



**HAL**  
open science

# Intérêt des cellules souches mésenchymateuses en ingénierie tissulaire du cartilage : effets des stimuli mécaniques et biochimiques

Yun Wang

► **To cite this version:**

Yun Wang. Intérêt des cellules souches mésenchymateuses en ingénierie tissulaire du cartilage : effets des stimuli mécaniques et biochimiques. Biotechnologies. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2007. Français. NNT : 2007NAN11304 . tel-01747415

**HAL Id: tel-01747415**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747415>**

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

NANCY UNIVERSITE – Faculté de Médecine

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE – SANTE - ENVIRONNEMENT

---

THESE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE NANCY UNIVERSITE**

*Spécialité : Bioingénierie*

Présentée et soutenue publiquement

Par

**Yun WANG**

Le 27 Juin 2007

**INTERET DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES  
EN INGENIERIE TISSULAIRE DU CARTILAGE  
EFFET DES STIMULI MECANIQUES ET BIOCHIMIQUES**

*Directeur de thèse : Docteur Sylvaine MULLER*

*Co-Directeur de thèse : Docteur Céline GIGANT-HUSELSTEIN*

JURY

Président :	Dr. N. JESSEL	CR1/INSERM	Université Louis Pasteur
Rapporteurs :	Dr. AM FREYRIA	CR/CNRS	Université Lyon I
	Prof. F. BEREMBAUM	Professeur	Université Paris VI
Examinateurs :	Dr. S. MULLER	CR1/INSERM	Nancy Université
	Dr. C. GIGANT-HUSELSTEIN	MCU	Nancy Université
Invité :	Prof. P. GILLET	Professeur	Nancy Université

**REMERCIEMENTS**

*À mes parents*

*À mon mari*

*À toute ma famille et tous mes amis*

*Pour leur patience, leur soutien et leur amour tout au long de ces années, je leur dédie cette thèse.*

Au terme de ce travail, je tiens avant tout à adresser mes remerciements les plus chaleureux à tous ceux qui m'ont aidée au cours de sa réalisation.

Je tiens tout d'abord à remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur **Jean-François STOLTZ**, Directeur du groupe «Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire du LEMTA», qui m'a accueillie et m'a permis de réaliser ce travail dans son laboratoire. Je lui suis très reconnaissante pour sa confiance, ses remarques, son soutien financier et scientifique.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Madame le Docteur **Sylvaine MULLER**, chargée de recherche à l'INSERM, mon directeur de thèse, qui m'a encadrée et orientée tout au long de ces années de travail. Je la remercie pour ses conseils éclairés lors de la correction de ce manuscrit.

J'exprime ma reconnaissance et ma gratitude à Madame le Docteur **Céline GIGANT-HUSELSTEIN**, maître de conférence, ma co-directrice de thèse. Je la remercie plus spécialement pour les nombreuses discussions et suggestions précieuses au cours de la correction de ce manuscrit.

Je remercie également Madame le Docteur **Astrid PINZANO** et Madame le Docteur **Christel HENRIONNET** pour leurs implications dans mon travail au cours de ma thèse et pour leurs aides et leurs précieux conseils.

J'exprime ma gratitude et mon profond respect à Madame le Docteur **Anne Marie FREYRIA**, Monsieur le Professeur **Francis BEREMBAUM** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, ainsi qu'à Madame le Docteur **Nadia JESSEL** et Monsieur le professeur **Pierre GILLET**, qui ont accepté d'évaluer mon travail.

Je tiens à remercier Monsieur le professeur **Laurent Galois** ainsi que le service de Chirurgie Orthopédique et Traumatique, qui m'ont fourni les prélèvements (des têtes fémorales et de la moelle osseuse).

J'adresse mes remerciements à Mesdames les Docteurs **Véronique Decot** et **Danielle Bensoussan** ainsi que l'Unité de Thérapie Cellulaire et Tissulaire.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur **Xiong WANG**, pour sa disponibilité et ses encouragements au cours de ma thèse ainsi que pour son aide, sa gentillesse et ses précieux conseils.

Je tiens à exprimer du fond du cœur toute ma reconnaissance à Madame **Ghislaine CAUCHOIS**, pour sa gentillesse, son soutien quotidien, particulièrement la patience et le courage dont elle a témoigné lors de la correction de ce manuscrit.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame **Christine PRIN-MATHIEU**, pour sa sympathie, ses conseils et son aide concernant notamment la cytométrie en flux. Je tiens à remercier Monsieur le Docteur **Luc Marchal**, Ingénieur d'Etudes et Monsieur le Docteur **Dominique DUMAS**, Ingénieur de Recherche, pour leur sympathie, leurs conseils et leur aide concernant respectivement la microscopie électronique et confocale.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Madame **Monique GENTILS**, Monsieur **Claude WENDLING** et Madame **Brigitte GUERBER** pour leur gentillesse à mon égard, leur soutien constant et leur disponibilité.

Je tiens à remercier Madame le Docteur **Natalia de Isla**, pour ses conseils éclairés, ses encouragements et son amitié pendant ces années de thèse.

Enfin, mes remerciements vont également vers tous mes chers collègues et mes amis du laboratoire pour m'avoir encouragée et supportée durant ces années :

*Assia, Karine, Caroline, Cédryck, Elisabeth, Elie, Estelle, Halima, Huahua, Jingwei, Lei, Mariama, Nicolas, Na, Naceur, Shalaw, Vanessa et Yinping.*

**TABLE DES MATIERES**

REMERCIEMENTS.....	1
TABLE DES MATIERES.....	5
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	10
LISTE DES ABREVIATIONS.....	13
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	17
AVANT-PROPOS.....	24
INTRODUCTION GENERALE.....	25
CHAPITRE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	29
<b>I. Physiologie du cartilage articulaire.....</b>	<b>30</b>
<i>I.1. Constitution du cartilage articulaire.....</i>	<i>32</i>
I.1.1. Les chondrocytes.....	32
I.1.2. La matrice extracellulaire.....	34
I.1.2.1. Le réseau collagénique .....	34
I.1.2.2. Les protéoglycannes .....	38
I.1.3. L'eau et les autres constituants de la matrice extracellulaire.....	41
<i>I.2. Répartition des différents constituants dans le cartilage articulaire.....</i>	<i>42</i>
I.2.1. La couche superficielle.....	42
I.2.2. La couche moyenne ou transitionnelle.....	43
I.2.3. La couche profonde.....	44
I.2.4. La couche basale ou calcifiée.....	44
<i>I.3. Propriétés biomécaniques du cartilage articulaire.....</i>	<i>45</i>
I.3.1. Contraintes exercées sur le cartilage .....	45
I.3.2. Réponse du tissu aux contraintes mécaniques.....	46
I.3.3. Réponse des cellules aux contraintes mécaniques.....	48
<i>I.4. Fonctions du cartilage articulaire.....</i>	<i>50</i>
I.4.1. Glissement des surfaces articulaires.....	50
I.4.2. Transmission et amortissement des contraintes.....	51
I.4.3. La fonction de trophicité.....	52
<b>II. Physiopathologie du cartilage articulaire.....</b>	<b>53</b>
<i>II.1. Classification des lésions cartilagineuses.....</i>	<i>53</i>
<i>II.2. Relation entre facteurs biomécaniques et lésions cartilagineuses.....</i>	<i>54</i>
II.2.1. Implications des facteurs mécaniques dans la physiopathologie du cartilage...54	
II.2.2. Mécanisme de dégradation du cartilage.....	55
<i>II.3. Stratégies thérapeutiques concernant les lésions cartilagineuses.....</i>	<i>57</i>
II.3.1. Traitements médicaux.....	58
II.3.2. Traitements chirurgicaux.....	58

II.3.2.1. Techniques palliatives.....	58
II.3.2.2. Techniques de réparation cartilagineuse.....	59
<b>III. Ingénierie tissulaire du cartilage.....</b>	<b>62</b>
<b><i>III.1. Sources cellulaires.....</i></b>	<b>63</b>
III.1.1. Chondrocytes.....	64
III.1.2. Cellules souches.....	64
III.1.2.1. Définition des cellules souches.....	65
III.1.2.2. Localisation des cellules souches mésenchymateuses .....	66
III.1.2.3. Caractérisation des CSMs.....	69
III.1.2.4. Chondrogénèse.....	72
III.1.2.4. Système de culture.....	75
<b><i>III.2. Biomatériaux.....</i></b>	<b>76</b>
III.2.1. Cahier des charges.....	76
III.2.2. Biomatériaux utilisés en ingénierie tissulaire du cartilage.....	77
III.2.2.1. Biomatériaux d'origine naturelle.....	77
III.2.2.2. Biomatériaux polymériques synthétiques.....	79
<b><i>III.3. Facteurs biochimiques ou physicochimiques.....</i></b>	<b>80</b>
III.3.1. Facteurs de croissance.....	81
III.3.1.1. Facteurs de croissance de la superfamille du TGF- $\beta$ .....	81
III.3.1.2. Autres facteurs de croissance.....	85
III.3.2. Autres facteurs biochimiques ou physicochimiques.....	86
<b><i>III.4. Facteurs biomécaniques.....</i></b>	<b>87</b>
III.4.1. Modèles d'étude.....	88
III.4.2. Différents types de contraintes mécaniques.....	89
III.4.2.1. Compression.....	89
III.4.2.2. Pression hydrostatique.....	91
III.4.2.3. Cisaillement.....	92
III.4.2.4. Contraintes mécaniques complexes.....	93
<b><i>III.5. Systèmes de culture - Bioréacteurs.....</i></b>	<b>93</b>
III.5.1. Différents systèmes de bioréacteurs.....	94
III.5.1.1. Bioréacteur à rotation.....	94
III.5.1.2. Bioréacteur à perfusion.....	95
III.5.2. Avantages des bioréacteurs.....	97
III.5.2.1. Contrôle des paramètres physico-chimiques.....	97
III.5.2.2. Répartition des cellules dans le biomatériau.....	97
III.5.2.3. Amélioration du transport de masse dans le biomatériau.....	98
III.5.2.4. Application de contraintes mécaniques contrôlées.....	99
<b>CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>100</b>
<b><i>I. Culture cellulaire.....</i></b>	<b>101</b>
I.1. Isolation des cellules à partir des prélèvements.....	101

I.2. Culture en monocouche, passage et congélation.....	103
I.3. Ensemencement des cellules dans des biomatériaux tridimensionnels.....	105
<b>II. Stimulations mécaniques.....</b>	<b>108</b>
II.1. Entrechoquement.....	108
II.2. Compression dynamique intermittente.....	109
<b>III. Stimulations biochimiques.....</b>	<b>111</b>
<b>IV. Méthodologies analytiques.....</b>	<b>113</b>
IV.1. Analyse de la viabilité cellulaire, apoptose et nécrose.....	113
IV.2. Analyse de l'activité métabolique.....	115
IV.3. Analyse du cycle cellulaire.....	118
IV.4. Analyse de l'expression de marqueurs de surface cellulaire.....	120
IV.5. Analyse de la synthèse matricielle par histologie.....	124
IV.6. Analyse de l'expression de gènes par RT-PCR quantitative.....	126
IV.7. Analyse de l'expression de protéines collagéniques.....	133
IV.8. Analyse statistique.....	137
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>138</b>
<b>I. Influence de l'expansion en monocouche sur l'expression de marqueurs de surface cellulaire et l'expression de gènes.....</b>	<b>139</b>
<b><i>I.1. Evolution des marqueurs de surface cellulaire et de gènes d'intérêt par les chondrocytes humains cultivés en monocouche en fonction des passages.....</i></b>	<b><i>139</i></b>
I.1.1. Expression de marqueurs de surface cellulaire.....	139
I.1.2. Expression de gènes d'intérêt.....	142
<b><i>I.2. Evolution des marqueurs de surface cellulaire et de gènes d'intérêt par les CSMs humaines cultivées en monocouche en fonction des passages.....</i></b>	<b><i>144</i></b>
I.2.1. Expression de marqueurs de surface cellulaire.....	144
I.2.2. Expression de gènes d'intérêt.....	147
<b><i>I.3. Discussion.....</i></b>	<b><i>149</i></b>
<b>II. Influence de la stimulation mécanique sur la réponse des chondrocytes et des CSMs encapsulés dans un hydrogel d'alginate/HA : effets des entrechoquements.....</b>	<b>158</b>
<b><i>II.1. Réponses des chondrocytes.....</i></b>	<b><i>158</i></b>
II.1.1. Activité métabolique.....	158
II.1.2. Viabilité cellulaire.....	159
II.1.3. Cycle cellulaire.....	161
II.1.4. Expression de gènes d'intérêt.....	162
II.1.5. Synthèse de la matrice extracellulaire.....	164
II.1.6. Synthèse de collagènes de type I et II.....	166
<b><i>II.2. Réponses des CSMs.....</i></b>	<b><i>168</i></b>

II.2.1. Activité métabolique.....	168
II.2.2. Viabilité cellulaire.....	168
II.2.3. Cycle cellulaire.....	170
II.2.4. Expression de gènes d'intérêt.....	171
II.2.5. Synthèse de la matrice extracellulaire.....	173
II.2.6. Synthèse de collagènes de type I et II.....	173
<b>II.3. Discussion.....</b>	<b>176</b>
<b>III. Influence de la stimulation mécanique sur la réponse des chondrocytes et des CSMs encapsulés dans un hydrogel d'alginate/HA : effets de la compression dynamique intermittente.....</b>	<b>180</b>
<b>III.1. Réponses des chondrocytes.....</b>	<b>181</b>
III.1.1. Viabilité cellulaire.....	181
III.1.2. Cycle cellulaire.....	181
III.1.3. Expression de gènes d'intérêt.....	182
<b>III.2. Réponses des CSMs.....</b>	<b>184</b>
III.2.1. Viabilité cellulaire.....	184
III.2.2. Cycle cellulaire.....	185
III.2.3. Expression de gènes d'intérêt.....	186
III.2.4. Synthèse de collagènes de type I et II.....	188
<b>III.3. Discussion.....</b>	<b>190</b>
<b>IV. Influence de la stimulation biochimique sur les chondrocytes et les CSMs encapsulés dans un hydrogel d'alginate/HA.....</b>	<b>193</b>
<b>IV.1. Réponses des chondrocytes .....</b>	<b>193</b>
IV.1.1. Activité métabolique.....	193
IV.1.2. Viabilité cellulaire.....	194
IV.1.3. Cycle cellulaire.....	195
IV.1.4. Expression de gènes d'intérêt.....	195
<b>IV.2. Réponses des CSMs.....</b>	<b>197</b>
IV.2.1. Activité métabolique.....	197
IV.2.2. Viabilité cellulaire.....	197
IV.2.3. Cycle cellulaire.....	198
IV.2.4. Expression de gènes d'intérêt.....	199
IV.2.5. Synthèse de collagènes de type I et II.....	199
<b>IV.3. Discussion.....</b>	<b>202</b>
<b>CHAPITRE IV : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>205</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>210</b>
<b>PUBLICATIONS.....</b>	<b>232</b>

**LISTE DES PUBLICATIONS**

et

**COMMUNICATIONS**

**Publications dans des revues internationales**

1. Li N, Eljaafari A, Bensoussan D, **Wang Y** *et al.* Human umbilical vein endothelial cells increase *ex vivo* expansion of human CD34(+) PBPC through IL-6 secretion. *Cytotherapy*. 2006; 8 : 335-342.
2. **Wang Y**, De Isla N, Huselstein C *et al.* The effect of alginate culture and mechanical stimulation on cartilaginous matrix synthesis of rat dedifferentiated chondrocytes. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2007 (*sous presse*).
3. Yang JW, DE Isla N, Huselstein C, **WANG Y**, *et al.* Evaluation of human Mesenchymal Stem Cells cell cycle, viability in different alginate culture conditions. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2007 (*sous presse*).
4. **Wang Y**, De Isla N, Marchal L *et al.* Effect of construct properties on the proliferation and matrix synthesis by dedifferentiated chondrocyte encapsulated in alginate gel (*en préparation*).
5. Henrionnet C\*, **Wang Y\***, Huselstein C *et al.* Phenotypic analysis of changes in cell surface markers and gene expression of human mesenchymal stem cells and chondrocytes during monolayer expansion (*en préparation*).

(\* les deux premiers auteurs ont contribué de façon égale au travail)

**Communications dans des congrès**

***Communications orales :***

1. **Wang Y**, De Isla N, Marchal L *et al.* Effect of construct properties on the proliferation and matrix synthesis by dedifferentiated chondrocyte encapsulated in alginate gel. *5<sup>th</sup> international symposium on mechanobiology of cartilage*, May 10-12, 2007 in Athens, Greece.
2. Henrionnet C\*, **Wang Y\***, Huselstein C, *et al.* Phenotypic analyssi of changes in cell surface markers and gene expression of human mesenchymal stem cells and chondrocytes during monolayer expansion. *5<sup>th</sup> international symposium on mechanobiology of cartilage*, May 10-12, 2007 in Athens, Greece.  
  
(\* les deux premiers auteurs ont contribué de façon égale au travail)
3. **Wang Y**, De Isla N, Huselstein C, *et al.* Influences of cell seeding density on dedifferentiated chondrocyte in alginate culture under mechanical stimulation. *5<sup>th</sup> World Congress of Biomechanics* July 29-August 4, 2006 in Munich, Germany.

