

NANOBONEFILLER

Vecteurs nanoporeux de biomolécules à base de céramiques CaP pour la régénération osseuse

Coordinateur : Dr K. Anselme, Institut de Science des Matériaux de Mulhouse, IS2M, CNRS LRC7228, Mulhouse

Partenaires: Dr C. Vix-Guterl, J. Möller, Institut de Science des Matériaux de Mulhouse, IS2M, CNRS LRC7228, Mulhouse
 Pr C. Tarnus, Chimie Organique et Bioorganique, COB, CNRS UMR7015, Mulhouse
 Pr P. Laquerrière, Pr D. Laurent-Maquin, Interaction biomatériaux/tissus hôtes, IBTH, INSERM ERM 0203, Reims
 Pr E. Jallot, Laboratoire de Physique Corpusculaire, LPC, CNRS UMR 6533, Clermont-Ferrand
 Dr J-M. Nedelec, O. Raisslé, Laboratoire des Matériaux Inorganiques, LMI, CNRS UMR 6002, Clermont-Ferrand
 Dr J. Amédée, R. Bareille, J.C. Fricain, Biomatériaux et Réparation tissulaire, BRT, INSERM U577, Bordeaux.

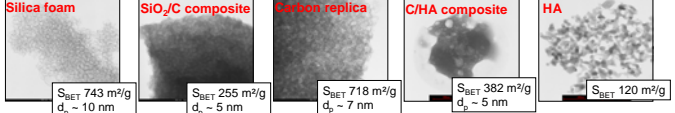
Objectif

Développer un système de comblement osseux injectable permettant le relargage contrôlé de facteurs de croissance basé sur des vecteurs à nanoporosité contrôlée à base de phosphate de calcium. Les fonctions majeures de ce système de relargage seront de maintenir en place les biomolécules sur le site de délivrance afin qu'elles puissent exercer leur activité biologique et de fournir également un support initial pour la croissance et la différenciation des cellules osseuses.

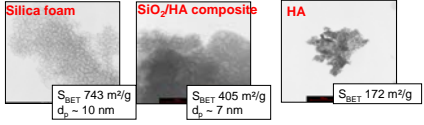
Synthèse des CaP par sol/gel aqueux dans templates durs (IS2M)

Deux voies de synthèse ont été retenues:

1. Double réplique silice → carbone → hydroxyapatite



2. Réplique directe silice → hydroxyapatite

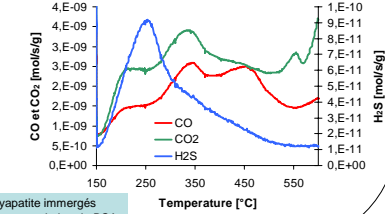


La réplique directe conduit à des céramiques à surface spécifique plus importante tout en simplifiant la synthèse.

Dosage de protéines modèles (BSA) par TPD

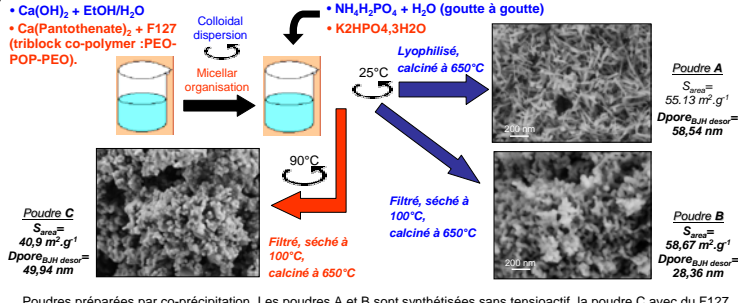
Thermo-désorption programmée d'une céramique avec de la BSA adsorbée: la céramique après adsorption est chauffée sous vide pour décomposer la BSA, puis les gaz formés sont analysés par spectroscopie de masse.

La quantité de protéine dans la porosité peut être calculée à partir de l'intégration de l'aire sous le pic de H₂S.



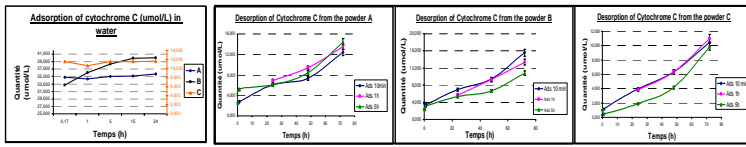
50 mg d'hydroxyapatite immergés pendant 3h dans une solution de BSA à 0,2% dans du PBS.

