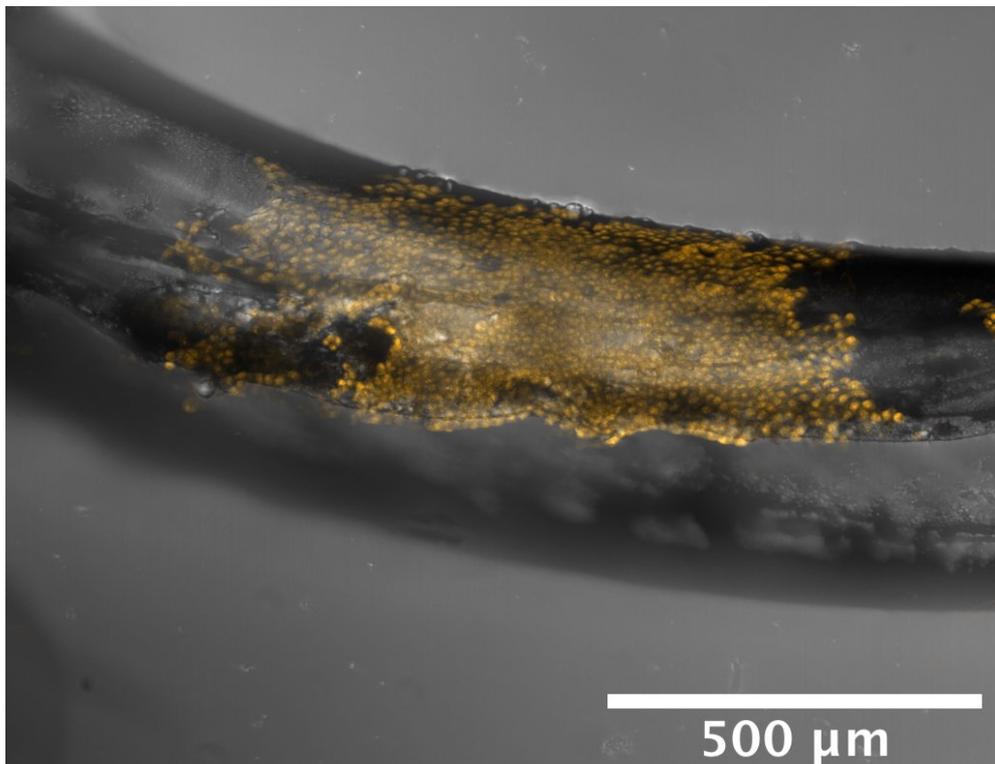


Projet Scientifique
Encadré

Bio-construction en alginate pour l'ingénierie tissulaire

Protocoles et Méthodes



Notre projet scientifique a consisté à créer des « tubes » en polymère biocompatible, afin de modéliser un système vasculaire. Les tubes ont été réalisés en hydrogel, de l'alginate, et ont été concrétionnés autour d'une matrice sacrificielle afin de créer un creux dans ceux-ci. Par la suite, les tubes ont étéensemencés de cellules afin d'en étudier la validité quant à la survie des cellules.

Projet Scientifique Encadré

L'ensemble des protocoles ont été réalisés sous hotte à flux laminaire (environnement stérile), afin d'éviter toute contamination.

1. Création de la matrice sacrificielle

Après plusieurs recherches bibliographiques approfondies, nous avons essayé plusieurs types de matrice sacrificielles telles que : fils de suture, fibres de gélatine, modèle vasculaire en PBS (Acrylonitrile butadiène styrène) imprimé en 3D, etc. Nous avons retenu, après plusieurs expériences, les fibres de gélatine car elles sont biocompatibles, faciles d'utilisation et se dégradent plus facilement.

Nous nous sommes basés sur l'article suivant pour cette expérimentation : *Fabrication of micro-alginate gel tubes utilizing micro-gelatin fibers* (Katsuhisa Sakaguchi, Takafumi Arai, Tatsuya Shimizu, [Japanese Journal of Applied Physics](#), 2017)

A- Matériel

- Gélatine (G1890-500G- SIGMA Gelatin from porcine skin)
- Eau distillée stérilisée
- *Colorant rouge* (71204- Éosine-Y alcoolique, éosine-Y avec phloxine, éosine-Y saturée Richard-Allan Scientific™)
- Acétone pure
- Boîte de Petri
- Plaque chauffante avec agitateur magnétique
- Étuve à 90°C

