

MISE AU POINT D'UNE METHODE D'ENCAPSULATION DE CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES DANS L'HPMC-Si POUR LE TRAITEMENT DE L'ARTHOSE

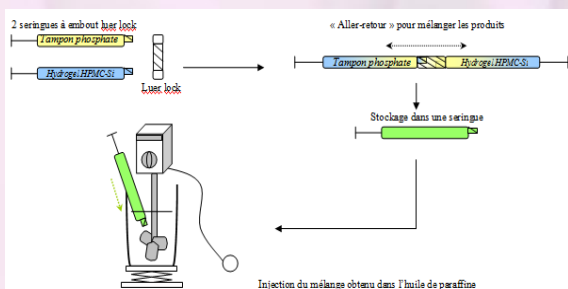
Suzy Bruder, Fahed Hached, Jérôme Guicheux, Gaël Grimandi, Aurélie Chabaud

INSERM U791, LIOAD, Groupe STEP « skeletal tissue engineering and physiopathology », Nantes. UFR Odontologie, Nantes. Centre Hospitalier Universitaire de Nantes. UFR des Sciences pharmaceutiques et biologiques, Nantes.

L'arthrose se caractérise par une atteinte de la matrice cartilagineuse et une inflammation locale à l'origine de douleurs articulaires. L'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (CSM) a été envisagée mais présente plusieurs limites : la mort cellulaire massive lors de leur injection, et leur risque de migration en dehors de la cavité articulaire. L'encapsulation de ces cellules pourrait permettre de contrer ces limites. Nous avons donc cherché à mettre au point une méthode d'encapsulation de ces CSM dans un nouveau biomatériau : l'hydroxypropylméthylcellulose silanisé (HPMC-Si), polymère développé par le laboratoire.

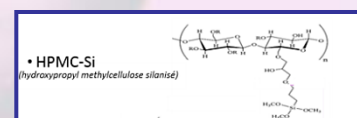
MATERIEL ET METHODE :

Fabrication des capsules Encapsulation des cellules



- Mélange huile de paraffine + Span® 80 (tensioactif)
- Préparation du gel : réticulation de l'HPMC-Si (pH=12,9) par neutralisation du pH par un tampon HEPES (pH=3,5)
- Introduction de l'hydrogel dans l'huile à l'aide d'une seringue sous agitation à 400 rpm → EMULSION
- Agitation pendant 4h, puis filtration et lavage

- Introduction de 2 millions de CSM /mL de gel d'HPMC-Si après réticulation
- Encapsulation selon le procédé décrit précédemment, dans des conditions stériles.



Caractérisation:

- Observation au microscope optique
- Evaluation de la taille par granulométrie laser (Mastersizer 3000, Malvern)
- Etude de la porosité par test de diffusion à l'aide de dextrans (20, 250 et 2000kDa) couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Suivi par microscopie confocale.
- Etude de la viabilité des CSM encapsulées : Kit Live and Dead (L3224, Molecular probes)

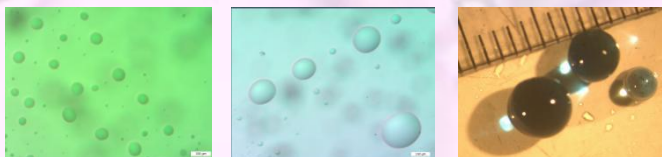
RESULTATS:

Les capsules obtenues présentent des tailles variables.

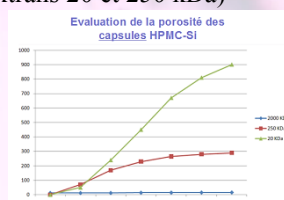
Les analyses de granulométrie laser indiquent un moyenne de $50,3 \pm 4,9 \mu\text{m}$. Quelques particules présentent des tailles beaucoup plus importantes de l'ordre de quelques mm :

N° d'enregistrement	Nom de l'échantillon	Dx 10 (µm)	Dx 50 (µm)	Dx 90 (µm)	Obscuration du laser	Nbr		Volume	
						D [0,1] (µm)	D [4,3] (µm)	D [0,1] (µm)	D [4,3] (µm)
4	Hpmc-Si	164	678	1410	6.87	45.0	767		
5	Hpmc-Si	110	673	1410	7.25	51.3	761		
6	Hpmc-Si	102	656	1260	7.23	54.6	705		
Moyenne		126	669	1360	7.12	50.3	744		
1xÉcart-type		33.6	11.5	85.8	0.21	4.90	34.2		
1xRSD		26.7	1.72	6.31	3.00	9.75	4.59		

Capsules d'HPMC-Si observées par microscopie optique :



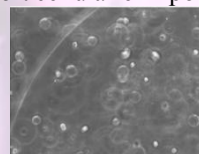
Porosité des capsules : comprise entre 10 et 21 nm (diffusion des dextrans 20 et 250 kDa)



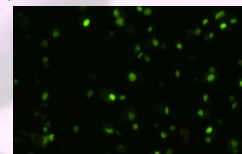
Test de diffusion intra-capsulaire des différentes solutions de dextrans-FITC dans des capsules d'HPMC-Si de 0,5 mm environ.

Encapsulation d'ASC :

- Présence de CSM dans les capsules après la manipulation
- Mort cellulaire importante à J+2:



CSM dans une capsule



Viabilité des CSM dans l'HPMC-Si

DISCUSSION ET CONCLUSION :

- La technique d'émulsion du gel HPMC-Si dans l'huile de paraffine a été mise au point et permet la fabrication de microparticules.
- Les tailles des capsules obtenues sont encore trop variables, nécessitant d'optimiser les paramètres opératoires (température, agitation, ...)
- La porosité des capsules est adaptée à l'encapsulation des CSM et devrait permettre le maintien de leur viabilité (diffusion des nutriments et d'oxygène), leur protection contre les cellules immunitaires, et le maintien de leurs fonctions immuno-modulatrices dans l'articulation (par diffusion des cytokines anti-inflammatoires)
- Les cellules ont bien été encapsulées mais leur viabilité est trop faible ; il faut étudier les raisons de cette cytotoxicité (huile, agitation, ...)

Références :

1. J. Sohler, *et al.* (2010) Hydrogel/Calcium phosphate composites require specific properties for three-dimensional culture of human bone mesenchymal cells. *Acta Biomaterialia* 6: 2932-2939
2. C. Trojani, *et al.* (2005) Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel. *Biomaterials* 26: 5509-5517
3. X. Bourges, *et al.* (2003) Développement d'un hydrogel autdurcissant in vivo, en perspective d'un usage biomédical. *ITBM-RBM* 24: 185-191