

# Matériel et méthodes

## I) Références du matériel

### Produits

	Références	Fournisseur
Levures	S. cerevisiae	Souches récupérées auprès de P. Hersen, rédacteur de l'article à la base de notre PSE
Milieu de culture	Y1375 – YPD Broth	Sigma Aldrich
Agar	A1296 – Agar	Sigma Aldrich
PDMS et agent réticulant	SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer Kit	dow-corning
Glycérol	G9012 - Glycérol	Sigma Aldrich

### Matériel

	Références	Fournisseur
Membranes millipores	Isopore™ Membrane Filters GTTP02500 pores 22 µm diamètre 25 mm	Merckmillipore
Filtres pour stériliser milieu de culture	Z358193 - Nalgene® vacuum filtration system, filter capacity 500 mL, pore size 0.2 µm	Sigma Aldrich
Boîtes de Pétri	/	
Étuve agitatrice	/	
Spin coater	<p>Afin de mouiller nos membranes avec du PDMS, nous avons accès au spin coater de l'Institut Pierre-Gilles de Gennes. Cependant, un encadrant était requis afin d'accéder à la salle grise : il ne nous était donc pas possible de nous y rendre régulièrement. Pour s'assurer d'avoir assez de membranes, nous avons donc fabriqué un spin-coater « artisanal » à l'aide d'une centrifugeuse dont le couvercle est retiré. Cette dernière est placée dans une enceinte fermée et recouverte d'aluminium afin d'éviter les projections sur les parois. Le porte tube est retiré de l'axe du moteur et est remplacé par une pièce fabriquée à l'atelier permettant de maintenir fermement les tampons de PDMS utilisés pour le mouillage. Enfin, l'interrupteur de la centrifugeuse est dessoudé et remplacé par un interrupteur filaire que l'on peut sortir de l'enceinte, par mesure de sécurité.</p> <p>La vitesse de rotation de ce spin-coater varie autour de 1300-1400 tours par minute. Les incertitudes quant à l'épaisseur de la couche de PDMS, calculable à l'aide de tables, est négligeable : la couche obtenue (~100µm) est adaptée au mouillage des membranes en transférant le motif présent sur le tampon sans pour autant le déformer par diffusion d'un surplus de PDMS.</p>	
Pattern	<p>Nous avons réalisé nos patterns à la découpeuse laser de l'atelier de l'ESPCI. Il s'agit de carré de plexiglas (5*5cm, 0.5cm d'épaisseur) avec un trou circulaire au centre (2 mm de diamètre pour le plus optimisé). Nous avons aussi réalisé d'autres formes (lettres, rectangle).</p>	

## II) Méthodes

### Protocole de mise en culture

Mise en croissance jusqu'au plateau : les levures (congelées ou récupérées de culture) sont mises en suspension dans du mélange de culture YPD (50g/L), et sont laissés la nuit sous agitation dans l'étuve en croissance. Le couvercle des tubes doit être très légèrement dévissé pour permettre l'oxygénation du milieu.

Mise en phase exponentielle : dilution x100 de notre suspension arrivée au plateau dans du milieu de culture YPD. Incubation dans l'étuve sous agitation 4h : au bout de 4 heures les levures sont en phase exponentielle et sont prêtes à être inoculées sur les gels d'agar.

### Protocole de congélation

Mélange 30/70 v/v filtré (0,2 µm). Ajout sous Bec Bunsen dans des tubes de congélation 0,5 mL du mélange avec 0,5 mL de suspension de levure arrivée au plateau. Secouer. Congeler à 80°C dans un bain qui permet de refroidir doucement (envi. 1°C/h).

### Gels d'agar

Les gels d'agar réalisés sont à 4% en masse.

Dans un erlenmeyer sous agitation, porter à ébullition du YPD avec 4% en masse d'Agar. Le liquide bulle puis devient plus clair, plus transparent (compter au moins 15 min). Il est ensuite versé dans des boîtes de Pétri sous hotte stérile, et le tout est laissé à sécher autour de 45 min sous la hotte à flux laminaire pour éviter la contamination et accélérer le séchage. Fermer avec les couvercles, utiliser directement ou mettre du parafilm.

NB : il faut que les gels soient d'épaisseur assez importante et/ou dans des boîtes de Pétri pas trop petites sinon ils ont tendance à sécher lors de l'expérience (qui dure 15 jours à 37°C) ...

### Préparation des membranes

Mélange énergique de PDMS avec l'agent réticulant dans un récipient plat (boîte de Pétri typiquement), possibilité de faire dégazer grâce à un dessiccateur pour plus d'homogénéité. Dépôt du mélange autour du centre du pattern en plexiglas fixé dans le spin coater, puis spin coat 1 minute environ à 1300 tours/min. Une fois le pattern en plexi sorti, dépôt délicat de la membrane au milieu du pattern. Ensemble du pattern recouvert de PDMS et de la membrane mis à cuire au four à 70°C au moins 4 heures. Ayant un certain nombre de patterns de plexi, on peut réaliser à chaque fois 6 membranes.

Décollage de la membrane épineux : s'aider d'un scalpel et d'une pince.

Possibilité de laver à l'éthanol (laisser tremper dedans quelques minutes) puis rincer au PBS deux à trois fois pour stériliser les membranes.

### Inoculation et expérience

Sous hotte stérile, on dépose les membranes (face la plus imbibée de PDMS au-dessus) sur les gels d'Agar. Sous Bec Bunsen on dépose à l'aide d'une micropipette une très petite goutte de suspension de levure en phase exponentielle au niveau de la zone perméable aux nutriments. Les boîtes de Pétri avec leurs couvercles sont mises à l'étuve à 37°C. Compter une semaine pour avoir une tige de quelques millimètres, 15 jours pour atteindre sa taille maximale.

### UV

Nous avons voulu répéter l'expérience d'un autre article (*Multicellular Stalk-Like, Structures in Saccharomyces cerevisiae*, DAVID ENGELBERG, AVISHAI MIMRAN and co.) notre protocole n'est pas au point par manque de matériel permettant la stérilité. Nous avons inoculé un gel d'agar avec nos

bactéries et éclairé la culture aux UV pendant une journée, mais d'autres organismes se sont développés. Nous n'avons pas d'endroit stérile où nous pouvons mettre des micro-organismes en culture.

### **Fixation de la structure**

La colonie de levure est immergée dans le PFA (Para formaldéhyde) pendant une journée au frigo. L'opération a pour but de fixer la structure interne de la colonie et d'arrêter le développement des levures. Cependant cela ne suffit pas à donner une rigidité à la structure et sa manipulation reste très délicate.

Nous avons ensuite essayé d'obtenir des coupes de la structure en effectuant des tranches au vibratome. Pour cela nous avons coulé la structure fixée au PFA dans de l'agar. Le bloc obtenu est coupé au vibratome (épaisseur 200 $\mu$ m). La manipulation n'a pas fonctionné et nous n'avons pas pu faire d'autre tentative par manque de temps.

Une piste que nous n'avons pas pu poursuivre et qui visait le même objectif est la découpe cryogénique. Le principe est de congeler l'échantillon afin de le rigidifier et d'en effectuer une coupe précise même sur des tissus mous à température ambiante.