

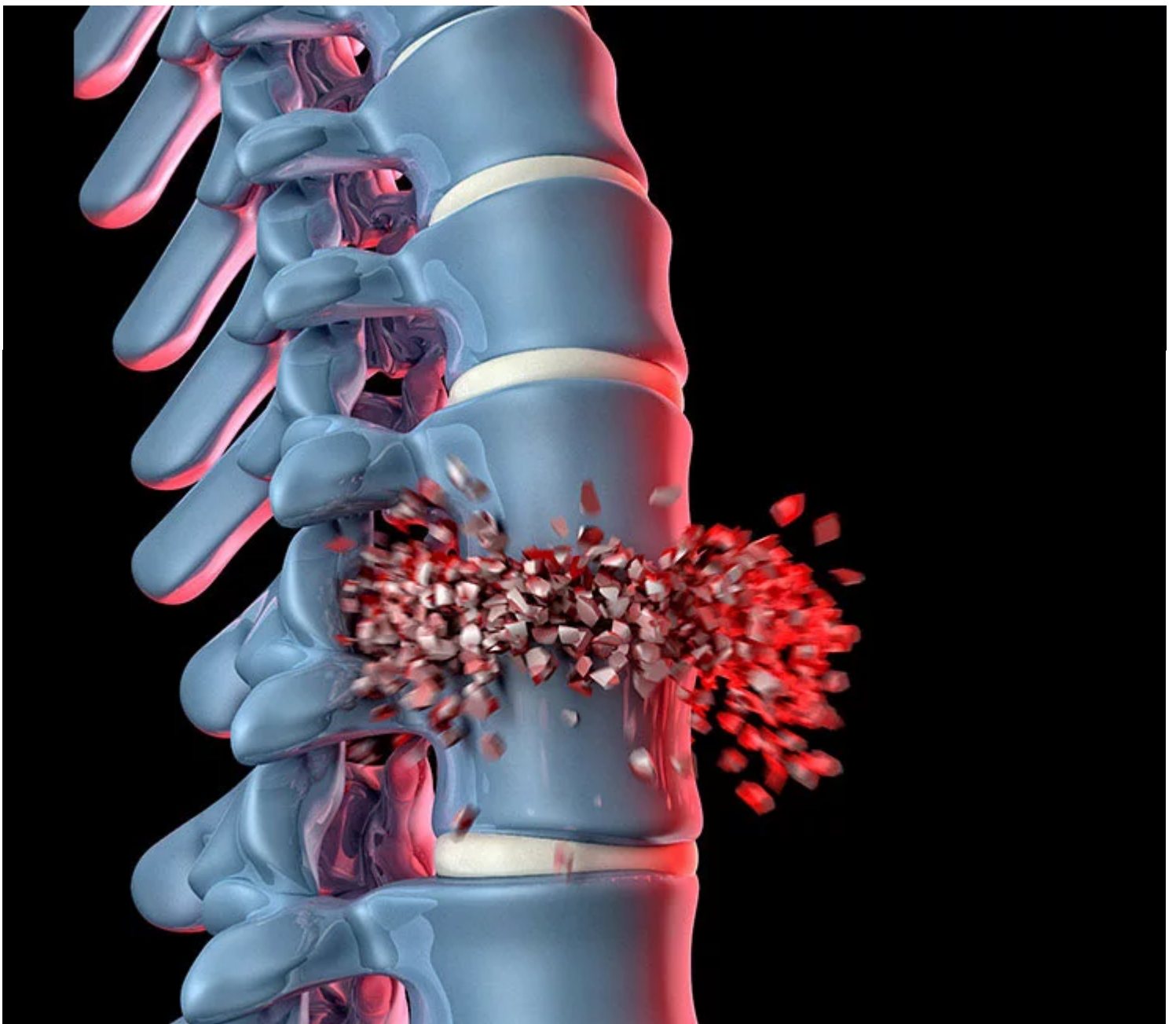
Article de recherche
SANTÉ

Des hydrogels de chitosane pour régénérer les disques intervertébraux

AA Atma Adoungotchodo **YA** Yasaman Alinejad **MG** Michael Grant

LE Laura M Epure **JA** John Antoniou **FM** Fackson Mwale

 Sophie Lerouge



RÉSUMÉ:

La thérapie cellulaire utilisant des cellules encapsulées dans des matrices injectables est une technique prometteuse pour le traitement minimalement invasif de la dégénérescence du disque intervertébral, qui représente l'une des causes majeures des maux de dos dont souffre 19 % de la population mondiale. Toutefois, cette approche thérapeutique est limitée par les propriétés mécaniques généralement faibles des matrices injectables. L'étude actuelle démontre le potentiel de nouvelles formulations d'hydrogels de chitosane thermosensibles ayant d'intéressantes propriétés mécaniques pour la régénération du disque intervertébral, notamment sa partie centrale appelée le noyau pulpeux (NP).

