

Article original

Développement d'un nouveau produit d'ingénierie du tissu osseux à l'aide de matrices macroporeuses de polysaccharides[☆]

Development of a new bone tissue-engineered product

Au nom des membres du consortium du programme ITOV^{a,b,c,d,e,f,g,h}

^a Inserm U1026, bioingénierie tissulaire, 146, rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France

^b Université Bordeaux-Segalen, 146, rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France

^c Inserm, U698, CHU X.-Bichat, 46, rue Henri-Huchard, 75877 Paris cedex 18, France

^d Université Paris 7, 16, rue Henri-Huchard, 75877 Paris cedex 18, France

^e Institut Galilée, université Paris 13, 99, avenue J.-B.-Clément, 93430 Villetaneuse, France

^f UMR CNRS 5536, université Bordeaux-Segalen, 146, rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux, France

^g UMR CNRS 6594 IRPHE Marseille, équipe de biomécanique, technopôle de Château-Gombert, 49, rue F. Joliot-Curie, BP 146, 13384 Marseille cedex 13, France

^h ABCELLBIO, 6, rue Pierre-Haret, 75009, Paris, France

Reçu le 24 janvier 2011 ; accepté le 25 janvier 2011

Disponible sur Internet le 2 mars 2011

Résumé

Les échecs rencontrés dans le domaine de la substitution osseuse utilisant les biomatériaux, associés ou non à des cellules ostéoformatrices, ou encore à des facteurs de croissance sont le plus souvent liés à un défaut de vascularisation de ces implants. L'objectif de ce projet est de mettre en place un nouveau produit d'ingénierie tissulaire à l'aide d'une matrice macroporeuse biodégradable composée de polysaccharides et de cellules issues du tissu adipeux d'origine humaine qui seront orientées vers le lignage endothélial et ostéoblastique sous contraintes biochimiques et/ou sous contraintes mécaniques (culture en bioréacteur). Cette combinaison de facteurs matriciels, cellulaires, biochimiques et mécaniques a pour mission de stimuler à la fois la formation osseuse et la revascularisation du tissu néoformé. Des études *in vitro* ont tout d'abord été menées afin d'évaluer la capacité de différenciation des cellules issues du tissu adipeux à s'orienter vers le lignage ostéoblastique et endothélial. La réponse de ces cellules aux matrices à base de polysaccharides a été évaluée pour les deux types cellulaires. Les études expérimentales ont ensuite été réalisées chez la souris et le rat dans deux modèles d'implantation : en site sous-cutané chez la souris et en site osseux dans le condyle fémoral chez le rat. Des résultats très favorables ont été ainsi obtenus et la nature du tissu néoformé a été mise en évidence par des techniques d'imagerie non invasives (microtomographie aux rayons X, imagerie par résonance magnétique) et par des techniques standard d'histologie.

© 2011 Publié par Elsevier Masson SAS.

Mots clés : Polysaccharides ; Tissu adipeux ; Progéniteurs ostéoblastiques ; Progéniteurs endothéliaux ; Bioréacteur ; Formation osseuse ; Vascularisation ; *In vitro* ; *In vivo*

Abstract

Failures in the field of bone replacement using biomaterials, with or without bone-forming cells, or growth factors are mostly related to defective vascularization of the implants. The objective of this project was to develop a new product of tissue engineering using a macroporous and biodegradable matrix composed of polysaccharides and cells derived from adipose tissue able to differentiate towards the endothelial lineage and osteoblastic with biochemical and/or mechanical stress (culture in a bioreactor). This combination of matrix, mesenchymal stem cells, biochemical and mechanical factors aims to stimulate both bone formation and revascularization of the newly formed tissue. *In vitro* studies were conducted to assess the ability of differentiation of cells derived from adipose tissue to shift toward the osteoblast and endothelial lineage. Experimental studies have been conducted in mice and rats using two experimental

[☆] Projet ANR-07-TECSAN-011-02.

Adresse e-mail : joelle.amedee@inserm.fr

models: the subcutaneous site in mice and a critical size bone defect in the femoral condyle in rats. Very encouraging results were obtained and the nature of the newly formed tissue was evidenced by non-invasive imaging techniques (X-ray microtomography, magnetic resonance imaging) and by standard histological methods.

© 2011 Published by Elsevier Masson SAS.

Keywords: Polysaccharides; Adipose tissue; Osteoprogenitor cells; Endothelial progenitor cells; Bioreactor; Bone formation; Vascularization; In vitro; In vivo

Compte tenu du vieillissement de la population, le nombre de fractures conduisant à des pertes massives de tissu osseux ne cesse d'augmenter. Sans remettre en cause l'efficacité incontestable des autogreffes, cette technique présente des inconvénients majeurs comme le volume disponible et une morbidité importante. Les progrès en science des matériaux ont permis le développement de nouveaux substituts osseux, principalement à base de phosphate de calcium ou encore de polymères. Le cahier des charges de ces matériaux reste très complexe et les échecs rencontrés par ces biomatériaux sont en partie liés à leur faible capacité de colonisation mais surtout à un défaut de vascularisation de ces implants.

