

# PROJET GLIOMATRACK

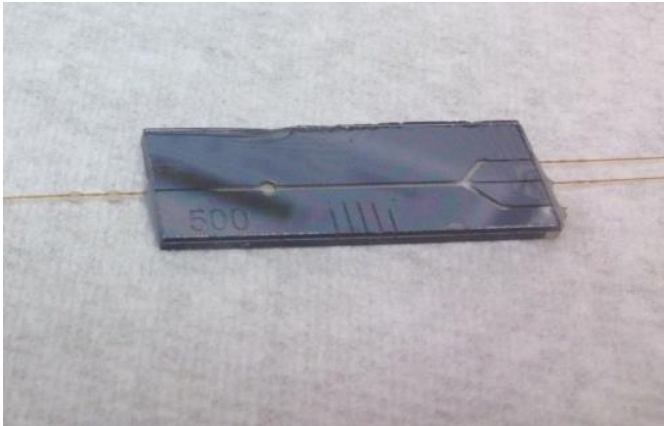
## Avancements



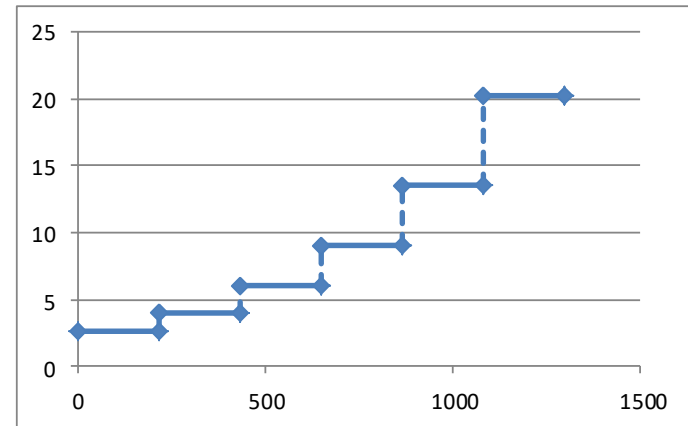
**Mouhamad Ibrahim**  
**19 mars 2015**

# Ancien dispositif

## Problèmes



*Photo d'un ancien dispositif contenant un seul canal, et des accès latéraux (tuyaux 75µm)*



*Profil de débit en créneaux (escalier)*

### ○ Problèmes:

- Accès fluide augmente considérablement la résistance microfluidique du setup
- On ne peut pas atteindre des shear suffisamment importants pour détacher
- Profil de débit en créneaux mis en question
- Stabilisation du débit sur la durée du palier et effet mémoire des cellules ??

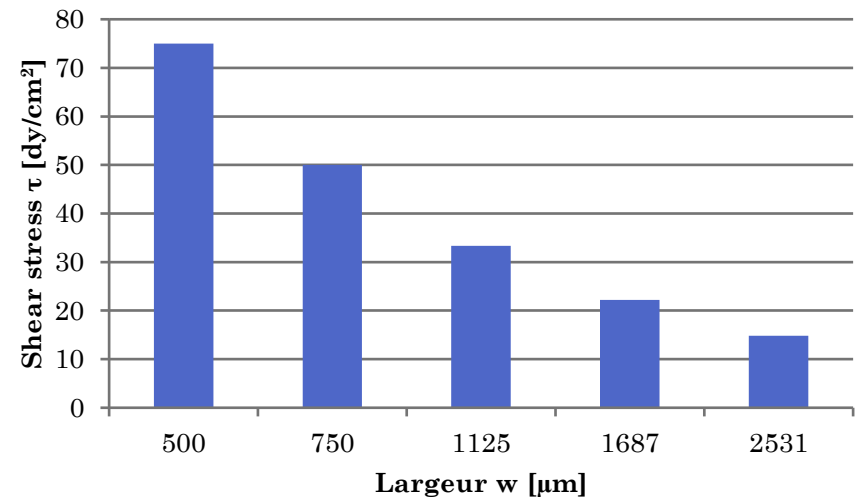
# Nouveau dispositif multishear

## Géométrie et caractéristiques



*Représentatif du détachement des cellules sous shear stress  $\tau$ , contrôlé par un débit  $Q$*

$$\tau_i = \frac{6\mu Q}{w_i h^2}$$



*Valeurs de shear stress  $\tau_i$  nominal pour les 5 zones, induites par un seul débit  $Q=1500\mu\text{l/min}$*

### ○ Caractéristiques

- Large gamme de shear stress : 5 zones de valeurs de shear différentes
- Accès par-dessus, via des tuyaux grands (800μm) d'où la résistance microfluidique faible
- Gamme de valeurs élevées de shear stress (car résistance microfluidique faible)

# SOMMAIRE

## ○ ETUDE SUR VERRE

- Fabrication des dispositifs en Verre
- Banc expérimental
- Résultats sur substrat Verre
- Résultats sur substrat Verre-LN

## ○ ETUDE SUR FIBRES

- Fabrication des dispositifs en PDMS
- Banc expérimental (idem que sur verre)
- Résultats sur substrat Fibres brutes

## ○ CONCLUSION ET PERSPECTIVES

# ETUDE SUR VERRE

# Fabrication des dispositifs en Verre

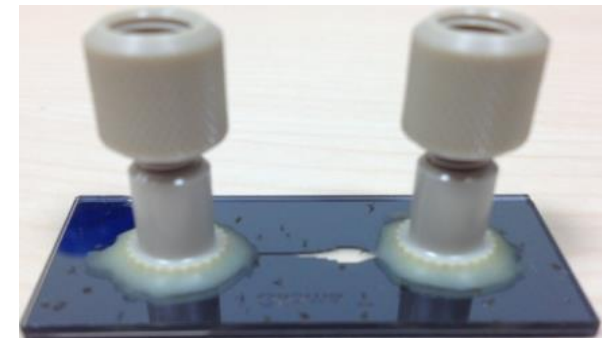
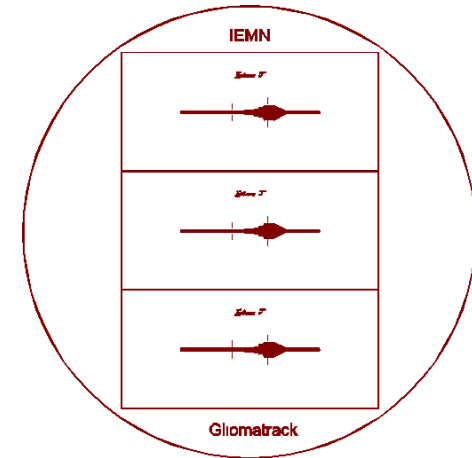
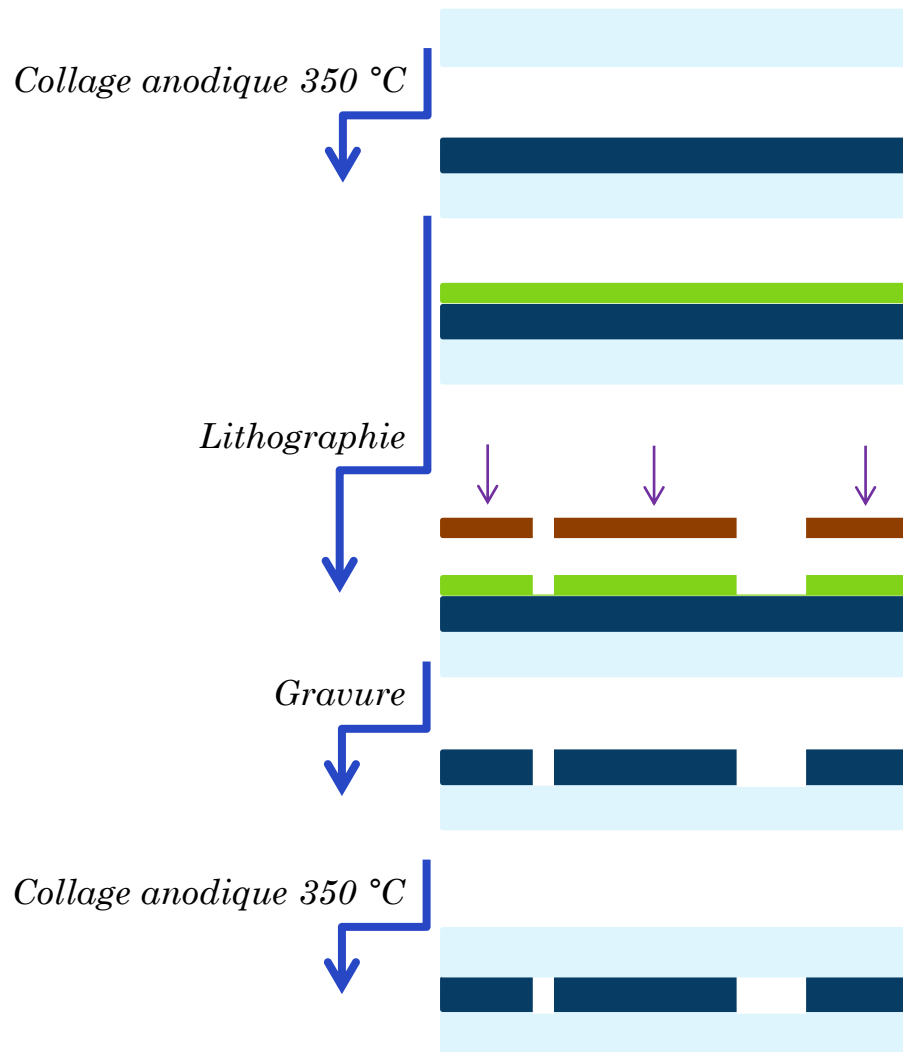
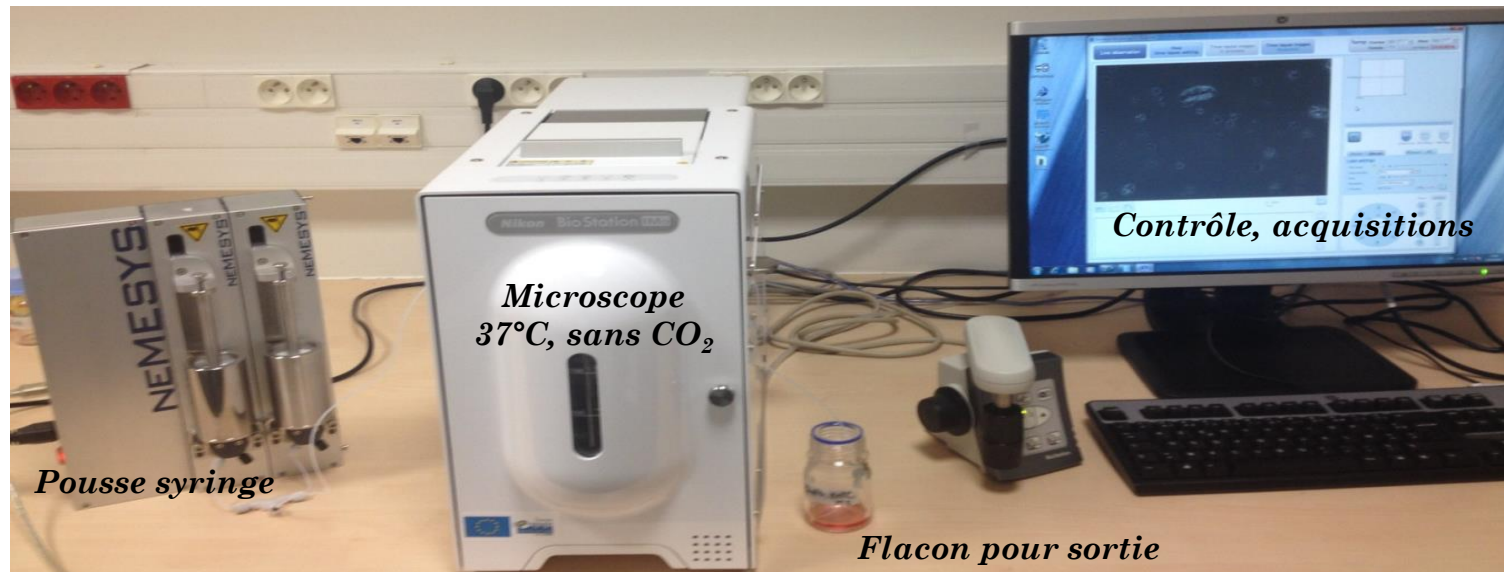