Introduction

La dégénérescence du disque intervertébral (DIV) est l'une des causes importantes des maux dans le bas du dos [1] dont souffre 19 % de la population mondiale [2]. Les techniques actuelles de prise en charge de ce dysfonctionnement sont non seulement très invasives, mais aussi inefficaces pour la restauration complète des fonctions biomécaniques du DIV. L'élaboration de nouvelles techniques minimalement invasives, axées sur la réparation ou la restauration du DIV, devient donc pertinente. L'une des techniques prometteuses pour cette application est la thérapie cellulaire. Cette technique consiste à injecter des cellules et des molécules particulières, éventuellement encapsulées dans des matrices biocompatibles, dans l'objectif de régénérer le disque, notamment sa partie centrale : le noyau pulpeux (NP). Toutefois, cette application est limitée par les propriétés mécaniques généralement très faibles des matrices injectables étudiées jusqu'à présent [3, 4].

Notre équipe a récemment mis au point des hydrogels de chitosane injectables ayant de meilleures propriétés mécaniques et une meilleure cytocompatibilité [5]. Ces formulations, liquides à température pièce, mais se gélifiant à 37 °C, pourraient être optimisées pour la régénérescence du DIV. L'objectif formel de ce travail est d'étudier ces formulations et de déterminer celles présentant un potentiel pour le support mécanique du NP humain, tout en permettant la survie des cellules NP encapsulées et la synthèse d'un tissu de composition similaire à celui du NP natif.

Matériel et méthodes

Les hydrogels ont été préparés en mélangeant une solution acide de chitosane et des solutions d'agents gélifiants constituées de sodium hydrogencarbonate (SHC), de tampon phosphate (PB) et/ ou de β -glycérophosphate (BGP). La composition des quatre formulations testées est présentée dans le tableau 1.

Tableau 1 Composition des formulations d'hydrogel de chitosane et leur osmolalité

Hydrogel	Chitosane (w/v %)	Composition de l'agent gélifiant (M)			Osmolalité (mOsmol/L)
		BGP	SHC	PB	
Formulation 1 (formulation classique)	2	0,4		-	837 ± 12
Formulation 2	2	0,1	0,075		434 ± 25
Formulation 3	2		0,075	0,02	262 ± 3
Formulation 4	2		0,075	0,04	313 ± 4

Des tests rhéologiques avec un rhéomètre rotationnel (Anton Paar) à la température pièce (22 °C) et à la température du corps (37 °C) ont été effectués afin de tester respectivement la stabilité des formulations à 22 °C et le profil de gélification à 37 °C. Les tests mécaniques en compression non confinée sur des hydrogels incubés pendant 24 h à 37 °C ont été effectués afin de déterminer le module de Young sécant de chaque échantillon. Ces propriétés mécaniques ont été comparées à celles du NP humain en compression non confinée grâce à un test de relaxation de contrainte incrémentale [6].

L'osmolarité de ces hydrogels a également été mesurée. Ensuite, des cellules de NP bovines ont été encapsulées dans ces hydrogels et cultivées pendant quatorze jours à 37 °C. Des tests de viabilité par AlamarBlue® et LIVE/DEAD® ont été faits afin d'évaluer respectivement l'activité métabolique des cellules encapsulées et leur taux de viabilité. L'activité de synthèse de ces cellules a également été évaluée en mesurant la quantité de glycosaminoglycanes (GAG) produite par le test du 1-dymethylmethylène (DMMB). L'injectabilité de ces hydrogels a été testée dans des disques humains explantés grâce à des aiguilles de jauge 25.



Figure 1 Méthode de préparation des hydrogels.

Résultats

Toutes les formulations d'hydrogels, sauf la formulation classique (1), présentent un module de stockage G' faible et stable à 22 °C. Ce module évolue rapidement à 37 °C, confirmant la thermosensibilité de ces matériaux. Les nouvelles formulations d'hydrogel présentent des propriétés mécaniques en compression plus élevées que la formulation classique (figure 2 A, B, C). Les tests en relaxation de contrainte montrent que deux de ces nouvelles formulations (2 et 3) présentent des propriétés mécaniques similaires aux propriétés du NP humain (figure 2 D).

