

Matériel et méthodes

Préparation des gels

L'agarose utilisé est l'agarose de type I low melting point (Sigma-Aldrich CAS : 9012-36-6). Des gels de différentes concentrations massiques en agarose (0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3% et 4%) sont préparés en introduisant la masse adéquate d'agarose dans du DPBS, puis introduits à l'autoclave (121°C pendant 20 minutes, à 1,2 bar). Le mélange est ensuite laissé à gélifier à température ambiante.

Les gels à 0,5% et 1% en masse d'agarose étant trop mous, la gamme de concentrations massiques en agarose utilisée dans la suite des expériences s'échelonne entre 1,5% et 4%.

Lien pour la commande de l'agarose :

https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/a6013?lang=fr®ion=FR&gclid=Cj0KCQjw9LPYBRDSARIsAHL7J5nqqWFz7XbemEYR4NIULXVIFRml6LBfZcDcMy0o6pAUZs-9sEXHqd0aAjVNEALw_wcB

Marquage des cellules

Différents marqueurs colorés sont utilisés pour marquer les cellules, chacun visant à observer un élément particulier. Toutes les solutions contenant les marqueurs doivent être conservées autant que possible à l'abri de la lumière.

Sir-Actin (utilisé afin d'observer les filaments d'actine) :

Le contenu du tube de Sir-Actin est dilué dans du DMSO anhydre de façon à obtenir une solution mère de 1mM. Cette solution est conservée au congélateur à une température optimale de -20°C. Pour chaque utilisation une partie de cette solution mère est prélevée et diluée dans du milieu de culture afin d'obtenir une concentration égale à 1µM. 150µL de cette solution sont introduits dans chaque puits contenant les cellules à marquer. Après une heure d'incubation à 37°C, la solution de Sir-Actin est rincée et remplacée par du milieu de culture. L'incubation peut être portée à deux heures en présence de gel afin que le colorant diffuse jusqu'aux cellules à marquer. L'observation est réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence. Les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission de la Sir-Actin étant respectivement de 652 et 674 nm, le filtre utilisé pour visualiser la fluorescence est le filtre rouge lointain.

WGA (Wheat Germ Agglutinin) (utilisé afin d'observer les lipides membranaires) :

Les 5 mg de WGA lyophilisé contenus dans le tube sont dilués dans du PBS afin d'obtenir une solution mère de concentration 1mg/mL. Cette solution peut être conservée au congélateur à -20°C. Le protocole d'utilisation est ensuite similaire à celui de la Sir-Actin. Seul le filtre utilisé pour l'observation diffère, en effet les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission du WGA étant respectivement de 650 et 665 nm, un filtre rouge proche est utilisé.

Syto 84 Orange Fluorescent Nucleic Acid Stains (utilisé afin d'observer les noyaux) :

Le produit utilisé est le Syto 84. Le marqueur est fourni dilué dans du DMSO à une concentration de 5 mM. Cette solution peut être conservée au congélateur à -20°C. Avant chaque utilisation, le tube est brièvement centrifugé puis le contenu prélevé est dilué à une concentration de 1 µM dans du milieu de culture et laissé à incuber comme dans les protocoles précédents. Les

longueurs d'ondes d'absorption et d'émission du Syto 84 étant respectivement de 567 et 582 nm, le filtre utilisé pour l'observation est le rouge proche.

Liens vers les produits :

Sir-Actin : <https://spirochrome.com/product/sir-actin-50-nmol/>

WGA : <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/W32466>

Syto 84 : <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S11365>

Tests de diffusion dans les gels

Un gel d'agarose à 3.5% en masse d'agarose et 96.5% en masse de DPBS est préparé. On le chauffe jusqu'à fusion (65°C), puis on le fait refroidir tout en s'assurant qu'il reste liquide jusqu'à 38°C. Une solution du marqueur WGA est préparée selon le protocole de préparation des gels. 1mL d'une solution de cellules MDCK (moins chères que les hépatocytes H4-II-C3 utilisés pour nos expériences) à 100 000 cellules/mL est versée dans une boîte de Pétri. Le gel d'agarose préparé précédemment est versé au-dessus des cellules. Le dépôt est rapide (afin que le gel ne solidifie pas avant d'avoir recouvert les MDCK) mais sans agitation (afin que les MDCK ne se retrouvent pas à la périphérie du gel). Une fois le gel solidifié, la solution de marqueur est versée doucement (afin de ne pas décoller le gel de la boîte de Pétri) par-dessus. Après 1h d'incubation, la diffusion est révélée par microscopie à la longueur d'onde correspondant au marqueur.

Mesure des modules d'Young des gels

Des gels d'agarose de diverses concentrations massiques sont préparés (1% ; 1,5% ; 2% ; 2,5% ; 3% ; 4%) dans le DPBS. Les gels sont ensuite chauffés jusqu'à fusion (65°C), puis coulés dans une boîte de pétri de 5 cm de diamètre de sorte à ce que l'épaisseur avoisine les 3 mm. Après gélification, ils sont découpés à l'emporte-pièce de 1 cm de diamètre. Les gels sont ensuite placés sur la machine de traction INSTRON munie d'un extensomètre vidéo (modèle 5565), à température ambiante (20°C) ou dans une enceinte à 35°C. Le logiciel renvoie les courbes de charge, qui nous permettent de mesurer, sur la portion élastique, le module d'Young.

