PSE: Nouveaux hydrogels synthétiques pour la Thérapie Tissulaire

Nicolas Dautain & Mahamane Ibrahima Traore & Chloé Jost

Mai 2019

Protocole, Matériel et Méthodes

1 PRÉPARATION DES SUBSTRATS

1.1 Matériel

Mélange Piranha :

- substrats : Lamelles de verre MENZEL-GLÄSER 200 Deckgläser/ Cover Slips 20x20mm
- Eau ultra-pure = eau à 18.2MOhm.cm
- acide sulfurique H_2SO_4
- peroxyde d'hydrogène H_20_2
- cristallisoir de 500 mL
- grand verre de montre
- plaque chauffante
- flux d'azote

Silanisation :

- réacteur à silanisation
- 2 ballons de baudruche
- cristallisoir
- 100 mL de toluène anhydre
- 200 mL de toluène

Dépôt du polymère par spin-coating :

- PNIPAM : poly(N-isopropylacrylamine)
- butanol $\rho = 810g/L$
- méthanol $\rho = 792g/L$
- réticulant : 1,4-dithioerytritol

1.2 Protocole

Tout d'abord, il faut laver les lamelles de toute impureté pour cela il faut préparer un mélange Piranha qui permet de nettoyer les résidus organiques sur les substrats. Le mélange Piranha est un mélange d'acide sulfurique et de peroxyde d'hydrogène en ratio 7 :3 en volume. 100 mL de cette solution sont préparés pour nettoyer une quinzaine de lamelles. Ce mélange étant très dangereux il faut se protéger en travaillant sous hotte, en utilisant une blouse, des lunettes de protection, deux paires de gants l'une sur l'autre (la plus résistante au piranha en dessous et la moins résistante au dessus et si jamais on constate que la paire de gant du dessus est abîmé à cause d'une projection il faut tout de suite changer de gants).

Dans un grand cristallisoir de 500 mL on place les lamelles à nettoyer. On recouvre tout le fond du cristallisoir avec une quinzaine de lamelles. On verse l'acide sulfurique puis le peroxyde d'hydrogène et on couvre à l'aide d'un grand verre de montre pour éviter les projections. On met à chauffer à 200 °C la solution. Le mélange se met à bouillir en effet il se forme l'acide sulfurique un oxydant fort qui va réduire toute les impuretés. Dès que le mélange arrête de bouillir donc qu'il n'y a plus d'impuretés, au bout de 15min environ, on arrête le chauffage et on laisse le mélange revenir à température ambiante.

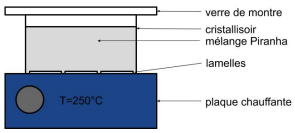

FIGURE 1 – Schéma du montage Piranha

Les lamelles sont récupérées et rincées immédiatement dans un premier cristallisoir d'eau ultra-pure et 15s plus tard dans un second que l'on passe pendant 30s dans un sonicateur. Les lamelles sont ensuite récupérées et séchées grâce à un flux d'azote.

L'étape suivante est la silanisation des substrats. Cela sert à fixer chimiquement sur la surface en verre des lamelles des molécules de silicium qui vont permettre au polymère de s'accrocher par la suite sur nos surfaces. Pour cela on place les substrats sont placés dans un réacteur à silanisation. On place ce réacteur sous azote car le silane ne réagit pas avec l'azote alors qu'il pourrait réagir avec le dioxygène de l'air. On introduit ensuite 100 mL d'une solution de 3-mercaptopropylmethoxysilane à 3% en volume dans du toluène sec à température ambiante et on laisse réagir pendant 1h30min.

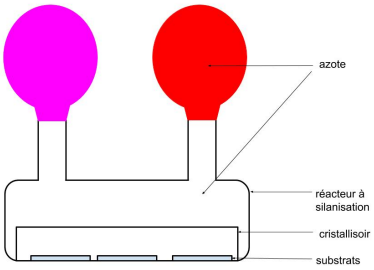

FIGURE 2 – Schéma du réacteur à silanisation

Une fois la réaction terminée les lamelles sont rapidement rincées dans deux bains successifs de toluène puis passées au sonicateur pendant 30s puis séchées sous flux d'azote. Ce lavage permet de laver les substrats du réactif pour qu'il ne polymérise pas avec l'eau de l'air.