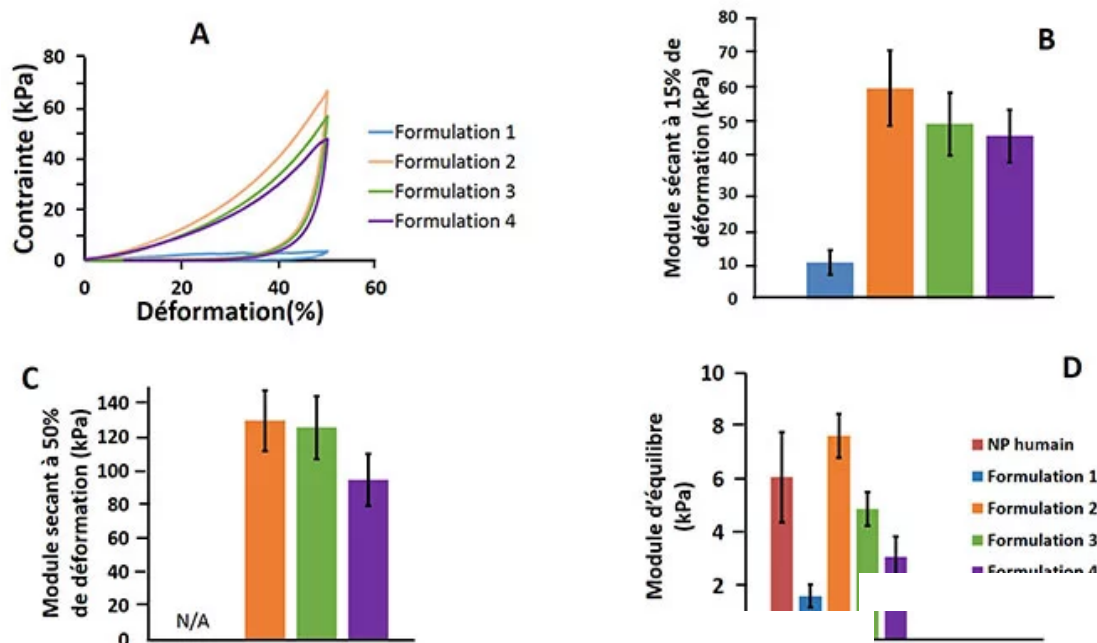


Figure 2 Les propriétés mécaniques des nouvelles formulations d'hydrogel (2, 3, 4) en compression non confinée sont beaucoup plus élevées que la formulation classique (1). A) Courbe contrainte déformation, B) et C) Module sécant à 15 et 50 % D) Propriétés mécaniques des formulations d'hydrogels comparées à celles du noyau pulpeux humain en relaxation de contrainte

En ce qui concerne les résultats de biocompatibilité, la formulation classique (la 1) est hypertonique avec une osmolalité > 800 mosmol/kg tandis que toutes les autres formulations présentent des valeurs d'osmolalité proches des valeurs physiologiques de l'intérieur du disque (430 mOsmol/kg)[7]. Un taux de viabilité d'environ 85 % des cellules encapsulées a été observé, les plus hautes activités métaboliques étant après 14 jours de culture pour les formulations 2 et 3 (Figure 3). Par contre, c'est la formulation 2 qui présente la production la plus élevée de glycosaminoglycanes (GAG) (figure 4).