B- Protocole expérimental

- La solution de gélatine est préparée à 20% massique dans l'eau distillée et chauffée à 37°C. Nous ajoutons :
- 0.1 ml d'éosine pour 4 ml de gélatine
- L'acétone pure est versée dans la solution de gélatine avec un volume double, soit 8 ml.
- La solution est bien mélangée pour avoir la coacervation de la gélatine (cf notes 1)
- Tremper la gélatine coacervée dans un bain d'eau à 50°C
- Mettre la gélatine à l'étuve à 90°C pendant environ 30 secondes pour bien faire fondre le "slime " obtenu (cf notes 2)

Projet Scientifique
Encadré

- En travaillant rapidement, tirer avec une pince la gélatine à une vitesse la plus constante possible afin de créer des fibres de gélatine ayant un diamètre homogène
- Poser les fibres sur un support pour les sécher et solidifier (cf notes 3)
- Répéter les trois dernières étapes afin de faire fondre le slime et pouvoir recréer des fibres. (cf notes 4)

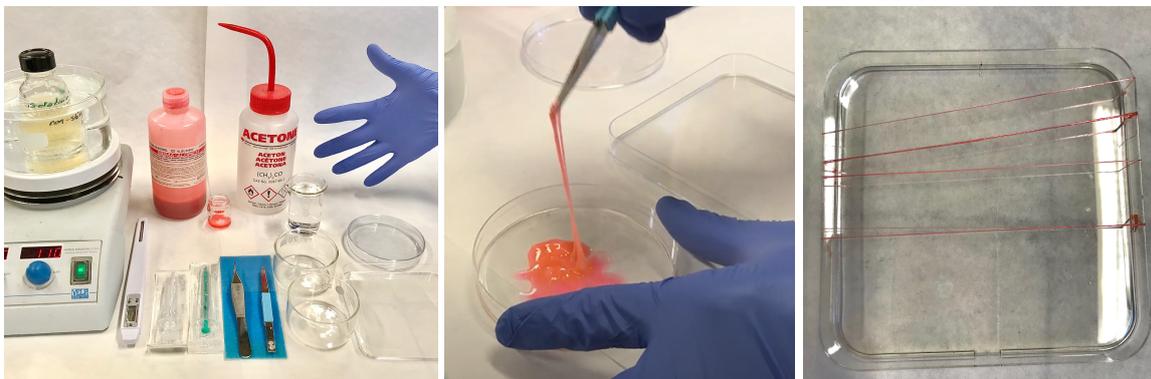


Figure 1 : Dispositifs expérimentaux

C- Analyse

Le diamètre des fibres de gélatine a été ensuite mesuré avec le logiciel imageJ sur plusieurs sections le long de chaque tube. Les graphiques ont été tracés avec le logiciel Excel (cf figures) et les écarts types ont été calculés avec la formule suivante :

$$\sigma^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})^2$$

Notes :

1. La coacervation est un phénomène physico-chimique de séparation de deux phases macromoléculaires. Les composés hydrophobes peuvent se rassembler en couches ou en émulsions de gouttelettes ; Une gouttelette contenant un colloïde riche en composés organiques, et entourée d'une membrane de molécules amphiphiles, ce qui forme par définition un coacervat.
2. "Slime" est employé ici pour caractériser l'aspect visqueux et homogène de la gélatine.
3. Les fibres sont tirées et séchées sur une boîte de Petri carrée.

Projet Scientifique
Encadré

4. *Le slime durcit au bout de quelques minutes, ainsi il est important de tirer rapidement les fibres et de répéter les trois dernières étapes afin de faire fondre le slime et pouvoir recréer des fibres.*

2. Préparation de la Solution Alginate-Collagène :

A- Matériel :

- Alginate de sodium (Protanal® LF 200 FTS Alginate - FMC Corporation)
- Solution 5% massique Chlorure de Calcium (CaCl_2)
- Glace pilée
- NaOH
- Collagène à 3mg/ml (A1048301 - *Collagen, Type I solution from rat tail*)
- TAMRA (C1171 - Invitrogen™ TAMRA, SE ; 5-(et-6) Carboxytétraméthylrhodamine, ester succinimidyle (5[6]-TAMRA, SE), isomères mixtes)