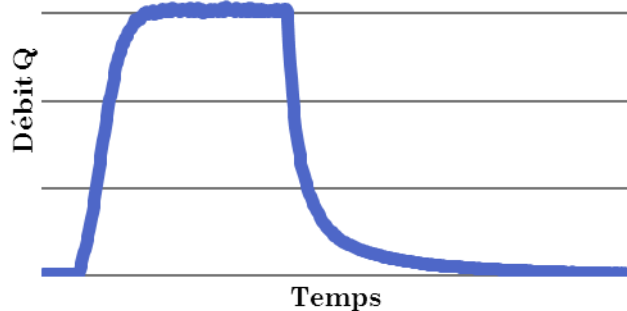
Photo d'un dispo en verre

- Pyrex 700μm
- Silicon 200μm
- Résine
- Masque

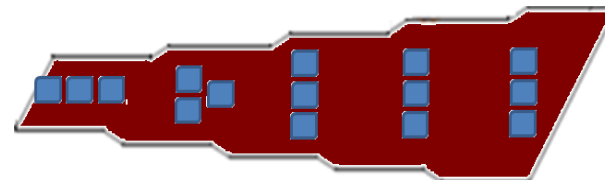
# Banc expérimental



*Banc expérimental de la mesure de taux de détachement*



**Protocole de détachement:** Allure représentative du débit appliqué 2 heures après l'injection des cellules; 1500 µl/min pendant 30 minutes



*Protocole d'imagerie: Time-lapse; 3 champs de vision/zone; 1 image/minute*

# Résultats sur substrat Verre

## Protocole de culture C6

### ○ Nettoyage dispo

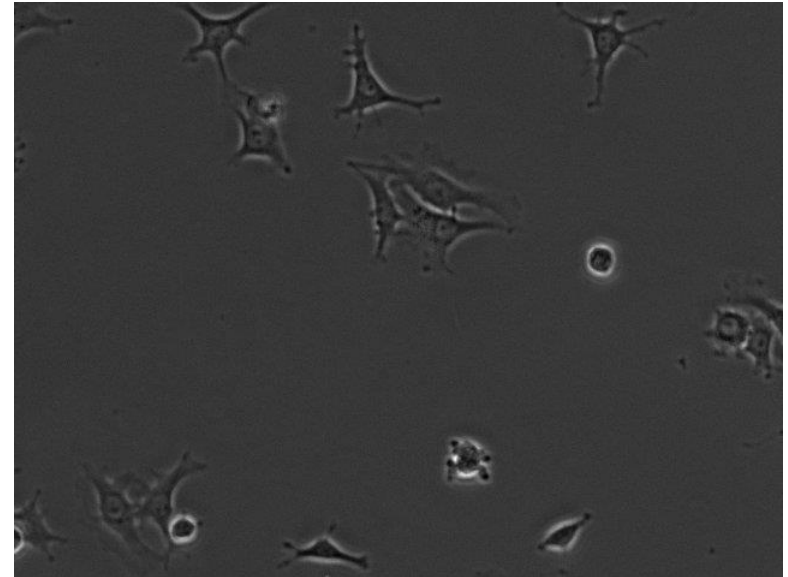
- NaOH—Eau—H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> +Sonication
- Javel—tween20 +Sonication
- UV ozone (60min)
- Javel—tween20 +Sonication

### ○ Stérilisation dispo

- Ethanol 70%
- PBS
- **L15 (sans L-Glutamine)**

### ○ Repiquage cellules

- Trypsinisation (Secouer 30secondes & taper pour décoller)
- Purification (5min, 1000rpm) & **remise dans L15 (sans L-Glutamine)**
- Homogénéisation (15 aller-retour)
- Injection  $5.10^5$  cellules/ml

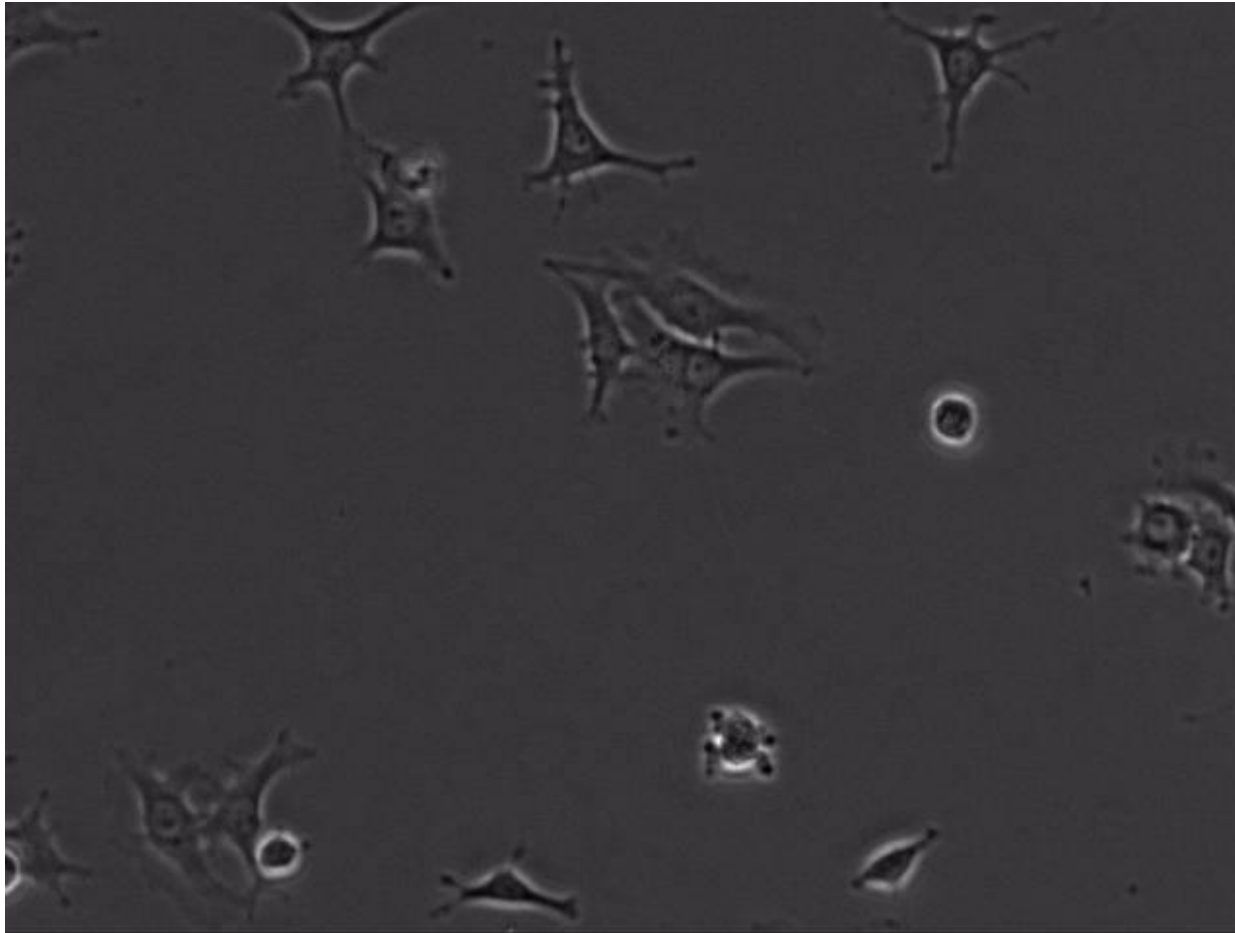


*Photo(415µm\*311µm) prise des cellules  
adhérées sur Verre, 2 heures après injection  
dans le dispositif*



# Résultats sur substrat Verre

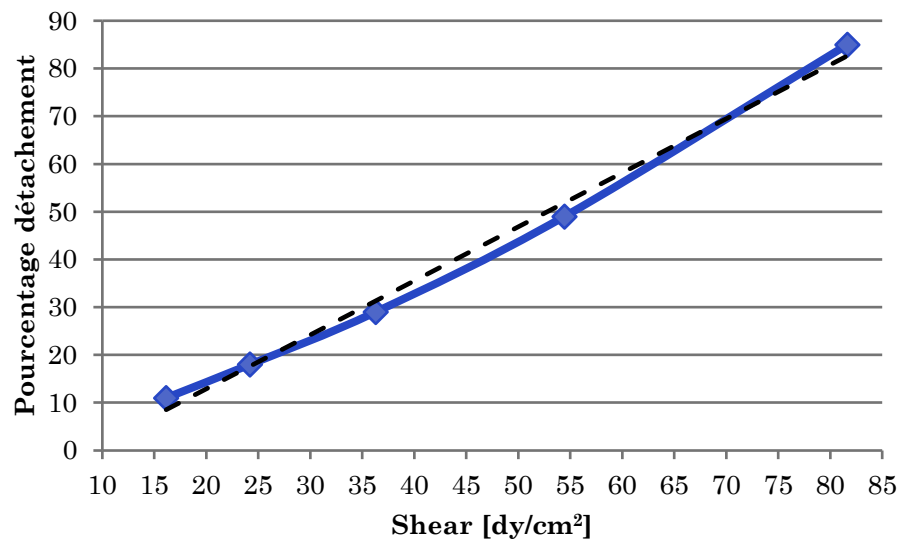
Détachement—Gamme de Shear stress 14-75dy/cm<sup>2</sup>



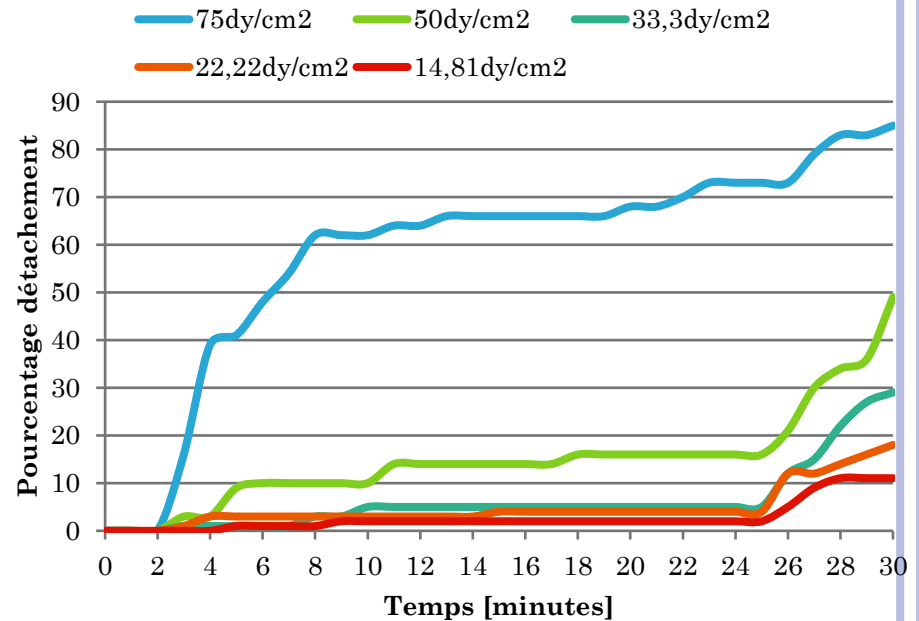
*Vidéo(415μm\*311μm) de détachement de cellules  
Zone de shear stress 50dy/cm<sup>2</sup>  
Temps total 30minutes  
1image/minute*

# Résultats sur substrat Verre

## Détachement—Gamme de Shear stress 14-75dy/cm<sup>2</sup>



Taux de détachement des cellules en fonction du shear  
Densité moyenne: 50cellules/zone



Cinétique du taux de détachement pour différentes valeurs de shear

- Taux de détachement pseudo linéaire en fonction du shear
- Taux critique  $\tau_{50\%} = \sim 55 \text{ dy/cm}^2$
- Détachement brusque après quelques minutes de pousse pour le shear le plus élevé.