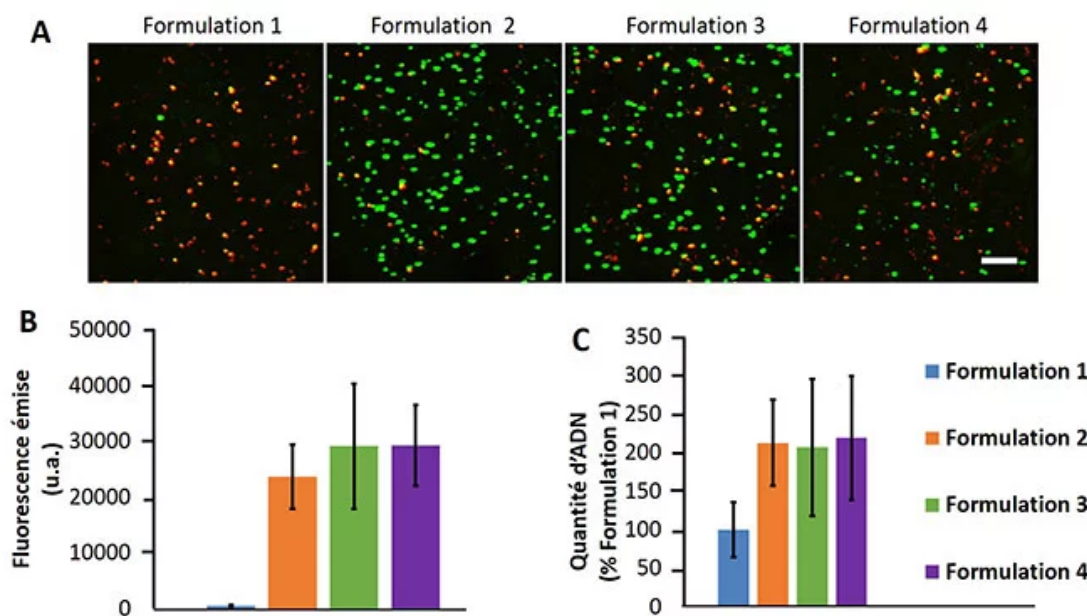


Figure 3 Les nouvelles formulations présentent une meilleure biocompatibilité après 14 jours en culture A) Viabilité cellulaire ée évaluée par LIVE/DEAD (rouge=cellule morte, vert= cellule vivante) B) Activité métabolique des cellules par AlamarBlue, C) Quantité d' ADN présente après 14jours

Tableau 2 Production de GAG selon la formulation

Hydrogel	Quantité Totale (μg)	Quantité relarguée (μg)	Quantité accumulée dans l'hydrogel (μg)
Formulation 1	10.7 ± 1.2	5.7 ± 0.5	5.2 ± 0.7
Formulation 2	33.1 ± 0.9	12.1 ± 1.2	21.0 ± 1.1
Formulation 3	23.8 ± 1.9	4.1 ± 0.4	19.6 ± 1.6
Formulation 4	15.2 ± 1.1	0.8 ± 0.2	14.3 ± 1.2

Pour finir, les tests d'injectabilité dans des disques humains explantés montrent une bonne rétention de la formulation 3. Non seulement la viscosité initiale de ce gel permet l'injection par une aiguille de petit diamètre en plus de combler les défauts présents dans le disque, mais aussi une gélification assez rapide pour éviter les fuites hors du site d'injection (figure 4).

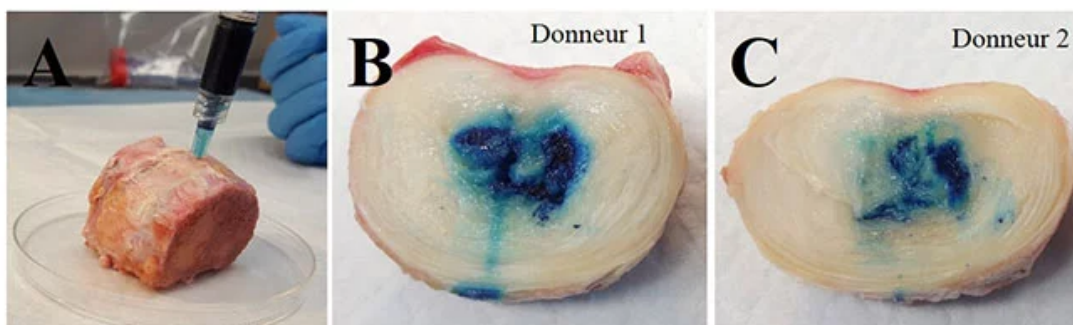


Figure 4 (A) Injection de l'hydrogel (colorée au bleu de toluidine) dans le NP d'un disque humain à travers l'anneau fibreux avec une aiguille de jauge 25. L'échantillon est gardé à 37 °C pour 30 minutes. (B) 0,5 ml d'hydrogel injecté dans le disque 1. (C) 0,3 dans le disque 2

Conclusion

Cette étude permet de conclure que la formulation 2 est une matrice injectable prometteuse pour la réparation des disques intervertébraux parce qu'elle présente des propriétés mécaniques similaires au NP humain et un environnement adéquat pour la survie des cellules ainsi que la synthèse et la rétention de glycosaminoglycanes, un des composants importants du tissu NP. La suite du projet se concentrera sur l'étude des bénéfices de l'ajout d'une molécule bioactive sur l'activité de synthèse des cellules et donc la capacité régénérative de la technologie. À terme, ce projet permettra de mettre au point des hydrogels injectables combinant cellules et agents bioactifs pour la médecine régénératrice notamment pour la régénéscence des disques intervertébraux.

