

---

# Protocoles et Méthodes

---

Julie Brun, Huiyin Liu, Fanny Delille

Nous avons au cours de notre PSE synthétisé deux types de matrice extracellulaire synthétique : une matrice en polylactide (PLA) et un hydrogel de polyéthylène glycol (PEG) et de polylactide (PLA). Voici les protocoles associés à ces synthèses.

(Attention, certains réactifs et solvants sont à manipuler avec précautions, il est important de se renseigner avant d'envisager une manipulation)

## 1 LA MATRICE DE POLYLACTIDE

### 1.1 PROTOCOLE DE LA SYNTHÈSE DE PLA

*Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer* Cynthia D'Avila Carvalho Erbeta1 et al. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2012, 3, 208-225

Produits	Matériel
dl-lactide (TCI europe NV,L0091, 25 g 44 euros)	Etuve à 60-70°C
stannous octoate (Sigma-Aldrich,S3252-100G, 34,8 euros)	Flux d'azote
alcool laurylique (Sigma-Aldrich, 261718-1KG-K, 37 euros)	Seringue et ballon de baudruche
dichlorométhane anhydre	Ballon de 50mL
méthanol anhydre	Septum
	agitateur magnétique chauffant
	olive magnétique
	Thermomètre
	crystallisateur, huile siliconé
	Support élévateur
	seringue hamilton
	filtre Buchner

#### Protocole

La synthèse s'est déroulée sous atmosphère d'azote et sans trace d'eau. Le matériel utilisé a été préalablement mis à sécher à l'étuve. 8,5g de dl-lactide ont été introduits dans un ballon de 50mL rempli d'azote grâce à un flux d'azote provenant de la bouteille. Pour garantir l'atmosphère d'azote tout au long de la réaction le ballon est fermé par un septum dans lequel est plantée une aiguille reliée à un ballon de baudruche rempli d'azote (voir Fig 1). Le dl-lactide est fondu sous agitation magnétique au bain marie avec un bain d'huile siliconé maintenu à 175°C. Une fois le dl-lactide fondu sont ajoutés au milieu réactionnel 1,4µL de stannous octoate (0,02% de la masse de lactide) puis 1,1µL

d'alcool laurylique (0,01% de la masse de lactide) avec une seringue hamilton perçant le septum. Le mélange réactionnel est agité pendant 10 minutes à 175°C puis pendant 2heures à 200°C pendant lesquelles le polymère prend en masse. A la fin de la polymérisation le polymère du dichlorométhane anhydre est ajouté sous agitation jusqu'à dissolution complète du produit. Le polymère est ensuite précipité dans un excès de méthanol anhydre, filtré sur Buchner et mis à sécher à l'étuve à 60-70°C à masse constante. Le produit est caractérisé par DSC et RMN du proton.



FIGURE 1.1 – Montage de réaction sous atmosphère inerte

## 1.2 PROTOCOLE SYNTHÈSE DU SEL POROGENÈ

*A new generation of sodium chloride porogen for tissue engineering*, Richard T. Tran and al., *Biotechnology and Applied Biochemistry*

Produits	Matériel
dNaCl ( Sigma-Aldrich, 378860-10G, 50,10€)	Ballon de 500mL
Eau ultrapure	Ballon bicol de 500mL
	Montage à reflux
	Thermomètre adapté sur un bouchon du ballon
	Agitateur magnétique
	Olive magnétique
	Cristalliseur rempli d'huile siliconée
	Support élévateur
	Etuve à 50°C

### Protocole

150g de NaCl sont dissous dans 300mL d'eau ultrapure dans un ballon de 500mL en chauffant à reflux avec un bain d'huile siliconée à 115°C sous agitation. L'agitation et le chauffage sont maintenus 30minutes. Le milieu réactionnel est alors transvasé sans le sel non dissous dans un ballon bicol sortant de l'étuve sur lequel est adapté le montage à reflux et un thermomètre. Le sel contenu dans cette solution saturée est laissé cristalliser à exactement 50°C pour obtenir des cristaux de la taille désirée. Le mélange est alors filtré sur un tamis de 100 µm, et les cristaux obtenus sont ensuite filtré sur un tamis de 300µm. On obtient ainsi des cristaux de taille comprise entre 100 et 300 µm.