En parallèle il faut préparer les solutions de polymère : les solutions à différents pourcentage en masse de polymère -PNIPAM- sont préparées dans un ratio de 50/50 en masse de butanol et méthanol et mises sous agitation pendant une semaine. Le PNIPAM est choisi pour ces propriétés thermosensible : pour une température inférieure à 32 °C il est hydrophile et gonflé et pour une température supérieure à 32 °C il est hydrophobe et se recroqueville. Les pourcentage en masse de PNIPAM sont de l'ordre de 1% et on prépare 10 mL de chaque solution de polymère soit 7,92g de méthanol et 8,10g de butanol par flacon. Les pourcentage exacte de PNIPAM utilisés seront détaillés dans la partie caractérisation des substrats.

Le dépôt du polymère sur les lamelles s'effectue par spin-coationg. Juste avant le dépôt du polymère sur les lamelles silanisées on ajoute le réticulant à 60% en masse de polymère et on agite bien la solution. On dépose alors quelques gouttes de solution sur nos lamelle, les paramètres de dépôt sont les suivants : 30s à 3 000 tr/min. Puis pour éliminer le solvant les lamelles sont mises au four à 150°C sous vide pendant 20h. Une fois la réticulation terminées les lamelles sont rincées dans deux bains successifs d'eau ultra-pure puis passées au sonicateur pendant 10s pour éliminer les chaînes qui n'ont pas réagit, puis séchées sous flux d'azote. On a ainsi obtenue les lamelles qui vont par la suite être caractérisées et servir de support pour la culture cellulaire.

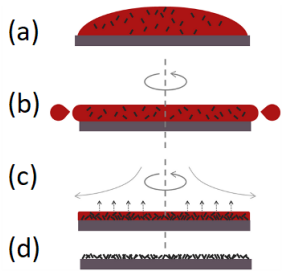

FIGURE 3 – Principe du dépôt par spin-coating : (a) dépôt d'une goutte de solution sur le substrats ; (b) mise en rotation et élimination de l'excès de solution, (c) une couche homogène s'est formé ; (d) séchage au four pour éliminer le solvant

2 CARACTÉRISATION DES SUBSTRATS

2.1 AFM

L'AFM ou microscope à force atomique permet la mesure d'épaisseur e de surface et la visualisation de la topographie des surfaces. Un creux est effectué dans le film de polymère à la surface de la lamelle grâce à une fine pointe. Le profil topographique de la surface est ensuite réalisé par AFM pour déterminer la profondeur du creux qui correspond ainsi à l'épaisseur du film.

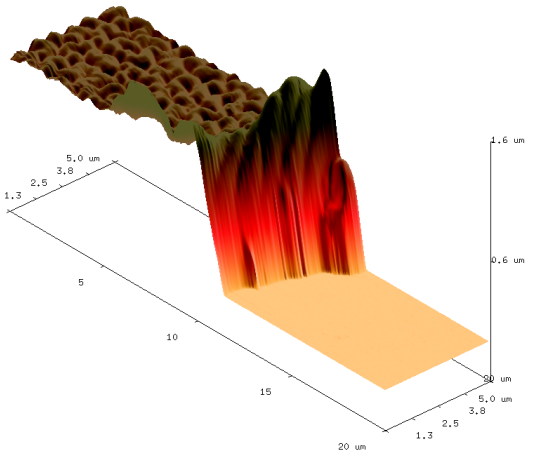

FIGURE 4 – Profil topographique d'une surface de PNIPAM à 5%

2.2 Ellipsométrie

L'éllipsométrie est une méthode qui permet, connaissant l'indice de réfraction d'une surface ici le PNIPAM, de déterminer rapidement l'épaisseur du film grâce à la variation de la polarisation d'une lumière laser polarisée envoyée sur le film. La polarisation étant périodique en fonction de l'épaisseur, il faut au préalable avoir une idée de la gamme d'épaisseur.

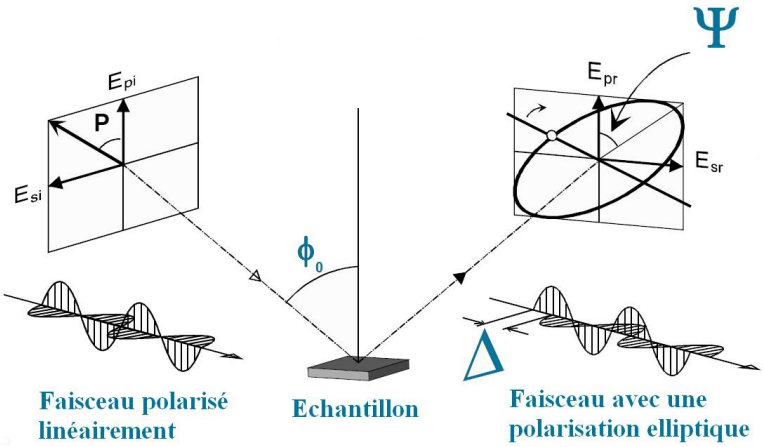

FIGURE 5 – Principe de l'éllipsométrie

3 CULTURE CELLULAIRE

3.1 Matériel

Préparation des cultures :