Information supplémentaire

Pour plus de détails sur cette recherche, consulter l'article suivant :

Alinejad, Yasaman, Atma Adoungotchodo, Michael P Grant, Laura M Epure, John Antoniou, Fackson Mwale et Sophie Lerouge. 2018. « [Injectable Chitosan Hydrogels with Enhanced Mechanical Properties for Nucleus Pulposus Regeneration](#) ». Tissue Engineering Part A. doi: 10.1089/ten.tea.2018.0170

Atma Adoungotchodo

Atma Adoungotchodo est doctorante au Département de génie mécanique de l'ÉTS. Son projet de recherche porte sur la mise au point d'hydrogels de chitosane injectables pour la régénérescence du disque intervertébral.

Programme : [Génie technologies de la santé](#) [Génie mécanique](#)

Chaire de recherche : [Chaire de recherche du Canada sur les biomatériaux et les implants endovasculaires](#)

Laboratoires de recherche : [LIO – Laboratoire de recherche en imagerie et orthopédie](#)

Yasaman Alinejad

Yasaman Alinejad est stagiaire postdoctorale au Département de génie mécanique de l'ÉTS. Son projet de recherche porte sur la régénérescence du disque intervertébral et la micro-encapsulation des cellules.

Programme : [Génie mécanique](#)

Chaire de recherche : [Chaire de recherche du Canada sur les biomatériaux et les implants endovasculaires](#)

Laboratoires de recherche : [LIO – Laboratoire de recherche en imagerie et orthopédie](#)

Michael Grant

Michael P Grant est assistant de recherche au Lady Davis Institute for Medical Research, Hôpital général juif de Montréal, Université McGill.

Laura M Epure

Laura M Epure est assistante de recherche au Lady Davis Institute for Medical Research, Hôpital général juif de Montréal, Université McGill

John Antoniou

John Antoniou est chirurgien orthopédiste à l'Hôpital général juif de Montréal, professeur agrégé et directeur de recherche à la division de chirurgie orthopédique du département de chirurgie, Université McGill.

Fackson Mwale

Fackson Mwale est professeur au Département de chirurgie de l'Université McGill. Ses recherches portent sur le génie tissulaire pour le disque intervertébral.



Sophie Lerouge

Sophie Lerouge est professeure au Département de génie mécanique de l'ÉTS et directrice du Laboratoire de biomatériaux endovasculaire au Centre de recherche du CHUM (CRCHUM).

Programme : Génie mécanique Génie technologies de la santé

Chaire de recherche : Chaire de recherche du Canada sur les biomatériaux et les implants endovasculaires

Laboratoires de recherche : LIO – Laboratoire de recherche en imagerie et orthopédie

Références

1. DePalma, M.J., J.M. Ketchum, and T. Saullo, What Is the Source of Chronic Low Back Pain and Does Age Play a Role? *Pain Medicine*, 2011. 12(2): p. 224-233.
2. Wang, Z., et al., Efficacy of intervertebral disc regeneration with stem cells — A systematic review and meta-analysis of animal controlled trials. *Gene*, 2015. 564(1): p. 1-8.
3. Crevensten, G., et al., Intervertebral Disc Cell Therapy for Regeneration: Mesenchymal Stem Cell Implantation in Rat Intervertebral Discs. *Annals of Biomedical Engineering*, 2004. 32(3): p. 430-434.
4. Francisco, A.T., et al., Injectable laminin-functionalized hydrogel for nucleus pulposus regeneration. *Biomaterials*, 2013. 34(30): p. 7381-7388.
5. Ceccaldi, C., et al., Optimization of Injectable Thermosensitive Scaffolds with Enhanced Mechanical Properties for Cell Therapy. *Macromolecular Bioscience*, 2017: p. 1600435-n/a.
6. Cloyd, J.M., et al., Material properties in unconfined compression of human nucleus pulposus, injectable hyaluronic acid-based hydrogels and tissue engineering scaffolds. *European Spine Journal*, 2007. 16(11): p. 1892-1898.
7. van Dijk, B., E. Potier, and K. Ito, Culturing bovine nucleus pulposus explants by balancing medium osmolarity. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2011. 17(11): p. 1089-1096.

Références images

L'image d'en-tête a été achetée sur Istock.com et est protégée par des droits d'auteur.

Les images font partie de l'article de recherche de Tissue Engineering et sont sous licence CC.