### 1.3 PROTOCOLE SYNTHÈSE DE LA MATRICE DE PLA POREUSE

*Method to Analyze Three-Dimensional Cell Distribution and Infiltration in Degradable Scaffolds*, Paul Thevenot and all, TISSUE ENGINEERING : Part C Volume 14, Number 4, 2008

Produits	Matériel
Poly lactide (PLA)	Cristallisateur de 2cm de diamètre
Cristaux de NaCl entre 150 et 300 µm	Agitateur magnétique
chloroforme	barreau aimanté
eau distillée	Agitateur orbital
solution de nitrate d'argent à 0,1 M	pipette graduée
éthanol biologique	balance

#### Protocole

0,22g de poly lactide sont dissous dans 2,2mL de chloroforme dans un petit cristallisateur de verre. 2 g de cristaux de sel de taille définie préalablement synthétisés sont étalés uniformément sur la solution de poly lactide. La solution est agitée magnétiquement sous hotte jusqu'à ce que la solution commence à solidifier. Le barreau aimanté est alors retiré du cristallisateur. La solution est laissée sous hotte jusqu'à évaporation complète du solvant. Le disque de polymère ainsi obtenu est recouvert d'eau distillée et placé dans un orbital shaker à 100 rpm. L'eau est ensuite changée régulièrement jusqu'à ce que l'eau submergeant la matrice ne contienne plus de sel. La matrice est ensuite lavée à l'eau distillée pour retirer tout le sel. Il n'y a plus de sel s'il n'y a pas de précipité blanc qui se forme quand on ajoute quelques gouttes d'une solution de nitrate d'argent à 0,1 molaire à l'eau de lavage. La matrice est enfin recouverte d'éthanol biologique pour la désinfecter en vue de la culture cellulaire.

### 1.4 PROTOCOLE MISE EN CULTURE DES CELLULES SUR LA MATRICE

Produits	Matériel
Fibroblastes L929 de souris	Hotte à flux laminaire
Milieu de culture DMEM ((1X)+ GlutaMax	Plaque 24 puits
+ antibiotiques (penicilline et streptomycine)	Micropipette
serum de veau foetal (Gibco))	Incubateur
Trypsine	Compteur
Tampon phosphate (PBS) 1X	Microscope optique

#### Protocole

Des cellules fibroblastes L929 de souris sont contenues dans un flacon de culture Nunc. Sous une hotte à flux laminaire le milieu de culture est vidé puis 10 mL de tampon phosphate (PSB) est ajouté dans le flacon et laissé 10min. 2mL de trypsine sont ensuite ajoutés et laissé 10min dans l'incubateur à 37°C pour décoller les cellules du flacon. Les cellules sont alors comptées avec une cellule de Mal-lasez et microscope optique. Un million de cellules par mL sont ainsi décomptées. On dilue avec du milieu de culture (DMEM) à 37°C afin d'atteindre une concentration de 750 000 cellules dans 2mL. Des échantillons de la matrice poreuse préalablement synthétisée sont introduits dans les puits d'une plaque 24 puits de manière à recouvrir le fond du puits. 2mL de milieu contenant les cellules sont ensuite introduits dans les puits contenant de la matrice. Dans deux puits 1mL de DMEM est ajouté pour recouvrir entièrement l'échantillon de matrice. Deux puits témoins sont créés : un avec 2 mL de la solution de cellules et un avec 2mL de la solution de cellules et un mL de DMEM supplémentaire, sans échantillon de matrice. La plaque est ensuite mise à cultiver à 37°C pendant 72h.

## 1.5 PROTOCOLE TEST DE VIABILITÉ CELLULAIRE

Produits	Matériel
Matrice à tester	Plaque 24 puits
Alamar blue (ThermoFischer scientifique, DAL1025, 25 mL 240 euros)	Pipettes graduées steriles
DMEM ((1X)+ GlutaMax + antibiotiques (penicilline et streptomycine)	Spectrophotomètre-fluorimètre
serum de veau foetal (Gibco)	
tampon phosphate (PBS) 1X	
PFA à 4%	

### Protocole

Sous une hotte à flux laminaire le milieu de culture est enlevé de chaque puit sans toucher la matrice. Dans chaque puits sont ajoutés 300µL d'Alamar blue dilué à 10% dans du milieu de culture. Dans les puits où les 300µL ne suffisent pas pour recouvrir la matrice 200µL supplémentaires sont ajoutés. Deux témoins sont créés en mettant respectivement 200 et 300µL d'Alamar blue dilué dans un puits vide. La plaque 24 puits est ensuite mise en culture pendant 3h30 dans l'incubateur. Après 3h30 le contenu de chaque puits est transféré dans une plaque 24 puits. Une solution de PFA à 4% est ajoutée dans les puits contenant la matrice de la première plaque. 500µL de DMEM sont introduits dans chaque puits de la plaque dans laquelle a été transféré l'Alamar blue puis sont mesurés la fluorescence et l'absorbance à 570 et à 600nm de chacun des puits. On en déduit le pourcentage de viabilité cellulaire.

$$\% \text{ Reduced} = \frac{C_{\text{RED}} \text{ Test Well}}{C_{\text{OX}} \text{ Negative Control Well}}$$

$$5. = \frac{(\epsilon_{\text{OX}})_{\lambda_2} A_{\lambda_1} - (\epsilon_{\text{OX}})_{\lambda_1} A_{\lambda_2}}{(\epsilon_{\text{RED}})_{\lambda_1} A'_{\lambda_2} - (\epsilon_{\text{RED}})_{\lambda_2} A'_{\lambda_1}} \times 100$$

FIGURE 1.2 – Calcul du pourcentage de réduction de l'Alamar blue

Après 24h les puits contenant la matrice sont rincés à l'eau distillée puis lyophilisés afin de pouvoir être observés au MEB.