Profils d'adsorption/désorption de protéines sur différentes poudres d'Hap (LMI)



Poudres préparées par co-précipitation. Les poudres A et B sont synthétisées sans tensioactif, la poudre C avec du F127.

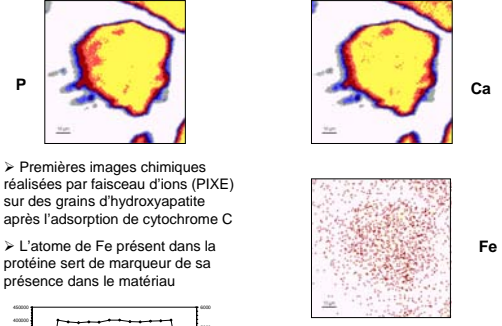
Désorption de cytochrome C en DMEM



La désorption est effectuée dans du DMEM. Les poudres sont centrifugées chaque 24h et plongées dans un nouveau bain de DMEM. La quantité de protéines est mesurée par spectrophotométrie UV.

Après 72h de désorption, les poudres A et B contiennent encore 10 umol/L de protéines → bon comportement pour le relargage des protéines

Cartographie chimique de la distribution des protéines par micro-faisceau d'ions (LPC)



► Premières images chimiques réalisées par faisceau d'ions (PIXE) sur des grains d'hydroxyapatite après l'adsorption de cytochrome C

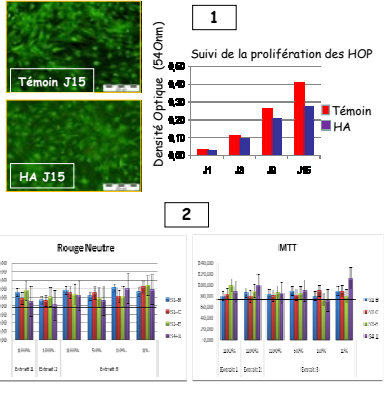
► L'atome de Fe présent dans la protéine sert de marqueur de sa présence dans le matériau

► Profils de concentrations en P, Ca, Fe à travers un grain.

► On note l'incorporation de la protéine à l'intérieur du grain.

► Ces résultats laissent présager un très bon comportement en conditions biologiques pour l'adsorption et le relargage de protéines

Evaluation de la Biocompatibilité de HAP provenant (1) d'IS2M et (2) du LMI sous forme de pastilles (1) ou de poudres (2) (BRT)



Matériaux non cytotoxiques

Avancement du projet

► Résultats

- Synthèse de vecteurs CaP avec des mésopores interconnectés mais non organisés (4 poudres différentes) (IS2M, LMI)
- Mise au point et validation d'une technique de dosage de protéines in situ (TPD) (IS2M)
- Mise au point des techniques d'inclusion pour analyse PIXE des nanovecteurs et imagerie sur coupes après imprégnation par le cytochrome C (LPC)
- Développement de modèles in vitro et in vivo pour l'étude du potentiel ostéogénique (BRT)
- Validation de la capacité d'adsorption de protéines des poudres par TPD et spectrométrie (IS2M, LMI)
- Validation de la non cytotoxicité des poudres vis à vis de cellules osseuses humaines (essais en contact direct ou sur extraits) (BRT)

► Travaux prévus

- Synthèse de vecteurs CaP à mésoporosité organisée par technique d'opale inverse (LMI)
- Etude de la réaction inflammatoire in vitro sur les 4 poudres déjà disponibles + nouvelles poudres (IBTH)
- Evaluation in vitro dans un modèle de co-culture cellules ostéoprogénitrices + cellules endothéliales des 4 poudres déjà disponibles + nouvelles poudres (BRT)
- Tests d'imprégnation des poudres par les facteurs de croissance d'intérêt (TGFβ, VEGF): dosage dans le matériau par TPD ou après marquage radioactif. Dosage des facteurs après relargage (IS2M)
- Visualisation sur coupes de la distribution des facteurs de croissance par analyse PIXE avant implantation et de l'ostéogénèse après implantation (LPC)
- Test du potentiel ostéogénique des vecteurs avec et sans facteurs de croissance chez la souris (BRT)