# Résultats sur substrat Verre-LN

## Protocole de culture C6—L15 sans L-Glu

### ○ Nettoyage dispo

- NaOH—Eau—H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> +Sonication
- Javel—tween20 +Sonication
- UV ozone (60min)
- Javel—tween20 +Sonication

### ○ Stérilisation dispo

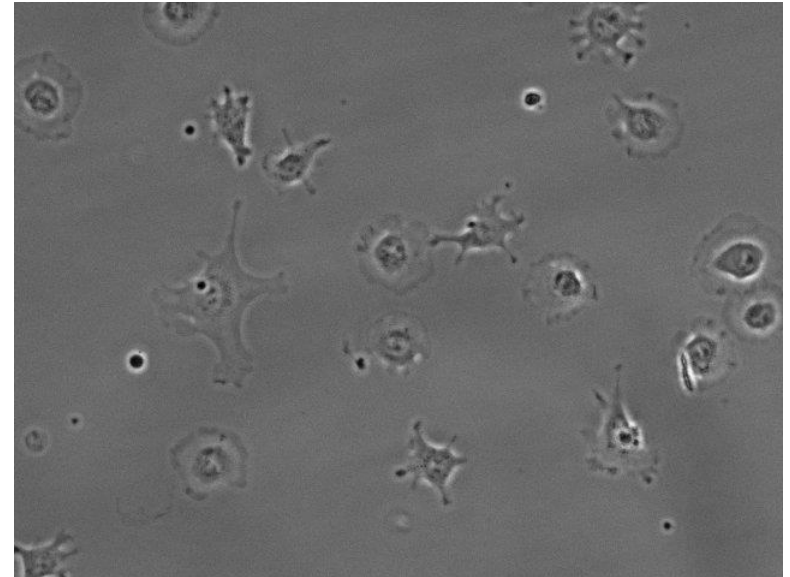
- Ethanol 70%
- PBS

### ○ Fonctionnalisation dispo

- **PDL 25µg/ml—Laminine 4µg/ml**
  - PDL 10µl/min 30minutes
  - PBS 10µl/min 5minutes
  - LN 10µl/min 30minutes
  - PBS 10µl/min 5minutes
- **L15 (sans L-Glutamine)**

### ○ Repiquage cellules

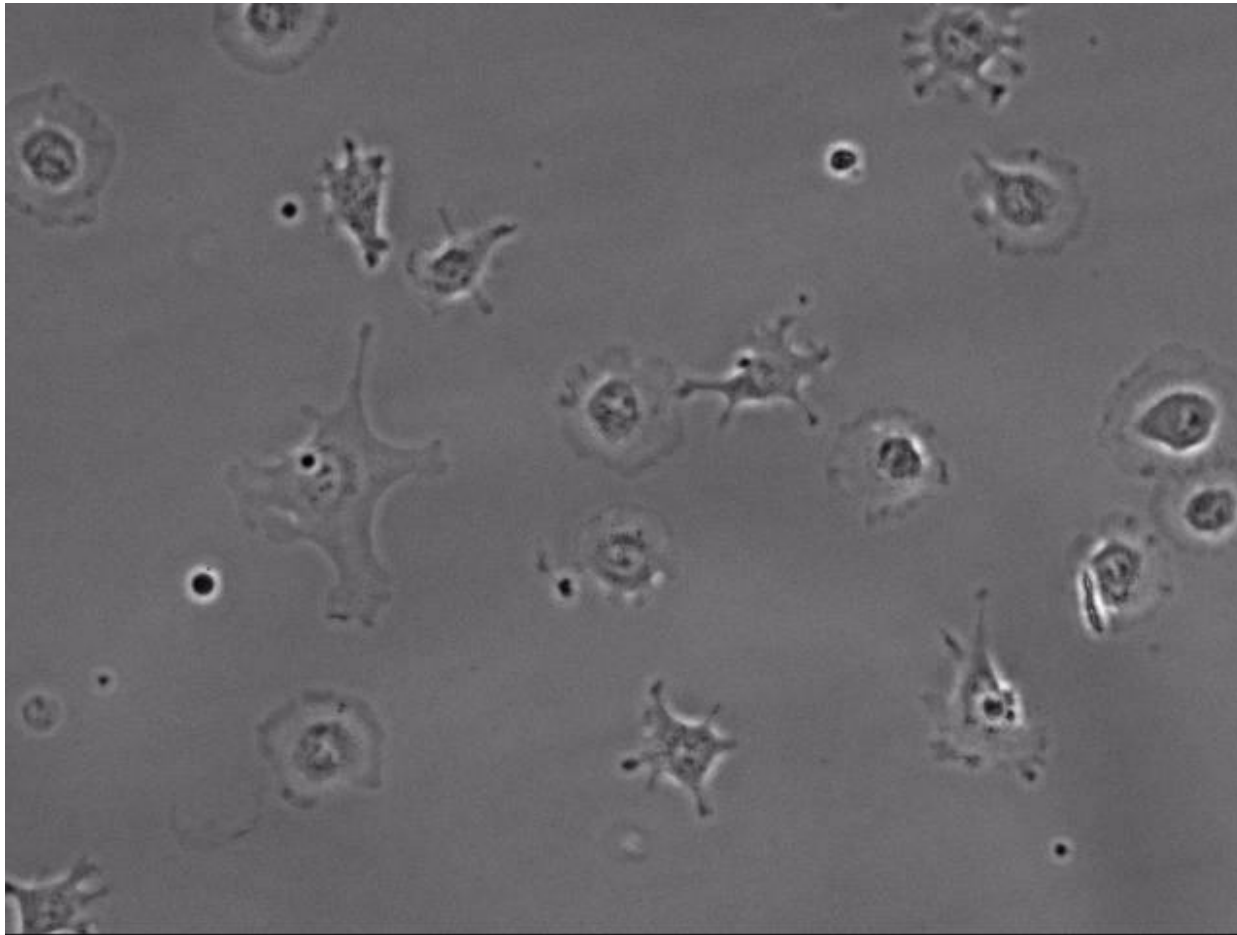
- Trypsinisation (Secouer 30secondes & taper pour décoller)
- Purification (5min, 1000rpm) & **remise dans L15 (sans L-Glutamine)**
- Homogénéisation (15 aller-retour)
- Injection 5.10<sup>5</sup> cellules/ml



*Photo(415µm\*311µm) prise des cellules adhérentes sur Verre-LN , 2 heures après injection dans le dispositif*

# Résultats sur substrat Verre-LN

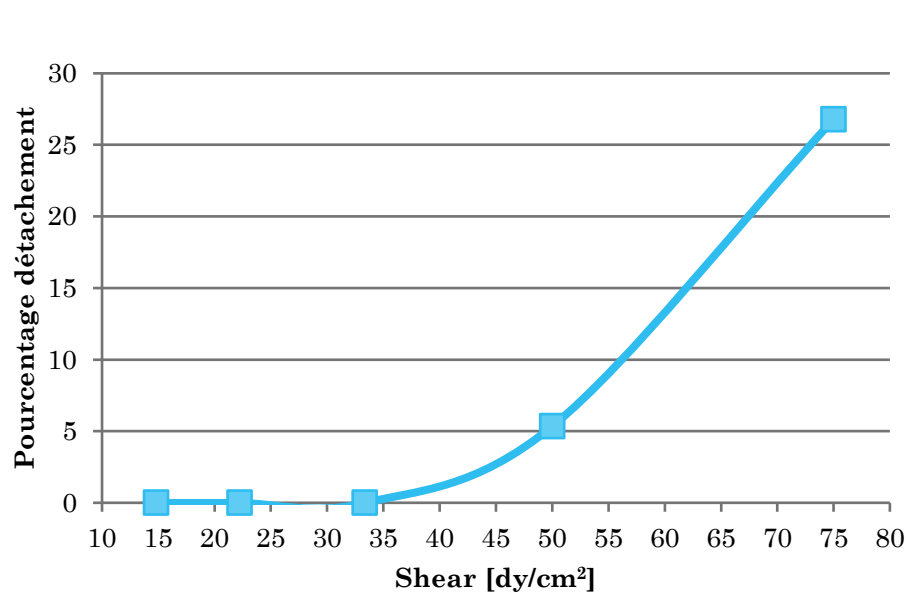
Détachement—Gamme de Shear stress 14-75dy/cm<sup>2</sup>



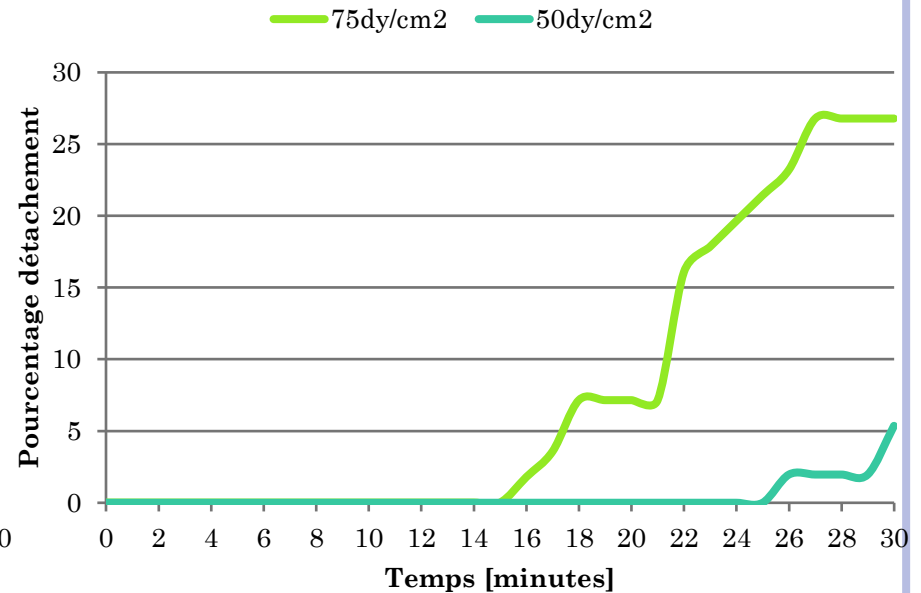
*Vidéo(415μm\*311μm) de détachement de cellules  
Zone de shear stress 75dy/cm<sup>2</sup>  
Temps total 30minutes  
1image/minute*

# Résultats sur substrat Verre-LN

## Détachement—Gamme de Shear stress 14-75dy/cm<sup>2</sup>



*Taux de détachement des cellules en fonction du shear  
Densité moyenne: 60cellules/zone*