## 2 LA MATRICE HYDROGEL DE POLYÉTHYLÈNE GLYCOL ET DE POLYLACTIDE (PEG-PLA)

### 2.1 PROTOCOLE SYNTHÈSE DU MONOMÈRE DE PEG-PLA

*Bioerodible Hydrogels Based on Photopolymerized Poly(ethylene glycol)-co-poly( $\alpha$ -hydroxy acid) Diacrylate Macromers*, Amarpreet S. Sawhney et al., *Macromolecules* 1993,26, 581-587

Produits	Matériel
dl-lactide (TCI europe NV,L0091, 25 g 44€)	Ballon 250mL
PEG 4600K	Agitateur magnétique chauffant
dichlorométhane	Olive magnétique
diéthylether	Support élévateur
triéthylamine (Sigma-Aldrich, T0886-100ML, 29,2€)	Septum
acryloyl chloride (Sigma-Aldrich, A24109-100G, 120€)	Seringue et ballon de baudruche
	Flux d'azote
	Seringue de 1mL avec une aiguille
	huile siliconée
	2 Cristallisoirs
	Filtre Buchner et fiole à vide
	Ballon de 500mL
	Pipette graduée de 2mL
	Cristallisoir
	Glace
	Dessiccateur

## Protocole

La synthèse s'est déroulée sous atmosphère d'azote et sans trace d'eau. Le matériel utilisé a été préalablement mis à sécher à l'étuve. 30g de PEG et 3,6g de dl-lactide ont été introduits dans un ballon de 50mL sous atmosphère inerte comme décrit en figure 1.1 Les réactifs sont fondus sous agitation magnétique au bain marie avec un bain d'huile siliconé maintenu à 130°C. Une fois fondu de l'azote est mis à buller dans le mélange réactionnel puis 12µL de stannous octoate sont ajoutés au milieu réactionnel avec une pipette en plastique de 1mL adaptée sur une aiguille perçant le septum. Le mélange réactionnel est agité pendant 4 heures à 175°C puis pendant 2 heures à 160°C. Une fois refroidi le copolymère ainsi obtenu est dissous dans le dichlorométhane. Après dissolution il est précipité dans de l'éther et filtré sous vide. Le produit intermédiaire est caractérisé par RMN et infrarouge. 30g de ce produit intermédiaire sont dissous dans 300mL de dichlorométhane dans un ballon de 500mL sous agitation magnétique. Le ballon est refroidi dans un bain de glace et 1,31mL de triéthylamine et 1,58mL d'acryloyle chloride sont ajoutés au milieu réactionnel, qui est alors agité pendant 12h dans le bain de glace puis 12h à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite filtré pour éliminer le sous-produit puis du diéthyléther est ajouté au filtrat pour faire précipiter le produit. Le mélange est filtré pour récupérer le produit. Ce produit est dissous dans du dichlorométhane puis précipité dans le diéthylether et filtré sur Buchner pour être purifié. Finalement le produit est séché au dessiccateur (70°C sous vide) puis caractérisé par RMN et infrarouge.

## 2.2 PROTOCOLE PHOTOPOLYMERISATION

*Manipulations in Hydrogel Degradation Behavior Enhance Osteoblast Function and Mineralized Tissue Formation* TISSUE ENGINEERING Volume 12, Number 6, 2006

Produits	Matériel
Polymère peg-pla préalablement synthétisé	Lampe UV
Irgacure 2959	Plaque 24 puits
(2-hydroxy-1-[4-(hydroxyethoxy) 2959 : phenyl]-2-methyl-1-propanone)	Flux d'azote
DMEM ((1X)+ GlutaMax + antibiotiques (penicilline et streptomycine)	Carton
serum de veau foetal (Gibco)	Balance
tampon phosphate (PBS) 1X	

## Protocole

Dans quatre puits d'une plaque 24 puits sont introduits respectivement 20, 30, 40 et 50mg de polymère (10, 15, 20 et 25 % en masse) de polymère, 2 mL de tampon sulfate (ou de milieu de culture + cellules pour la culture cellulaire) et 1mg (0,05 % en masse) d'initiateur Irgacure 2959. La plaque est éclairée par une lampe UV à 365 nm pendant 10 min, sous un carton dans lequel est introduit un flux d'azote pour rendre l'atmosphère inerte. Le contenu des puits ne se transforme pas en gel, même après 2h d'exposition au UV, ni avec une quantité plus grande d'initiateur, de monomère, et l'atmosphère inerte.