B- Protocole expérimental

Solution alginate- collagène

- Premièrement, une solution d'Alginate de Sodium (NaAlg) est préparée à 3,6% massique dans l'eau
- Le collagène est dilué à 2/3 en volume avec 1/3 de soude (NaOH) à 3mol/L : on obtient la solution appelée Col I pour une concentration finale de 2mg/ml de Col I et 1 mol/L de NaOH
- L'ensemble est homogénéisé avec une pipette et ensuite centrifugé pour éliminer les éventuelles bulles d'air
- Enfin, nous mélangeons la solution de NaAlg avec la solution de Col I à 50% chacun en volume

Formation des tubes en polymère

- Les fibres de gélatine sont trempées dans la solution d'Alginate-Collagène à 4°C (pour cela la solution est placée dans un bain de glace pilée afin d'éviter la polymérisation précoce du collagène)

Projet Scientifique
Encadré

- Ces derniers sont ensuite imbibés pendant 8 minutes dans la solution de CaCl_2 (10% massique) à 4°C, afin de permettre la polymérisation radicalaire de l'alginate. Les extrémités des tubes sont délicatement coupées au ciseau.
- Les tubes sont placés ensuite dans un bain marie d'eau à 40°C afin de dissoudre la gélatine via les extrémités découpées précédemment. C'est à cet étape que le collagène se réticule. Nous obtenons donc des tubes creux.

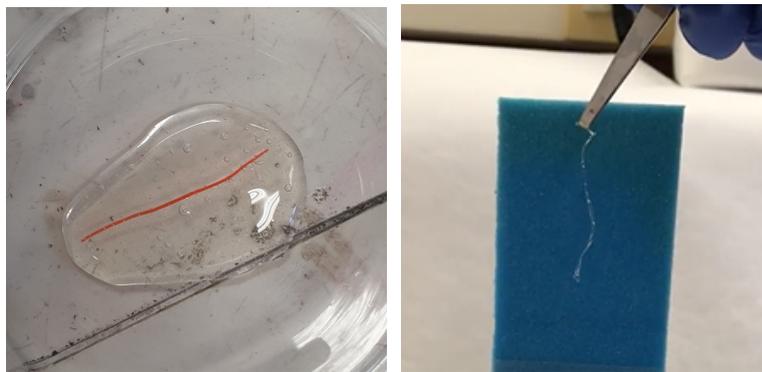


Figure 2 : Fibre de gélatine colorée trempée dans l'hydrogel (gauche). Tube d'hydrogel polymérisée (droite)

C- Analyse

La distribution de collagène dans le gel d'alginate a été visualisée avec le marqueur TAMRA, un anticorps fluorescent qui adhère spécifiquement au collagène. Le TAMRA est déposé dans le milieu contenant l'hydrogel à marquer pour une concentration du milieu de 2 mg/ml. La boîte est doucement agitée et incubée pendant 1h (37°C, 5% CO_2), et l'hydrogel est rincé trois fois. Avec un microscope confocale, le système a été pris en image sur plusieurs plans de profondeur (stack image), permettant de faire une modélisation en 3D. L'image a été traitée avec ImageJ (cf Figures).

Projet Scientifique
Encadré

3- Ensemencement des Cellules

Nous avons préparé un milieu de culture propice au développement des cellules.

A- Matériel

- Cellules MDCK
- DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 1X (61965026- Gibco™ DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement)
- Antibiotique-antimycosique (Gibco, 15240062 – Antibiotico antimycosique (100 X))
- Sérum de veau fœtal (26140079- Sérum de veau fœtal, qualifié, d'origine américaine, standard (stérilisé-filtré))
- PBS (phosphate buffered saline) 1X (10010023- Gibco™ Solution (saline dans un tampon phosphate), pH 7,4)
- Trypsin-EDTA (25300096 - 0.05% Trypsin - EDTA (1x), phenol red)
- SYTO 80 (S11360- SYTO™ Orange Fluorescent Nucleic Acid Stain dye 80)
- Calcein (65-0853-39- eBioscience™ Calcein AM Viability Dye (UltraPure Grade))

B-Protocole expérimental

Les cellules MDCK sont entretenues à l'incubateur (37°C, 5% CO₂)

Pour le milieu des cellules MDCK, nous mélangeons les proportions suivantes dans un tube Falcon de 50 ml:

- 89% (44,5 ml) de DMEM 1X
- 1% (500 µl) d'antibiotique- antimycosique 100X
- 10% (5 ml) de sérum de veau fœtal

Les cellules sont par la suite passées une fois à confluence (10⁵ cellules/cm²) et pour cela nous avons suivi le protocole suivant :