- 2 mL de trypsin
- 20 mL de culture cellulaire : HUVECK ou MDCK
- 50 mL de milieu de culture
- cellule de Malassez

Stérélisation des substrats :

- 10mL d'éthanol
- 10 mL de DPBS (Dulbecco's Phisphate-Buffered Saline)
- boîte de Pétrie

3.2 Protocole

Maintenant que nous disposons de nos substrats nous allons pouvoir passer à la culture de tissus sur ces substrats.

La première étape consiste à récupérer les cultures cellulaire qui seront soit des culture cellulaire de HUVECK de C2C12 ou de MDCK en fonction des expériences. Pour récupérer la culture cellulaire il faut sortir tout d'abord retirer le milieu de culture de la boîte dans laquelle se trouvent les cellules. Les cellules se trouvent accrocher sur le fond de la boîte il faut donc les décoller. Pour les décoller on utilise 2 mL de Trypsin et on laisse incuber à 37 $^{\circ}$C pendant 4 min. Au bout de 4 min on peut voir au microscope que les cellules sont bien rondes ce qui indique qu'elles se sont décollées. Il faut alors neutraliser la trypsin pour ne pas tuer les cellules pour cela on rajoute 8 mL de milieu de culture, on homogénéise et on centrifuge pendant 4 min. On observe après centrifugation un culot au fond du tube à essaie qui correspond aux cellules. On retire alors le milieu cellulaire. On rajoute ensuite 4 mL de milieu cellulaire.

Il faut maintenant compter le nombre de cellules en suspension dans la solution. Pour cela on utilise une cellule de Malassez.

Maintenant qu'on a nos cultures prêtes il faut stéréliser nos lamelles afin de pouvoir faire de la culture cellulaire dessus. Pour cela il faut laver les lamelles en les plongeant deux fois dans de l'éthanol sous hotte stérile pendant respectivement 20 min et 10 min afin d'être sûr que le polymère a bien relargué toute l'eau qu'il avait et donc que nos substrats sont bien stérile. Ensuite comme les cellules ne peuvent pas pousser sur de l'éthanol, elles meurent si elles sont en contact avec de l'éthanol, il faut laver les substrats de l'éthanol. Pour cela on plonge les lamelles deux fois dans du DPBS respectivement pendant 20 min et 10 min (Dulbecco's Phisphate-Buffered Saline) afin que le polymère est bien relargué tout l'éthanol qu'il avait.

On peut enfin déposer nos cultures sur nos substrats. On dépose environ 800k cellules/échantillon puis on met les échantillons à incuber à 37 $^{\circ}$C. Il faut alors une semaine pour que les cellules arrivent à confluence et forment un tapis cellulaire sur nos substrats. Il faut donc revenir changer le milieu cellulaire au bout de trois jours pour ne pas que les cellules meurent. Une fois qu'il y a confluence le milieu cellulaire est rapidement descendu à 22 $^{\circ}$C et se détache progressivement des lamelles.

4 OBSERVATION DES CELLULES

Les cellules sont observées grâce à un microscope optique muni d'une caméra qui permet de faire une visualisation sur ordinateur et un enregistrement vidéo.