Préparation des micropatterns

La figure à imprimer est dessinée en négatif grâce au logiciel Autocad. Un masque UV en est tiré qui permet de produire la figure sur un substrat de silicone par photolithographie. Un moule de PDMS d'une épaisseur de quelques mm est ensuite coulé par-dessus. Le moule est ensuite retiré doucement (afin de ne pas abîmer la figure sur le silicone). Le moule est traité afin d'empêcher le mouillage du PDMS sur celui-ci. Un tampon en PDMS d'une épaisseur de l'ordre du cm est coulé par-dessus. Une fois le tampon préparé, il est découpé afin de ne garder qu'une zone de quelques cm² autour des motifs en relief.

Une solution "encre" est préparée par dissolution de fibronectine (Sigma F4759) dans du PBS filtré à 22µm dans des tubes de 10 mL.

Dans une boîte de Pétri ouverte servant de récipient, le tampon est déposé avec la face portant les motifs vers le haut. Le tampon est traité aux plasmas afin de permettre le mouillage de

l'encre sur le tampon. Quelques gouttes d'encre sont versées sur le tampon de sorte à le recouvrir complètement, puis le tampon mouillé est incubé 30 min à 37°C, 5% CO₂. Le tampon est ensuite séché au diazote puis appliqué sur la surface à marquer (lame de verre) en appliquant une légère pression dessus pendant 3 à 5 minutes. Cette étape est cruciale car il faut que seuls les motifs soient en contact avec la surface à marquer, en jouant sur la pression. La lame est ensuite incubée 30 min à 37°C, 5% CO₂. Le tampon est ensuite détaché très délicatement de la lame (afin de ne pas détériorer le dépôt de fibronectine).

Une solution de Pluronic F-127 à 2% est préparée. Afin de ne pas faire mousser la solution, les cristaux de Pluronic sont dissous par ultra-sons. Quelques gouttes de solution sont placées sur la lame de manière à la recouvrir totalement. Après 3 minutes (il ne faut pas laisser le tensioactif agir trop longtemps, sinon les dépôts de fibronectine risqueraient de se détacher de la lame), la lame est rincée trois fois à l'eau distillée.

Le motif doit être visible à l'œil nu à la lumière du jour en regardant sous le bon angle.

Montage de traction

Du PDMS a été mélangé en proportions 10:1 avec du crosslinker, puis mis à dégazer pendant 1h. Un cylindre de PDMS de diamètre 4,7 cm et de hauteur 1 cm (portion n°1) est ensuite coulé dans un puits en méthacrylate, puis mis à incuber à 65°C pour une nuit. Une fois gélifié, ce bloc de PDMS est déposé au centre d'une boîte de Pétri de 8,5 cm de diamètre. Du mélange PDMS/crosslinker dégazé est coulé par-dessus (portion n°2) de manière à ce qu'une fine pellicule de PDMS recouvre le premier cylindre gélifié. Une fois la portion n°2 gélifiée après une nuit à 65°C, les deux portions n°1 et n°2 de PDMS sont séparées de manière à ne conserver que la portion n°2. Cette opération est répétée afin d'obtenir deux portions n°2. Les deux portions sont placées dans la machine à plasma Femtoscience et traitées au plasma pendant 1 minute. Une fois le traitement effectué, les deux pièces sont accolées l'une sur l'autre : un montage avec une cavité de volume 17,35 cm³ surplombée d'un puits de diamètre 4,7 cm est obtenu. Une aiguille et une seringue sont implantés de manière à pouvoir injecter de l'air dans la cavité.

Insémination des sphéroïdes

Les cellules utilisées sont des hépatocytes de souris de la souche H4-II-C3. Tout cette manipulation est à réaliser sous hotte avec du matériel stérile.

Une solution de 1x10⁵ cellules/mL d'hépatocytes est préparée dans du milieu de culture DMEM-glutaMAX (+ SVF 10% ; streptomycine 1%). 3x10⁴ cellules sont introduites dans chaque puits d'une plaque anti-adhésion Corning 4S15, puis chaque puits est complété avec du milieu. La plaque est placée à l'incubateur à 37°C, 4% CO₂.

Changement de milieu et introduction du gel

À l'aide d'une pipette, l'ancien milieu est prélevé délicatement de manière à ne pas prendre les sphéroïdes se situant au fond du puits. 400 µL de milieu préalablement chauffé à 37°C pendant 20 minutes sont déposés dans chaque puits. Cette opération est répétée trois fois par semaine, les lundis, mercredis et vendredis. Les gels préparés sont chauffés jusqu'à fusion, puis laissés refroidir de manière à ce que leur température ne descende pas sous les 38°C. Les récipients de gel sont ouverts sous hotte (afin qu'ils restent stériles), puis du gel est versé dans les puits de

culture grâce à une pipette p1000 dont les cônes ont été au préalable coupés avec une lame de rasoir stérile (afin de permettre l'écoulement des gels visqueux). Après gélification (quasi instantanée) des gels, les puits sont complétés avec quelques gouttes de milieu afin de nourrir les cellules.