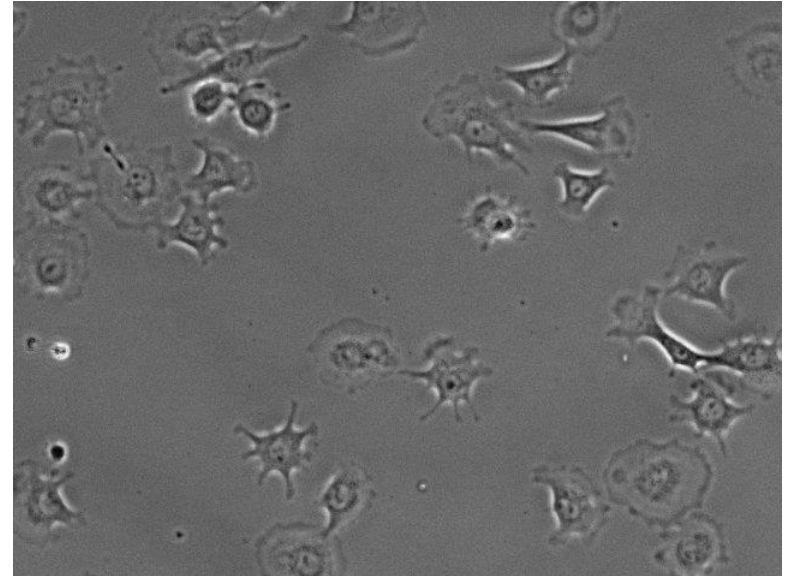
*Cinétique du taux de détachement pour différentes  
valeurs de shear*

- Taux de détachement pseudo exponentiel
- Détachement décalé temporellement par rapport au verre et des taux plus faible

# Résultats sur substrat Verre-LN

## Protocole de culture C6—L15 avec L-Glu

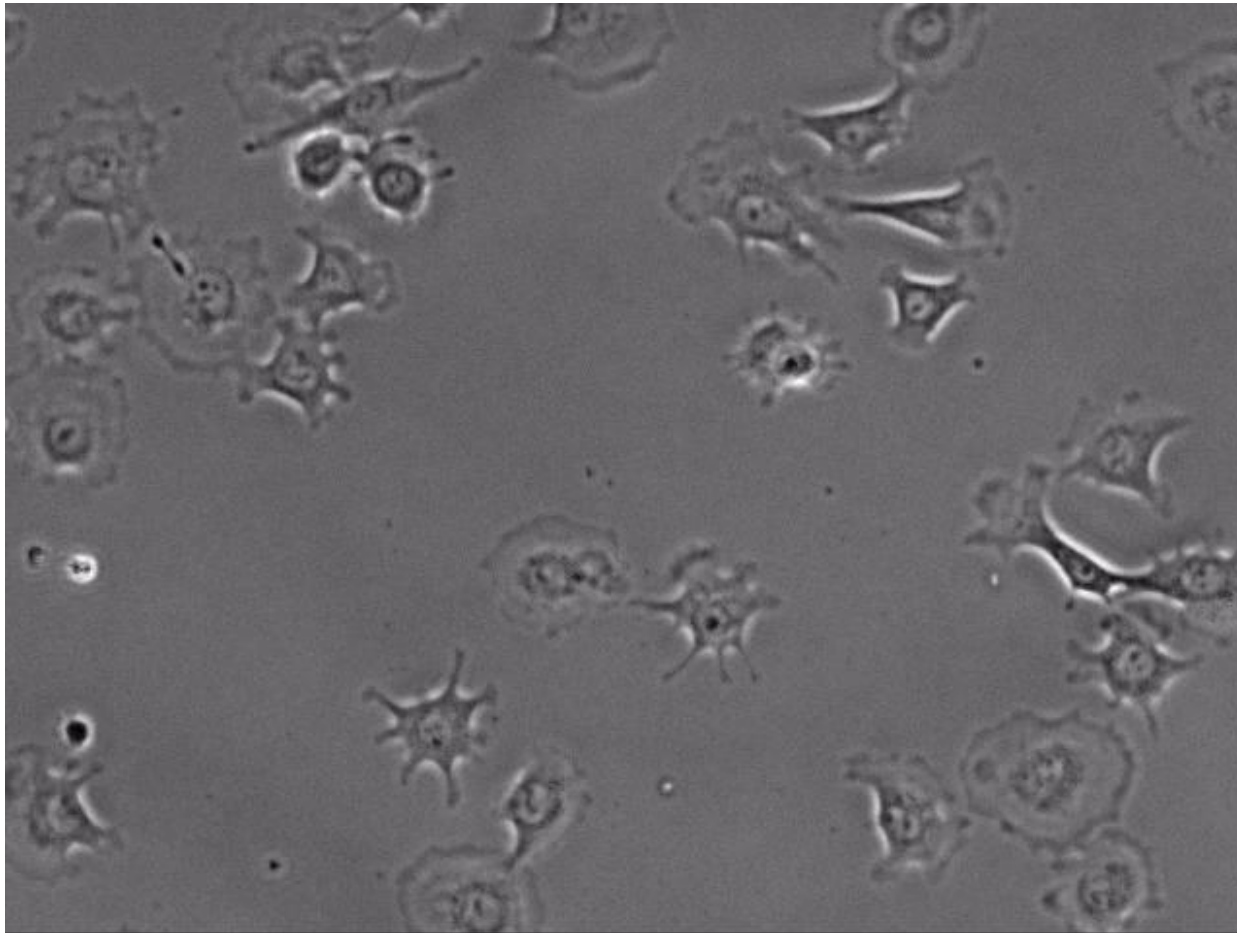
- Nettoyage dispo
  - NaOH—Eau—H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> +Sonication
  - Javel—tween20 +Sonication
  - UV ozone (60min)
  - Javel—tween20 +Sonication
- Stérilisation dispo
  - Ethanol 70%
  - PBS
- Fonctionnalisation dispo
  - PDL 25µg/ml—Laminine 4µg/ml
    - PDL 10µl/min 30minutes
    - PBS 10µl/min 5minutes
    - LN 10µl/min 30minutes
    - PBS 10µl/min 5minutes
  - **L15 (avec L-Glutamine)**
- Repiquage cellules
  - Trypsinisation (Secouer 30secondes & taper pour décoller)
  - Purification (5min, 1000rpm) & **remise dans L15 (avec L-Glutamine)**
  - Homogénéisation (15 aller-retour)
  - Injection 5.10<sup>5</sup> cellules/ml



*Photo(415µm\*311µm) prise des cellules adhérentes sur Verre-LN , 2 heures après injection dans le dispositif*

# Résultats sur substrat Verre-LN

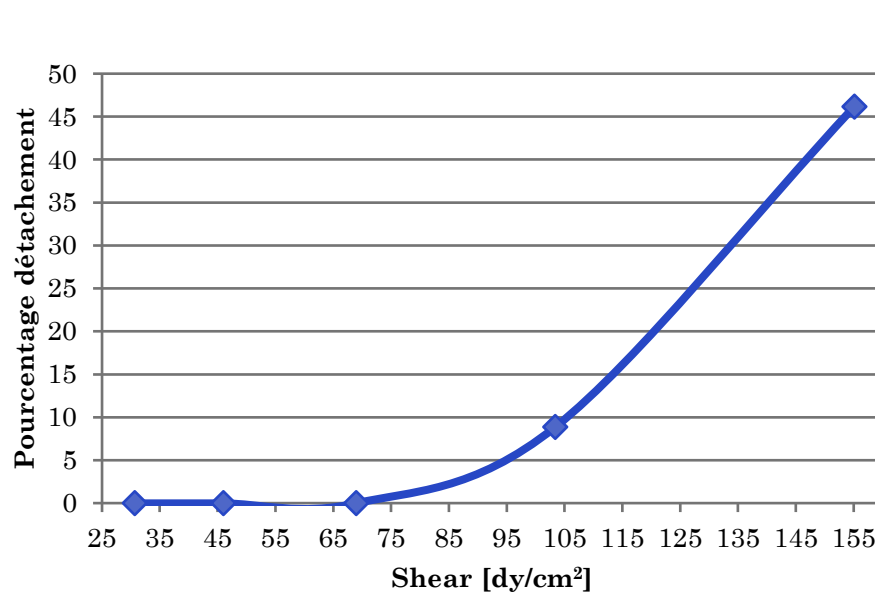
Détachement—Gamme de Shear stress 30-155dy/cm<sup>2</sup>



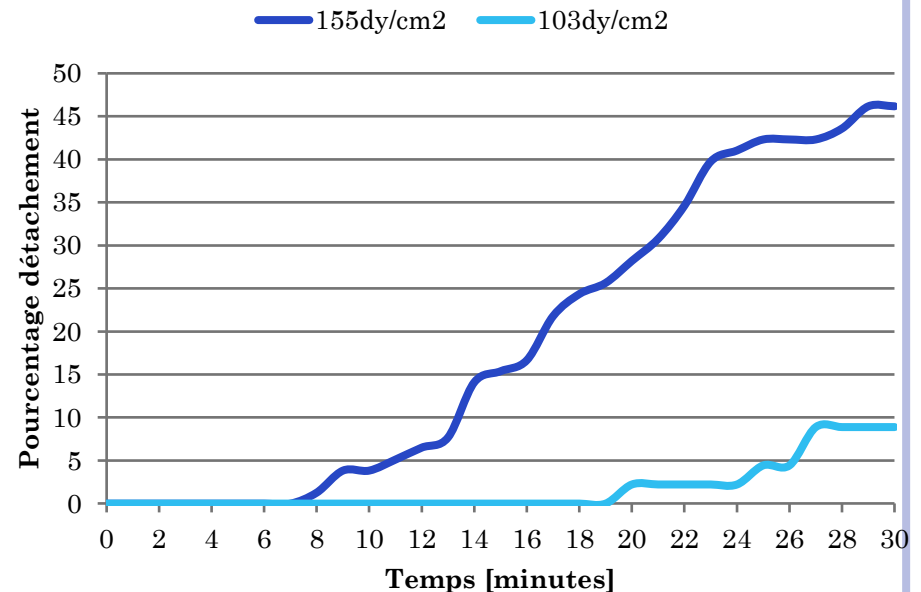
*Vidéo(415μm\*311μm) de détachement de cellules  
Zone de shear stress 155dy/cm<sup>2</sup>  
Temps total 30minutes  
1image/minute*

# Résultats sur substrat Verre-LN

## Détachement—Gamme de Shear stress 30-155dy/cm<sup>2</sup>



*Taux de détachement des cellules en fonction du shear  
Densité moyenne: 60cellules/zone*



