

# Matériel et méthodes

## Produits

- PDMS : SYLGARD 184 Silicone Elastomer Kit ®
- Fibronectin bovine plasma
- Pluronic® F-127
- PBS : Phosphate Buffered Saline
- Triton™ X-100
- BSA : Bovine Serum Albumin
- DAPI
- Phalloïdine
- Anti-Fibronectin antibody
- Cellules C2C12

## I. Protocole de tamponnage

### a. Fabrication d'un tampon en PDMS

Mélanger le PDMS et l'agent de réticulation en proportions 10:1 dans un bécher en plastique et mélanger à l'aide d'une pipette en plastique. Des bulles apparaissent dans l'élastomère. Le couler sur un moule en plexiglas puis le mettre au dessiccateur. Une fois les bulles d'air éliminées, le cuire à l'étuve pendant 2 heures à 60°C.

### b. Tamponnage

Nettoyer le moule en PDMS puis y déposer de la fibronectine à 50 µg/mL dans le PBS. Incuber pendant une heure à température ambiante. Rincer au PBS pour enlever le surplus de fibronectine puis sécher. Tamponner immédiatement sur le support : déposer le tampon et appliquer une légère pression. Nous avons testé les protocoles suivants :

Tests :	1	2	3	4	5	6	7	8
Tampon vierge							X	X
Tampon silanisé		X		X				
Tampon activé plasma	X		X		X	X		
Nettoyage ethanol	X		X		X	X	X	X
Nettoyage eau		X		X	X	X	X	X
Verre vierge								
Verre silanisé	X	X				X		
Boîte de pétri activée plasma			X	X	X			X
Boîte de pétri silanisée								
Boîte de pétri vierge							X	

Le dernier protocole est celui que nous avons retenu et testé plusieurs fois. L'étape de rinçage et de séchage du tampon après incubation était délicate. Nous avons testé séchage à l'air libre, par capillarité avec une lingette sèche, par air comprimé à courte et longue distance.

Après tamponnage retirer le tampon et traiter par une solution de Pluronic à 5% dans le PBS pour empêcher l'adhésion des cellules en dehors des motifs. Les tampons doivent être conservés dans un contenant clos à l'abri de la poussière. Il faut les nettoyer par sonication avant utilisation.

Si les motifs n'ont pas été préparé en milieu stérile, il faut les stériliser sous U.V. mais cela risque d'endommager la fibronectine.

#### c. Repiquage et ensemencement

Vider l'ancien milieu de culture à la poubelle. Rincer au PBS pour casser les liaisons intercellulaires. Décoller les cellules avec de la Trypsine. Incuber 1 min à 37°C. Observer au microscope pour vérifier que les cellules sont décollées. Récupérer les cellules dans un alicot. Centrifuger 3 minutes à 1500 rpm. Enlever le surnageant. Ajouter 10 mL de milieu de culture. Solubiliser les cellules par Aspiration/refoulement. Compter les cellules. Ensemencer la boîte de pétri pour avoir  $10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>, compléter avec du milieu de culture.

#### d. Contrôle avec un anticorps de la fibronectine fluorescent

- boîte vide pour contrôle négatif
- boîte activée au plasma puis incubée 2 minutes avec de la fibronectine, air comprimé pour sécher la fibronectine puis conservation dans le PBS (1h dans le noir à 4°C)

- boîte activée au plasma puis incubée 2 minutes avec de la fibronectine, rinçage au PBS puis incubation 1 h avec l'anticorps (1h dans le noir à 4°C)
- Boîte qui incube 1 h avec l'anticorps (1h dans le noir à 4°C)

On n'arrive pas à fixer la fibronectine sur les boîtes de pétri.

## II. Utilisation des puits fabriqués par photolithographie

### a. Préparation des puits :

Les puits stériles sont recouverts d'une solution de matrice extracellulaire dans le PBS (4µg/mL fibronectine, 50µg/mL collagène, Ø) pendant 1 heure. Ils sont ensuite rincés à deux reprises avec 1 mL de PBS puis ensemencés.

Milieu de culture : 1% antibiotique - 10% FBS

Nombre de cellules par puits :  $1 \cdot 10^5$

Après plusieurs jours le milieu est appauvri en facteurs de croissance, les cellules commencent à se différencier.

### b. Fixation des cellules

Extraire la lamelle du puits et la déposer dans une boîte de pétri. Rincer les cellules au PBS (préchauffé) deux fois. Immerger 15 minutes dans une solution de paraformaldéhyde à 3% dans le PBS (fixation). Rincer au PBS. Immerger dans une solution de Triton à 1% en tampon PHEM pendant 10 min. Rincer au PBS. Bloquer en BSA 1% + goat serum 10 % dans le PBS pendant 1 heure à température ambiante. Rincer au PBS. Immerger dans la phalloïdine  $20 \text{ mol.L}^{-1}$  pendant 30 minutes. Rincer au PBS 3x5 minutes. Marquer les noyaux avec DAPI. Poser la lamelle retournée sur une lame, lutter au vernis à ongle.