**Communications affichées :**

1. De Isla N, **Wang Y**, Huselstein C, *et al.* The influence of mechanical and biochemical stimuli on NO and GAG release by human OA cartilage explants or tissue engineered cartilages under different oxygen tensions. **Annual Hilton Head Workshop « Engineering tissues : replace, repair, regenerate »**, March 7-11 2007, Hilton Head Island SC, USA.
2. **Wang Y**, De Isla N, Huselstein C, *et al.* Effect of mechanical stimulation on the redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes in alginate bead culture. **Annual TERMIS-EU Meeting** October 8-11, 2006 in Rotterdam, Netherlands.
3. **Wang Y**, De Isla N, Huselstein C, *et al.* Effect of mechanical stimulation on chondrocytes in alginate bead culture. **3<sup>rd</sup> international meeting of medical engineering and cell therapy** May 15-16, 2006 in Nancy, France.
4. Yang JW, De Isla N, Huselstein C, **Wang Y** *et al.* Chondrogenesis of human MSC in micromass culture. A fluorescence and electron microscopy approach. **2<sup>nd</sup> international meeting of medical engineering and cell therapy** May 10-11, 2005 in Nancy, France.

**LISTE DES ABREVIATIONS**

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN Complémentaire
ALCAM	Activated Leukocyte-Cell Adhesion Molecule
ARN	Acide Ribonucléique
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BMPs	Bone Morphogenetic Proteins
BSA	Albumine de Sérum Bovin
CD	Cluster de Différenciation
CLA	Capacité liante en anticorps
CMF	Cytométrie en Flux
COMP	Cartilage Oligo Matrix Protein
CS	Sulfate de Chondroïtine
CSEs	Cellules souches embryonnaires
CSHs	Cellules Souches Hématopoïétiques
CSMs	Cellules Souches Mésenchymateuses
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DO	Densité Optique
DS	Sulfate de Dermatanne
EDTA	Acide Ethylènedinitrilotétraacétique
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluorescein Isothiocyanate

Liste des abréviations

FSC	Forward Scatter
GAGs	Glycosaminoglycannes
HA	Acide Hyaluronique
HBSS	Hank's Balanced Salts Solution
HES	Hématoxyliine-Erythrosine-Safran
HLA	Humain Leukocyte Antigen
HS	Sulfate d'Héparanne
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IGF	Insulin like Growth Factor
IMF	Intensité Moyenne de Fluorescence
IP	Iodure de Propidium
KS	Sulfate de Kératane
LFA-3	Lymphocyte fuction-associated antigen-3
MAPCs	Multipotent Adult Progenitor Cells
MEC	Matrice Extracellulaire
N-CAMs	Nature Cell Adhesion Molecules
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCRq	Polymerase Chain Reaction Quantitative
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PE	Phycoérythrine
PGA	Acide Polyglycolique
PLA	Acide Polylactique

Liste des abréviations

PLGA	Acide Lactique-co-Glycolique
PMT	Photomultiplicateur
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
PCRq	PCR Quantitative
RWV	Rotating-Wall Vessel
SSC	Side Scatter
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TF	Facteurs de Transcription
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
VCAM-1	Vascular Cellular Adhesion Molecule-1

**TABLE DES ILLUSTRATIONS**

## Figures

### Chapitre I :

- Figure I-1 : Localisation chez l'Homme adulte des différents types de cartilage
- Figure I-2 : Représentation schématique d'une coupe externe du genou
- Figure I-3 : Répartition des différents constituants du cartilage articulaire
- Figure I- 4 : Morphologie du chondrocyte
- Figure I-5 : Structure du collagène
- Figure I-6 : Représentation schématique de l'organisation des collagènes dans le tissu cartilagineux
- Figure I-7 : Structure chimique des glycosaminoglycannes
- Figure I-8 : Structure des agrécannes
- Figure I-9 : Structure du cartilage articulaire
- Figure I-10 : Représentation schématique de l'environnement mécanique du cartilage articulaire sous contrainte
- Figure I-11 : Représentation schématique d'une voie possible de mécanotransduction
- Figure I-12 : Représentation schématique de la transmission et de l'amortissement des contraintes mécaniques
- Figure I-13 : Classification des lésions cartilagineuses selon la loi d'Outerbridge
- Figure I-14 : Représentation schématique du " cercle vicieux"
- Figure I-15 : Principe de la mosaïcoplastie
- Figure I-16 : Procédure de la transplantation de chondrocytes autologues
- Figure I-17 : Principales étapes de l'ingénierie tissulaire du cartilage
- Figure I-18 : Filiation des différentes populations cellulaires de la moelle osseuse
- Figure I-19 : Représentation schématique des différentes étapes de la chondrogénèse et de l'ostéogénèse au cours du développement des os longs
- Figure I-20 : Représentation schématique de l'expression des facteurs transcriptionnels lors des différentes étapes de la chondrogénèse et de l'ossification endochondrale
- Figure I-21 : Voie de transduction de la signalisation des TGF- $\beta$ s
- Figure I-22 : Cascade de signalisation des BMPs
- Figure I-23 : Présentation schématique du bioréacteur à rotation
- Figure I-24 : Présentation schématique de bioréacteur à perfusion

Figure I-25 : Principe du fonctionnement d'un bioréacteur

## **Chapitre II :**

Figure II-1 : Moule développé par l'Institut de Biomécanique de Berne pour la création de cylindre d'alginate/HA

Figure II-2 : Appareil permettant l'entrechoquement

Figure II-3 : Représentation schématique du protocole d'entrechoquement

Figure II-4 : Appareil de compression et son principe

Figure II-5 : Représentation schématique du protocole de compression dynamique intermittente

Figure II-6 : Représentation schématique du protocole de stimulation biochimique

Figure II-7 : Détermination de l'état physiologique des cellules

Figure II-8: Différentes phases du cycle cellulaire

Figure II-9 : Analyse des phases du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Figure II-10 : Principe du marquage par immunofluorescence directe

Figure II-11 : Principe de la technique de PCR

Figure II-12 : Principe de la PCR en temps réel avec un fluorophore (SYBR Green)

Figure II-13 : Principe du marquage par immunofluorescence indirecte

Figure II-14 : Représentation schématique de la microscopie confocale à balayage laser

## **Chapitre III :**

Figure III-1 : Expression de marqueurs CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 et CD166 à la surface de chondrocytes humains

Figure III-2 : Pourcentage de cellules positives pour un marqueur de surface exprimé par des chondrocytes humains cultivés en monocouche (P0 à P5)

Figure III-3 : Capacité liante en anticorps (CLA) pour les marqueurs cellulaires exprimés à la surface des chondrocytes humains cultivés en monocouche (P0 à P5)

Figure III-4 : Expression de gènes codant pour les différentes protéines d'intérêt exprimés par des chondrocytes en fonction du passage

Figure III-5 : Expression de marqueurs CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 et CD166 à la surface de CSMs humaines

Figure III-6 : Pourcentage de cellules positives pour un marqueur de surface exprimé par des CSMs humaines cultivées en monocouche (P0 à P5)

Figure III-7 : Capacité liante en anticorps (CLA) pour chaque marqueur cellulaire exprimé à la surface des CSMs humaines cultivées en monocouche (P0 à P5)

Figure III-8 : Expression de gènes codant pour différentes protéines d'intérêt exprimés par des CSMs en fonction du passage

Figure III-9 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur l'activité métabolique des chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate/HA.

Figure III-10 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur la viabilité des chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate/HA

Figure III-11 : Coloration à l'HES sur les chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate/HA (J28)

Figure III-12: Influence de la contrainte d'entrechoquement sur le cycle cellulaire des chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate/HA

Figure III-13 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur l'expression de gènes codant pour différentes protéines d'intérêt exprimés par des chondrocytes, après 28 jours de culture

Figure III-14 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur la synthèse de la matrice extracellulaire par les chondrocytes, après 28 jours de culture

Figure III-15 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur la synthèse de collagènes de type I et type II dans la matrice péricellulaire des chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate/HA

Figure III-16 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur l'activité métabolique des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA

Figure III-17 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur la viabilité des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA

Figure III-18 : Coloration à l'HES sur les CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA (J28)

Figure III-19 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur le cycle cellulaire des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA

Figure III-20 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur l'expression de gènes codant pour différentes protéines d'intérêt exprimés par des CSMs, après 28 jours de culture

Figure III-21 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur la synthèse de la matrice extracellulaire par les CSMs, après 28 jours de culture

Figure III-22 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur la synthèse de

collagènes de type I et type II dans la matrice péri-cellulaire des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA

Figure III-23 : Influence de la compression dynamique intermittente sur la viabilité des chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate/HA

Figure III-24 : Influence de la compression dynamique intermittente sur le cycle cellulaire des chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate/HA

Figure III-25 : Influence d'une compression dynamique (0,5 ou 1 Hz) et intermittente (4h/jour) sur l'expression de gènes d'intérêt exprimés par des chondrocytes, après 3 et 14 jours de culture

Figure III-26 : Influence de la compression dynamique intermittente sur la viabilité des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA

Figure III-27 : Influence de la compression dynamique intermittente sur la viabilité des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA

Figure III-28 : Influence d'une compression dynamique (0,5 ou 1 Hz) et intermittente (4h/jour) sur l'expression de gènes d'intérêt exprimés par des CSMs, après 3 et 14 jours de culture.

Figure III-29 : Influence de compression dynamique intermittente sur la synthèse de collagènes de type I et II dans la matrice péri-cellulaire des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA

Figure III-30 : Effet de la BMP-2 sur l'activité métabolique des chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate/HA

Figure III-31 : Effet de la BMP-2 sur la viabilité des chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate/HA

Figure III-32 : Effet de la BMP-2 sur le cycle cellulaire des chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate/HA

Figure III-33 : Influence de la BMP-2 sur l'expression de gènes codant pour différentes protéines d'intérêt exprimés par des chondrocytes, après 28 jours de culture

Figure III-34 : Effet de facteurs de croissance (TGF- $\beta$ 1 et BMP-2) sur l'activité métabolique des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA

Figure III-35 : Effet de facteurs de croissance (TGF- $\beta$ 1 et BMP-2) sur la viabilité des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA

Figure III-36 : Effet de facteurs de croissance (TGF- $\beta$ 1 et BMP-2) sur le cycle cellulaire des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA

Figure III-37 : Influence de facteurs de croissance (TGF- $\beta$ 1 et BMP-2) sur l'expression de gènes codant pour différentes protéines d'intérêt exprimés par des CSMs, après 28 jours de culture

Figure III-38 : Influence de BMP-2 sur la synthèse de collagènes de type I et II dans la matrice péricellulaire des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA.

## **Tableaux**

### **Chapitre I :**

Tableau I-1 : Comparaison des potentiels de prolifération et de différenciation cartilagineuse en fonction de l'origine des CSMs

Tableau I-2 : Liste des marqueurs de surface exprimés ou non par les CSMs humains

Tableau I-3 : Expression de marqueurs à la surface des cellules souches hématopoïétiques (CSHs), des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) et des chondrocytes sans culture

Tableau I-4 : Effets de la compression sur la réponse cellulaire en fonction du modèle

Tableau I-5 : Effets de la pression hydrostatique sur la réponse cellulaire en fonction du modèle

### **Chapitre II :**

Tableau II-1 : Milieux de culture pour l'expansion en monocouche

Tableau II-2 : Milieux de culture utilisés avec les biomatériaux d'alginate/HA

Tableau II-3 : Milieux de culture pour les stimulations biochimiques des chondrocytes ou des CSMs ensemencés dans des billes d'alginate/HA

Tableau II-4 : Anticorps impliqués dans les immunomarquages directs

Tableau II-5 : Amorces et conditions de PCRq pour chaque gène

Tableau II-6 : Anticorps impliqués dans les immunomarquages indirects

### **Chapitre III :**

Tableau III-1 : Comparaison de la proportion de chondrocytes ou de CSMs positifs pour un marqueur

Tableau III-2 : Comparaison du nombre de sites CD73, CD90, CD105 et CD166 à la surface de chondrocytes ou de CSMs

Tableau III-3 : Comparaison de l'expression de gènes par des chondrocytes ou des CSMs

## Avant-propos

Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'ANR Jeunes Chercheur (CESOMIC, JC05-51629, Astrid PINZANO) qui regroupe l'équipe Cartilage du Laboratoire de Physiopathologie et de Pharmacologie Articulaires (UMR-CNRS 7561) et le Groupe Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire (LEMTA-UMR-CNRS 7563). De plus, ces travaux ont été effectués grâce à la collaboration Franco-Chinoise entre Nancy Université et le département de Biochimie et Biologie Moléculaire de la faculté de Médecine de l'Université de Wuhan en Chine, et ont reçu le soutien de l'Ambassade de France à Pékin.

**INTRODUCTION GENERALE**

Le cartilage est un tissu conjonctif complexe non vascularisé et non innervé. Il est composé de chondrocytes et d'une matrice extracellulaire riche en collagènes et protéoglycannes. Sa composition est étroitement liée à ses propriétés mécaniques et ses fonctions. En effet, le cartilage est un tissu soumis en permanence à plusieurs contraintes mécaniques, la compression étant la contrainte déterminante au sein du cartilage sous charge mécanique. Elle entraîne d'autres contraintes telles que la pression hydrostatique et le cisaillement, ainsi que différents phénomènes physiques, électriques, et biochimiques au niveau cellulaire.

Au cours de certaines atteintes articulaires tels que les traumatismes accidentels ou pathologies dégénératives comme l'arthrose, on assiste à une dégradation importante du cartilage qui a une faible potentialité de régénération. Des traitements médicaux et chirurgicaux lourds sont appliqués actuellement en clinique. Un traitement innovant, faisant appel à l'ingénierie tissulaire, concept qui s'est développé au cours de ces dernières années, conduirait à la régénération d'un néo-cartilage réimplantable.

L'ingénierie tissulaire du cartilage consiste en la culture de cellules dans un biomatériau tridimensionnel, sous des conditions biochimiques ou mécaniques contrôlées, afin de reconstruire un néo-cartilage. Cette forme de thérapie diffère de celle des traitements standards et propose une solution durable à certains problèmes cliniques.

Cependant, un des principaux challenges dans la création d'un nouveau tissu vient du fait que les cellules qui sont mises en culture *in vitro* ne forment pas un tissu identique au tissu natif. En effet, les conditions de culture *in vitro* ne reproduisent pas complètement l'environnement *in vivo* très complexe : à l'intérieur du corps, des signaux sont transmis aux cellules par leur environnement extérieur. Ces signaux peuvent être chimiques, mécaniques et électriques et stimulent l'assemblage des cellules en tissus puis en organes. Les scientifiques ont tenté de reproduire les conditions naturelles de différentes manières en prenant en compte les principaux paramètres : utilisation de biomatériaux biocompatibles, addition de facteurs de croissance dans le milieu de

culture, mise en charge de contraintes mécaniques sur des cellules, et enfin, mise au point de bioréacteurs pour réguler le flux de nutriments et l'ensemble des paramètres sus-cités.

Les chondrocytes et les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) sont les sources cellulaires principales dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage. De nombreuses études ont montré que des facteurs biochimiques et mécaniques sont capables de modifier le phénotype ainsi que la synthèse de la matrice extracellulaire des chondrocytes et d'induire la différenciation des CSMs en chondrocytes. Cependant, les paramètres optimaux pour favoriser la formation d'un néo-cartilage *in vitro* sont loin d'être déterminés. Il est donc nécessaire de développer les connaissances sur les comportements de ces cellules en réponse aux stimuli biochimiques et mécaniques pour en comprendre le mécanisme ainsi que pour contrôler les conditions *in vitro* afin d'aboutir à un néo-tissu présentant une structure et une fonctionnalité semblable à celle du tissu natif.

L'objectif de cette étude a été de définir d'une part les conditions optimales d'utilisation des CSMs en ingénierie tissulaire, et d'autre part d'établir un protocole de culture en matrice 3D, sous stimulation mécanique ou biochimique, pour initier la chondrogénèse et, à plus long terme, reconstruire un néo-tissu.

L'ensemble de ces travaux a été réalisé, en parallèle sur des CSMs et des chondrocytes humains, ces derniers servant de cellules « témoins ».

La première étape abordée en ingénierie tissulaire est une étape d'expansion cellulaire. Or, il est connu que la culture en monocouche peut affecter le phénotype cellulaire, et entraîne, en particulier, une dédifférenciation des chondrocytes. Il est donc primordial de contrôler cette étape pour la poursuite des expérimentations en matrice 3D, de manière à ensemercer, dans ces matrices, des cellules possédant un potentiel chondrogénique intact.

C'est pourquoi, dans un premier temps, nous nous sommes appliqués à contrôler le phénotype des CSMs et des chondrocytes après 5 passages. Ces travaux ont été réalisés

sur 28 jours en fonction de deux objectifs principaux :

1. d'une part, par le contrôle des marqueurs phénotypiques des CSMs et des chondrocytes, par cytométrie en flux (CD34<sup>-</sup> / CD45<sup>-</sup> / CD105<sup>+</sup> / CD166<sup>+</sup> / CD90<sup>+</sup> / CD73<sup>+</sup>).
2. d'autre part, par l'étude de la synthèse des composants matriciels par PCR quantitative (collagènes de type I, II, II, X, versican, agrécannes, Sox9, COMP, ...),

pour trouver un compromis entre l'expansion cellulaire en monocouche et le maintien des caractéristiques chondrocytaires des cellules.

