

Article original

Suivi par IRM du destin *in vivo* des cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse, marquées par des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique et injectées par voie intra-articulaire chez le lapin[☆]

In vivo MRI tracking of magnetic iron oxide nanoparticles labeled, engineered, autologous bone marrow mesenchymal stem cells following intra-articular injection

Xu-hong Jing^a, Liu Yang^{a,*}, Xiao-jun Duan^a, Bing Xie^b, Wei Chen^b, Zhong Li^b, Hong-bo Tan^a

^a Center of Joint Surgery, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing, Chine

^b Department of Radiology, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing, Chine

Accepté le 27 septembre 2007

Disponible sur Internet le 20 juin 2008

Résumé

Objectif. – Utiliser l'imagerie par résonance magnétique (IRM, appareil à 1,5 T) pour suivre des cellules souches mésenchymateuses extraites de la moelle osseuse autologue, marquées par des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique (SPIO), puis injectées dans le genou de lapins chez qui des pertes de substance cartilagineuse avaient été induites au préalable.

Méthodes. – Des cellules souches mésenchymateuses de lapin ont été marquées par des nanoparticules de SPIO grâce à un vecteur de transfection. La viabilité, la prolifération et la différenciation cellulaires ont été évaluées *in vitro* grâce à des examens appropriés, notamment un examen au microscope électronique après coloration au bleu de Prusse. Une IRM à écho de gradient et séquence pondérée en T2* (GRE-T2*) a été réalisée *in vitro*. Les cellules autologues ensemencées sur un gel de chitosane et de glycérophosphate ont été injectées dans le genou des lapins porteurs de lésions cartilagineuses. Une IRM GRE-T2* a été réalisée *in vivo* une, quatre, huit et 12 semaines après l'injection. Les résultats de l'IRM ont été comparés aux résultats histologiques.

Résultats. – *In vitro*, la viabilité, la prolifération et la différenciation cellulaires étaient comparables pour les cellules marquées et non marquées. Après l'injection intra-articulaire de cellules marquées, les images GRE-T2* ont mis en évidence, pendant 12 semaines au moins, des zones de vide de signal correspondant aux cellules injectées. Après 12 semaines, les cellules marquées ont migré dans le liquide synovial de la bourse sus-rotulienne, l'espace poplité et l'os sous-chondral fémoral. Elles n'ont pas été mises en évidence dans la perte de substance cartilagineuse. Les examens histochimiques ont confirmé la présence de cellules marquées par le bleu de Prusse et la bromodésoxyuridine.

Conclusions. – L'IRM serait une bonne technique non invasive pour visualiser les déplacements *in vivo* des cellules souches marquées au SPIO. Les cellules souches mésenchymateuses autologues marquées au SPIO et injectées dans la cavité articulaire ne jouent aucun rôle dans la réparation des pertes de substance cartilagineuses.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Oxyde de fer superparamagnétique ; Cellules souches mésenchymateuses ; Perte de substance cartilagineuse ; Imagerie par résonance magnétique

Keywords: Superparamagnetic iron oxide; Mesenchymal stem cells; Cartilage defect; Magnetic resonance imaging

1. Introduction

En clinique, les pertes de substance cartilagineuses sont fréquentes dans diverses situations pathologiques, notamment les traumatismes, l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde [1]. Les

[☆] Ne pas utiliser, pour citation, la référence française de cet article, mais sa référence anglaise dans le même volume de *Joint Bone Spine*.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : joinsurgery@163.com (L. Yang).

traitements utilisés vont des plus conservateurs aux plus invasifs, et l'on compte parmi ces derniers le débridement, les microfractures et la plastie en mosaïque, qui ne permettent toutefois d'obtenir qu'une réparation partielle consistant en la formation de fibrocartilage [2,3]. Les techniques de régénération tissulaire pourraient, au contraire, permettre la formation de cartilage hyalin, qui viendrait combler la perte de substance. De nombreuses études ont démontré que les cellules souches mésenchymateuses (CSM) extraites de la moelle osseuse sont pluripotentiels et peuvent se différencier en ostéocytes, chondrocytes et adipocytes [4,5]. Chez l'animal, ces cellules ont permis d'obtenir la réparation par du cartilage hyalin de pertes de substance intéressant l'ensemble de l'épaisseur du cartilage des condyles fémoraux [6,7]. Toutefois, les caractéristiques cellulaires qui favorisent la réparation du cartilage sont mal connues. De plus, on ignore si l'effet des CSM est directe, lié à la colonisation du cartilage par les cellules injectées, ou au contraire indirect, lié au recrutement de cellules de l'hôte en réponse à la présence des cellules injectées [6,7]. Ainsi, le rôle joué par les cellules injectées dans la régénération tissulaire et la capacité de ces cellules à survivre et à s'intégrer dans le cartilage néoformé restent discutés. Afin de mettre au point des techniques de régénération cellulaire, il faut pouvoir disposer d'une méthode efficace et non invasive pour suivre les cellules implantées *in vivo* et donc mieux comprendre leurs caractéristiques. L'examen histologique de prélèvements obtenus après le sacrifice des animaux est largement utilisé pour déterminer le siège des cellules implantées [8–10]. Toutefois, l'IRM permet de suivre les cellules *in vivo*, à condition de marquer ces cellules au préalable par des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique (SPIO)[11–13]. Cette méthode non invasive devrait permettre de mieux comprendre les fonctions des cellules implantées, d'évaluer l'efficacité des thérapies cellulaires et de déterminer quels protocoles thérapeutiques donnent une probabilité maximale de régénération cartilagineuse.