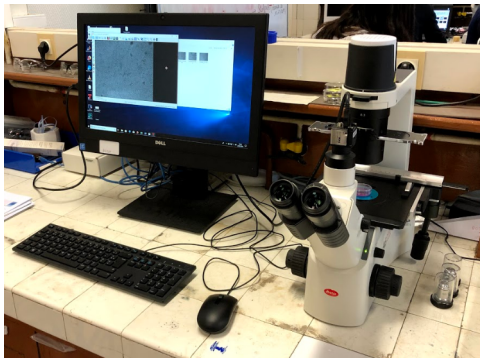

FIGURE 6 – Microscope pour la visualisation sur ordinateur

Après une semaine de culture les cellules sont suffisamment attachées et on va pouvoir observer si elles se décollent. En effet lorsque le PNIPAM est au dessus de 32 °C il est hydrophobe donc rétracté et les cellules forme un tissus à la surface du PNIPAM. Lorsqu'on diminue la température en dessous de 32 °C le polymère devient hydrophile, se gonflent, et avec le changement de surface le tissus de cellule se détachent du PNIPAM. On peut alors récupérer un tissu cellulaire complet. C'est donc ce qu'on souhaite observer. Pour que les tissus se décollent effectivement du polymère il faut que le changement de température soit suffisamment rapide pour que les cellules n'aient pas le temps de s'accommoder du changement de surface et donc restent attachées au polymère car les cellules qu'on a choisit préfèrent être sur un support qu'en suspension. Pour cela dès qu'on sort la boîte de Pétrie contenant les cellules de l'incubateur on la pose directement sur la paillasse froide et on attend 5 min pour que la température du milieu passe de 37 °C à 22 °C. Une fois la température du milieu descendu on commence l'observation au microscope pendant 2h en ayant bien vérifié que le tissu cellulaire était toujours le même au moment de la sortie de l'incubateur et juste après le refroidissement au moment où on commence l'observation au microscope.

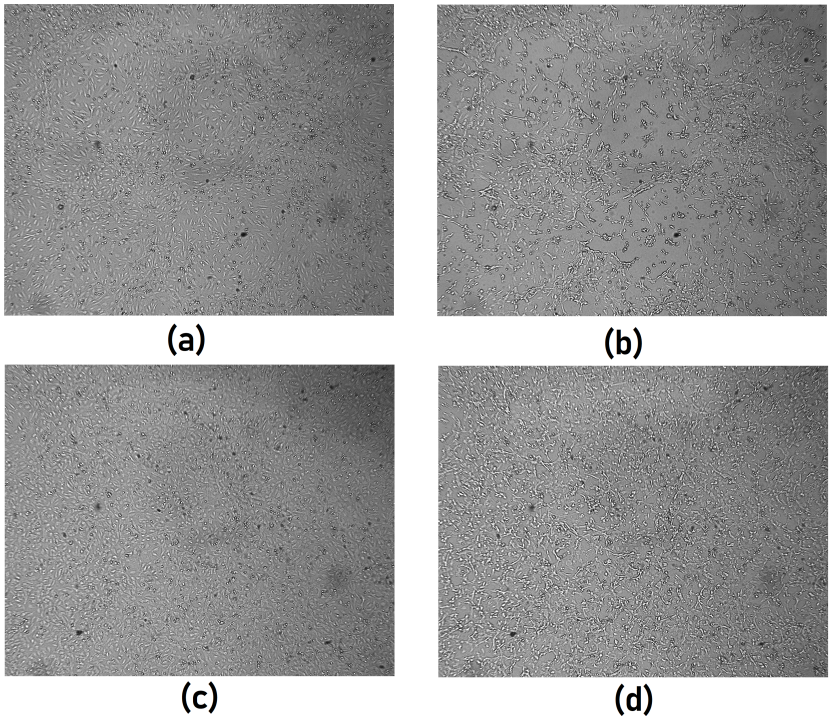

FIGURE 7 – Image de cellules HUVEK sur lamelles au microscope, grossissement x40 : (a) lamelle avec du PNIPAM à 2% juste après refroidissement ; (b) lamelle avec du PNIPAM à 2% après 1h à température ambiante ; (c) lamelle sans PNIPAM juste après le refroidissement ; (d) lamelle sans PNIPAM après 1h à température ambiante

Le décollement des cellules après 1h à température ambiante est bien plus important pour les cellules HUVEK sur du PNIPAM cependant les cellules se détachent distinctement les une des autres or on souhaite obtenir un tissu entier de cellules détachées. C'est pourquoi nous avons réalisé d'autres manipulation avec des cellules plus liées entre elles les cellules MDCK.

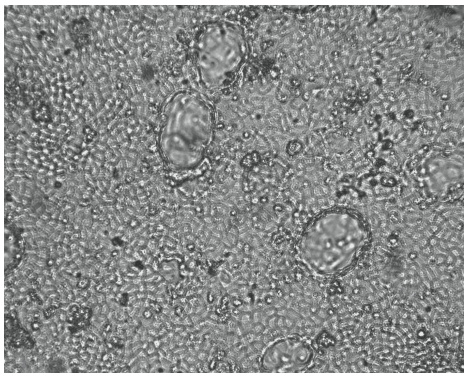

FIGURE 8 – Image de cellules MCK sur lamelles à 0.1% au microscope, grossissement x40 : bulles en formation

Avec les cellules MDCK des bulles se forment à la surface du PNIPAM ce qui indique que les cellules se décollent bien cependant une partie des cellules reste trop attachée au polymère pour que tout le tissu se décolle et les cellules finissent par se rattacher au polymère. C'est donc prometteur car on parvient à avoir des débuts de tissus cellulaires qui se détachent cependant nous n'avons pas réussi à détacher totalement un tissu entier.