

Baska JACKOVA

Emile GASSER

Fanny PREVOT

Mimer le disque intervertébral

Matériel & Méthodes

I. Synthèse des hydrogels de collagène I et des composites collagène I/Sulfate de Chondroïtine

Produits :

Collagène I

Sulfate de Chondroïtine - 5 g à 50€, Sigma Aldrich

Hydroxyde de Sodium (NaOH)

Tampon Phosphate Salin (PBS) – 500mL à 7€, Sigma Aldrich

Acide acétique (AcOH)

Ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) – 1g à 23€, Sigma Aldrich

N-Hydrosuccinimide (NHS) – 5g à 20€, Sigma Aldrich

Méthode :

Les gels composites de collagène I et de sulfate de chondroïtine (CS) sont synthétisés dans une plaque 24 puits. Tous les produits sont au préalable placés dans la glace (au minimum 10 minutes avant le début de la manipulation). Dans chaque puits sont ajoutés successivement différents volumes de CS (30 mg/mL, dissous dans PBS, 1x), 100 μ L de PBS 10x, 100 μ L de NaOH et 600 μ L de collagène I (4 mg/mL, dans AcOH 17 mM), puis différents volumes d'EDC (20 mg/mL, dissous dans l'eau) et NHS (80 mg/mL, dissous dans l'eau). La quantité de CS, d'EDC et de NHS varie suivant différents ratios, cf tableau ci-dessous. Le tout est mélangé à l'aide d'une micropipette. La gélification dure en moyenne une vingtaine de minutes. Les hydrogels sont ensuite recouverts avec du PBS pour empêcher la déshydratation et stockés à +4°C jusqu'à leur analyse.

Ratio massique Collagène:CS	Quantité de CS	Quantité de EDC	Quantité de NHS
Témoin	0 μL	/	/
1:1	120 μL	15 μL	9,5 μL
1:2	240 μL	31,3 μL	18,5 μL
1:3	360 μL	47,5 μL	29 μL
4:1	30 μL	3,88 μL	2,3 μL

II. Détermination de la température de dénaturation du collagène dans les hydrogels composites

Matériel :

Couppelles métalliques

Appareil TA Instruments Discovery DSC

Méthode :

Une masse d'environ 30mg de chaque hydrogel composite (synthétisé selon le protocole ci-dessus) de composition définie est déposée dans une coupelle en aluminium préalablement tarée. La coupelle est hermétiquement fermée et placée dans le four de l'appareil de DSC (Differential Scanning Calorimetry, appareil TA Instruments DSC), avec une coupelle vide pour référence. Une rampe de température de 10°C/min de 20°C à 90°C est appliquée sur les échantillons pour réaliser un thermogramme. La dénaturation des fibres de collagène des hydrogels de collagène composites libère de la chaleur captée par l'appareil. Le pic correspondant à la dénaturation des fibrilles de collagène des matrices polymères.

III. Mesure du taux de gonflement (Swelling) des hydrogels

Matériel :

Balance

Produits :

Chlorure de sodium (NaCl)

Méthode :

Les gels des différents ratios collagène/CS sont préparés selon le protocole ci-dessus. Ils sont placés pendant une heure à 4°C dans 1mL de solution de NaCl à 0,4M. Ils sont ensuite pesés et laissés à sécher dans un endroit peu humide. Une fois toute eau évaporée les gels sont pesés à nouveau sur une balance précision. Le taux de gonflement du gel est ensuite calculé à l'aide de la formule suivante :

$$A(\%) = \frac{m_{avant} - m_{après}}{m_{après}} \times 100$$

Où A est la masse d'eau emmagasinée par rapport à la masse du gel (en pourcentage), et $m_{avant/après}$ sont les masses pesées à la balance de précision avant et après évaporation.

IV. Mesure du module de cisaillement du gel de collagène I

Matériel :

Cloche à vide

Rhéomètre TA Instruments DHR2

Méthode :

Afin de mesurer les propriétés rhéologiques, un hydrogel composite de 3 mL, de composition définie est préparé sur une épaisseur d'au moins 1mm. Pour pouvoir réaliser cette mesure nous avons dû préparer un échantillon d'un volume important suffisamment homogène. La méthode de préparation utilisée précédemment ne permettait pas d'obtenir l'homogénéité nécessaire pour pouvoir effectuer la mesure. Nous avons donc provoqué la gélification en neutralisant par l'ammoniac dans une cloche à vide. De l'alizarine, un indicateur coloré, a été utilisé pour suivre l'évolution du pH sous la cloche. Après gélification de l'hydrogel (environ 2h), un disque de diamètre 22mm est découpé et placé sur le support plan d'un rhéomètre cône-plan (Rhéomètre TA Instruments DHR2). L'échantillon est soumis à une déformation croissante afin d'en déterminer le domaine de linéarité. Une déformation d'1% est retenue pour la suite. L'échantillon est soumis à un gradient d'oscillation sinusoïdal de 10Hz à 0,1Hz. Les modules de conservation G' et de perte G'' sont enregistrés.