Dans un deuxième temps, l'influence d'un type de contrainte mécanique, développée sur le modèle du lit fluidisé (« entrechoquement »), a été explorée sur les chondrocytes et les CSMs ensemencés dans des hydrogels d'alginate/HA. Les principaux paramètres étudiés dans cette partie sont la viabilité, l'activité métabolique, le cycle cellulaire, la synthèse de la MEC ainsi que l'expression des gènes d'intérêt.

Dans un troisième temps, une étude préliminaire a été conduite sur l'influence de la compression dynamique sur ces constructions cellulaires. Les principaux paramètres étudiés dans cette partie sont identiques à ceux décrits ci-dessus.

Enfin, nous avons étudié la réponse des cellules incorporées dans ce biomatériau à deux facteurs de croissance, impliqués dans la chondrogénèse, tels que le TGF- $\beta$ 1 et le BMP-2.

**CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I. Physiologie du cartilage articulaire**

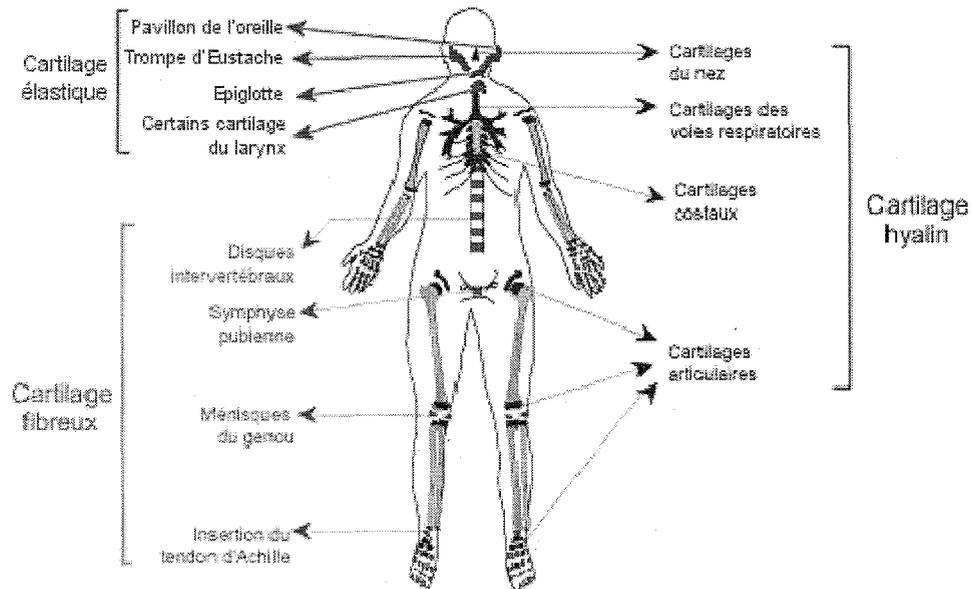
Le cartilage est un tissu conjonctif complexe non vascularisé et non innervé. Il est composé d'un seul type de cellule, appelées chondrocytes, et d'une matrice extracellulaire qui contient des protéines et de l'eau, entre autres. Les variations de la composition de la matrice extracellulaire (MEC) permettent de décrire trois types de cartilage (Figure I-1): le cartilage hyalin, le cartilage fibreux et le cartilage élastique [Mallein-Gerin F *et al.*, 1996].

Le cartilage hyalin : c'est le type de cartilage le plus représenté dans le corps humain. Il se distingue des deux autres types de cartilage par la présence d'une MEC, riche en collagènes de type II, IX et XI et en protéoglycannes. Il est rencontré au niveau du nez, de la trachée, des bronches, des costaux et des articulations.

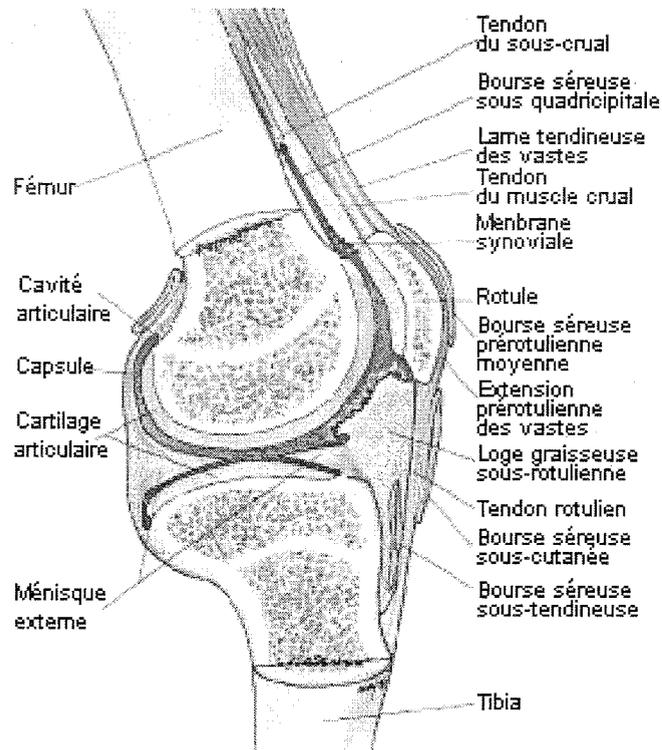
Le cartilage fibreux ou fibrocartilage : contrairement au précédent, sa MEC contient d'épais faisceaux de fibres de collagène de type I. Ces fibres permettent une bonne résistance à des forces de traction et de compression. Ce type de tissu est retrouvé dans les disques intervertébraux de la colonne vertébrale ainsi que dans les zones d'insertion des tendons.

Le cartilage élastique : il est caractérisé par la présence d'une grande quantité de fibres élastiques. Ces fibres élastiques sont disposées en un réseau tridimensionnel, lui permettant ainsi de conserver leur structure comme c'est le cas pour le pavillon de l'oreille externe, l'épiglotte et certains cartilages du larynx.

Compte tenu de l'objet du présent travail, cette étude bibliographique ne concerne que le cas du cartilage articulaire, qui est situé à la surface de l'os et en regard du liquide synovial (Figure I-2). C'est une forme de cartilage hyalin.



**Figure I-1 : Localisation chez l'Homme adulte des différents types de cartilage**  
 [Mallein-Gerin F et al., 1996]



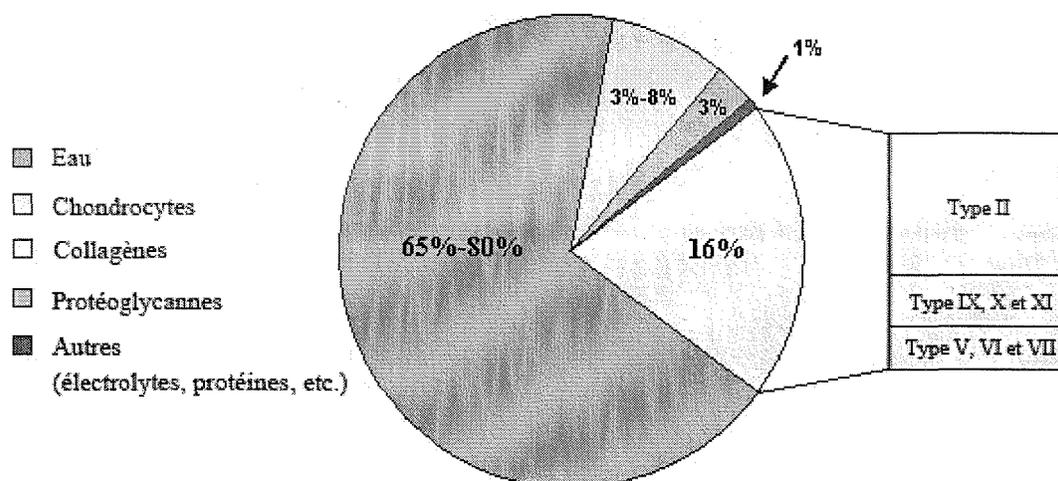
**Figure I-2 : Représentation schématique d'une coupe externe du genou**  
 [Vignon E, 1995].

### ***I.1. Constitution du cartilage articulaire***

Le cartilage articulaire normal apparaît blanc, brillant, discrètement translucide, et sa richesse en protéoglycannes lui donne un indice de réfraction élevé qui ne rend pas visibles les fibres de collagène, d'où son qualificatif de hyalin [Maraudas A *et al.*, 1986]. L'épaisseur d'un cartilage varie d'une articulation à une autre. Elle est de l'ordre de 2 à 4 mm pour une hanche, de 6 à 7 mm pour un genou [Muir H *et al.*, 1986].

Dans le cartilage sain, la substance intercellulaire apparaît amorphe. Les études en microscopie électronique du cartilage articulaire montrent des structures fibreuses incluant les chondrocytes et formant une substance fondamentale homogène. Les études biochimiques montrent qu'environ 40 % du poids sec du cartilage articulaire correspondent aux collagènes [Mow VC *et al.*, 1999].

Ainsi, le cartilage articulaire est constitué de trois éléments principaux (Figure I-3) : des chondrocytes, un réseau de fibres des collagènes, un gel de protéoglycannes hydrophiles qui forment la matrice extracellulaire, et de l'eau [Muir H *et al.* 1986].



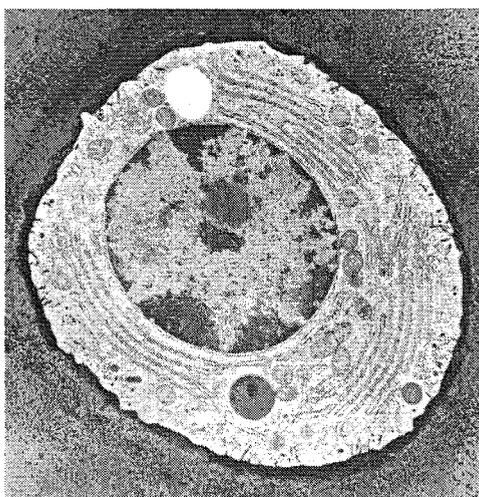
**Figure I-3 : Répartition des différents constituants du cartilage articulaire**

#### *I.1.1. Les chondrocytes*

Origine des cellules : Le seul type cellulaire rencontré dans le cartilage articulaire est le chondrocyte, qui dérive du mésenchyme embryonnaire. La différenciation des cellules mésenchymateuses en chondroblastes est accompagnée d'un fort développement du réticulum endoplasmique. Les chondrocytes synthétisent une matrice

intercellulaire en quantité telle que les cellules se retrouvent éloignées les unes des autres. Ainsi, le cartilage apparaît pauvre en cellules (3%-8% du volume total). La densité cellulaire varie en fonction de la profondeur du cartilage, de l'individu et pour un même individu, du type d'articulation considérée [Szimai J, 1969].

Morphologie cellulaire : Le chondrocyte a une forme sphérique et mesure de 10 à 30  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les chondrocytes contiennent un noyau volumineux, un réticulum endoplasmique avec de nombreux ribosomes, un appareil de Golgi bien développé, des mitochondries avec des crêtes indistinctes, des vacuoles lipidiques et glycoléniques, des bonnets endoplasmiques, des liposomes et des lysosomes [Vignon E *et al.*, 1987] (Figure I-4).



**Figure I- 4 : Morphologie du chondrocyte**  
[[www.master-biomed.ethz.ch/education/bio\\_courses](http://www.master-biomed.ethz.ch/education/bio_courses)]

Métabolisme : Les chondrocytes utilisent essentiellement le glucose comme substrat énergétique. En raison du caractère avasculaire du cartilage, ils reçoivent peu d'oxygène et donc doivent privilégier la voie de la glycolyse anaérobie [Muir H *et al.*, 1986]. Ils convertissent le glucose en glucosamine, pour réaliser la synthèse des protéoglycannes.

Espace péricellulaire : Les chondrocytes sont séparés de la MEC par un espace péricellulaire particulier. Dans cet espace, les protéoglycannes et les collagènes présents sont utilisés pour réaliser l'ancrage des chondrocytes à la matrice par l'intermédiaire de protéines membranaires [Marcelino J *et al.*, 1995]. Le métabolisme

des chondrocytes est influencé par les conditions physico-chimiques définies dans cet espace péricellulaire [Wilkins RJ *et al.*, 1995]. En effet, le pH y est plus acide (pH 6,1) que dans l'espace extracellulaire (pH 7,4) [Adolphe M *et al.*, 1992]. Activées par le pH acide, les lysosomes secrètent des protéases à cystéine : les cathepsines, qui réguleront l'homéostasie du cartilage.

Rôle du chondrocyte dans l'homéostasie : L'homéostasie est la balance entre les phénomènes d'anabolisme et de catabolisme. Dans le cartilage, seuls les chondrocytes y sont impliqués. En effet, les chondrocytes sont non seulement capables de produire la MEC mais également les enzymes capables de la dégrader afin d'assurer un équilibre. Dans des cas pathologiques, les cellules peuvent aussi produire des cytokines pro-inflammatoires provoquant la destruction du cartilage par augmentation de la synthèse et de l'activité des métalloprotéinases [Shlopov BV *et al.*, 1997], des hyaluronidases [Flannery CR *et al.*, 1998] et des agrécannases. Enfin, ils assurent la trophicité du cartilage en élaborant une substance fondamentale solide mais poreuse permettant ainsi le transport des éléments nécessaire au métabolisme cellulaire depuis et vers le liquide synovial par le phénomène d'imbibition [Eyre DR, 2004].

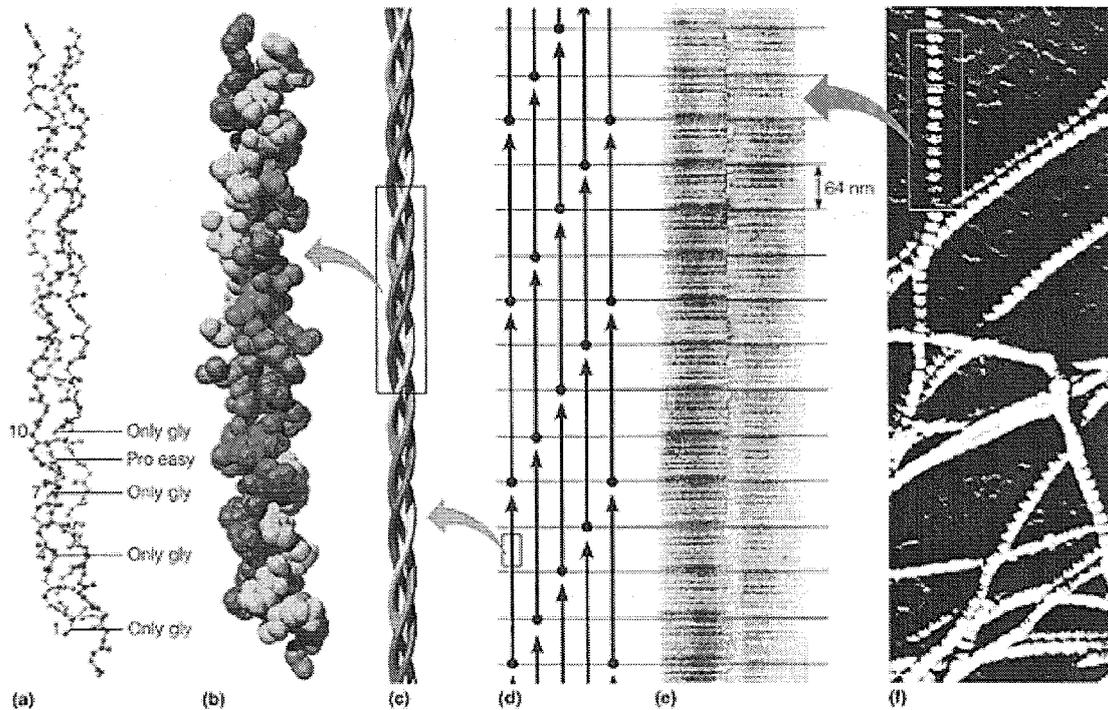
### *1.1.2 La matrice extracellulaire*

Ainsi qu'il est décrit plus haut (cf. Figure I-3), les composants majeurs de la matrice cartilagineuse sont l'eau, les collagènes, les protéoglycannes, les électrolytes etc. [Mow VC *et al.*, 1999].

#### *1.1.2.1 Le réseau collagénique :*

A ce jour, vingt-sept types de collagènes sont identifiés [Ricard-Blum S *et al.*, 2005], ils jouent un rôle de soutien des tissus conjonctifs. Chaque molécule de collagène est composée de trois chaînes, caractérisées par une séquence Gly -X - Y répétitive où dans 30 % des cas X est une proline et Y une hydroxyproline (Figure I-5a). Cette structure primaire a pour conséquence la formation d'une hélice gauche de type polyproline (Figure I-5b). L'association avec deux autres hélices gauches conduit à la formation d'une superhélice droite (Figure I-5c). Cette structure est extrêmement résistante à la protéolyse, excepté lorsque celle-ci implique des collagénases. Pas moins

de 35 chaînes ont été rapportées et chacune chaîne est codée par un gène unique. Ces chaînes se combinent entre elles pour former un homotrimère ou un hétérotrimère [Van Der Rest M *et al.*, 1991].

