

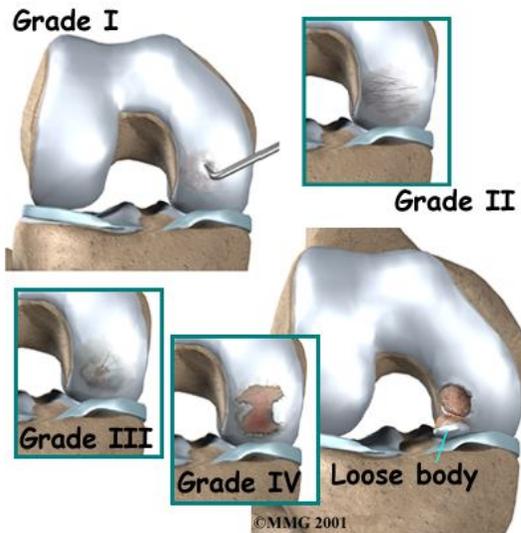
Mathieu RIFFAULT

Présentation du projet de stage

Laboratoire de Pharmacologie Physiopathologie et
Ingénierie Articulaires (UMR 7561)

Groupe BioIngénierie Tissulaire Vectorisation et
Imagerie Articulaire.

M2 ISSM parcours BIMC



Contexte

Cartilage articulaire : avasculaire et non innervé → faibles capacités de régénération, mauvaise réparation des lésions.

Lésions arthrosiques focales → différents degrés de sévérité selon couches concernées.

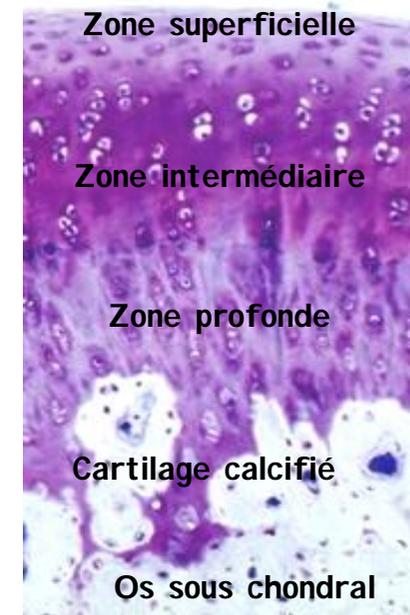
→ Elaboration d'un biomatériau composite fonctionnalisé, par polymérisation contrôlée, reproduisant la structure du cartilage hyalin.

Comment ?

Technique du spray, et association de différents biomatériaux : agarose et alginate.

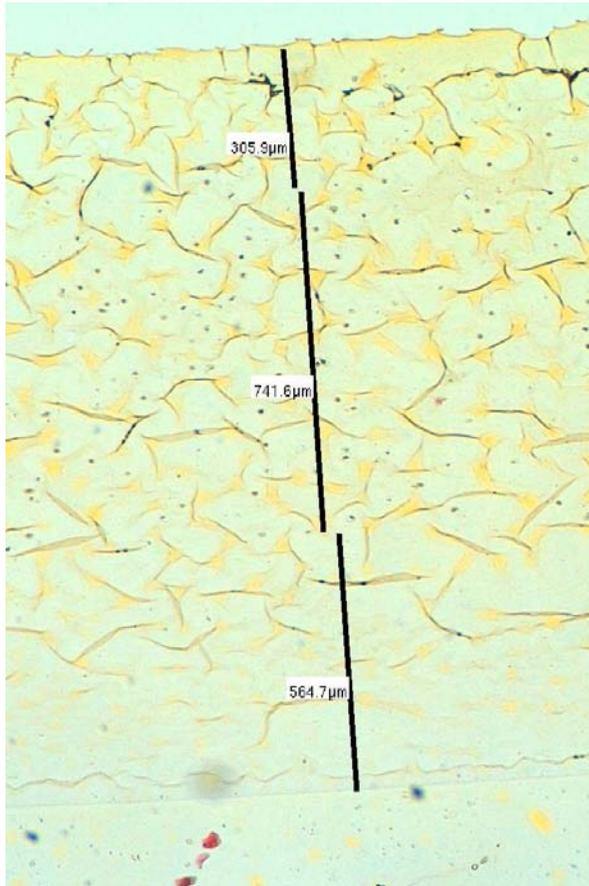
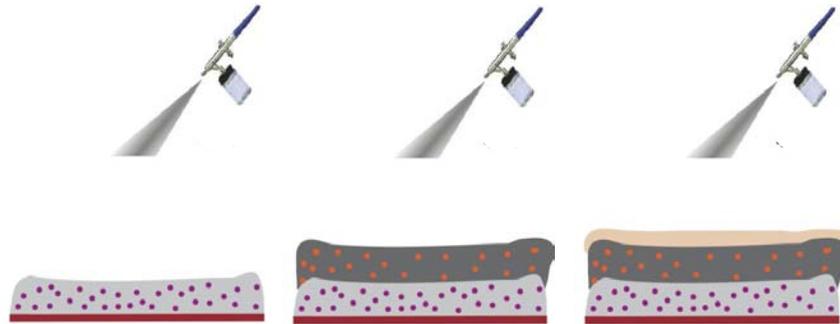
Ingénierie tissulaire : quelles cellules pour le biomatériau ?