Nous avons réalisé une étude dans un modèle de perte de substance cartilagineuse induite au genou chez le lapin. L'objectif de l'étude était de suivre le devenir *in vivo* de CSM autologues, extraites de la moelle osseuse, marquées par des nanoparticules de SPIO, puis injectées dans la cavité articulaire. Nous avons au préalable étudié *in vitro* l'effet du marquage par le SPIO sur les propriétés biologiques des CSM. Puis, nous avons réalisé plusieurs IRM *in vivo*, grâce à un appareil classique à 1,5 T, au cours d'une période de trois mois.

2. Méthodes

2.1. Isolement et culture des cellules souches mésenchymateuses

(Annexe S1 ; voir le matériel complémentaire accompagnant la version en ligne de cet article)

2.2. Marquage des cellules à l'oxyde de fer

Une suspension de ferumoxides disponible dans le commerce (Feridex IV, 11,2 mg Fe/ml, Advanced Magnetics, Cambridge,

MA, États-Unis) a été diluée dans un milieu de culture pour obtenir une concentration de 50 µg/ml, de façon extemporanée, selon la technique décrite antérieurement [15]. Le sulfate de protamine (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, États-Unis), qui a servi d'agent de transfection, a été préparé immédiatement avant l'emploi, sous forme d'une solution mère à 10 mg/ml dans de l'eau distillée. Une dilution à 6 µg/ml préparée à partir de cette solution mère a été mélangée à la suspension de ferumoxides diluée dans le milieu de culture, grâce à un agitateur rotatif, pendant 60 minutes à température ambiante. Le mélange ainsi obtenu a été mélangé à volume égal au milieu présent dans les cultures de CSM de lapin, ce qui a donné une concentration finale de 25 µg/ml pour le SPIO et 3 µg/ml pour le sulfate de protamine. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 12 heures à 37 °C sous air contenant 5 % de CO₂, puis lavées trois fois avec du tampon phosphate salé (PBS) afin d'éliminer les ferumoxides en excès. Les cellules ont été marquées à la bromouridine (BrdU, Sigma-Aldrich) 30 µmol/l, deux heures avant la transplantation.

2.3. Mise en évidence des nanoparticules d'oxyde de fer

(Annexe S2)

2.4. Étude de la prolifération et de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses *in vitro* [14,16,17]

(Annexe S3)

2.5. IRM des cultures cellulaires

(Annexe S4)

2.6. Animaux

Le Comité d'éthique de l'expérimentation animale de notre établissement a approuvé toutes les procédures de l'étude. Nous avons utilisé 18 lapins blancs japonais, divisés en trois groupes de six animaux. Deux groupes ont été traités par injection intra-articulaire de CSM autologuesensemencées sur du gel de chitosane et de glycérophosphate (C-GP) ; dans l'un de ces groupes, les CSM étaient marquées au SPIO et au BrdU, tandis que dans l'autre groupe elles n'étaient marquées qu'au BrdU. Le troisième groupe n'a pas été traité et a servi de témoin.

2.7. Création des pertes de substance cartilagineuses et expériences *in vivo*

Les lapins ont été anesthésiés grâce à une injection intramusculaire de kétamine (50 mg/kg). Les membres postérieurs ont été rasés et recouverts de champs stériles. Selon la technique décrite par Mierisch et al. [18], une incision cutanée a été réalisée à la face antéro-interne du genou et la surface articulaire du fémur a été abordée à travers une petite arthrotomie pararotulienne interne. Une carotte de cartilage trochléaire mesurant 4 mm de diamètre et 3 mm de profondeur a été prélevée grâce à une aiguille de Keith à air comprimé. Après le réveil, les

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3389039>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3389039>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)