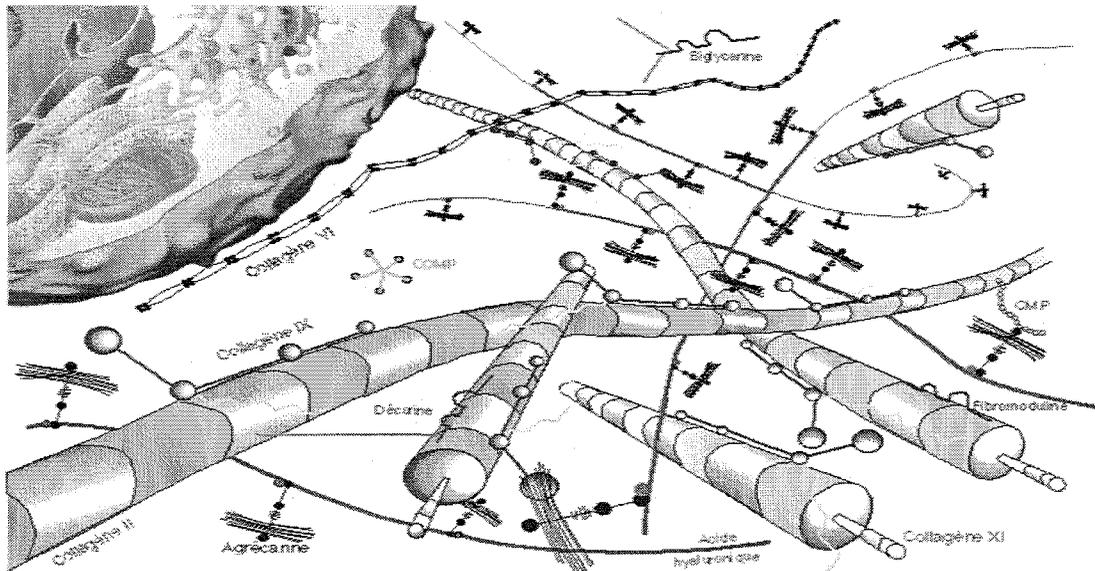


**Figure I-5 : Structure du collagène.**

Chaque molécule de collagène est caractérisée par une séquence répétitive d'acides aminés (a). Cette structure primaire forme une hélice gauche (b) qui s'associerait avec 2 autres hélices pour former une superhélice droite (c). Ces superhélices sont reliées entre elles pour former de grosses fibres (d) très résistantes, visibles au microscope électronique (e et f).

[<http://wwwfac.mcdaniel.edu/Chemistry/CH3321JPGs/Proteins/Collagen.jpg>]

Au niveau du cartilage articulaire, sept principaux types de collagènes (II, IX, XI, X, V, VI et VII) ont été identifiés (Figure I-6). Ces collagènes confèrent à ce tissu sa propriété mécanique d'élasticité.



**Figure I-6 : Représentation schématique de l'organisation des collagènes dans le tissu cartilagineux. Les collagènes de types II, VI, IX, XI constituent les principaux collagènes impliqués dans la charpente de la MEC du cartilage articulaire. [Mallein-Gerin F et al., 1996]**

Le collagène de type II est la protéine collagénique la plus abondante trouvée dans le cartilage et constitue 80 à 85 % du contenu en collagènes [Cremer MA *et al.*, 1998]. Il est composé de trois chaînes de type  $\alpha 1$  (II) codées par le gène Col2a1. Par ailleurs, le collagène de type II est synthétisé en pro-collagène de type IIA ou type IIB, issus d'un épissage alternatif du précurseur d'ARNm au niveau de l'exon 2. Le pro-collagène de type IIA comprenant l'exon 2 est synthétisé par le mésenchyme chondrogénique, le péricondrium ainsi que les tissus non-cartilagineux. Par contre, le pro-collagène de type IIB excluant l'exon 2 est synthétisé par les chondrocytes différenciés [Mehlhorn AT *et al.*, 2006]. Les fibrilles de collagène de type II entourent le collagène de type XI et à la périphérie des fibrilles de collagène de type II s'attachent au collagène de type IX [Eyre DR *et al.*, 2002].

Les collagènes de type IX et XI représentent entre 3 et 10 % du collagène total suivant la source du cartilage (nature de l'articulation et espèce) et l'âge du donneur [Cremer MA *et al.*, 1998].

Le collagène de type IX interviendrait plus particulièrement dans les liaisons inter-fibrillaires et les interactions avec les protéoglycannes. Les fonctions du collagène de type IX sont mal connues. Il pourrait jouer un rôle dans l'espacement de fibrilles

distinctes, la liaison entre fibrilles et l'interaction avec les protéoglycannes.

Le type XI régulerait l'organisation tridimensionnelle des fibrilles et leur diamètre. Il contribuerait à la formation et à la stabilité du réseau collagénique. Il est principalement localisé à l'intérieur des fibrilles où il est lié de façon covalente au collagène de type II *via* des réticulations faisant intervenir des hydroxylysines. Dans les fibrilles de petit diamètre, sa proportion de collagène de type XI est plus importante que dans celles de gros diamètre.

Le collagène de type X est un homotrimère plus court que les collagènes de type II et XI. Il est retrouvé en faible quantité dans la zone superficielle du cartilage articulaire [Linsenmayer TF *et al.*, 1988]. Il se dépose sous la forme d'un tapis uniquement autour des chondrocytes du cartilage calcifié et des chondrocytes hypertrophiques ; ce tapis représente vraisemblablement la forme dans laquelle il est sécrété. La présence du collagène de type X est transitoire durant la formation des os. Cependant, de petites quantités de collagène de type X ont été observées dans la zone de surface du cartilage adulte normal [Robins SP *et al.*, 1988]. Il jouerait un rôle dans la résorption du cartilage hypertrophique ou un rôle fonctionnel dans l'organisation de la matrice. Il serait aussi impliqué dans la minéralisation du cartilage.

Les collagènes de type V, VI et VII sont aussi présents au sein du cartilage [Buckwalter JA *et al.*, 1998]. Ces molécules confèrent sa rigidité au cartilage. Le collagène de type VI est retrouvé à deux niveaux : à la surface du cartilage et dans l'espace péricellulaire, il pourrait intervenir dans l'adhérence des chondrocytes à la MEC [Marcelino J *et al.*, 1995]. Le collagène de type VI ne paraît pas se lier de façon covalente avec d'autres collagènes.

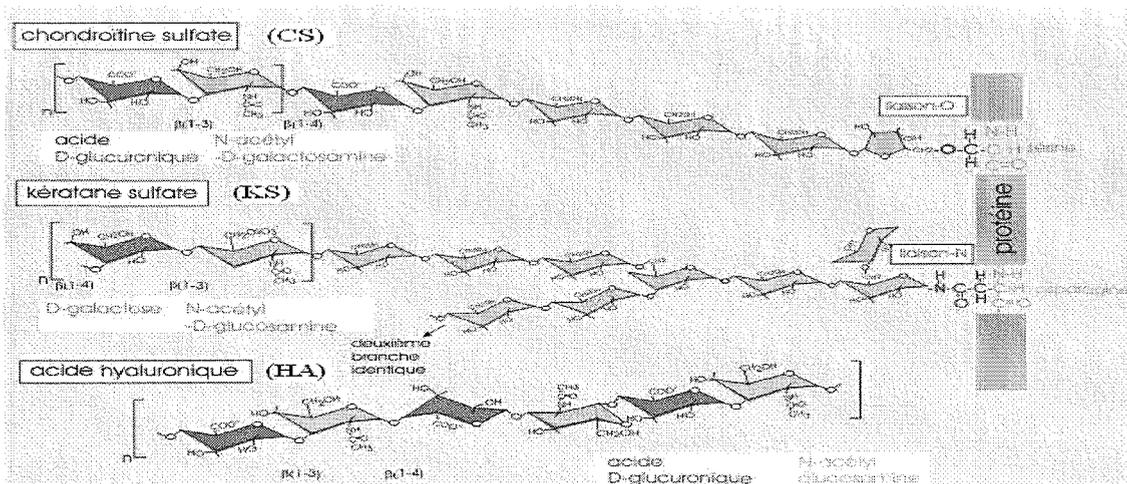
Le collagène de type I et III sont absents du cartilage articulaire en dehors de deux situations particulières : certaines étapes du développement embryonnaire et divers états pathologiques [Cremer MA *et al.*, 1998 ; Aigner T *et al.*, 1993].

*Il est important de noter que le "turn-over" quasi nul de réseau de collagène au sein du cartilage articulaire adulte, ne permet d'envisager qu'un très modeste processus d'entretien sans réelle possibilité de réparation.*

*I.1.2.2. Les protéoglycannes :*

Entre les cellules et les fibres de collagène se trouve la substance fondamentale : les protéoglycannes. Ce sont des macromolécules formées par une protéine axiale ou porteuse (protéine de noyau) sur laquelle se branchent une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycannes (GAGs). Le cartilage articulaire contient deux classes de protéoglycannes : d'une part des protéoglycannes formant de larges agrégats, d'autre part des protéoglycannes de petites tailles. La fonction principale des protéoglycannes est de retenir l'eau dans le cartilage, ce qui confère à ce tissu sa propriété mécanique de viscosité.

Les GAGs sont des polysaccharides composés d'une répétition de disaccharides contenant un sucre aminé (hexosamine) et un sucre de type hexuronique (ou galactose dans le cas du sulfate de kératine) [Roughley PJ *et al.*, 2006] (Figure I-7). Ces sucres forment un polysaccharide non branché, chargé négativement par le groupement carboxylique ou par le groupement sulfate qui repousse les charges négatives environnantes et attire les cations. Il existe 5 types de chaînes de GAGs : le sulfate de chondroïtine (CS), le sulfate de dermatane (DS), le sulfate d'héparane (HS), le sulfate de kératine (KS) et l'acide hyaluronique (HA). Tous ces GAGs sont retrouvés dans le cartilage, en concentration variable en fonction de la zone du cartilage considérée.



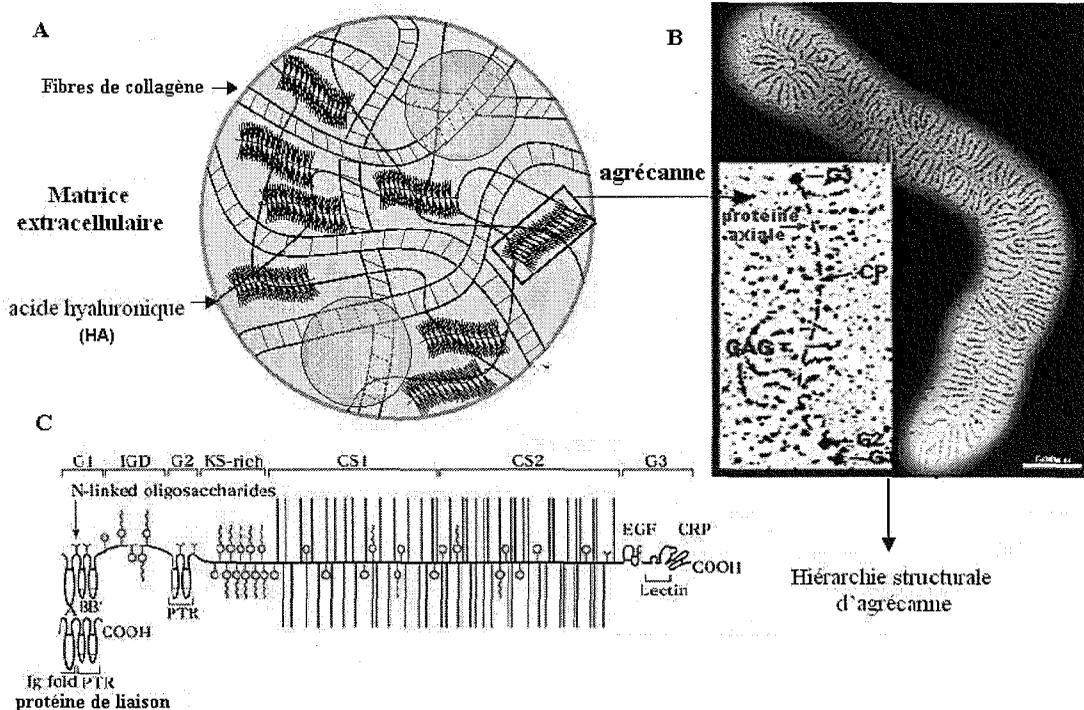
**Figure I-7 : Structure chimique des glycosaminoglycannes.** Le sulfate de kératine (KS), le sulfate de chondroïtine (CS) et l'acide hyaluronique (HA) sont composés d'une répétition de disaccharides contenant un sucre aminé (hexosamine) et un sucre de type hexuronique (ou galactose dans le cas du sulfate de kératine).

[[http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell\\_diffusion/images/fig14.jpg](http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion/images/fig14.jpg)]

Le HA est le seul GAG qui ne possède pas de groupement  $\text{SO}_4^{2-}$  et qui ne soit pas lié à une chaîne protéique. Il joue un rôle structural indispensable au niveau de la matrice cartilagineuse puisqu'il participe à la formation des agrégats de protéoglycannes. De plus, le HA influence de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la migration, l'adhérence ou la prolifération cellulaire, en raison de la présence de récepteurs spécifiques sur les chondrocytes [Lindenhayn K *et al.*, 1999]. Au niveau de la MEC, ce polymère jouerait un rôle primordial dans la rétention des protéoglycannes [D'Souza AL *et al.*, 2000] et favoriserait leur synthèse par les chondrocytes [Kawasaki K *et al.*, 1999]. Son rôle protecteur contre l'action d'enzymes de dégradation ou vis à vis de radicaux libres, provenant des réactions impliquées dans la respiration cellulaire, a par ailleurs été mis en évidence *in vitro* sur des explants cartilagineux [Larsen NE *et al.*, 1992].

L'agrécane, est le plus important des protéoglycannes parce qu'il constitue 90 % des protéoglycannes du cartilage articulaire. Il est composé d'une protéine axiale de 220kDa sur laquelle sont fixées, de façon covalente, une centaine de CS et une trentaine de KS. L'agrécane se lie avec HA, de façon non-covalente, au niveau de sa région NH<sub>2</sub>-terminale. Cette interaction est stabilisée par une protéine de liaison. Plus de 300 molécules d'agrécannes peuvent s'associer autour d'un squelette d'HA et constituer un ensemble pouvant atteindre 10 micromètres [Buckwalter JA *et al.*, 1994a] et créant de larges domaines hydrodynamiques entre les fibres de collagène (Figure I-8). Du fait de leur taille, ces protéoglycannes sont retenus dans la MEC durant les déformations subies par le cartilage. La perte de ces macromolécules conduit à une diminution de la viscosité du tissu et est observée lors de l'arthrose.

Au cours du vieillissement, il se produit une diminution de la quantité de ces macromolécules du fait du ralentissement du métabolisme des cellules et d'une durée de renouvellement plus courte des protéoglycannes que des collagènes, respectivement, 1 à 3 ans suivant les articulations versus 400 ans [Sandy J, 1992]. De ce fait, les propriétés mécaniques du cartilage se détériorent ce qui peut expliquer la dégénérescence arthrosique survenant avec le vieillissement.



**Figure I-8 : Structure des agrécannes**

Les agrécannes s'associent autour d'un squelette d'HA et créent de larges domaines hydrodynamiques entre les fibres de collagène (A). La hiérarchie structurale montre que l'agrécane est composée d'une protéine axiale sur laquelle sont fixées des GAGs (B). L'agrécane contient 3 domaines globulaires (G1, G2, G3) et 2 régions prolongées, qui forment la région interglobulaire entre G1 et G2, et la région principale d'attachement des GAGs. Le domaine G1 de l'agrécane est lié à HA et cette attache est stabilisée par la protéine de liaison (C). [<http://web.mit.edu/cortiz/www/Figure2.gif>]

Le cartilage contient aussi de larges protéoglycannes non agrégées qui ressemblent en structure et en composition à l'agrécane. Ces molécules représentent moins de 10 % de la masse de protéoglycannes et pourraient correspondre à des agrécannes dégradés [Buckwalter JA *et al.*, 1994a].

Les petits protéoglycannes ne représentent que 3 % environ du tissu cartilagineux. Généralement, ils ne sont pas spécifiques du cartilage mais participent à la formation de la MEC. Parmi eux, la décorine, le biglycane et la fibromoduline qui interagissent avec les fibres de collagène [Roughley PJ *et al.*, 1994]. La décorine et la fibromoduline sont décrites comme régulant le diamètre des fibrilles de collagène durant la fibrillogénèse [Font B *et al.*, 1998]. De plus, la décorine comporte un site de liaison spécifique à certains facteurs de croissance tels que le TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) et

l'IGF (Insulin like growth factor) [Burton-wurster N *et al.*, 2003 ; Schonherr E *et al.*, 2005] et peut agir sur le métabolisme et la prolifération des chondrocytes.

La fonction du biglycane n'est pas très bien connue. Il est principalement localisé dans la région péricellulaire des chondrocytes et peut interagir avec le collagène de type VI [Roughley PJ *et al.*, 2006].

D'un point de vue général, ces molécules se lient aux autres macromolécules et influencent probablement l'organisation de la MEC et la fonction des chondrocytes. Les petits protéoglycannes peuvent agir sur l'activité des cytokines dans le cartilage [Roughley PJ *et al.*, 2006].