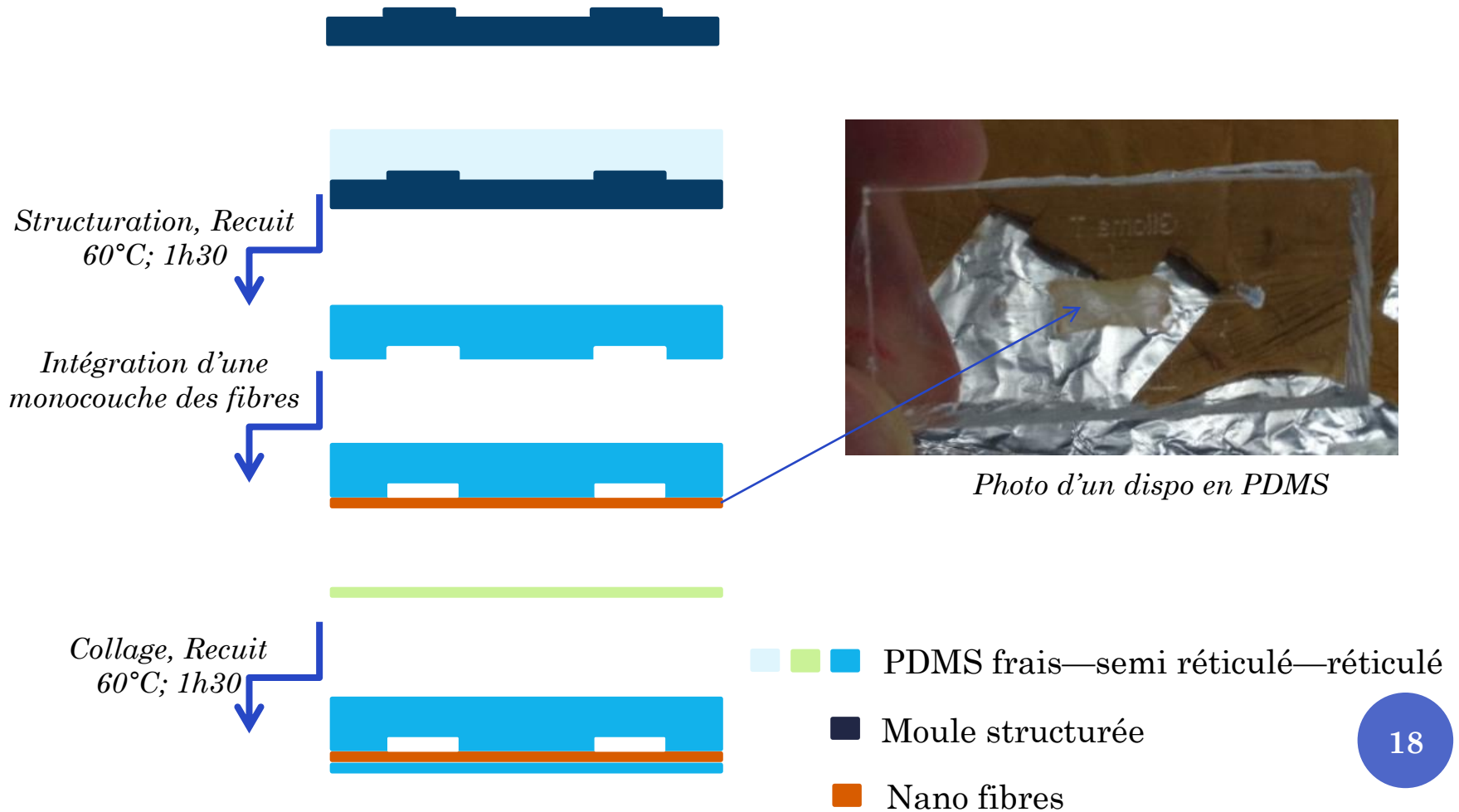
*Cinétique du taux de détachement en fonction du temps pour différentes valeurs de shear*

- **L-Glutamine** semble renforcer l'adhésion cellulaire ??
- Tendance d'évolution linéaire du taux de détachement en fonction du temps

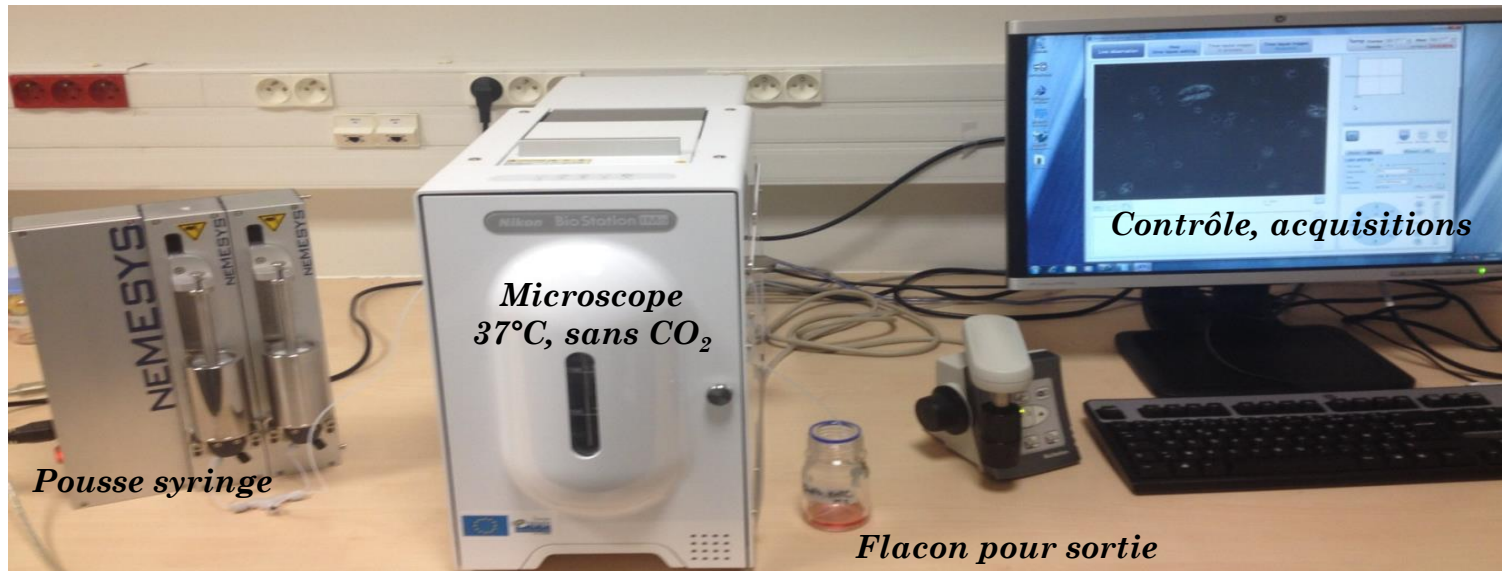


# ETUDE SUR FIBRES

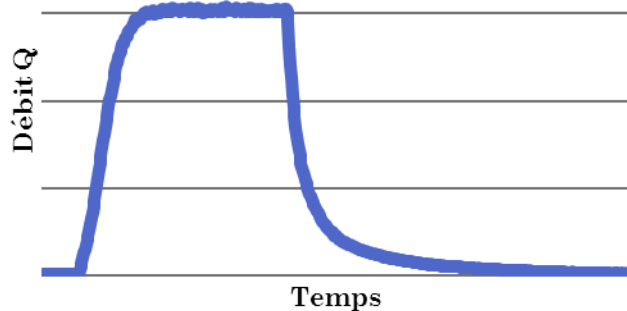
# Fabrication des dispositifs en PDMS



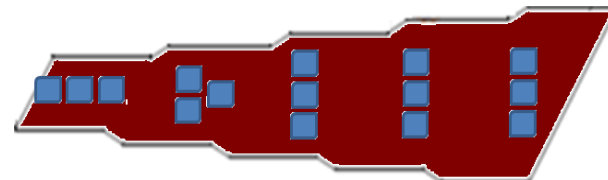
# Banc expérimental (idem que sur verre)



*Banc expérimental de la mesure de taux de détachement*



**Protocole de détachement:** Allure représentative du débit appliqué 2heures après l'injection des cellules; 1500 $\mu$ l/min pendant 30minutes



*Protocole d'imagerie: Time-lapse; 3 champs de vision/zone; 1image/minute*

# Résultats sur substrat Fibres

## Protocole de culture C6

### ○ Stérilisation dispo

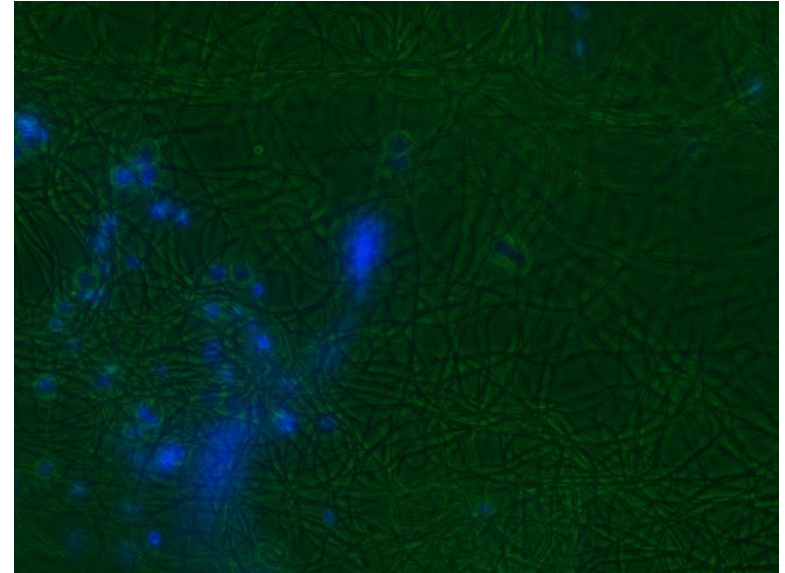
- Ethanol 70%
- PBS
- **L15 (sans L-Glutamine)**

### ○ Marquage cellules

- Incubation –Hoechst 33342- 30minutes
- avant repiquage
- 0.5µl/ml

### ○ Repiquage cellules

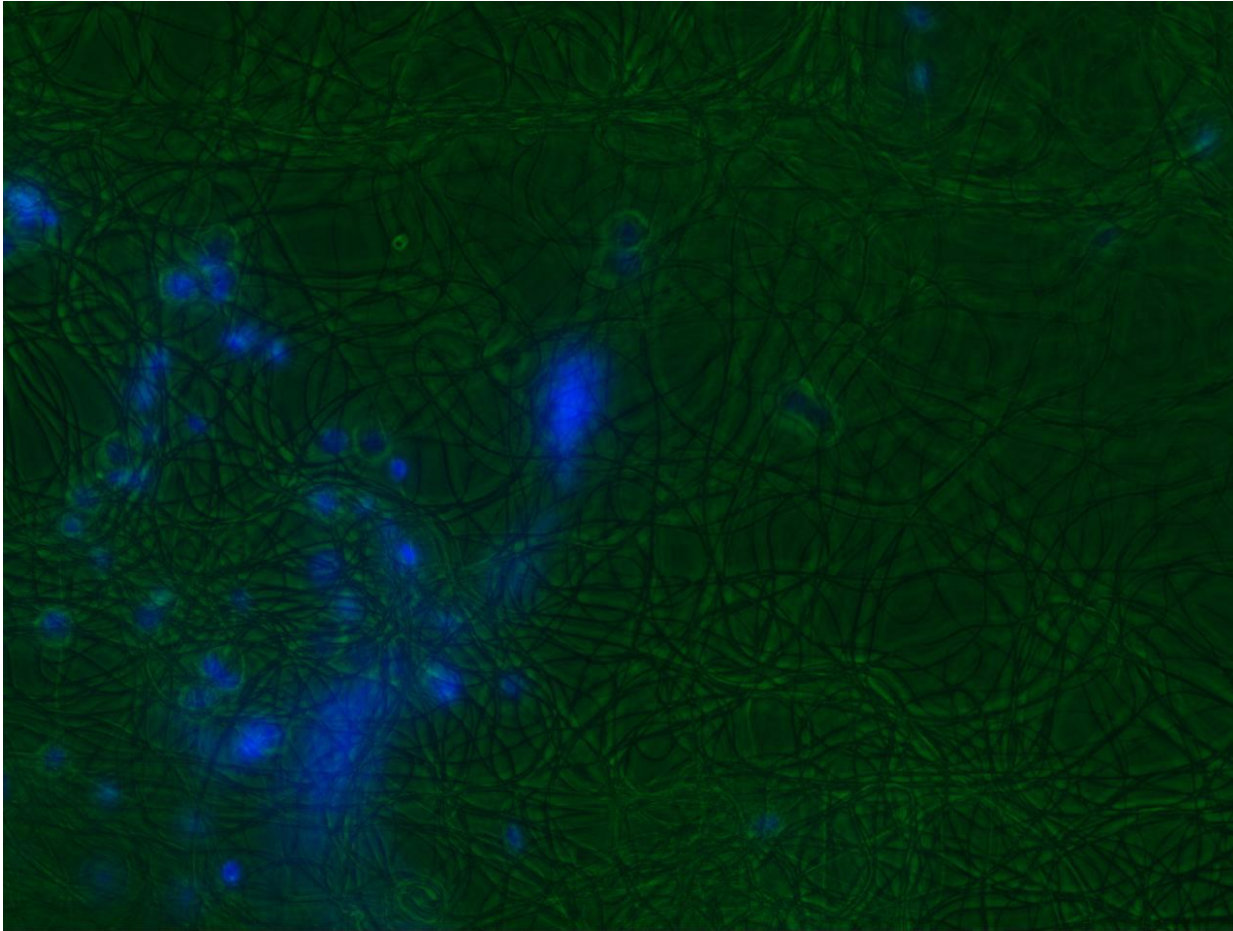
- Trypsinisation (Secouer 30secondes & taper pour décoller)
- Purification (5min, 1000rpm) & **remise dans L15 (sans L-Glutamine)**
- Homogénéisation (15 aller-retour)
- Injection  $5.10^5$  cellules/ml



