

Hydrogels macroporeux pour l'ingénierie tissulaire : Matériel et Méthodes

Introduction

Dans le but de créer et d'étudier des hydrogels macroporeux permettant la réparation des tissus, nous avons organisé notre travail en trois parties. Dans un premier temps, nous avons tenté de synthétiser puis de caractériser de l'acide poly-lactide-co-glycolide (PLGA). En parallèle, nous avons fabriqué des échantillons d'hydrogel macroporeux avec du PLGA commercial et du sel calibré. Puis nous avons réalisé des matrices sacrificielles en ABS afin de réaliser des structures poreuses en collagène. Enfin nous avons tenté de remplacer le PLGA par du PLA d'imprimante 3D par souci d'économie. Sur chaque type d'échantillon, nous avons cultivé des fibroblastes pour constater la biocompatibilité de nos échantillons ainsi que l'adhésion et la migration des cellules dans les pores.

Matériel

Synthèse du PLGA

- Monomères : Glycolide et Lactide (Sigma Aldrich)
- Amorceurs : chlorure de choline, octanoate stanneux (Sigma Aldrich)
- Lavage : acétone, dichlorométhane, méthanol
- ballon de 25mL
- ballon d'azote
- support élévateur, agitateur magnétique et barreau aimanté, septums
- pipette 2 μ L
- thermomètre

Structures poreuses PLGA/PLA

- hydrogels : PLGA 50 :50, 7,000-17,000 kDa (Sigma) ou PLA
- sel : NaCl pur (sigma) tamisé entre 400 et 500 μ m de diamètre
- acétone
- eau distillée
- béchers de 25mL et 1L
- petit cristalliseur
- agitateur magnétique et barreau
- cuve à ultrasons

Structures poreuses Collagène/ Agar

- collagènes à 2 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL dans l'acide acétique
- agar à 4% dans l'eau distillée
- structures 3D en ABS
- acétone et eau distillée
- dessiccateur avec atmosphère saturée en ammoniac (pH=9)
- seringues 1 mL
- bécher de 1L

Culture cellulaire

- fibroblastes
- Tampon phosphate salin (*Phosphate buffered saline*, PBS)
- trypsine
- milieu de culture DMEM
- plaques stériles 24 puits

Méthodes

Synthèse du PLGA

Dans un ballon 25mL sont introduits 4.25g de Lactide, 4.25g de glycolide, 1.36 μ L de SnOct₂ et 1.03 μ L de CHOL avec un barreau aimanté. Le tout avec un réfrigérant et septum est surmonté d'un ballon N₂. Le milieu réactionnel est porté jusqu'à 125°C.

A la fin de la réaction, le produit est dissout dans le dichlorométhane (5 séances) sous agitation et en broyant le produit puis est précipité avec un excès de méthanol anhydre (4 fois en volume). Le soluté est filtré sur Büchner avec du méthanol. Le séchage et ensuite au dessiccateur chauffant (2h).

L'analyse du produit est faite en RMN (comparée aux RMNs du produit commercial et des deux monomères) ainsi que en DSC (comparée à la DSC du produit commercial).

Structures poreuses PLGA/PLA

Les structures poreuses sont réalisées à partir de PLGA commercial (50:50, 7000-17000 kDa Sigma) ou du PLA commercial d'imprimante.

Le procédé consiste tout d'abord à dissoudre le polymère (PLA ou PLGA) dans de l'acétone avec un ratio polymère-acétone de 20/80 en masse. Puis on ajoute la fraction de sel tamisée 400 μ m-500 μ m en proportion 44% en masse. après agitation jusqu'à homogénéisation, le mélange est laissé à sécher à l'air libre. Le bloc obtenu est mis 3 demi journées dans un bécher d'eau ultra pure (eau changée à chaque séance) plongé dans une cuve ultrason pour enlever le sel. On obtient ainsi un hydrogel poreux assez rigide.

L'analyse de l'hydrogel est faite au MEB pour contrôler la taille des pores du réseau.

Structures poreuses Collagène

Des matrices sacrificielles sont imprimées en acrylonitrile butadiène styrène (ABS) à l'imprimante 3D. Les filaments de la matrice sont choisis de diamètre environ égal à 400 μ m.

On prépare sous hotte stérile des solutions de collagène dans l'acide acétique à 2 mg/mL, 5 mg/mL et 10 mg/mL.

On prépare une solution d'agar à 4% dans 20mL d'eau sous agitation en portant à ébullition.

Avec une seringue, on remplit chaque matrice avec une solution de collagène ou d'agar.

L'échantillon en agar durcit en refroidissant.

Les échantillons de collagène sont placés pendant 2h dans un dessiccateur à atmosphère saturée en ammoniac dont le pH est contrôlé à 8-9 avec du papier pH.

A 2 mg/mL, le collagène ne polymérise pas.

On place l'échantillon d'agar et ceux de collagène à 5 mg/mL et 10 mg/mL ayant polymérisé dans un bécher contenant 0,5L d'acétone avec une agitation lente.

L'ABS se dissout. L'échantillon à 5 mg/mL est trop fragile et se détruit.

On obtient des échantillons poreux tels que souhaités avec l'agar et le collagène à 10 mg/mL.

On replace ces échantillons dans de l'eau distillée pour les réhydrater.

Culture cellulaire

On utilise des plaques stériles de 24 puits de 2mL. On stérilise les échantillons formés précédemment avec de l'éthanol en faisant attention à ne pas les laisser tremper plus de 20 min au risque de détruire les pores. On rince 3 fois avec du PBS. On place chaque échantillon d'hydrogel macroporeux à étudier dans un puits. On décolle les fibroblastes avec 1 mL de trypsine. Après 7 min, on vérifie au microscope que les cellules sont bien décollées. On ajoute 9 mL de PBS. On centrifuge 3 min à 1600 tr/min à température ambiante. On retire le liquide surnageant puis on dissout le culot dans 10 mL de milieu de culture. On compte les cellules avec une cellule de Malassez. On les ensemence à 100 000 cellules/mL en mettant 1 mL par puits.

Après une semaine de culture, on fixe les échantillons. Pour cela on retire le milieu de culture puis on ajoute dans chaque puits 1 mL de PFA à 4% dans le PBS préalablement préparé en chauffant au bain marie à 60 °C sous agitation pendant 1h. On conserve les échantillons au réfrigérateur. Les échantillons sont observés au microscope électronique à balayage.