### *1.1.3. L'eau et les autres constituants de la matrice extracellulaire*

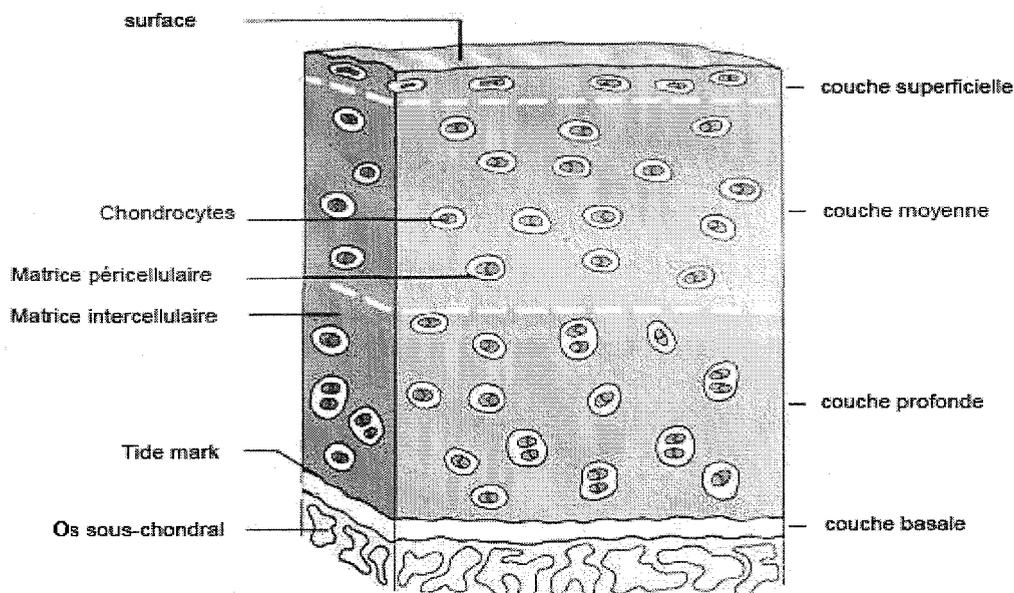
L'eau représente 65 % - 80 % du poids humide du cartilage. La teneur en eau est plus élevée à la surface du tissu qu'en profondeur [Maroudas A *et al.*, 1985]. L'eau existe sous 2 formes : libre ou liée aux protéoglycannes [Maroudas A *et al.*, 1985]. L'eau libre véhicule les substances nutritives et les déchets métaboliques tandis que l'eau liée confère au tissu sa consistance élastique. Ainsi, l'interaction entre l'eau et les macromolécules de la matrice influence la viscosité du tissu.

Il existe également des protéines non collagéniques et non glycoprotéines dans l'assemblage de la matrice du cartilage articulaire. Elles sont décrites comme appartenant à la famille des protéines d'adhérence qui comprend, entre autres, l'annexine V, et l'anchoring CII. Une autre protéine comme la COMP (Cartilage Oligo Matrix Protein) a valeur de marqueur du renouvellement et de la dégénération de la matrice extracellulaire. Citons encore la trombospondine, la tétranectine, la tenascine et la fibronectine comme protéines non collagéniques [Buckwalter JA *et al.*, 1998]. Dans un cartilage normal, la synthèse de ces protéines est modérée mais peut considérablement augmenter dans diverses situations pathologiques. Bien que la fonction de la plupart de ces protéines reste encore inconnue, elles semblent cependant jouer un rôle important dans les interactions entre les chondrocytes et la MEC et donc dans les phénomènes d'adhérence et de migration des chondrocytes. La liaison avec les chondrocytes se réalise par des protéines transmembranaires, les intégrines.

Des électrolytes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ , etc.) sont également présents dans la MEC et permettent de neutraliser les charges des protéoglycannes et des collagènes [Mow VC et al, 1999].

### ***1.2. Répartition des différents constituants dans le cartilage articulaire***

Les chondrocytes ainsi que les collagènes, les protéoglycannes et d'autres protéines sont organisés au sein du tissu cartilagineux dans un ordre défini. La MEC formant le cartilage change de composition et de propriétés en fonction de sa position par rapport à la surface articulaire. Ainsi, quatre couches peuvent être différenciées depuis la surface articulaire jusqu'à l'os sous-chondral selon leur composition, l'activité métabolique des cellules et les propriétés biomécaniques [Figure I-9]. De même, les chondrocytes ont une forme, une taille et une orientation différente dans chacune de ces couches [Aydellote KA *et al.*, 1992].



**Figure I-9 : Structure du cartilage articulaire**

*Les couches superficielles, moyennes, profondes et basales qui forment le cartilage articulaire sont caractérisées par l'activité métabolique des cellules, la présence des différents constituants matriciels et leurs propriétés biomécaniques. [http://www.ukcte.org/images/cartilage.jpg]*

#### ***1.2.1. La couche superficielle***

Elle est en contact avec le liquide synovial et sert de surface de glissement. Elle

représente environ 5 à 10 % de l'épaisseur totale du cartilage. Cette couche est séparée en deux zones :

(1) La zone en contact avec le liquide synovial, composée d'un film de microfibrilles avec peu de protéoglycannes et aucune cellule.

(2) La zone en contact avec la couche moyenne, contenant des chondrocytes plats et ellipsoïdaux, disposés parallèlement à la surface articulaire. Ces chondrocytes synthétisent une plus forte quantité de collagènes et une plus faible quantité de gros protéoglycannes que les chondrocytes des autres zones. Les concentrations en fibronectine et en eau sont plus élevées. Les fibrilles de collagène sont orientées parallèlement à la surface articulaire apportant une plus grande résistance aux tensions et aux pressions mécaniques que dans les zones plus profondes.

La couche superficielle protège le cartilage sous-jacent des contraintes mécaniques générées lors de l'activité articulaire [Roth V *et al.*, 1980]. La suppression expérimentale de cette couche augmente la perméabilité du tissu ainsi que la contrainte supportée par la matrice extracellulaire sous-jacente durant la compression. La déchirure et le remodelage est le premier changement détectable dans l'induction expérimentale d'une ostéoarthrose [Guilak F *et al.*, 1994].

En outre, la surface articulaire limite l'accès du cartilage au système immunitaire en bloquant entre autre la pénétration des immunoglobulines. Une déchirure de cette couche peut donc exposer des constituants natifs ou dégradés du cartilage, stimuler le système immunitaire et induire à plus ou moins long terme une dégradation du cartilage.

### *1.2.2. La couche moyenne ou transitionnelle*

Elle constitue 5 à 40% de la hauteur cartilagineuse. Elle est formée de fibres de collagènes de type II, IX et XI qui y sont enchevêtrées en tous sens mais avec une majorité de fibres dirigées obliquement par rapport à la surface du cartilage. Les chondrocytes, ici, de forme plus arrondie, sont plus actifs dans cette zone que dans la couche supérieure, comme l'indique l'importance du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. De plus, le taux de protéoglycannes augmente fortement en comparaison avec celui de la couche superficielle.

*I.2.3. La couche profonde*

Elle représente 40 à 90 % de l'épaisseur totale du cartilage. L'organisation principale des fibres de collagène de type II, IX et XI se fait perpendiculairement à la surface articulaire. Les chondrocytes présents dans cette zone montrent les signes d'un anabolisme cellulaire plus actif que dans les deux zones précédentes. Au niveau de la couche profonde, les chondrocytes se présentent souvent alignés et dirigés perpendiculairement à la surface. Ils sont également entourés par des chondrons, sorte de panier fibreux qui entoure un ou plusieurs chondrocytes. Cette formation fibreuse, mise en évidence par Poole [Poole CA, 1997], structure la matrice de la couche profonde, mais aussi celle de la couche moyenne. Le rôle de ces chondrons n'a pas encore été mis clairement en évidence. Ils seraient cependant responsables de la protection des chondrocytes face aux contraintes mécaniques telles que la pression hydrostatique, le flux de liquide et la compression (cf. paragraphe I.3.2.) subies par le cartilage. Cette couche contient la plus grande quantité de protéoglycannes et la plus faible proportion en eau.

*I.2.4. La couche basale ou calcifiée*

Cette couche s'étend sur 2 à 3 % de la hauteur totale du cartilage et est en contact avec la plaque osseuse sous-chondrale à laquelle est amarré le cartilage. La couche basale correspond à une zone où le cartilage est en voie de calcification et où les chondrocytes conservent la disposition en file indienne décrite dans la couche profonde. Ces cellules sont beaucoup plus restreintes en nombre et deviennent hypertrophiques. La couche basale est séparée de la couche profonde par une ligne protéique basophile nommée "tide-mark". Celle-ci correspond à un enchevêtrement extrêmement dense de fibres de collagène [Oegema T *et al.*, 1995].

En conclusion, le cartilage articulaire est un tissu hautement organisé et complexe, constitué de différentes couches aux morphologies variées. Ces couches successives sont fondamentales sur le plan fonctionnel car elles sont susceptibles de répondre différemment aux contraintes extérieures.

### ***1.3. Propriétés biomécaniques du cartilage articulaire***

Le cartilage est un tissu spécialisé et adapté aux contraintes mécaniques. Il amortit dans le temps et répartit dans l'espace les contraintes mécaniques auxquelles il est soumis. Sa composition et ses propriétés physico-chimiques, l'organisation fondamentale du réseau de collagène, et l'interaction moléculaire des fibres de collagènes et des protéoglycannes ont des effets essentiels sur les propriétés mécaniques intrinsèques de la MEC ainsi que sur les propriétés de transport et de diffusion des liquides du cartilage.

#### *1.3.1. Contraintes exercées sur le cartilage*

Le cartilage est soumis en permanence à plusieurs contraintes mécaniques. La contrainte principale est la compression qui engendre d'autres contraintes telles que des flux de liquide, des contraintes de cisaillement, des pressions hydrostatiques et des forces de tension ou d'étirement *etc.* [Kerin A *et al.*, 2002 ; Urban JP, 1994 ; Smith RL *et al.*, 1995]. La capacité du cartilage articulaire d'exécuter sa fonction physiologique, quand il est soumis à différents types de contraintes, dépend de l'interaction sensible des constituants du cartilage et de l'écoulement du fluide interstitiel à travers la matrice perméable [Hasler EM, 1999].

La pression exercée à la surface du cartilage articulaire varie entre 0 et 20 MPa en fonction des activités physiques. En effet, des mesures *in vivo* ont montré que dans la position debout, la pression qui s'exerce sur la hanche d'un patient est de 0,7 MPa. Lors d'une marche, une contrainte de 5-10 MPa est exercée sur la hanche, soit une charge équivalente à 3-8 fois le poids du corps [Bergmann G *et al.*, 2001 ; Afoke NY *et al.*, 1987]. Enfin, cette contrainte peut dépasser 18 MPa lors de mouvements physiques plus intenses comme par exemple un saut à partir d'une chaise [Kerin A *et al.*, 2002].

Dans le cartilage au repos, les forces de tension entre les fibres de collagène sont en l'équilibre avec les forces de gonflement osmotique des protéoglycannes [Bader DL *et al.*, 1992].

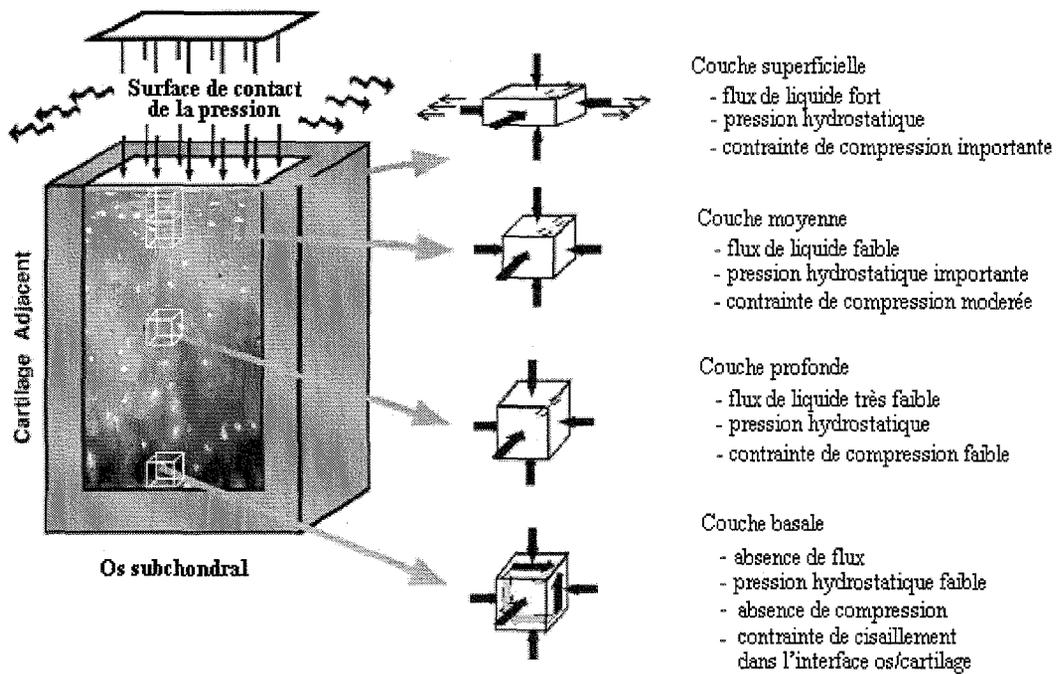
Pendant la locomotion normale, le cartilage articulaire est soumis à une contrainte dynamique qui entraîne une augmentation des surfaces de contact et génère une compression, un étirement et des contraintes de cisaillement [Mow VC *et al.*, 1990]. Les forces de compression appliquées sur le cartilage augmentent et diminuent rapidement et répétitivement de façon cyclique. La réponse du cartilage à la contrainte dynamique dépend de ses propriétés viscoélastiques à court terme [Bader DL *et al.*, 1994] et est reliée à la fréquence des contraintes [Wong M *et al.*, 2000].

Sous des contraintes de hautes fréquences, le cartilage est incompressible, ce qui signifie que dans ces circonstances il n'y a aucun flux de liquide du cartilage [Wong M *et al.*, 2000].

### *I.3.2. Réponse du tissu aux contraintes mécaniques*

Les propriétés d'élasticité et de viscosité du cartilage sont essentielles à la capacité de résistance du tissu aux contraintes mécaniques. Ainsi, l'élasticité dépend en grande partie des caractéristiques du réseau de collagènes [Bader DL *et al.*, 1992 ; 1994], tandis que la viscosité est étroitement liée à la teneur en protéoglycannes, notamment en HA. De ce fait, ces propriétés d'élasticité et de viscosité influencent respectivement la déformation du tissu ainsi que le mouvement liquidien [Mow VC *et al.*, 1984].

Comme il a été évoqué, dans le paragraphe I.2, les 4 couches qui composent le cartilage ont des teneurs en protéoglycannes et un réseau de collagène qui diffèrent selon la profondeur du tissu. Ainsi, il en résulte des propriétés mécaniques variables d'une couche du cartilage à l'autre. Lorsque le cartilage est soumis à une contrainte mécanique de type compression, la couche superficielle laisse sortir le fluide, devenant alors plus solide. Dans la couche moyenne et profonde, la pression hydrostatique augmente, alors que la compression et le flux de liquide diminuent. Au niveau de la couche basale, la compression et le flux de liquide deviennent négligeables, tandis qu'une contrainte de cisaillement apparaît dans l'interface cartilage/os (Figure I-10) [Wong M *et al.*, 2000].



**Figure I-10 : Représentation schématique de l'environnement mécanique du cartilage articulaire sous contrainte**

*Selon les couches du cartilage, la MEC et les cellules sont soumises à des contraintes mécaniques, qui diffèrent dans leur nature et/ou leur intensité. [D'après Wong M et al., 2003]*

Les propriétés biomécaniques du cartilage articulaire ne sont pas unidirectionnelles. Il existe une certaine anisotropie liée à la distribution et à la structure non homogène des constituants du cartilage articulaire [Bank RA *et al.*, 2000 ; Laasanen MS *et al.*, 2003]. Généralement, le réseau de collagène agit au niveau de l'étirement [MOW 1990], tandis que les protéoglycannes interviennent sur la compression [Bader DL *et al.*, 1994 ; Korhonen RK *et al.*, 2003a]. Ainsi, la résistance à l'étirement décroît alors que la résistance à la compression croît lorsque l'on s'enfonce dans le cartilage, définissant ainsi une anisotropie axiale [Schinagl RM *et al.*, 1997, Wang CC *et al.*, 2002]. En plus de cette anisotropie axiale, il existe une anisotropie parallèle à la surface articulaire. Cette conformation anisotrope confère au cartilage une plus grande résistance à l'étirement. En effet, une partie de la force d'étirement verticale est transformée en une déformation parallèle aux fibres à la surface du cartilage [Wong M *et al.*, 2003].

### *I.3.3. Réponse des cellules aux contraintes mécaniques*

Tandis que les influences des contraintes mécaniques sur le cartilage et le métabolisme des chondrocytes ont été intensivement explorées, les mécanismes de la mécanotransduction restent mal compris.

Le concept de mécanotransduction peut se traduire ainsi : les cellules transforment les signaux mécaniques en signaux biochimiques, qui acheminés vers le noyau, induisent des modifications métaboliques.