*Photo(415µm\*311µm) prise des cellules (noyau en bleu) accrochées sur Fibres brutes non alignés (auto-fluorescentes en vert) , 2 heures après injection dans le dispositif*

# Résultats sur substrat Fibres

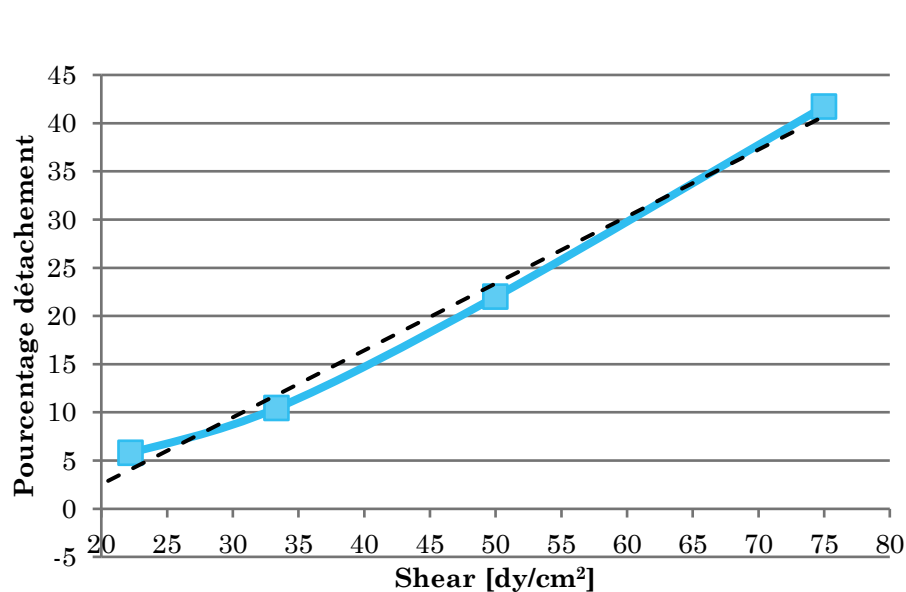
Détachement—Gamme de Shear stress 20-75dy/cm<sup>2</sup>



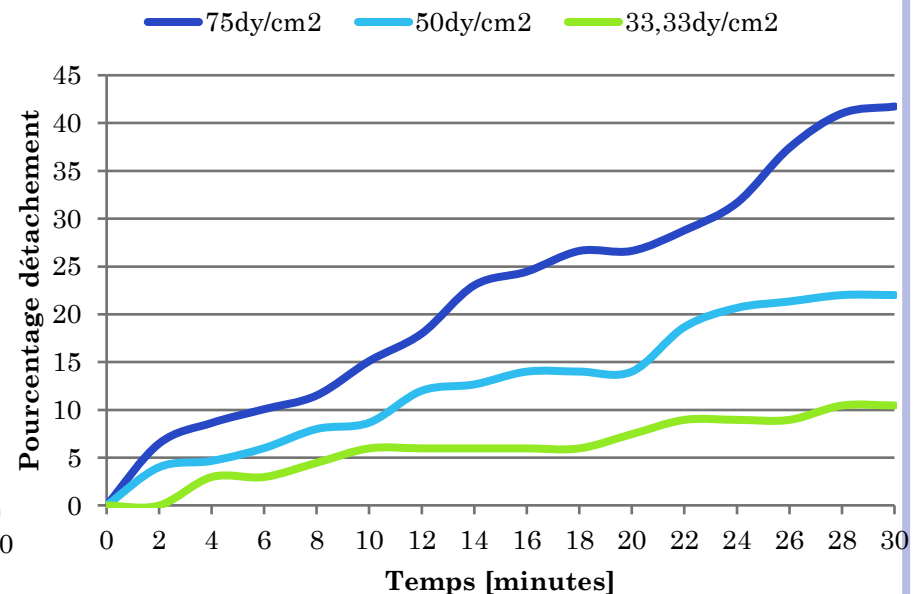
*Vidéo(415μm\*311μm) de détachement de cellules  
Zone de shear stress 75dy/cm<sup>2</sup>  
Temps total 30minutes  
1image/2minute*

# Résultats sur substrat Fibres

## Détachement—Gamme de Shear stress 20-75dy/cm<sup>2</sup>



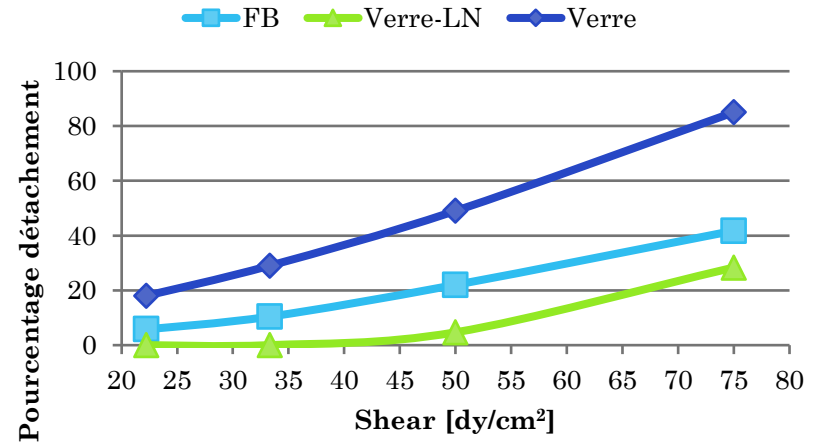
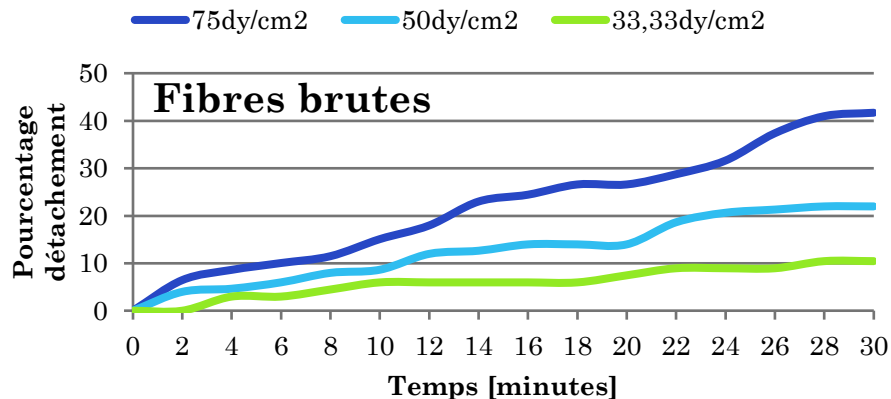
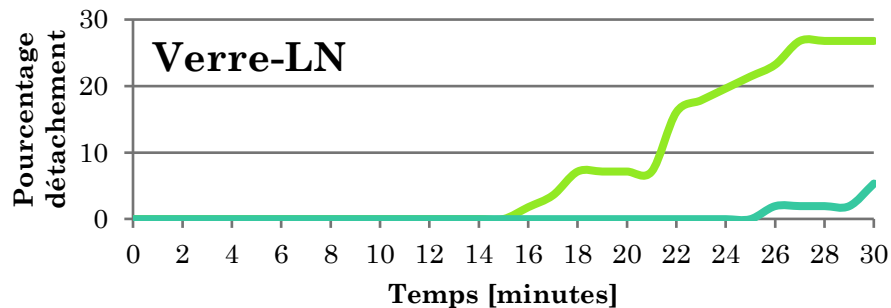
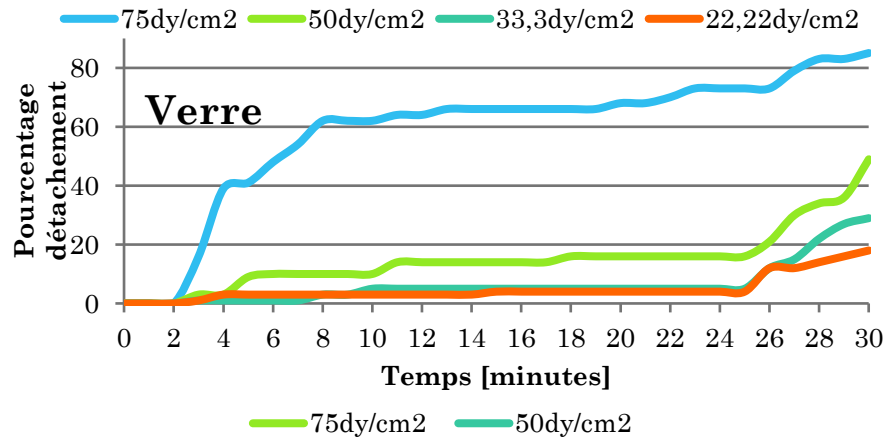
Taux de détachement des cellules en fonction du shear  
Densité moyenne: 130cellules/zone



Cinétique du taux de détachement pour différentes valeurs de shear

- Evolution pseudo linéaire du taux de détachement en fonction du shear
- Les cellules semblent avoir une meilleure adhérence sur fibres (3D) que sur du verre (2D)

# Résultats sur différents substrats



- Évolutions de cinétique différentes pour les détachements sur les différents substrats
- Les cellules adhèrent mieux sur les fibres que sur verre
- Les cellules adhèrent mieux sur verre-LN que sur verre



