

Matériel et méthodes

I. Culture et repiquage des cellules

Matériel :

- DMEM glutamax
- Sérum foetal de veau 5%
- Antibiotique/antifongique (ampicilline, penicilline, fungizone) 1/100e
- Trypsine (trypsin-EDTA 0,25%, phenol red)
- Incubateur : 37°C, 5 % de CO₂, pression de vapeur saturante en H₂O
- Hotte à flux laminaire et matériel stérile

Préparation du milieu de culture :

- Décongeler 400 µL d'antibiotique et 2 mL de sérum foetal de veau
- Dans un 'falcon' de 50mL, insérer le sérum et l'antibiotique
- Compléter à 50mL avec du DMEM glutamax
- Homogénéiser et conserver au réfrigérateur à 4°C

Repiquage des cellules :

1) Observation des cellules au microscope

- Observer l'aspect des cellules
- Vérifier que le tapis cellulaire est uniforme et confluent
- Noter la couleur du milieu

2) Lavage du tapis cellulaire

- Eliminer le milieu en respectant les règles d'asepsie
- Laver le tapis cellulaire en introduisant 5mL de PBS sans Ca²⁺
- Agiter doucement la boîte pendant 30s et éliminer le liquide

3) Trypsination

- Chauffer le milieu cellulaire au bain-marie à 37°C, décongeler 2mL de trypsine
- Introduire la trypsine dans la boîte et la répartir sur tout le tapis cellulaire
- Laisser agir pendant 7 à 10 minutes à l'incubateur
- Examiner la flasque toutes les 1 à 2 minutes à partir de 5 minutes à l'œil nu et au microscope pour surveiller le décollement du tapis cellulaire du support et l'individualisation des cellules qui deviennent rondes

4) Arrêt de la trypsination

- Dès que décollement et individualisation se sont produits, arrêter l'action de la trypsine
- Introduire 8mL de milieu de culture
- Disperser soigneusement les cellules par aspiration et refoulement à la pipette
- A chaque refoulement, envoyer le liquide sur le fond de la bouteille pour finir le décollement des cellules

5) Numération

- Réaliser le comptage des cellules à l'aide d'une chambre de Malassez : compter le nombre de cellules dans dix carrés et le multiplier par 10^4 pour avoir le nombre de cellules par mL

6) Mise en culture dans une nouvelle flasque

- Calculer le volume de suspension cellulaire à introduire dans chaque nouvelle flasque de sorte que les cellules en culture soient placées à une densité finale d'environ 10^6 cellules par flasque (Une flasque fait 25cm^2 et contient 10mL de milieu).
- Introduire ce volume dans la nouvelle flasque et compléter à 10 mL avec du milieu de culture
- Placer la nouvelle flasque à l'incubateur

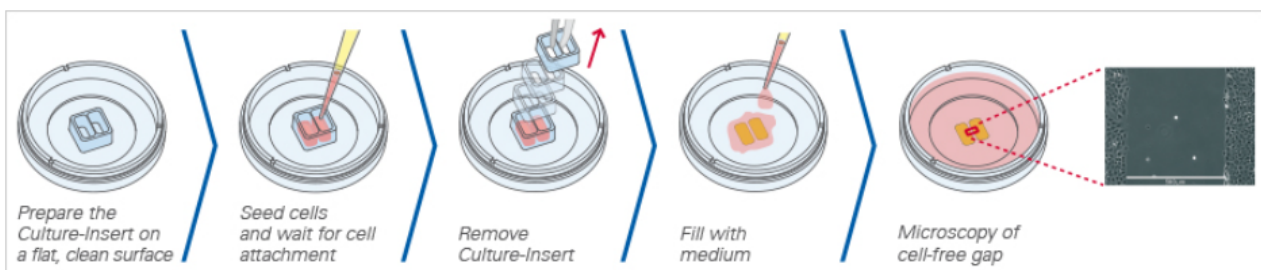
7) Entretien

- Observer les cellules et le milieu de culture tous les deux jours
- Repiquer lorsque les cellules sont à confluence

II. Pochoirs et enregistrements des migrations

Montage :

Nous utilisons des pochoirs de la marque Ibidi selon le protocole suivant :



L'enregistrement de la migration se fait dans l'incubateur (37°C, 5% CO₂) avec une caméra-microscope Dino-Lite (AM4113ZT4(R4) Standard 400x-470x) et le logiciel Dinocapture.