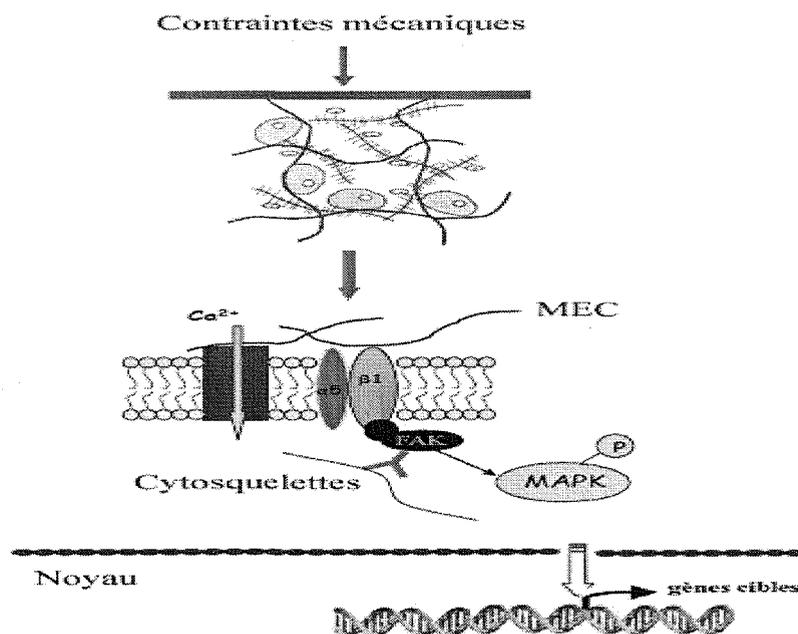
Lors d'une mise sous contrainte de l'articulation, la déformation de la MEC du cartilage représente la première étape du phénomène suivie par l'apparition d'un cisaillement et d'une pression hydrostatique. Ces contraintes induisent une modification des potentiels électriques, une augmentation de la pression osmotique et une baisse de pH [Gray ML *et al.*, 1988, Guilak F *et al.*, 1999]. Toutes ces modifications peuvent influencer les activités métaboliques ainsi que l'expression des gènes *via* la voie de la mécanotransduction [Shieh AC *et al.*, 2003].

Plusieurs voies de mécanotransduction ont été identifiées et impliquent les canaux ioniques, les intégrines, le cytosquelette et le noyau (Figure I-11). De plus, ces voies de mécanotransduction sont également liées à d'autres voies de signalisation, qui partagent des chemins communs tels que les canaux ioniques, les protéines G et les kinases couplées avec les récepteurs transmembranaires. Ceci explique peut-être les effets synergiques des contraintes mécaniques avec les facteurs de croissance [Adrian C *et al.*, 2003].

Les canaux ioniques : l'écoulement ionique au niveau cellulaire est un évènement important dans la voie commune de la transduction de signal. Les canaux ioniques (en particulier  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ ), activés par les contraintes mécaniques, induisent le changement de la concentration ionique qui provoque une cascade de réactions cellulaires *via* des messagers secondaires, les protéines G et les kinases [Wu QQ *et al.*, 2000].

Intégrines : Les intégrines, responsable en partie de la liaison MEC- cytosquelette (actine), sont identifiées comme des mécanotraducteurs importants des interactions

entre les cellules et la MEC. En effet, ces molécules sont capables d'enregistrer directement le signal de la déformation de la MEC et par la suite de transférer cette information au noyau de la cellule. Cette transfert peut se faire soit *via* le cytosquelette [Durrant *et al.*, 1999] ou via la voie de signalisation de FAK (focal adhesion kinase) ainsi que des MAPK (mitogen-activated protein kinases) et d'activer des facteurs de transcription tels que AP-1, NF $\kappa$ B *etc.* [Loeser RF *et al.*, 2002]. La majorité des intégrines se trouvant dans un cartilage articulaire normal sont les  $\alpha$ 1 $\beta$ 5,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1,  $\alpha$ 10 $\beta$ 1 et  $\alpha$ V $\beta$ 1 [Loeser RF *et al.*, 2000 ; Ostergaard K *et al.*, 1998]. Parmi elles, l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, récepteur de la fibronectine, est l'intégrine la plus impliquée dans la voie de méchanotransduction. Il a été démontré que  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 participe à l'hyperpolarisation des chondrocytes sous une contrainte de compression dynamique [Millward-Sadler SJ *et al.*, 2000] et associée à l'augmentation de la synthèse de GAGs et de la prolifération de chondrocytes [Chowdhury TT *et al.*, 2004]. Par ailleurs, les récepteurs, les intégrines  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1 interviennent plus spécifiquement au niveau des CSMs [Chen J *et al.*, 2006 ; Mueller FJ *et al.*, 2006].



**Figure I-11 : Représentation schématique d'une voie possible de méchanotransduction.** Les signaux mécaniques extracellulaires induits par les contraintes sont transformés en signaux intracellulaires via les canaux ioniques, la MEC, les intégrines, le cytosquelette afin de modifier la transcription de gènes cibles dans le noyau. [Lee C *et al.*, 2005]

Cytosquelette : le cytosquelette est considéré comme un mécanotransducteur potentiel en raison de son rôle structural dans la cellule. Le cytosquelette peut subir de nombreux changements induits par les contraintes mécaniques, y compris la déformation, la réorganisation, la polymérisation des fibres d'actines. [Shieh AC *et al.*, 2003]. La composition du cytosquelette (actine, tubuline et vimentine) varie d'une zone à l'autre du cartilage, créant un environnement mécanique différent dans chaque zone du cartilage [Langelier ER *et al.*, 2000].

Déformation du noyau : la déformation du noyau induite par des contraintes mécaniques peut modifier l'organisation de la membrane nucléaire et donc la perméabilité des pores membranaires induisant aussi des modifications dans la transcription de l'ADN génomique [Lee DA *et al.*, 2000].

#### ***1.4. Fonctions du cartilage articulaire***

Le cartilage constitue la partie essentielle de l'articulation. Il recouvre les extrémités osseuses et il joue un rôle de " film protecteur " de l'articulation. Lors de la réalisation de mouvement, il remplit deux principales fonctions. Il assure d'une part, le glissement des segments osseux les uns contre les autres, en diminuant au maximum les forces de friction présentes. Le cartilage étant non innervé, il ne peut donc transmettre aucune information au cerveau, ce qui rend le mouvement imperceptible et indolore. D'autre part, le cartilage assure la transmission, la répartition et l'amortissement des contraintes subies par l'articulation. Une troisième fonction, dépendante des deux premières, peut lui être attribuée : celle d'assurer sa propre trophicité. Le cartilage est effectivement "nourri" par le liquide synovial, lui-même sécrété par la membrane synoviale.

##### ***1.4.1. Glissement des surfaces articulaires***

Le cartilage articulaire exécute cette fonction à l'aide du liquide synovial dans des conditions de frottements minimales. Cette propriété du cartilage articulaire est due à l'interaction entre la couche superficielle et le liquide synovial qui est un lubrifiant articulaire. Le liquide synovial est un liquide transparent, sécrété par la membrane

synoviale, tapissant la face interne de la capsule articulaire [Buckwalter JA *et al.*, 1997]. L'HA est le principal constituant de ce liquide articulaire. Il est son support rhéologique. La capacité à passer d'un comportement visqueux (mouvement lent) à un comportement élastique (mouvement rapide) est une des caractéristiques de l'HA. Ainsi, le coefficient de friction, très faible, assure un fonctionnement harmonieux de l'articulation. L'HA forme également une mince pellicule protectrice à la surface du cartilage articulaire. Lors d'un mouvement de glissement, ce film protecteur se déforme tels les deux feuillets de la plèvre pulmonaire, évitant ainsi l'usure du cartilage. A ce mécanisme s'ajoute, lors de la mise en charge de l'articulation, un écoulement du liquide contenu dans le cartilage vers les régions voisines moins sollicitées et vers le milieu intra-articulaire. Ce liquide synovial joue un rôle de lubrification de la surface cartilagineuse.

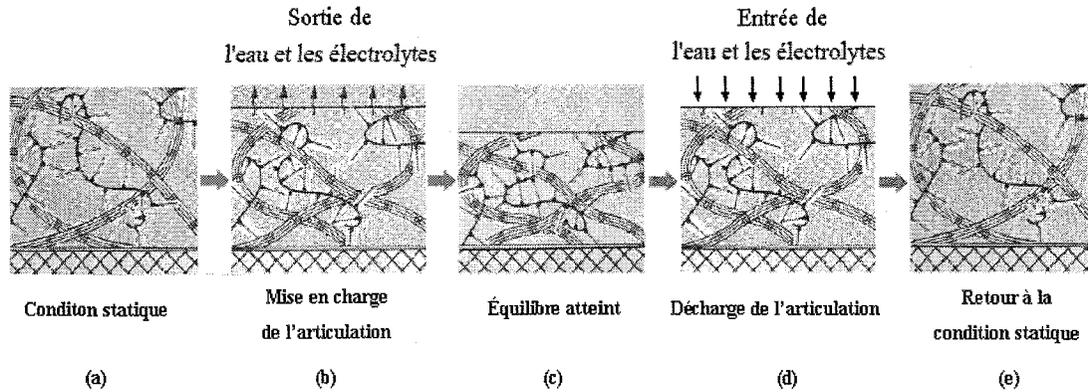
#### *1.4.2. Transmission et amortissement des contraintes*

Le cartilage est un tissu ayant une extraordinaire capacité d'amortissement et de répartition des pressions, ce qui permet une diminution des contraintes mécaniques imposées à l'articulation.

Lors de la mise en charge de l'articulation, la transmission et l'amortissement des contraintes s'effectuent en deux temps : dans un premier temps, le cartilage répond rapidement par un changement de forme, à volume constant. L'expansion latérale, qui se produit, provoque un mouvement des protéoglycannes ainsi qu'un flux de liquide qui se trouve dans la région soumise à la compression. Dans un second temps, *via* les pores de la matrice cartilagineuse, l'eau et les électrolytes migrent vers les zones où règne une pression plus faible. Cette fuite de liquide entraîne une augmentation de la concentration en protéoglycannes, contribuant à une augmentation de la pression osmotique. Ce phénomène entraîne dès lors une résistance à la pression croissante ainsi qu'une déformation cartilagineuse modérée, qui permet de mieux répartir les contraintes subies. Ce processus se termine lorsque l'équilibre entre les deux pressions est atteint (Figure I-12 a-c).

Lors de la mise en décharge de l'articulation, le phénomène inverse s'observe : la chute rapide de la pression osmotique suivie d'un retour de liquide vers les zones de

faible pression. Le volume cartilagineux augmente graduellement jusqu'à ce que l'équilibre original entre la pression de gonflement et la tension des fibres de collagène soit restauré (Figure I-12 d-e).



**Figure I-12 : Représentation schématique de la transmission et de l'amortissement des contraintes mécaniques**

*Quand l'articulation est mise en charge, la pression intracellulaire augmente et conduit l'eau et les électrolytes à migrer vers les zones où règne une pression plus faible (a, b). Cette fuite de liquide entraîne une augmentation de la pression osmotique jusqu'à un équilibre (c). Lorsque la contrainte est retirée de l'articulation, l'eau et les électrolytes retournent dans le tissu (d, e).*

#### *1.4.3. La fonction de trophicité*

Outre ces deux fonctions, une troisième fonction peut être attribuée au cartilage : celle d'assurer sa propre trophicité. En effet, le cartilage est dépourvu de vaisseaux. Cette trophicité dépend des cellules qui élaborent une MEC fondamentale solide, déformable, poreuse, qui permet la circulation des liquides et des électrolytes. C'est donc dans les mouvements articulaires de la vie de tous les jours que, par imbibition, le cartilage articulaire puise les éléments nécessaires à son métabolisme cellulaire, *via* les échanges de liquides réalisés avec le liquide synovial depuis sa couche superficielle.

## **II. Physiopathologie du cartilage articulaire**

La dégradation du cartilage peut conduire, à plus ou moins long terme, à l'apparition de lésions qui peuvent aller jusqu'à l'os sous-chondral, où il se produit au niveau du foyer lésionnel, une invasion de cellules issues de la moelle osseuse [Setton LA *et al.*, 1999]. La réaction de type inflammatoire qui s'ensuit engendre alors la formation d'un tissu cartilagineux proche du fibrocartilage, par sa constitution riche en collagène de type I et faible en élastine [Setton LA *et al.*, 1999]. Les propriétés mécaniques, moins élastiques et moins résistantes, d'un tel tissu ne lui permettent pas de résister aux fortes contraintes que subirait sans dommage un cartilage articulaire sain ; il finit généralement par se fissurer [Naumann A *et al.*, 2002]. Or le cartilage articulaire n'a pas la capacité de se régénérer naturellement dans le cas de lésions qui dépassent 2 millimètres de diamètre [Ghivizzani SC *et al.*, 2000]. Ceci explique que l'on rencontre des lésions du cartilage articulaire dans plus de 10% de la population [Bliddal H *et al.*, 2006].

L'exposition du cartilage à des éléments agressifs (enzymes protéolytiques, cytokines inflammatoires, *etc.*) peut stimuler la dégénérescence des protéoglycannes ou en inhiber la synthèse [Zhang L *et al.*, 2007]. Ces agressions peuvent également agir sur le collagène et les chondrocytes. La plupart des lésions ont une origine traumatologique (entorses graves ou luxations rotuliennes) mais elles peuvent également apparaître à la suite de phénomène inflammatoire (ostéochondrite juvénile ou après une corticothérapie). Elles peuvent aussi être dues au vieillissement. La réparation spontanée de ces lésions est déterminée par de nombreux facteurs : le type, l'ampleur et la sévérité des lésions, l'état général du cartilage et l'âge de l'individu [Zhang L *et al.*, 2007].

### ***II.1. Classification des lésions cartilagineuses***

Les lésions localisées dans le cartilage superficiel apparaissent pour la plupart sous forme de fissures ou de lésions de surface plus étendues. Ces lésions s'arrêtent à la couche de cartilage calcifié. En revanche, les lésions profondes concernent des lésions qui atteignent la zone du cartilage calcifié et l'os sous-chondral au-delà de la «tide

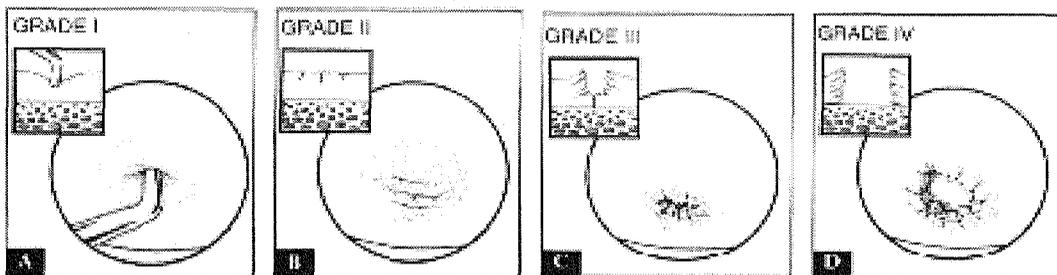
mark» [Minas T *et al.*, 1997]. D'après la loi d'Outerbridge, les lésions cartilagineuses sont classées en quatre grades, selon leur localisation et leur gravité [Minas T *et al.*, 1997] (Figure I-13):

Le grade I correspond à un ramollissement localisé du cartilage articulaire dû à la rupture d'une petite quantité de fibres de collagène. Cette lésion peut être décelée grâce à l'imagerie par résonance magnétique qui permet d'observer un léger oedème cartilagineux au niveau de la zone lésée (Figure I-13A).

Le grade II désigne un cartilage articulaire présentant des fissurations au niveau de sa surface. Cette lésion résulte d'une fibrillation plus importante que celle observée au grade I (Figure I-13B).

Le grade III se caractérise par une fissuration beaucoup plus marquée qu'au grade II, mais toujours sans exposition de l'os sous-chondral (Figure I-13C).

Le grade IV est marqué par une destruction cartilagineuse beaucoup plus massive, entraînant l'exposition de l'os sous-chondral au milieu intra-articulaire. A ce stade avancé, il existe un risque d'abrasion de la surface articulaire cartilagineuse opposée à la partie endommagée (Figure I-13D).



**Figure I-13 : Classification des lésions cartilagineuses selon la loi d'Outerbridge**  
*Chaque grade (I à IV) se caractérise par une fissuration de plus en plus importante du cartilage pouvant atteindre l'os sous-chondral.*

[<http://www.orthojournalhms.org/ojhms2002/images/77-1.jpg>]

## **II.2. Relation entre facteurs biomécaniques et lésions cartilagineuses**

### *II.2.1. Implications des facteurs mécaniques dans la physiopathologie du cartilage*

Les influences mécaniques sont souvent à l'origine du développement de pathologies du cartilage [Hayes DW *et al.*, 2001]. Les lésions du cartilage se

produisent quand la contrainte appliquée excède la capacité d'absorption de charge du tissu [Cornwall MW, 1984]. Divers mécanismes peuvent être impliqués :

Tout d'abord, un dommage mécanique peut se produire dès qu'une articulation se déplace au delà de sa possibilité habituelle de mouvement, induisant un effort sur les parties plus molles du cartilage qui ne peuvent pas supporter la contrainte, et endommagent ainsi le réseau de collagène. [Andersson S *et al.*, 1989].

Par ailleurs, d'autres dommages d'origines mécaniques peuvent également se produire de manière chronique lors d'exercices sportifs physiques intenses et répétés. Dans ce cas, les articulations sont répétitivement exposées à des contraintes de niveaux élevés, et les dommages sont associées à une fissure de fatigue [Kujala UM *et al.*, 1995].