Les techniques d'ingénierie tissulaire et, de façon plus précise, l'implantation de cellules « réparatrices » dans un biomatériau ont ouvert une voie de développement de thérapies substitutives à la pratique de l'allogreffe et de l'hétérogreffe. Ce concept extrêmement prometteur, pour être efficace et aller vers la clinique, doit tenir compte des interactions entre les principaux acteurs de cette reconstruction. Parmi ceux-ci, nous citerons :

- la source cellulaire, la plus pertinente pour des applications cliniques ;
- les facteurs biochimiques appropriés pour autoriser des études cliniques ;
- la structure tridimensionnelle d'hébergement de ces cellules, capable de mimer au mieux la matrice du tissu à réparer ;
- les conditions mécaniques susceptibles de réguler ces interactions, et in fine de disposer de modèles précliniques pour évaluer la capacité de ces produits d'ingénierie tissulaire (PIT) à régénérer un tissu fonctionnel.

L'objectif de ce programme a été de combiner ces différents acteurs pour élaborer un nouveau PIT à partir de matrices tridimensionnelles biodégradables de polysaccharides développées par l'Inserm U698. Les cellules souches utilisées sont des cellules dérivées du tissu adipeux (ADSC) isolées en collaboration avec la société ICELLTIS (Toulouse). Ces ADSC ont été induites vers le lignage ostéoblastique et/ou endothélial à l'aide de milieux de culture définis, sans sérum, produits en conditions GMP par la société ABCELLBIO (Paris). Des contraintes mécaniques sont appliquées à ces PIT à l'aide d'un nouveau bioréacteur développé par le laboratoire UMR 6594. Enfin, ces nouveaux PIT sont évalués in vivo à l'aide de modèles expérimentaux chez la souris et le rat. Deux sites d'implantation ont été utilisés : un site sous-cutané chez la souris et un site osseux dans le condyle fémoral chez le rat. La nature du tissu néoformé a été évaluée par des techniques d'imagerie, de préférence non invasives, dont la microtomographie aux rayons X (micro-CT), et l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Cette dernière technique nous permet en particulier de suivre le devenir de la matrice in vivo, et celui des ADSC chargées en nanoparticules de fer et implantées dans le matériau. Cette dernière partie fait l'objet des travaux de l'UMR 5536. Enfin, les techniques d'histologie sont réalisées en collaboration avec le CIC-IT Biomatériaux.

1. Les matrices 3D de polysaccharides développées pour l'ingénierie osseuse

Les matrices utilisées dans ce programme ont fait l'objet de deux dépôts de brevets et sont à base de polysaccharides, de type pullulane et dextrane. Ces matrices macroporeuses ont été caractérisées par microscopie confocale et microscopie électronique environnementale et la porosité de ces matrices peut être ajustée de 5 % à 50 %. La forme des pores apparaît comme des travées où les cellules peuvent se loger et coloniser le matériau. Ces matrices 3D ont été produites sous différentes tailles et formes : des disques pour les études in vitro, des cylindres ou encore des cubes pour les études in vivo en fonction de la lésion osseuse créée.

2. Les modèles cellulaires associés aux matrices 3D de polysaccharides

La composante cellulaire utilisée pour élaborer ce PIT est issue du tissu adipeux humain (ADSC). Les milieux d'induction du lignage ostéoblastique et endothélial ont été fournis par la société ABCELLBIO. Plusieurs formulations ont été évaluées afin de contrôler au mieux la prolifération des cellules ainsi que leur différenciation cellulaire, en deux dimensions (2D) puis en 3D dans les matrices de polysaccharides. S'agissant de la différenciation ostéoblastique des ADSC en 2D, la dernière formulation (milieu OB) fournie par ABCELLBIO donne des résultats très compétitifs (expression des marqueurs précoces et tardifs tels que *cbfa1/runx2*, phosphatase alcaline, collagène de type I et ostéocalcine) par rapport à des milieux contrôles d'ostéo-induction contenant de la dexaméthasone, de l'acide ascorbique, du β glycérophosphate et du sérum. En ce qui concerne le lignage endothélial, les ADSC triées à l'aide de billes magnétiques, CD31– CD34+, placées en 2D dans le milieu ABCELLBIO SPE-Vec, montrent l'expression du récepteur 2 du VEGF, l'incorporation du LDL acétylé et la capacité à former des tubes sur Matrigel®.

3. Développement d'un bioréacteur pour la culture dynamique de ces PIT.

Le partenaire UMR 6594 a défini les contraintes de fonctionnement et d'ergonomie du bioréacteur par rapport à la matrice de polymères utilisée dans ce programme. Un premier prototype a

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/870948>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/870948>

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