- Chondrocytes : problème maintien du phénotype en phase d'expansion
- Cellules souches mésenchymateuse : étapes de différenciation préalables à prendre en compte (facteurs de croissance...)



Organisation du tissu en différentes zones.

Méthode de préparation des biomatériaux composites fonctionnalisés par nébulisation / pulvérisation



La nébulisation permet le dépôt de plusieurs couches de gels d'alginate de composition variable.

Contrôler la polymérisation permet également d'augmenter l'épaisseur de la construction

Coloration HES d'un gel d'alginate à trois couches, dont une enrichie en cellules.

(Grossissement : x10)

Epaisseur **1600** μm

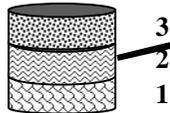
Démarche expérimentale suivie

Etude du comportement des cellules dans les biomatériaux choisis.

1^{ère} étape
Assise ostéoblastique
En agarose



2^{ème} étape
Couches d'alginate



Culture de 7 à 28 jours

Acquisition du phénotype cellulaire désiré

Hypoxie
Normoxie
Bioactivateurs

Analyses moléculaires (RT-PCRq, dosage ARN) : expression marqueurs spécifiques os (phosphatase alcaline, ostéocalcine...).

Analyses histologiques : visualisation synthèse matrice osseuse, minéralisation (Von Kossa)

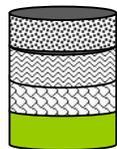
Immunohistochimie : phosphatase alcaline, collagène X

Analyses moléculaires : expression marqueurs spécifiques du cartilage (Collagène 2, aggrecane...)

Analyses histologiques : visualisation synthèse matrice cartilagineuse (HES, Rouge Sirius, Bleu Alcian)

Immunohistochimie : Collagène II ,...

3^{ème} étape
Superposition des deux



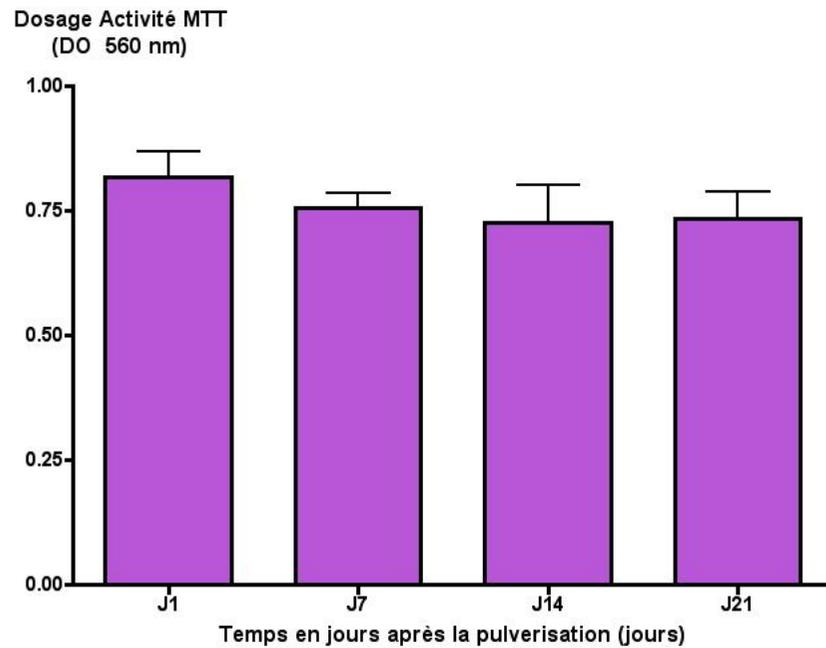
Cinétique de superposition des couches d'alginate sur l'agarose