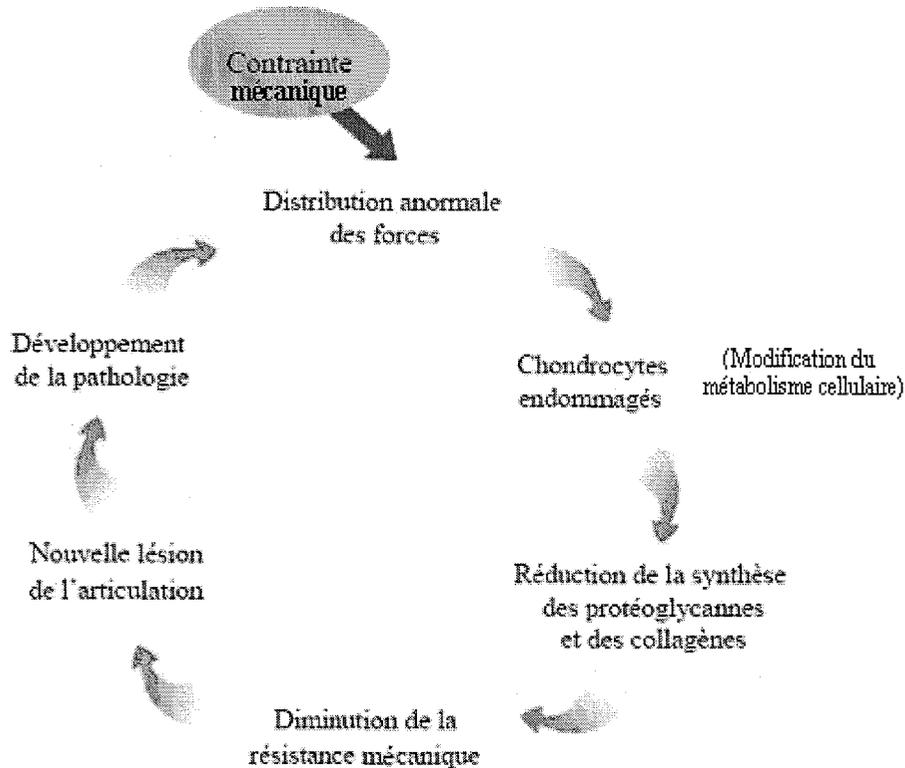
Enfin, l'exposition à des surcharges et une utilisation anormale et répétée de l'articulation déjà endommagée mènent à des lésions plus graves et à la dégénérescence du cartilage [Simmons EJ *et al.*, 1999 ; Van de Breevaart Bravenboer J *et al.*, 2004].

### *II.2.2. Mécanisme de dégradation du cartilage*

L'altération du réseau de collagène constitue le facteur décisif dans les pathologies du cartilage entraînant par la suite une diminution de l'agrégation des protéoglycannes. Avec une augmentation de la teneur en eau, ces changements, qui ont lieu dans la couche superficielle du cartilage, sont les premiers symptômes réversibles. [Arokoski JP *et al.*, 2000 ; Bank RA *et al.*, 2000].

Ces changements de la couche superficielle sont associés à une augmentation compensatoire de la synthèse des protéoglycannes dans les zones plus profondes de telle sorte qu'il n'y a aucune perte de la quantité totale des protéoglycannes pour toutes les couches du cartilage confondues [Poole AR *et al.*, 1992]. Dans ces zones les plus profondes, la synthèse de collagène semble également être augmentée dans cette phase, reflétant une tentative de réparation des dommages par les chondrocytes [Fukui N *et al.*, 2001]. Par conséquent, la concentration en collagène demeure constante, mais la composition du collagène est modifiée. Il se trouve en effet sous forme de molécules

dégradées restant incorporées dans les fibrilles en raison de la structure réticulée du réseau de collagène [Bank RA *et al.*, 1997]. Cependant, comme la molécule de collagène a subi un clivage par des métalloprotéinases matricielles, certaines de ces réticulations ne sont plus fonctionnelles [Pratta MA *et al.*, 2003]. Par conséquent, les molécules de collagène dépolymérisées glisseront les unes le long des autres pendant l'application de la contrainte, ce qui explique pourquoi ces fibrilles seront moins élastiques [Bank RA *et al.*, 2000]. Ainsi, la quantité de molécules dégradées de collagène est fortement liée à la diminution de la rigidité du cartilage [Bank RA *et al.*, 2000]. En raison des dommages du réseau de collagène et du déclin de l'agrégation des protéoglycannes, la résistance à l'étirement et à la compression de la couche superficielle du cartilage est réduite [Armstrong CG *et al.*, 1982]. Comme la zone superficielle de cartilage est la zone la plus rigide, elle joue un rôle important dans les réactions de compression et d'étirement. Ainsi, les changements substantiels des propriétés biomécaniques dans cette zone auront un effet significatif sur les caractéristiques globales du tissu [Guilak F *et al.*, 1994]. Dans ce cas, la compression axiale de la surface articulaire du cartilage mènera à une expansion latérale plus importante que la normale. Ainsi, la surface subissant la contrainte, sera élargie. Les secteurs adjacents seront sollicités et il en résulte que le réseau de collagène y subira de plus grandes tensions et pourra être endommagé. Ceci aboutira à une réduction de l'agrégation des protéoglycannes. Comme conséquence fonctionnelle, une nouvelle réduction de la rigidité à la tension et à la compression de la couche de cartilage sera observée [Guilak F *et al.*, 1994]. L'ensemble de ces réactions entre dans un cercle vicieux (Figure I-14).



**Figure I-14 : Représentation schématique du “ cercle vicieux”**

*Une contrainte mécanique entraîne une distribution anormale des forces sur le cartilage et endommage les chondrocytes. La diminution de la synthèse de la MEC ainsi que la résistance mécanique provoquent ainsi une nouvelle lésion. Ces réactions entrent alors dans un cercle vicieux.*

### ***II.3. Stratégies thérapeutiques concernant les lésions cartilagineuses***

Il est généralement admis que le cartilage articulaire, après un traumatisme de la trame du collagène, ne peut se réparer spontanément. Il existe alors le risque de voir se développer chez le sujet atteint, une arthrose précoce qu'il sera difficile de traiter par des moyens autres que la pose d'une prothèse totale. Il est donc nécessaire d'intervenir aussi rapidement que possible afin d'éviter que le cercle vicieux du phénomène arthrosique cité précédemment (Figure I-14) se mette en oeuvre.

Actuellement, de traitements médicaux et chirurgicaux sont disponibles en clinique. Un complément pourra être apporté à ces traitements, grâce au développement de l'ingénierie tissulaire.

### *II.3.1. Les traitements médicaux*

Les traitements médicaux combinent généralement plusieurs des techniques suivantes :

La mise en décharge : une pression intra-articulaire trop élevée est souvent retrouvée, comme point commun aux lésions, entraînant, pour le cartilage, une surcharge mécanique néfaste. De plus, il a été démontré que dans des conditions de pression moindre, l'activité métabolique du chondrocyte s'accroît, ce qui pourrait favoriser la régénération matricielle [O'Driscoll SW *et al.*, 1998].

Agents pharmacologiques : Des substances comme des corticostéroïdes, de l'acide hyaluronique et des facteurs de croissance font l'objet de nombreuses études car ce sont des agents pharmacologiques pouvant stimuler la régénération spontanée du cartilage articulaire. Cependant, elles suscitent de nombreuses controverses. En effet, certains auteurs y voient une action stimulante sur la régénération cartilagineuse [Sarzi-Puttini P *et al.*, 2005], alors que d'autres constatent par la suite une aggravation de l'arthropathie et une augmentation des phénomènes inflammatoires [O'Driscoll SW *et al.*, 1998].

Mouvement passif : introduit par Salter *et al.* [Salter RB *et al.*, 1980], cette technique est aujourd'hui massivement reconnue pour sa complémentarité apportée dans le traitement des lésions cartilagineuses. Rappelons ici que le mouvement est nécessaire à l'imbibition du cartilage alors que l'immobilisation complète d'un membre produit son amincissement et une diminution de son contenu en protéoglycannes [Minas T *et al.*, 1997].

Lorsque le traitement médical est un échec, un traitement chirurgical peut venir en secours.

### *II.3.2. Traitements chirurgicaux*

#### *II.3.2.1. Techniques palliatives*

Lavage articulaire : Le lavage articulaire consiste à retirer le liquide synovial qui contient les cellules inflammatoires, les cytokines (Il-1, TNF- $\alpha$ ), les enzymes de

dégradation du cartilage (les métalloprotéinases) et des fragments cartilagineux. Le sérum physiologique ou le glycocolle sont recommandés alors que l'eau distillée ou le Ringer lactate entraînent des lésions ultra-structurales du cartilage.

Stimulation de l'os sous-chondral : Dans le cadre d'une atteinte traumatique, la réparation des lésions peut se faire par stimulation de l'os sous-chondral. Il s'agit de favoriser l'apparition d'un fibrocartilage à partir de la stimulation des cellules souches de la moelle osseuse sous-jacente à l'os, qui va combler la perte de substance depuis la profondeur jusqu'en superficie. C'est le cas des « perforations de Pridie », de « micro fractures » qui aboutissent après un délai de 4 à 6 mois à la formation d'un fibrocartilage. Comme le fibrocartilage ainsi obtenu est plus fragile que le cartilage articulaire normal, la plupart des protocoles de réhabilitation conseille d'y associer le mouvement passif continu et un soulagement des contraintes articulaires [Minas T *et al.*, 1997].

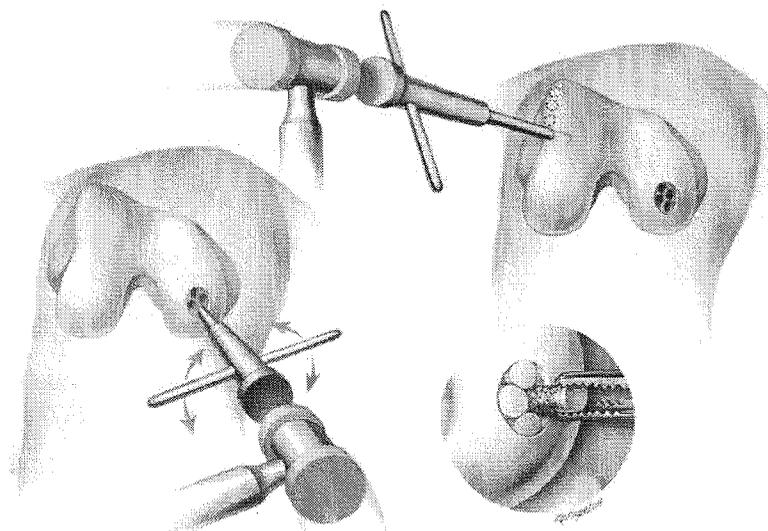
#### *II.3.2.2. Techniques de réparation cartilagineuse*

Greffes de périoste ou de périchondre : La couche profonde du périoste est riche en cellules progénitrices chondrales et osseuses et en facteurs de croissance. Le principe de cette technique est de prélever un lambeau sur la portion cartilagineuse des dernières côtes en emportant la couche profonde. Le prélèvement est alors adapté à la zone receveuse. Au niveau d'une lésion cartilagineuse, ce type de greffe aboutit à la formation d'un cartilage hyalin. Actuellement, il existe un risque d'ossification endochondrale du greffon qui ne laisse espérer que de faibles résultats à long terme. L'âge influence lourdement le pronostic de ce type de greffe. Dans le cas d'une application clinique, les greffes de périchondre sont adaptées uniquement à des lésions récentes chez un sujet âgé de moins de 40 ans [Minas T *et al.*, 1997].

Greffes ostéochondrales : Le cartilage tend à se fissurer, il y a perte de matrice et dégénérescence chondrocytaire. Beaucoup de patients présentent du fibrocartilage et chez certains, l'os sous-chondral est à nu. A ce stade d'altération de la partie sous-chondrale, les traitements précédents ne sont plus efficaces. Certains travaux ont cependant obtenu de meilleurs résultats avec des greffes ostéochondrales [Minas T *et al.*, 1997]. Mahomed *et al.* [Mahomed MN *et al.*, 1992] ont réalisé des allogreffes sur

des condyles fémoraux et ont observé 75% de succès avec un recul clinique de cinq ans.

La technique la plus récemment employée est la mosaïcoplastie qui utilise de petits cylindres de cartilage autologue prélevés sur des zones non-portantes de l'articulation (Figure I-15) [Hangody L *et al.*, 1998]. Les greffons maintiennent leur caractère hyalin dans 60 à 80% des cas. L'intégration des greffons est généralement excellente au niveau du tissu hôte et les patients retrouvent une bonne fonctionnalité articulaire [Hangody L *et al.*, 1998]. Après trois ans, des biopsies ont montré que le tissu conservait son aspect hyalin [Hangody L *et al.*, 1998]. Cependant, il faut noter que cette technique a donné de bons résultats au niveau des condyles mais pas sur des lésions rotuliennes. De plus, la quantité de matériel prélevé en zone non portante doit être faible pour éviter une nécrose du tissu donneur.

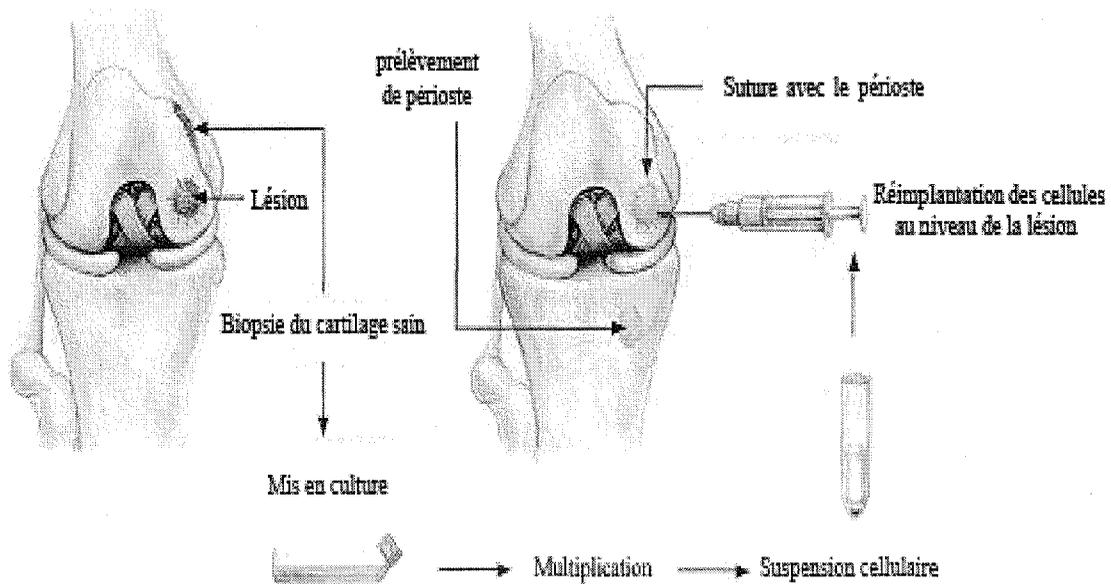


**Figure I-15 : Principe de la mosaïcoplastie**

*De petits cylindres ostéochondraux sont prélevés sur des zones non-portantes de l'articulation, puis sont réimplantés au niveau de la lésion cartilagineuse [http://perso.orange.fr/corine.bensimon/versier03.htm]*

Transplantations de chondrocytes autologues : cette stratégie thérapeutique a été réalisée, chez l'Homme, par Brittberg M [Brittberg M *et al.*, 1994]. Des chondrocytes autologues prélevés en zone saine sont placés en culture pendant deux à trois semaines. A l'issue de la culture, les lésions cartilagineuses de 1,6 à 6,5 cm<sup>2</sup> de diamètre sont suturées par un couvercle de périoste, dans lequel les chondrocytes sont réimplantés

(Figure I-16). Les chondrocytes commencent dès lors à produire une MEC proche de celle du cartilage hyalin. Au cours de ces dernières années, ce type d'intervention a été pratiqué dans le monde sur 12000 patients. De bons résultats ont été obtenus sur une période de 2 à 10 ans surtout chez les patients jeunes [Marlovits S *et al.*, 2006]. Cependant, la transplantation de chondrocytes autologues présente toujours certains inconvénients. Tout d'abord un coût élevé et par ailleurs l'arthroscopie révèle l'apparition d'une zone hypertrophique importante au niveau de l'implantation [Marlovits S *et al.*, 2006].



**Figure I-16 : Procédure de la transplantation de chondrocytes autologues**

*Des chondrocytes autologues prélevés en zone saine sont placés en culture pendant deux à trois semaines. A l'issue de la culture, les lésions cartilagineuses de 1,6 à 6,5 cm<sup>2</sup> de diamètre sont suturées par un couvercle de périoste, dans lequel les chondrocytes sont réimplantés. [Brittberg M *et al.*, 1994]*

Le but du traitement des lésions cartilagineuses est d'arrêter et d'inverser leur progression localement et globalement. Cependant, les traitements actuellement disponibles pour réparer le cartilage articulaire endommagé ne sont pas tout à fait satisfaisants, au niveau de la restitution structurelle et fonctionnelle. Il s'avère donc nécessaire et important de trouver de nouveaux moyens pour régler ce problème.