# CONCLUSION

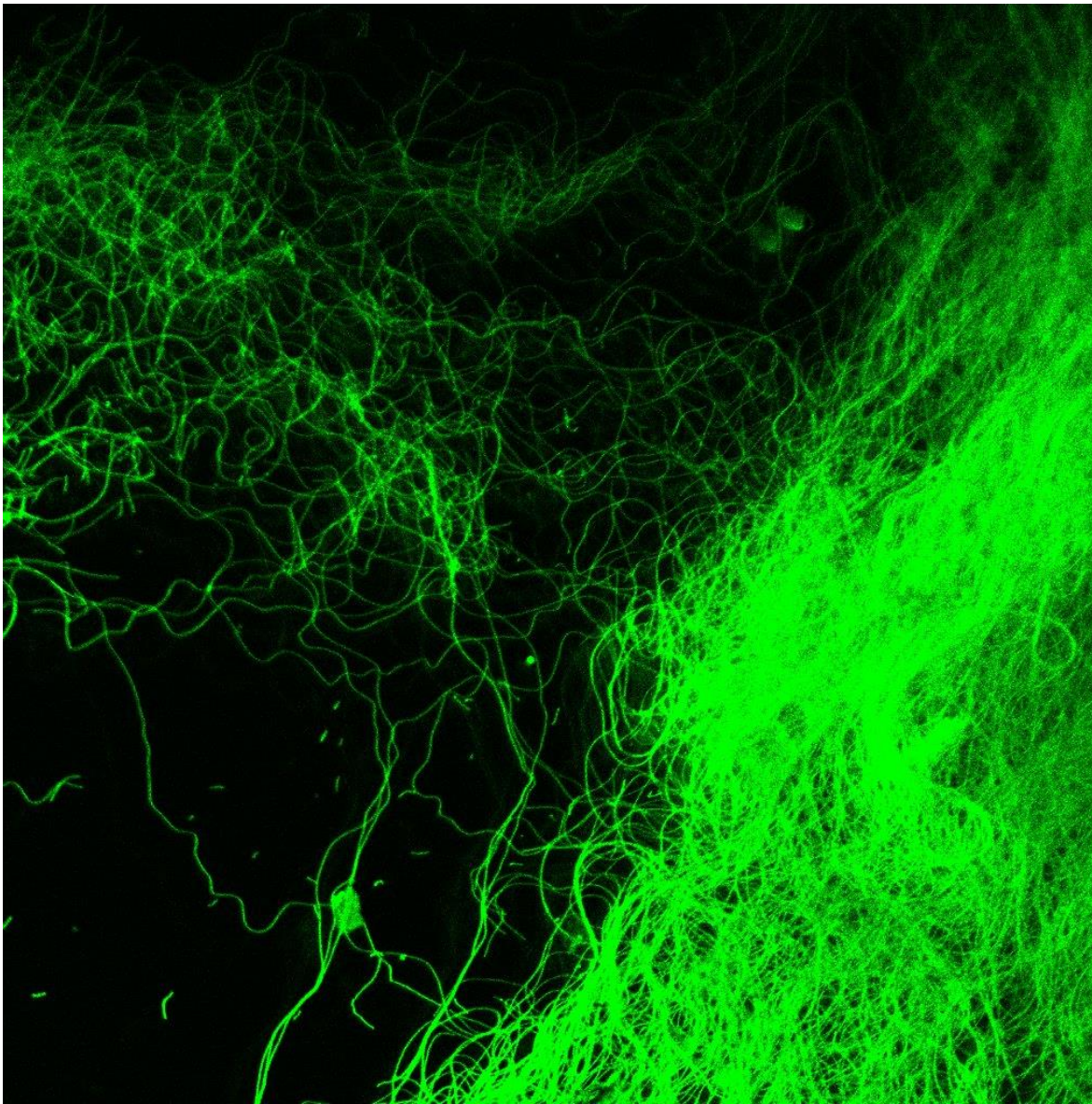
- Réalisation dispositifs microfluidiques multishear
  - Large gamme de shear stress
  - Verre et PDMS
  - Intégration des nanofibres
- Culture cellulaire dans différents environnements
  - 2D (verre et verre-LN)
  - **3D (fibres)**
- Mesure de taux de détachement
  - Verre
    - **Détachement « linéaire » en fonction du shear**
  - Verre-LN
  - Fibres brutes 3D
    - **Détachement « linéaire » en fonction du shear**
    - **Détachement « linéaire » en fonction du temps**



# PERSPECTIVES

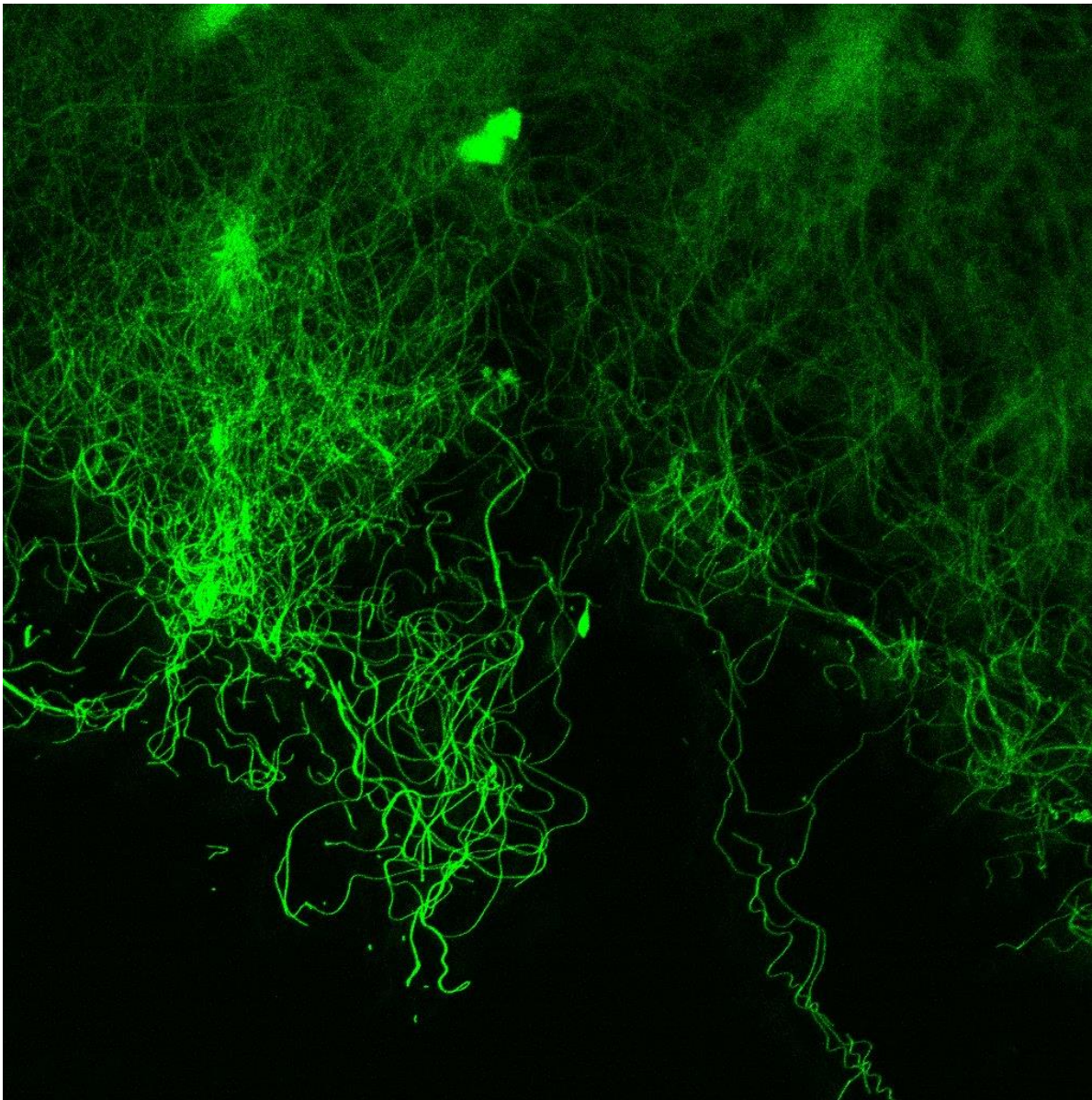
- Mesure de taux de détachement critique  $\tau_{50\%}$ 
  - Verre-LN
  - Fibres brutes
  - Fibres-LN
- Détachement sur matériau de fibres en système 2D (plan)
  - 3D vs 2D
- Publication des résultats