Viabilité des cellules : Test MTT, dosage ADN

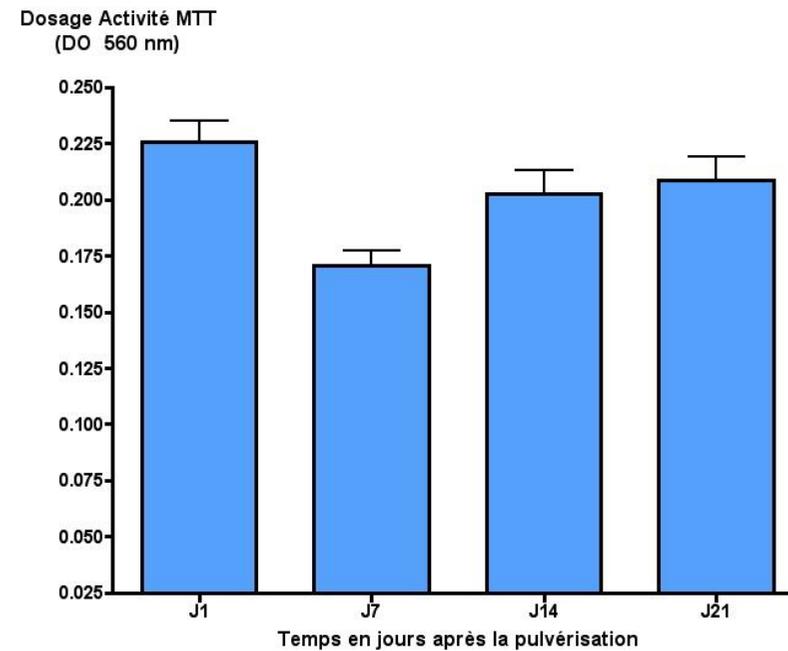
Phénotype cellulaire : RT-PCRq

Synthèse matricielle : Histologie et immunohistochimie

Viabilité cellulaire dans les gels d'alginate par nébulisation



Cellules souches mésenchymateuses

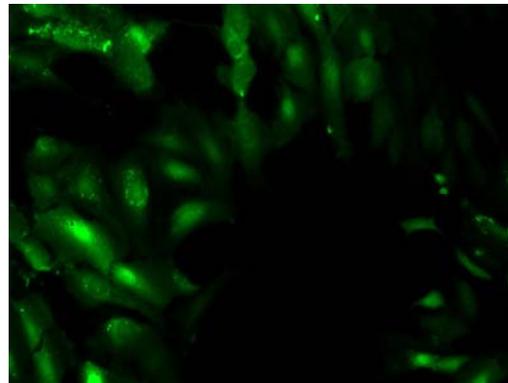


Chondrocytes

Optimisation des conditions de pulvérisations de plusieurs couches d'alginate

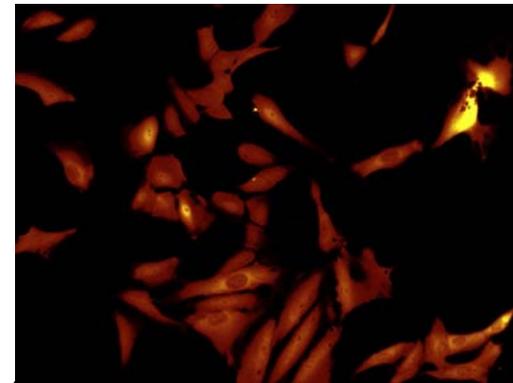
Plusieurs couches d'alginate : impossible de les différencier en microscopie optique et de visualiser l'interpénétration des couches entre elles

→ Utilisation de cellules fluorescentes dans les deux couches pour déterminer les paramètres cinétiques de gélification pour la superposition

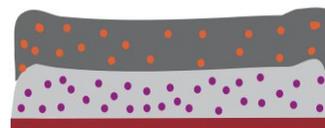


Plasmide ZS Green

Transfection de cellules de chondrosarcome avec un plasmide codant pour une protéine fluorescente.