Protocole :

1) Préparation des pochoirs

- Calculer le volume de suspension cellulaire obtenue lors d'un repiquage à introduire dans chaque pochoir pour être à confluence le jour de la migration (un pochoir fait 0,22 cm² et contient 70µL) sachant que le taux de division journalier des MDCK est de 1
- Introduire ce volume dans chaque puits
- Placer la boîte Ibidi dans l'incubateur

2) Enregistrement de la migration

- Lorsque les cellules sont confluentes (vérifier au microscope), retirer le pochoir en silicone
- Chauffer le milieu cellulaire au bain-marie à 37°C
- « Flusher » la boîte pour enlever d'éventuels résidus en suspension
- Remplir la boîte de Pétri aux 3/4 de milieu cellulaire
- Placer la boîte dans l'incubateur et régler la mise au point de la Dino
- Fermer l'incubateur et lancer l'acquisition pendant 12 heures

III. Marquages immunofluorescents des cellules

Nous avons utilisé différents marqueurs colorés (dont les solutions doivent absolument être conservées à l'abri de la lumière) afin d'observer des éléments cellulaires particuliers : MKS1, kératine, et noyaux.

Matériel :

- DPBS
- PFA (4 % dans DPBS)
- Triton X-100 (0,1 % dans tampon Phem)
- Solution de blocage (BSA à 1 % dans DPBS) + Goat sérum (10%)
- Anticorps primaire et secondaire

Protocole :

1) Fixation

- Quand les cellules sont prêtes à être marquées, retirer le milieu et rincer les cellules au DPBS
- Fixer avec le PFA pendant 15mins pour figer les cellules

2) Perméabilisation

- Rincer trois fois au DPBS
- Introduire Triton X100 et laisser agir pendant 10mins

3) Saturation

- Rincer au DPBS trois fois
- Bloquer au BSA + Goat serum pendant 1h à température ambiante

4) Marquage

- Rincer trois fois au DPBS
- Calculer la quantité d'anticorps (Ire et Ire) à prélever pour obtenir des solutions au 1/100^e pour les anticorps primaires anti MKS1 (Rabbit Polyclonal human MKS1 PrEST Sigma--France HPA021812 Affinity isolated) et anti pan keratine (Mouse Cocktail A broad-spectrum pan-keratin monoclonal antibody cocktail which recognizes keratin 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 18 and 19, Invitrogen-France MA5-13203) et au 1/500^e pour les anticorps secondaires, liés aux fluorophores.
- Ajouter l'anticorps primaire et laisser reposer pendant une nuit à 4°C
- Rincer au DPBS trois fois
- Ajouter l'anticorps secondaire et laisser agir 1h à 4°C
- Rincer au DPBS trois fois

5) Montage

- Mettre une goutte de DAPI-milieu de montage pendant 5mins à 37°C

IV. Time Lapse, tracking, et analyse des images

Les Times Lapse ont été réalisés à l'aide d'une Dino-Lite (AM4113ZT4(R4) Standard 400x-470x) placé en dessous de la culture. On utilise le plug-in Manual Tracking de Icy afin de réaliser le tracking des cellules leader ainsi que des fibroblastes. Et on utilise ImageJ pour calculer la vitesse du front et faire les mesures. On utilise MathLab pour analyser les données et faire le traitement statistique sur les cellules leader suivies. L'analyse des vitesses instantanées et leur représentation a été réalisée par le logiciel Icy. Le calcul du contraste est fait à partir de la formule de Michelson du contraste. Cela à partir des intensités relevées sur ImageJ et par traitement statistique sur MatLab.