- Retirer le milieu du flask (25 cm²)
- Déposer 4 ml de PBS 1X dans le flask, incuber pendant 4 minutes (à 37°C, 5% CO₂) jusqu'à observer l'augmentation de l'espace intercellulaire au microscope, puis retirer le surnageant.
- Déposer 1 ml de trypsin-EDTA 1X dans le flask et incuber pendant 5-10 minutes jusqu'à décollement des cellules observé au microscope (cf notes 4)

Projet Scientifique
Encadré

- Déposer 9 ml de milieu MDCK dans le flask et bien homogénéiser. Faire écouler le milieu sur la surface pour décoller un maximum de cellules.
- Centrifuger (5min, 1000rpm) pour assurer la suspension des cellules dans un Falcon de 15 ml
- Enlever le surnageant sans décoller la calotte
- Homogénéiser la solution dans le milieu restant puis ajouter 1 ml de PBS 1X et homogénéiser
- Déposer 20 μl de suspension (10^5 cellules) dans 8 ml de milieu MDCK dans un nouveau flask (25 cm^2) et bien homogénéiser
- Entreposer à l'incubateur (37°C , 5% CO_2)

Cette opération est répétée tous les 6 jours jusqu' à confluence de la culture cellulaire.

Pour l'ensemencement des tubes :

- Rincer les tubes en alginate-collagène avec du milieu MDCK
- Dans une boîte de Petri, placer les tubes en hydrogel avec du milieu de culture MDCK pour les imbiber.
- Estimer le pourcentage de confluence
- Passer les cellules (voir protocole précédent)
- Déposer dans la boîte de Petri 10 μl de cellules concentrées dans du PBS 1X (le volume est ajusté au pourcentage de confluence pour ensemercer 10^5 cellules) tous les 4 ml de milieu MDCK. Agiter doucement.
- Les tubes en hydrogels sont ainsi laissés dans les cellules pendant plusieurs jours afin que les cellules prolifèrent sur le tube.

C- Analyse

La manipulation des marqueurs fluorescents devrait se faire avec un minimum d'exposition à la lumière pour minimiser le photo-blanchiment. Éteindre la lumière de la hotte et protéger la boîte avec du papier aluminium.

Projet Scientifique
Encadré

Marqueur de noyaux SYTO 80

- Déposer du SYTO 80 dans le milieu avec cellules pour une concentration de 2 μM dans le milieu de culture.
- Incuber pendant une heure (37°C, 5% CO₂).
- Remplacer le milieu et imager au microscope fluorescent (absorption à 531 nm, émission à 545 nm).

Marquage cytosolique par la Calceine DA

- Déposer de la Calceine diacétate dans le milieu avec cellules pour une concentration de 10 μM dans le milieu de culture. La Calcéine DA, qui diffuse dans les cellules est rendue fluorescente par l'action des estérases cellulaires.
- Imager au microscope fluorescent (absorption à 495 nm, émission à 515 nm).

Liens pour les produits :

Gélatine

https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g1890?lang=fr®ion=FR&gclid=CjwKCAjw7-P1BRA2EiwAXoPWA4z38_J9eEc-2AbJ0r4YgwMgnRz80HjmKt85_5vtOjWWcDgPkzizHBoCFZ0QAvD_BwE

Alginate

<https://www.yumpu.com/en/document/view/20918188/protanalr-lf-200-fts-alginate-fmc-corporation>

SYTO 80

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S11360?SID=srch-srp-S11360#/S11360?SID=srch-srp-S11360>

DMEM

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/61965026?SID=srch-hj-61965026#/61965026?SID=srch-hj-61965026>

PBS

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10010023?SID=srch-hj-10010023#/10010023?SID=srch-hj-10010023>

Projet Scientifique
Encadré

Antibiotique-antimycosique

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15240062?SID=srch-srp-15240062#/15240062?SID=srch-srp-15240062>

Sérum de veau foetal

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26140079#/26140079>

Trypsin-EDTA

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/25300096?SID=srch-srp-25300096#/25300096?SID=srch-srp-25300096>

Tamra

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C1171#/C1171>

Calcein

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/65-0853-39?SID=srch-hj-65-0853-39#/65-0853-39?SID=srch-hj-65-0853-39>

Collagène

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A1048301#/A1048301>

Gelatine

https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g1890?lang=fr®ion=FR&gclid=CjwKCAjw7-P1BRA2EiwAXoPWA-RtqrM0usOtEl3DDRjtThscW_se-LMGU4kOt90tw_gG_MiH9JI8iBoC33wQAvD_BwE