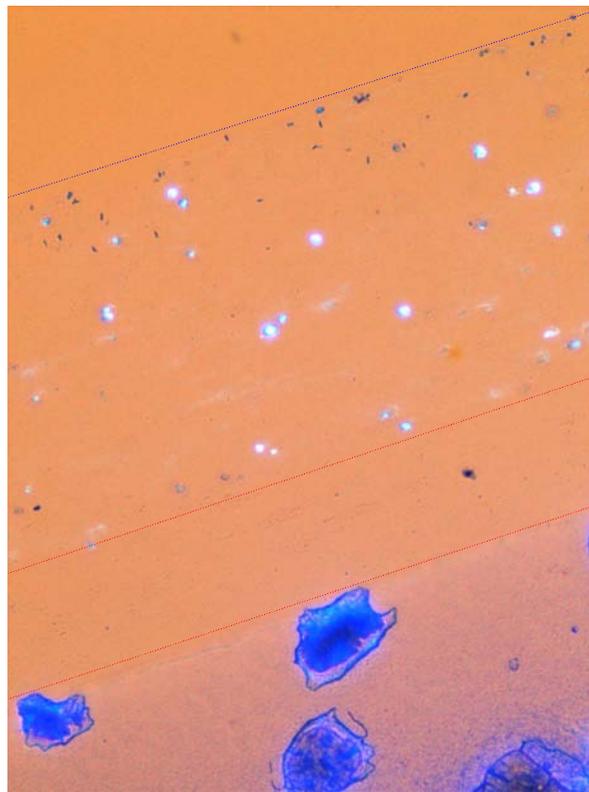


Plasmide tdTomato



Pulvérisations de plusieurs couches d'alginate

- 1 - Pulvérisation d'une couche d'alginate vierge
- 2 - Pulvérisation d'une couche d'alginate contenant des cellules