# ANNEXES

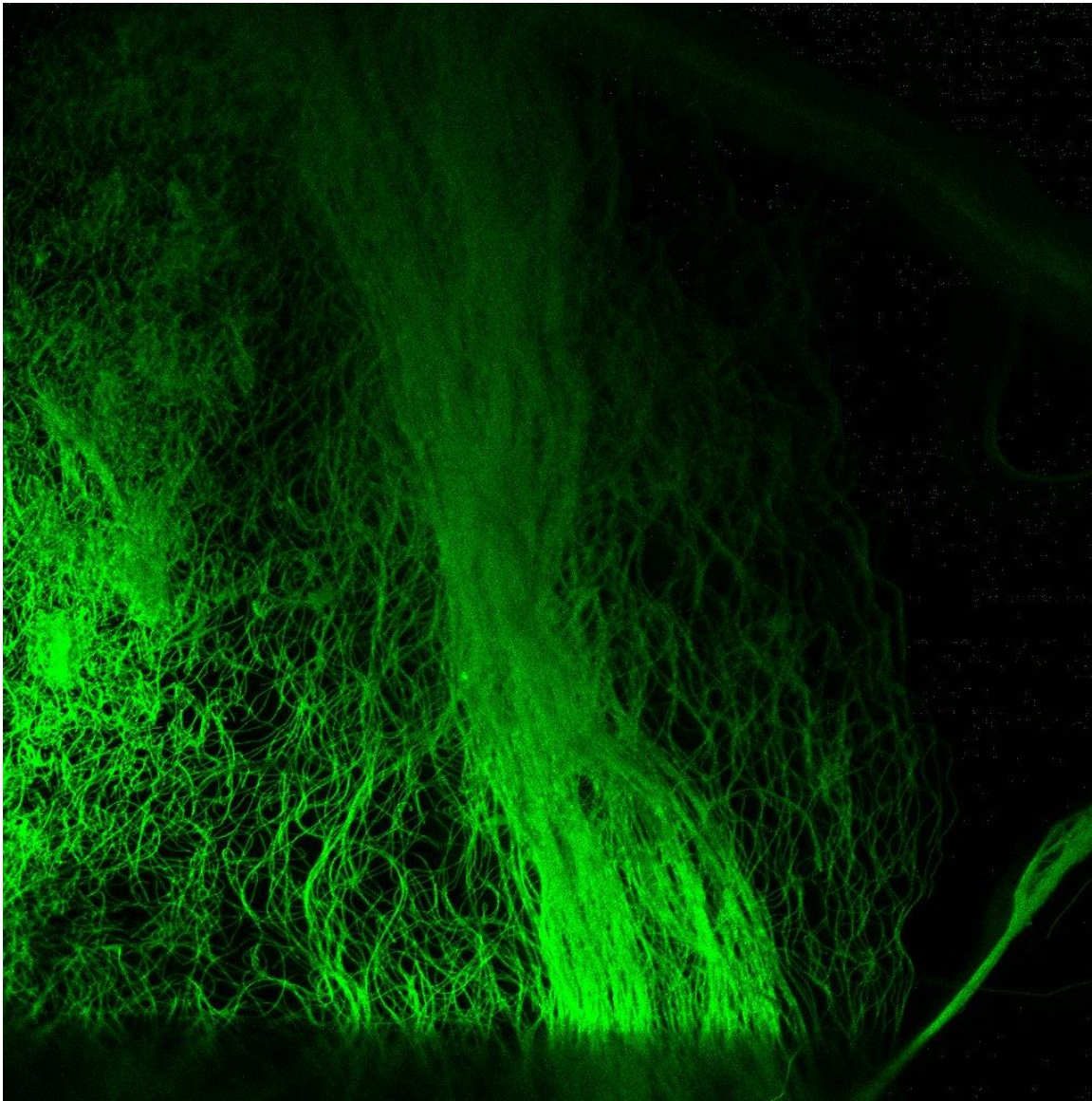


*Photo confocale des fibres non fonctionnalisées*

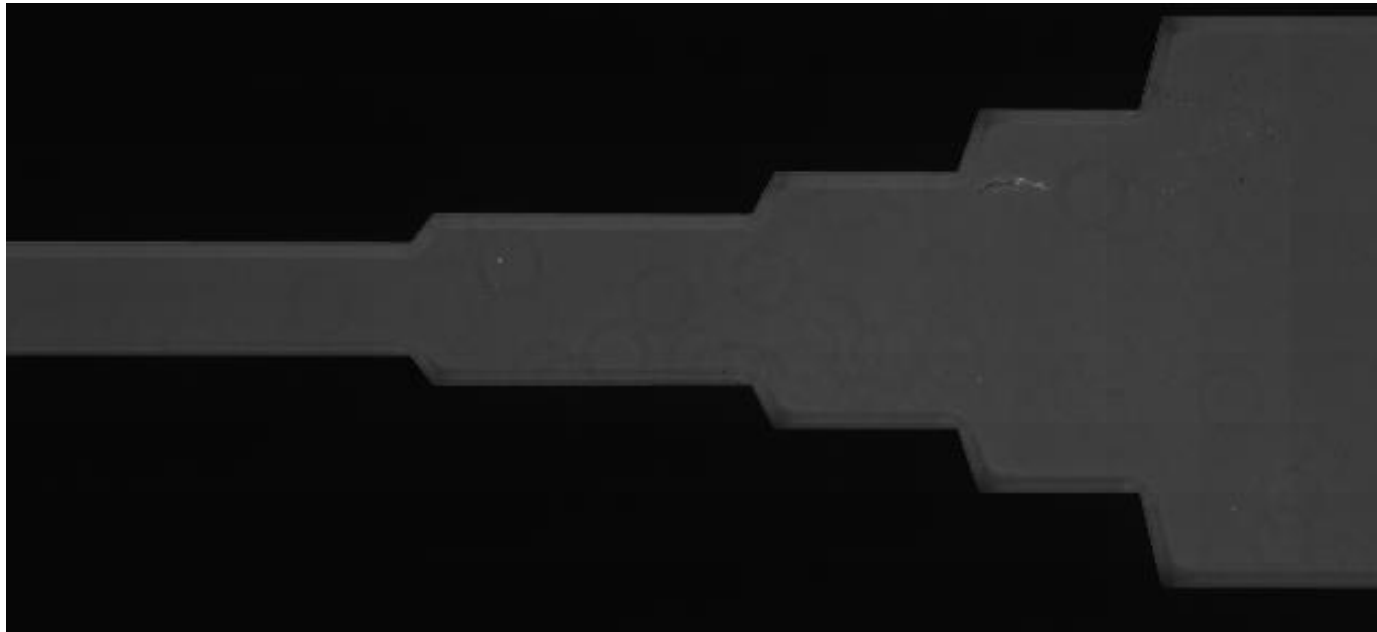




*Photo confocale des fibres fonctionnalisées LN*



*Photo confocale des fibres fonctionnalisées LN*

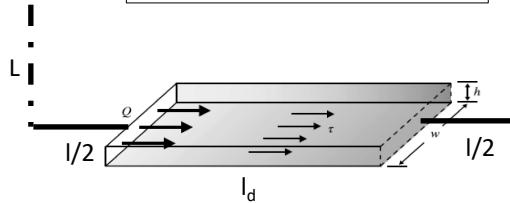


*Photo dispo 6mm\*3mm*

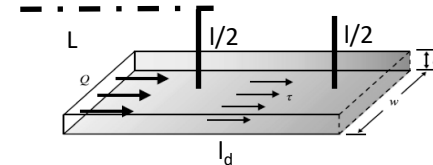


# Pression & accès

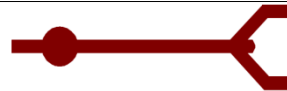
Accès par les cotés



Accès par dessus



## Tests (Nemesys)



✓ *Expérim.* :

$Q = 1.7 \text{ ml/min} \rightarrow \Delta p = 15 \text{ bar}$

✓ *Théo.* :

$\Delta p = R_h Q = 16 \text{ bar}$

$R_h = [8\mu l / \pi (d/2)^4 + 8\mu L / \pi (D/2)^4 + 12\mu l_d / wh^3 (1 - 0.63h/w)] Q$   
 $L = 50 \text{ cm}; l = 4.5 \text{ cm}; D = 800 \mu\text{m}; d = 75 \mu\text{m}; l_d = 2 \text{ cm}; w = 500 \mu\text{m}; h = 200 \mu\text{m}$   
 $\Delta p_{\text{limite}} = 20 \text{ bar} = 20 \times 10^6 \text{ dyn/cm}^2$

✓ *Théo.* :

$\Delta p = R_h Q = 2 \text{ bar}$

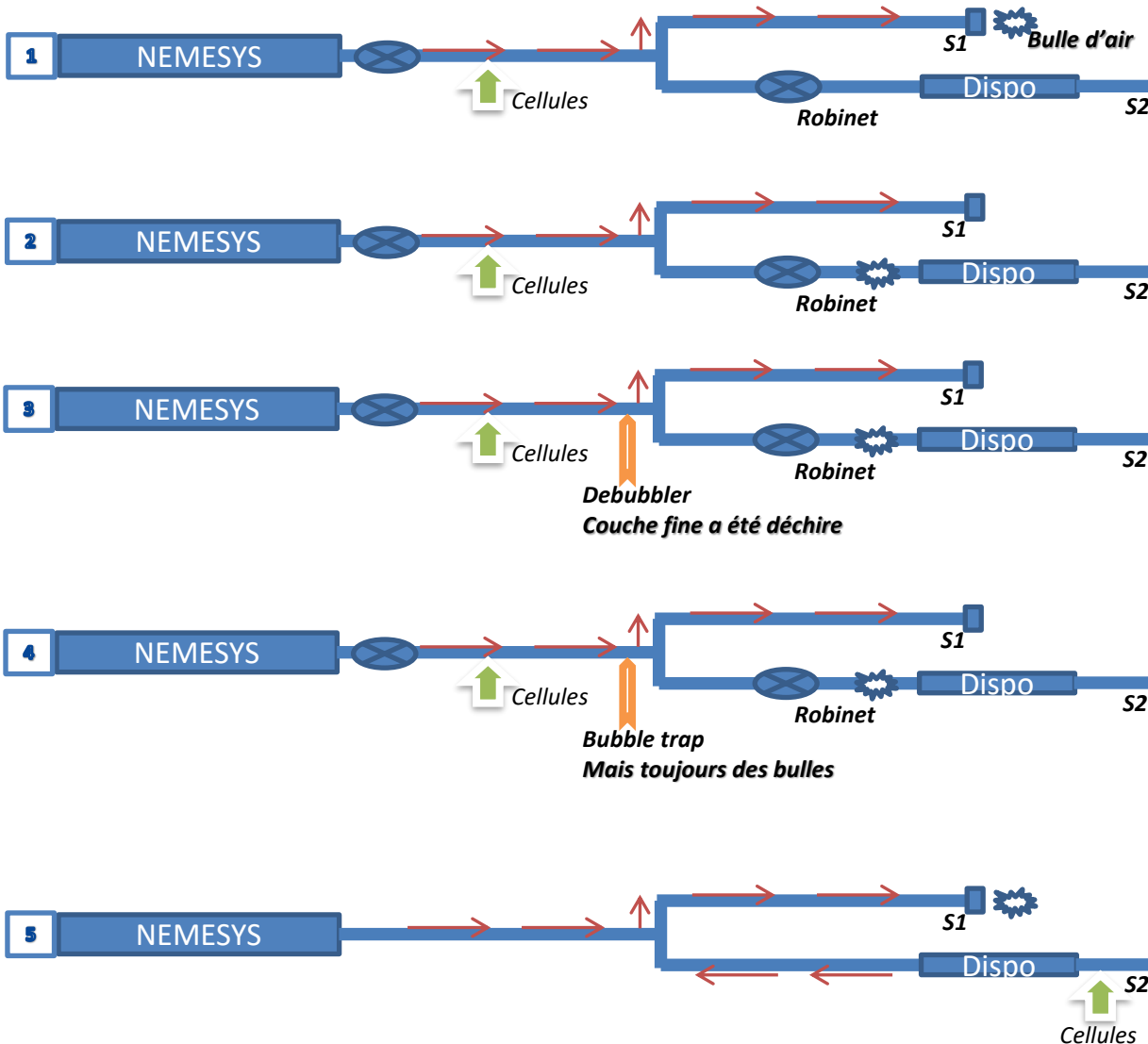
$Q = 1.7 \text{ ml/min}$

$R_h = [8\mu l / \pi (d/2)^4 + 8\mu L / \pi (D/2)^4 + 12\mu l_d / wh^3 (1 - 0.63h/w)] Q$   
 $L = 80 \text{ cm}; l = 10 \text{ cm}; D = 800 \mu\text{m}; d = 150 \mu\text{m}; l_d = 2.5 \text{ cm}; w = 500 \mu\text{m}; h = 100 \mu\text{m}$   
 $\Delta p_{\text{limite}} = 20 \text{ bar} = 20 \times 10^6 \text{ dyn/cm}^2$



# Démarches faites

## —Bulles d'air—



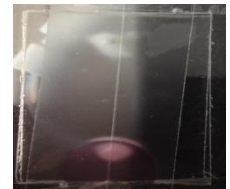
Tube 800 $\mu$ m diamètre interne

Tube 300 $\mu$ m diamètre interne

Debubblen en PDMS  
Chambre:  $h=2$ ;  $l=38$ ;  $w=25$ mm  
Couche fine 500 $\mu$ m



Bubble trap en PDMS  
Collage lame verre  
sur la couche fine

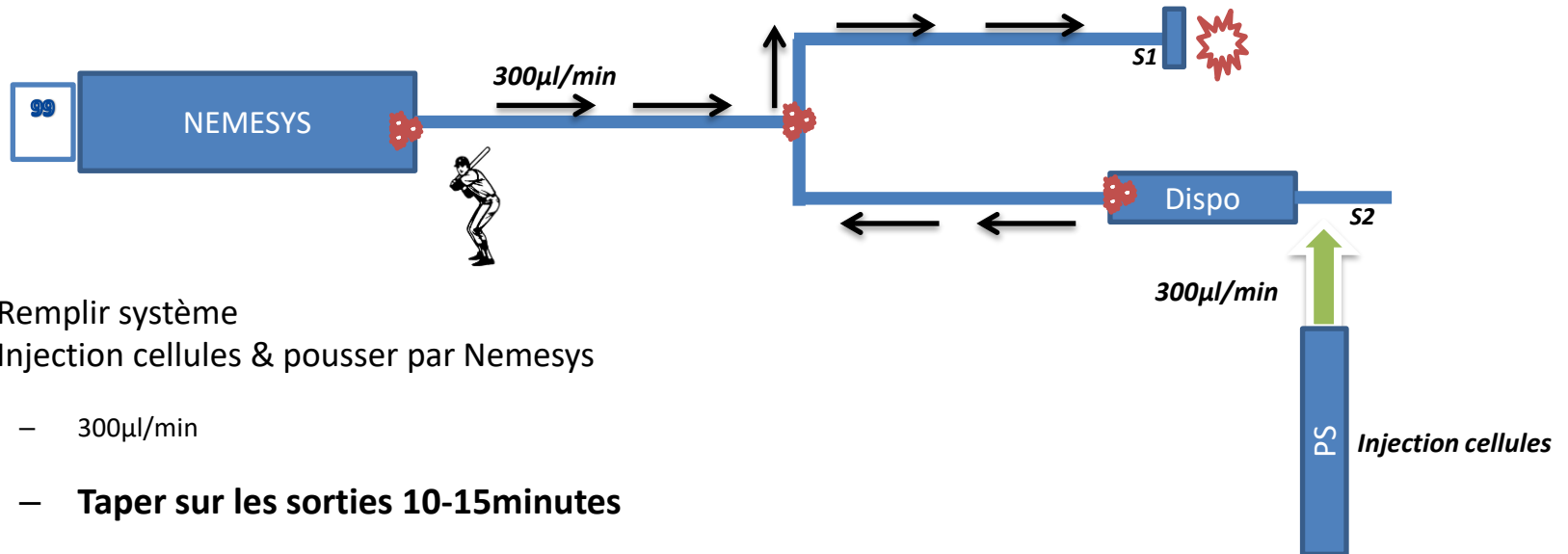


Pas de robinets



# Élimination

## — Bulles d'air



- Remplir système
- Injection cellules & pousser par Nemesys
  - $300\mu\text{l}/\text{min}$
  - **Taper sur les sorties 10-15minutes**