

Fig. 1 - Schéma de routine : a. L'imperméabilisation d'une membrane en 4 étapes. On applique le PDMS non réticulé sur un pattern correspondant à la forme souhaitée. On passe la plaque au spin-coater. On imprime le pattern en PDMS sur la membrane microporeuse. On fait cuire la membrane pour réticuler le PDMS. b. L'action du spin-coater permet d'obtenir une couche uniforme et d'épaisseur maîtrisée. Nous faisons tourner pendant 1min à 1300rpm. c. L'obtention d'un pattern sur la membrane permet de contrôler l'accès aux nutriments. Il consiste en une phase d'impression et une phase de cuisson de 4h à 70°C. On la stérilise par la suite par un lavage à éthanol puis au PBS. d. L'inoculation est la dernière étape avant la pousse. On dépose la membrane imperméabilisée sur un plaque d'agar-YPD. On dépose une goutte (qqqs μL) au niveau de la membrane. e. Photo de colonies après croissance. Bien que notre système idéal soit un cylindre, il est aussi possible d'obtenir des formes plus complexes en variant la forme du pattern.

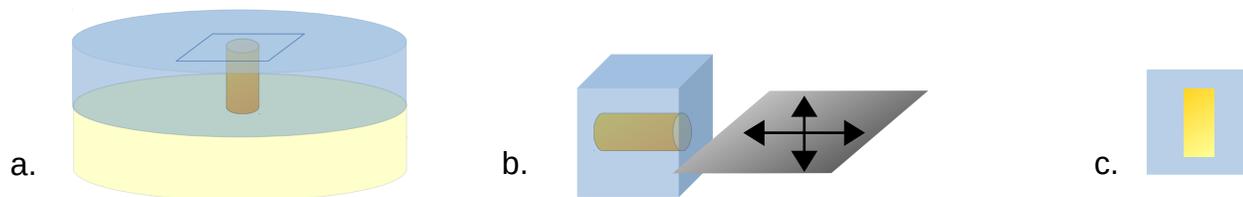


Fig. 2 - Coupe de la structure : a. La structure a préalablement été fixée au PFA (paraformaldéhyde) afin de préserver la disposition cellulaire. On coule la structure dans un bloc d'agar 4 % afin de lui donner une tenue mécanique. Cette opération est délicate car la colonie est très peu résistante et un mouvement brusque peut la briser. b. Le vibratome est un appareil muni d'une lame hyperfine qui bouge selon deux axes et permet d'effectuer une coupe longitudinale de notre colonie. Nous n'avons pu effectuer qu'une tentative qui s'est avérée infructueuse. c. La coupe obtenue (200 μm d'épaisseur) est transparente à la lumière, on peut donc l'observer au microscope contrairement à la colonie initiale opaque.

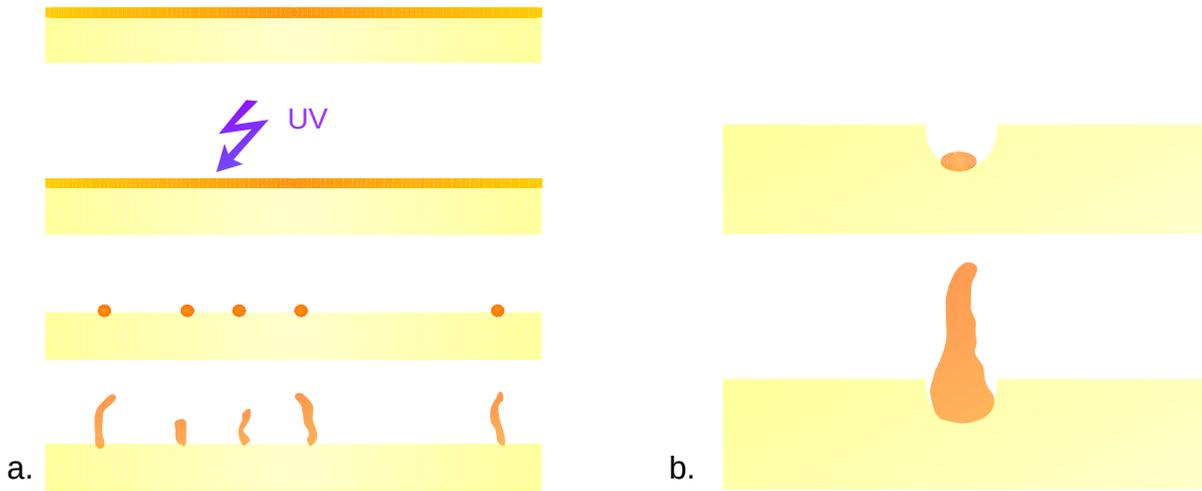


Fig. 3 – Méthode alternative de croissance de colonies : a. La méthode se repose sur quatre étapes. (1) On commence par inoculer normalement des levures sur une plaque d'agar-YPD. (2) La plaque est ensuite irradiée aux UV afin de tuer les levures en surface. (3) Seules les levures protégées par les pores de l'agar survivent à ce traitement. (4) Après quelques jours de croissance on observe des structures verticales qui sont cependant plus fines que celles obtenues par l'autre méthode. b. Le mécanisme proposé suppose que les levures qui survivent se situent dans un pore de l'agar dont la forme va dicter la croissance : la seule place disponible est vers le haut et on obtient une structure verticale.