V. Observation des hydrogels à l'aide de la microscopie électronique à balayage (MEB)

Matériel :

Lyophilisateur Cryotec Cosmos

Microscope à balayage Hitachi S-3400N SEM

Méthode :

Les hydrogels composites sont fixés au paraformaldehyde à 4% solubilisé dans du PBS pendant 24 heures. Après 3 rinçages de 30 minutes en eau distillée, les hydrogels sont congelés dans de l'azote liquide pendant 20 minutes. Les échantillons congelés sont placés dans un lyophilisateur Cryotec Cosmos à une température de -80°C et un vide de 0.1 mbar pendant 24 heures. Les échantillons lyophilisés sont ensuite coupés, déchirés et métallisés avec une couche d'or de 10 nm pour analyse. Enfin les hydrogels sont observés avec un microscope à balayage Hitachi S-3400N SEM avec une tension de 10 kV.

VI. Mise en culture des cellules dans les hydrogels

Les manipulations suivantes sont réalisées à un poste de sécurité microbiologique II.

Matériel :

Poste de sécurité microbiologique II.

Plaque 24 puits

Micropipette

Incubateur à CO₂

Microscope optique

Compteur de cellules

Cellule de Malassez

Produits :

Souche L929 de fibroblastes de souris

Hydrogels de collagène I/CS

PBS 1X

Milieu complet : DMEM (DMEM 1X (Gibco) + serum de veau fœtal (Sigma) 10% + GlutaMax + Antibiotiques (Gibco) : Pénicilline à la concentration 100 unités par mL et Streptomycine à la concentration 100 µg/mL

Trypsine 0.05 unités par mL

Méthode :

Un flacon de culture Nunc contient une lignée immortalisée de fibroblastes. Sous un PSM, le milieu de culture est enlevé en veillant à ne pas toucher les cellules qui sont accrochées sur les parois de la boîte de culture. La boîte est rincée avec 10mL de PBS. Après 10 minutes, ces 10mL sont retirés. 2mL de trypsine sont ajoutés et la trypsine est répartie sur toute la surface occupée par les cellules en penchant la boîte. La boîte est placée dans l'incubateur à 37°C pendant 10 minutes afin de décoller les cellules de la boîte. A l'aide d'un microscope optique et d'une cellule de Malassez, les cellules sont dénombrées. Nous avons compté 3 millions de cellules par mL. La solution doit être diluée avec du milieu de culture (DMEM) jusqu'à obtenir une concentration de 2 millions de cellules par mL.

Les hydrogels sont préparés dans une plaque 24 puits. Avant la gélification des solutions (protocole 1), 300µL de cellules sont ajoutés dans chacun des puits. Cela représente 600 000 cellules par puits. Les hydrogels sont placés à l'incubateur pendant 15 minutes. Après gélification, 1mL de milieu de culture est ajouté dans chaque puits. La plaque est placée à l'incubateur pendant une semaine. Le milieu de culture est changé le 3^{ème} jour et le 5^{ème} jour.

VII. Test de viabilité cellulaire

Les manipulations suivantes sont réalisées sous un PSM.

Matériel :

Poste de sécurité microbiologique II.

Plaque 24 puits

Pipettes graduées stériles

Spectrophotomètre Spectromax M5 de Molecular Devices

Produits :

La plaque 24 puits contenant les cellules mises en culture dans les hydrogels

PBS 1x

Alamar Blue (ThermoFischer scientific, DAL1025, 1g, 38€)

DMEM (DMEM 1X (Gibco) + serum de veau fœtal (Sigma) + GlutaMax + Antibiotiques (Gibco) : Pénicilline à la concentration 100 U/mL et Streptomycine à la concentration 100 µg/mL

Méthode :

Après une semaine, le milieu de culture est remplacé dans chaque puits par 300µL d'Alamar Blue dilué à 10% dans du milieu de culture. Il est important de veiller à ne pas toucher les hydrogels lors du retrait du milieu de culture. En parallèle, un témoin est réalisé en

mettant 300µL d'Alamar Blue dilué à 10% dans un puit, et un autre puit est rempli de 300µL de milieu de culture pour la référence. Après 2 heures d'incubation, les 300µL de surnageant présent dans chaque puits sont transférés sur une nouvelle plaque de 24 puits. 500 µL de DMEM sont introduits dans chaque puits de la plaque.

Enfin, pour chacun des puits, on mesure et l'absorbance à 570nm et à 600nm. Ces mesures indiquent le pourcentage de réduction de l'Alamar Blue dans chaque puits. On en déduit le pourcentage de viabilité cellulaire par la formule :

$$\% \text{ réduction} = \frac{\text{concentration forme réduite}}{\text{concentration forme oxydée}} = \frac{\varepsilon_{ox,600} A_{570} - \varepsilon_{ox,570} A_{600}}{\varepsilon_{red,570} A_{600}^{\circ} - \varepsilon_{red,600} A_{570}^{\circ}} * 100$$

Avec :

$\varepsilon_{red,570} = 155,677$ (respectivement $\varepsilon_{red,600}=14,652$), le coefficient d'extinction molaire de l'Alamar Blue réduit à 570 nm (resp. à 600nm).

$\varepsilon_{ox,570} = 80,586$ (resp. $\varepsilon_{ox,600} =117,216$), le coefficient d'extinction molaire de l'Alamar Blue oxydé à 570 nm (resp. à 600 nm)

A_{570} (resp. A_{600}), Absorbance de l'échantillon à 570 nm (resp. à 600 nm)

A_{570}° (resp. A_{600}°), Absorbance du puits contrôle contenant de l'Alamar Blue sans cellule à 570 nm (resp. à 600 nm).

Le pourcentage de réduction d'un échantillon est comparé à celui d'un échantillon témoin (gel de collagène sans crosslinker EDC/NHS) afin d'évaluer la toxicité d'un produit de notre protocole.