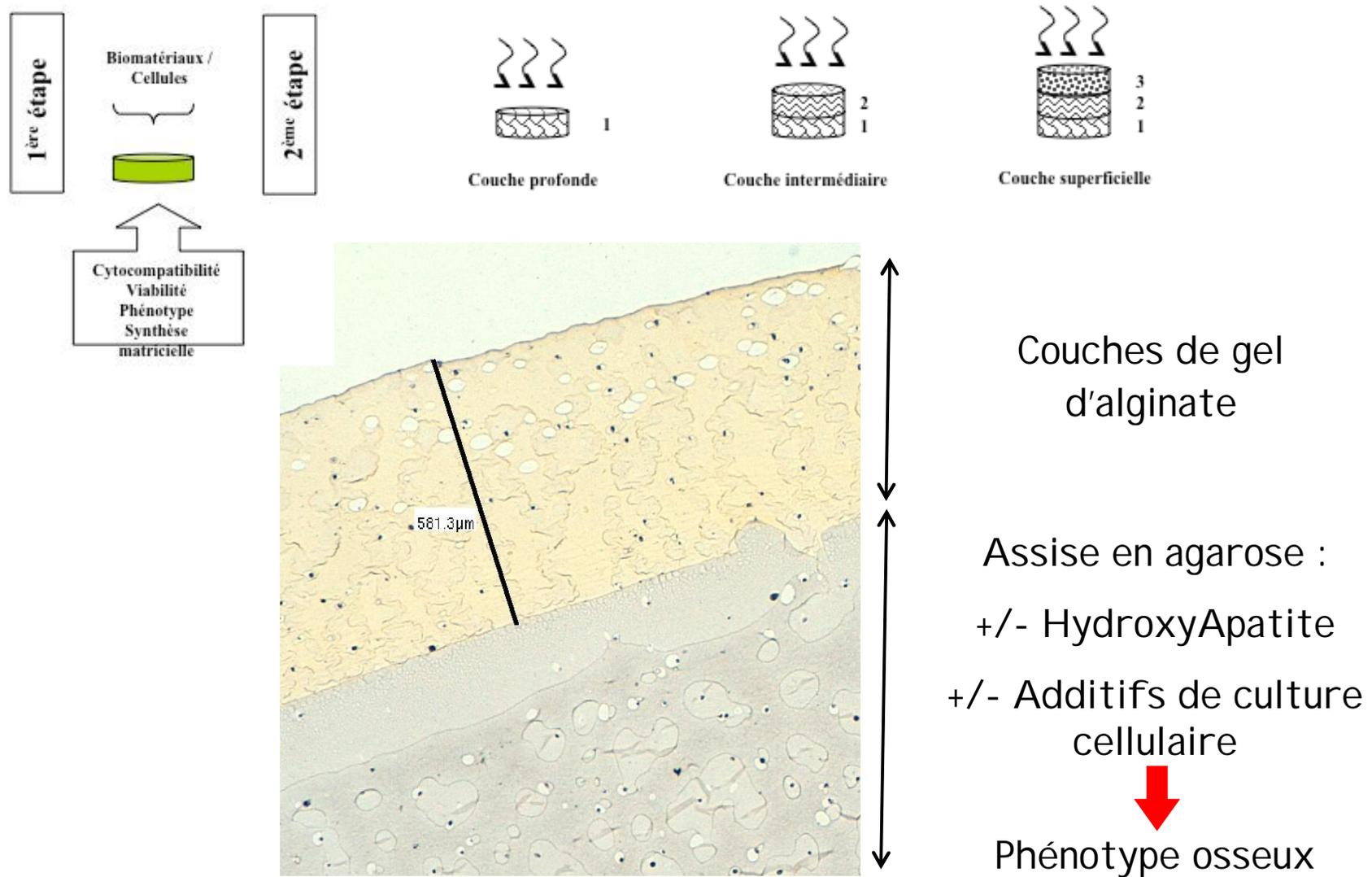


Marquage au DAPI des cellules dans la couche d'alginate supérieure

Couche d'alginate inférieure sans cellules

Gel support vierge en agarose

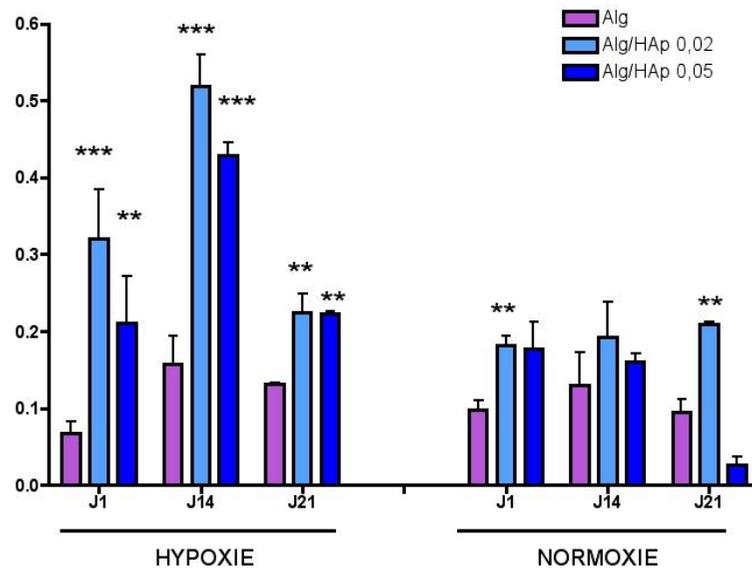
Fonctionnalisation de l'assise en agarose afin d'obtenir la construction composite



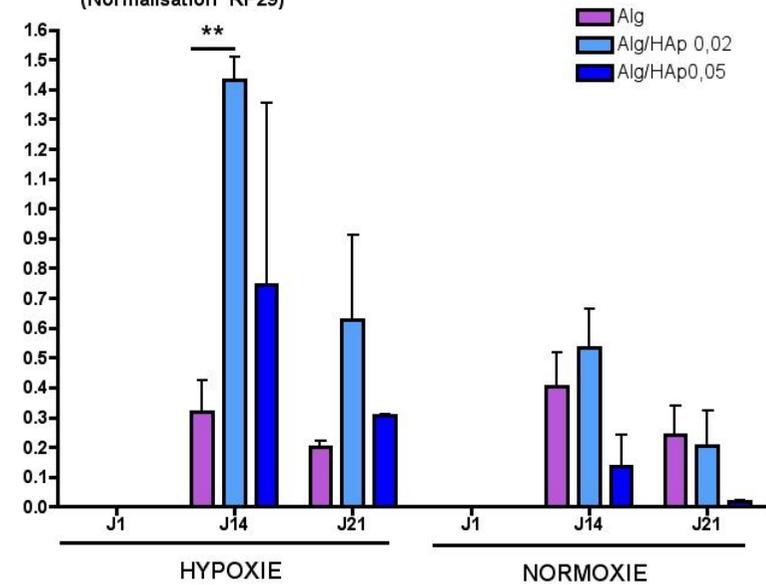
Coloration HES d'un gel d'alginate à 2 couches enrichies en CAH, reposant sur une assise en agarose également enrichies en CAH (Epaisseur **581 μm**)

Fonctionnalisation des gels d'alginate par l'Hydroxy-apatite (HAp)

Taux d'expression en ARNm Col 10
(Normalisation RP29)



Taux d'expression en ARNm Phosphatase Alcaline
(Normalisation RP29)



Etude de l'expression par RT-qPCR de marqueurs osseux (Collagène 10, Phosphatase Alcaline) par les chondrocytes cultivés en gels.

Résultats en cours...

- Pulvérisation de gels d'alginate contenant des cellules transfectées fluorescentes vertes ou rouge.

Visualisation du degrés d'interpénétration des couches.

- Pulvérisation de gels d'alginate contenant des chondrocytes articulaires.

Cinétique de maintien ou de renforcement du phénotype chondrocytaire et évolution à 28 jours.

- Fonctionnalisation du gel agarose support contenant des cellules autologues : orientation vers un phénotype ostéoblastique afin de reproduire l'assise sous chondrale.

Cinétique d'apparition du phénotype osseux en vue de déterminer quand assembler les deux biomatériaux pour réaliser la construction composite.