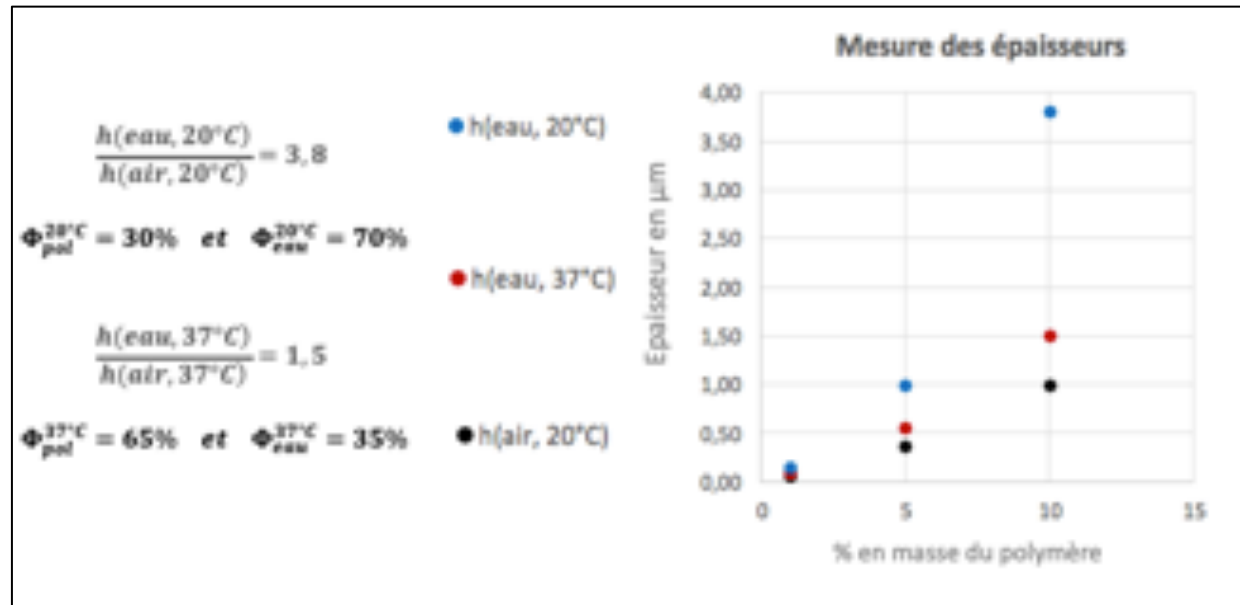
2.1



2.2



2.3



2.1 : Mesure de l'épaisseur du film par AFM

L'AFM (microscopie à force atomique) permet faire l'image topographique de surfaces avec des résolutions pouvant être atomiques.

Un creux est effectué dans le film jusqu'à la surface de la lamelle grâce à une pointe fine. L'image topographique de ce creux est effectuée par AFM (2.2) pour en déterminer la profondeur qui correspond donc à l'épaisseur du film.

L'épaisseur à sec peut aussi rapidement être mesurée par éllipsométrie en ayant une idée de son ordre de grandeur.

2.2 : Image topographie d'un creux dans un film de polymère sur lamelle de verre

2.3 : Epaisseurs et gonflement

Les épaisseurs des substrats ont été mesurées à sec (AFM et éllipsométrie), dans l'eau à température ambiante et dans de l'eau chauffée à 37°C (AFM); les deux dernières mesures permettant de mimer le comportement des films dans le milieu de culture cellulaire aux températures d'usage.

Les films de polymères présentent globalement un gonflement par rapport à l'état sec de 1,5 dans l'eau à température ambiante et 3,6 dans de l'eau chauffée à 37°C.

Ainsi, grâce aux courbes tracées et avec une simple mesure de l'épaisseur à sec par éllipsométrie, nous pouvons prédire le comportement des films en milieu de culture cellulaire.

Figure 3 : Culture cellulaire et observation

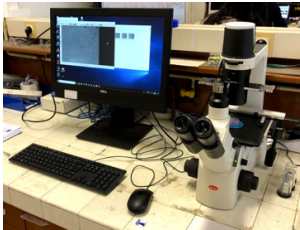
3.1



3.2



3.3



CULTURE

3.1 Stérilisation

Toute l'étape de préparation des cultures de cellules est effectuée sous hotte stérile.

Les substrats sont d'abord stérilisés grâce à de l'éthanol puis lavés de l'éthanol (mortelle pour les cellules) avec une solution saline de DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline). Les cellules sont ensuite déposées sur les substrats (800 kcellules par échantillon).

3.2 Incubation

Les échantillons sont ensuite mis dans un incubateur à 37°C sous pression régulée de CO₂. Les milieux de culture sont changés tous les 3 jours pour nourrir les cellules.

OBSERVATION

3.3 Microscopie optique

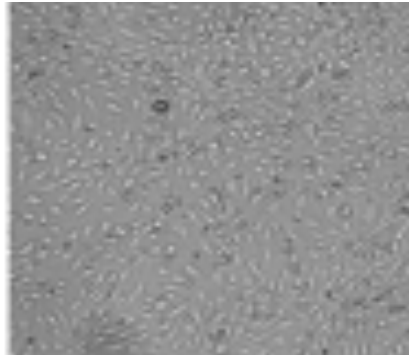
L'observation du décollement des cellules peut être faite une fois qu'il y a confluence. Celle-ci est faite grâce à un microscope optique muni d'une camera et branché sur ordinateur. Les cultures cellulaires, une fois sorties de l'incubateur, sont rapidement (4min) refroidies à 22°C pour ne pas donner le temps aux cellules de s'adapter et donc de se décoller en tapis cellulaire puis observé via le microscope.

RESULTATS

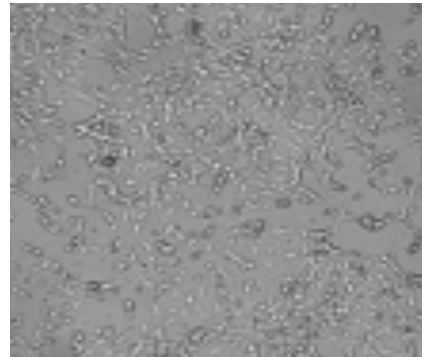
Les sous-figures 3.4 et 3.5 représentent respectivement la culture de cellules HUVEC sur un substrat de P-NIPAM juste à la sortie de l'incubateur et après une heure à température ambiante; et les sous-figures 3.6 et 3.7 indenne mais sur des lamelles vierges

Le décollement, bien que non sous forme de tapis pour ce type de cellule est très significatif sur le substrat de P-NIPAM.

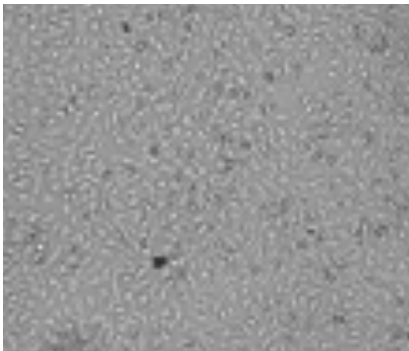
3.4



3.5



3.6



3.7