Une nouvelle génération de traitement a ainsi vu le jour récemment, il s'agit de l'ingénierie tissulaire [Hunziker EB *et al.*, 2002].

### III. Ingénierie tissulaire du cartilage

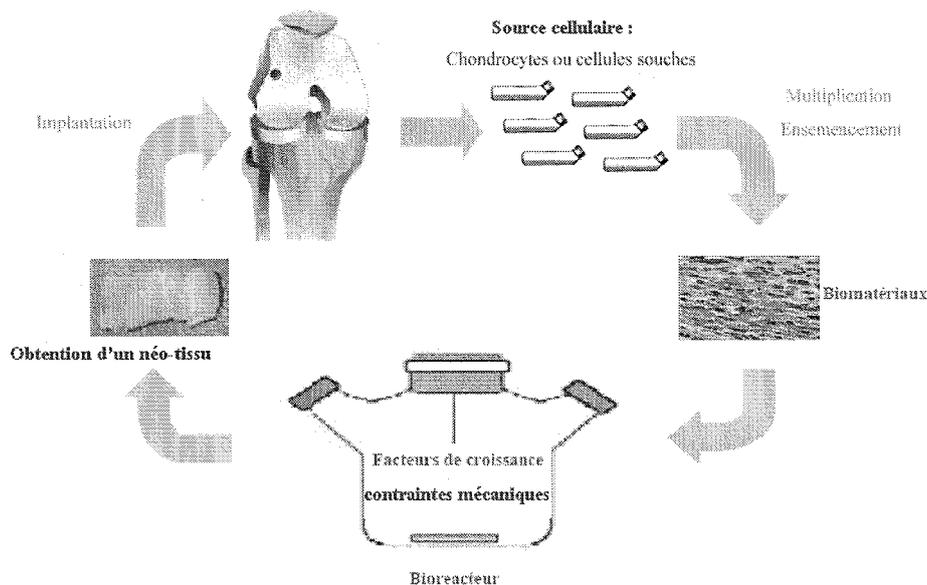
L'ingénierie tissulaire se définit comme l'ensemble des techniques et des méthodes s'inspirant des principes de l'ingénierie et des sciences de la vie pour développer un nouveau tissu ou un organe qui sera implanté au niveau d'une lésion. Cette approche vise à induire, guider et structurer la croissance cellulaire avec ou sans matrice adéquate, afin d'organiser les cellules en tissus complexes et éventuellement fonctionnels. Ainsi, pour «fabriquer» un tissu, de nombreuses disciplines sont requises: sciences des matériaux, biologie moléculaire et cellulaire, ingénierie chimique et mécanique, biochimie, robotique, bioinformatique, médecine et chirurgie. Les produits de l'ingénierie tissulaire peuvent, par ailleurs, améliorer les thérapies actuelles tout en réduisant les coûts du traitement.

Dans le cas de l'ingénierie tissulaire du cartilage, l'objectif est de produire un cartilage artificiel pour combler les lésions du tissu natif et maintenir ou améliorer ses fonctions au niveau articulaire.

Cependant, malgré tous les progrès de ces dernières années, il reste encore de nombreux problèmes à résoudre. Un des principaux challenges dans la création d'un cartilage vient du fait que les cellules, mises en culture, *in vitro*, sont incapables de s'organiser d'elles-mêmes en tissus implantables. En effet, comme les chondrocytes ne représentent que moins de 10% du tissu, ils sont tributaires de la MEC qui donne au tissu ses propriétés et à travers laquelle vont transiter différents signaux (chimiques, mécaniques et électriques). En fait, les cellules ont besoin de ces signaux et d'une matrice tridimensionnelle pour former un tissu tridimensionnel fonctionnel. Donc, il est important de reproduire des conditions les plus physiologiques possibles afin de construire un néo-cartilage de façon contrôlée.

L'ingénierie tissulaire, et plus particulièrement celle du cartilage comporte un certain nombre d'étapes (Figure I-17). Tout d'abord, des cellules (chondrocytes ou cellules souches) sont amplifiées etensemencées dans des biomatériaux. Cette construction cellulaire (cellules-biomatériau) est ensuite placée dans un milieu de culture en présence de facteurs de croissance et/ou de contraintes mécaniques pendant

une période de culture déterminée. Le néo-tissu résultant peut être implanté au niveau des lésions cartilagineuses. Ces différentes étapes vont être développées dans les paragraphes qui suivent.



**Figure I-17 : Principales étapes de l'ingénierie tissulaire du cartilage**

### III .1. Sources cellulaires

L'ingénierie du cartilage a besoin d'une source abondante de cellules saines qui peuvent être autologues (du même individu), homologues (d'un autre individu de même espèce) ou hétérologues (d'un individu d'une autre espèce). Ces cellules peuvent aussi être embryonnaires, foetales ou adultes [Leo AJ *et al.*, 2006].

Le choix des cellules est conditionné par la nécessité d'obtenir une nouvelle matrice aux propriétés biochimiques et biomécaniques les plus proches possibles de celles du tissu à remplacer. Deux grandes catégories de cellules peuvent servir à la réparation du cartilage : les chondrocytes natifs ou des cellules immatures, les cellules souches, qui, ont la capacité de se différencier en chondrocytes.

### **III.1.1. Chondrocytes**

Le chondrocyte, du fait de sa capacité à synthétiser une matrice extracellulaire associant le collagène de type II et les agrécannes s'est imposé naturellement comme source cellulaire pour la réparation du cartilage [Brittberg M *et al.*, 1996].

Cependant, le nombre limité de cellules, obtenues par prélèvement autologue, nécessite une amplification de celles-ci afin d'en obtenir une quantité suffisante pour une réparation de qualité. Cela présente un problème important, puisqu'une dédifférenciation cellulaire se produit rapidement lors de l'expansion de chondrocytes en monocouche. Elle se caractérise par des changements de morphologie (cellules fibroblastiques) et de synthèse matricielle (notamment apparition du collagène de type I et disparition du collagène de type II) [Domm C *et al.*, 2002]. Le tissu néosynthétisé dans ces conditions ne retrouve pas ses propriétés biologiques et mécaniques initiales, mais présente des caractéristiques de fibrocartilage [Kafienah W *et al.*, 2002]. Diverses techniques telles que la multiplication tridimensionnelle, sous hypoxie ou en présence de facteurs de croissance ou de contraintes mécaniques, ont été développées pour permettre aux cellules de retrouver un phénotype de chondrocytes. C'est ce que l'on appelle la redifférenciation cellulaire [Domm C *et al.*, 2002].

Une autre source cellulaire est utilisée : les cellules souches, qui sont des cellules indifférenciées. L'objectif est de contrôler leur différenciation, *in vitro*, vers un phénotype chondrocytaire.

### **III.1.2. Cellules souches**

L'utilisation de cellules souches présente plusieurs avantages [Luyten FP *et al.*, 2001]. Ces cellules permettent de s'affranchir du prélèvement de chondrocytes autologues, évitant ainsi l'étape du prélèvement cartilagineux potentiellement iatrogène et les problèmes de prolifération et de dédifférenciation cellulaire [Cancedda R *et al.*, 2003]. Les cellules souches semblent ainsi être de bonnes candidates à la thérapie génique et tissulaire [Grande DA *et al.*, 2003]

### III.1.2.1 Définition des cellules souches

Le terme de “ cellule souche ” est utilisé pour désigner une cellule jeune qui n’exprime, aucune spécificité. Cette cellule est dite “indifférenciée”. Lorsque les cellules souches sont placées dans un environnement tissulaire approprié, elles sont capables de se multiplier et de produire des cellules spécialisées, qui acquièrent une morphologie et une fonction spécifique du tissu. C’est la différenciation.

En raison de l’origine des cellules souches, elles sont classées en trois types :

Les cellules souches embryonnaires (CSEs) se distinguent par trois caractéristiques essentielles : (1) Elles proviennent d’un embryon de 4 à 5 jours (stade blastula) issu d’une fécondation *in vitro* ; (2) Elles conservent leur état indifférencié ce qui leur permet de s’autorenouveler [Boyer LA *et al.*, 2006] ; (3) Elles sont totipotentes et peuvent conduire à la formation de tous les tissus de l’organisme, y compris les tissus de la lignée germinale, même après une culture prolongée *in vitro*. [Kerr CL *et al.*, 2006].

Bien qu’il soit possible d’induire la différenciation *in vitro* des cellules souches embryonnaires [Hwang NS *et al.*, 2006 ; zur Nieden NI *et al.*, 2005], plusieurs problèmes devront être résolus avant d’arriver à l’étape finale d’application en clinique. Premièrement, le maintien en culture de cellules peut entraîner des mutations génétiques, et induire un risque de développement ultérieur de tumeurs [Draper JS *et al.*, 2004]. Deuxièmement, la réponse immune de l’hôte aux CSEs pose un défi important. Enfin, l’obstacle majeur au développement de la recherche sur les CSEs humaines reste, notamment en France, d’ordre éthique. L’absence d’accords quant à l’utilisation de cellules souches embryonnaires humaines dans un but expérimental limite leur application en l’ingénierie tissulaire [Bobbert M, 2006].

Les cellules souches foetales sont issues de tissus foetaux à un stade beaucoup plus tardif (5-9 semaines) que le stade de blastocyste embryonnaire et sont isolées à partir de foetus résultant d’avortements [Guillot PV *et al.*, 2006].

Les cellules souches adultes sont, pour leur part, déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique, ce qui explique leur hétérogénéité, même si certaines

d'entre elles peuvent conduire à la formation ou à la régénération de tissus distincts (multipotence). Plusieurs sous-types de cellules souches adultes sont identifiés, tels que les cellules souches hématopoïétiques, neuronales, épithéliales, mésenchymateuses, gastro-intestinales, épidermiques *etc.* [Tarnowski M *et al.*, 2006].

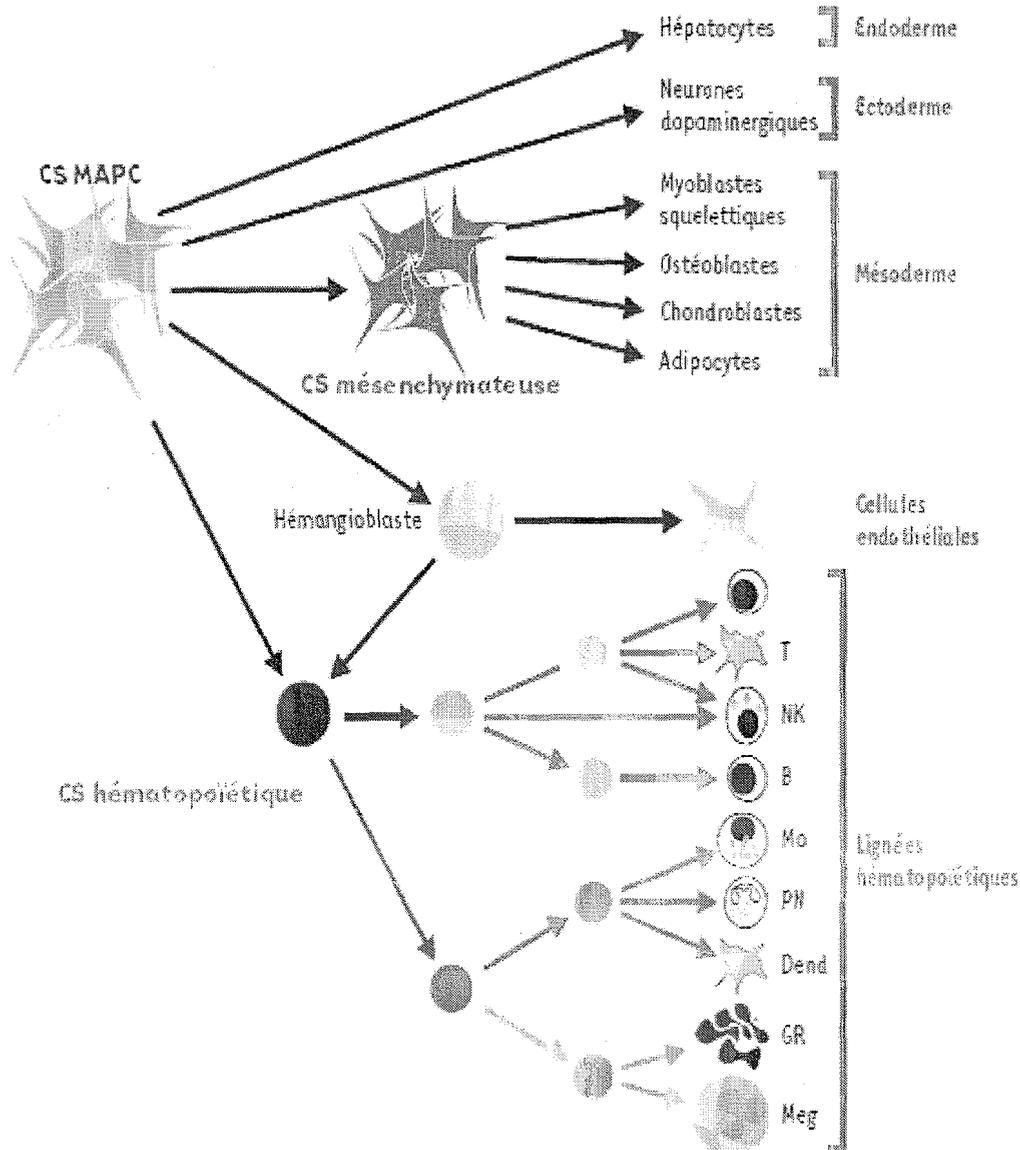
Les cellules souches adultes et plus particulièrement les cellules souches mésenchymateuses sont les plus utilisées et plus immunocompatibles. De plus, elles ne sont pas concernées par les problèmes éthiques. La maîtrise de leur plasticité constitue un maillon essentiel dans l'ingénierie tissulaire du cartilage. Cependant, il est encore nécessaire d'optimiser les techniques d'isolement, de maintien de l'état différencié et de l'amplification et de la synthèse matricielle en vue de la formation d'un tissu ou d'un organe.

### *III.1.2.2 Localisation des cellules souches mésenchymateuses*

Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) sont présentes dans divers tissus de l'organisme :

- La moelle osseuse est considérée comme la source la plus riche en CSMs et la plus accessible [Tuan RS *et al.*, 2003]. Elle contient plusieurs types de cellules souches : les cellules souches hématopoïétiques (CSHs) qui donnent naissance aux différentes lignées des cellules sanguines, les CSMs qui assurent la fonction de soutien stromal, et une troisième population a été découverte très récemment (2002), il s'agit des MAPCs de l'anglais «multipotent adult progenitor cells» (Figure I-18) [Coulombel L, 2003]. Ces cellules offrent un vaste potentiel de différenciation, proche des CSEs. Les MAPCs sont décrites comme étant les ancêtres de toutes les populations hématopoïétiques et mésenchymateuses présentes dans la moelle osseuse humaine [Verfaillie CM, 2005].
- Les tissus fœtaux tels que le placenta [Zhang X *et al.*, 2006] et le cordon ombilical [Guillot PV *et al.*, 2006] sont également riches en CSMs.
- Les tissus conjonctifs chez l'adulte peuvent contenir un faible pourcentage de CSMs, en particulier, le tissu adipeux [Zuk PA *et al.*, 2002], mais aussi le cartilage [Alsalamah S *et al.*, 2004], le périoste [Cuevas *et al.*, 2004], la membrane

synoviale [De Bari C *et al.*, 2001], le liquide synovial [Jones EA *et al.*, 2004], les muscles [Young HE *et al.*, 2001] ainsi que les tendons [Salingcarnboriboon R *et al.*, 2003].



**Figure I-18 : Filiation des différentes populations cellulaires de la moelle osseuse**  
 MAPCs : de l'anglais «multipotent adult progenitor cells»; CS : Cellule Souche ; GR : Globule Rouge ; PN : Polynucléaire neutrophiles ; NK : de l'anglais «naturel killer» ; Mo : Monocytes ; Meg : Mégacaryocytes ; T, B : Lymphocytes T et B ; Dend : Cellules dendritiques. [Coulombel L *et al.*, 2003].

Les CSMs isolées à partir de différents tissus présentent une expression des marqueurs de la surface cellulaire similaire quelle que soit l'origine du tissu [Yoshimura

H *et al.*, 2007]. Cependant, leurs potentiels d'expansion et de différenciation chondrogénique sont différents :

- Les CSMs issues de la moelle osseuse ont un taux de prolifération important et peuvent se différencier en chondrocytes en présence des facteurs de croissances tels que les TGF- $\beta$ s, les BMPs *etc.* Cependant, leur potentiel de différenciation cartilagineuse diminue au fur et à mesure des phases d'expansion [Sakaguchi Y *et al.*, 2005].
- Les CSMs provenant du cordon ombilical peuvent se multiplier rapidement et suivent la voie de la différenciation chondrocytaire même après une longue durée d'expansion [Wang JF *et al.*, 2004].
- Les CSMs isolées à partir du périoste et de la membrane synoviale ont un potentiel plus important d'expansion que celles de la moelle osseuse [Sakaguchi Y *et al.*, 2005 ; Yoshimura H *et al.*, 2007]. Le nombre de colonies obtenues après 7 jours de culture est 6 fois plus élevé que celui de CSMs d'origine médullaire. De plus, une meilleure potentialité de synthèse de la MEC cartilagineuse a été décrite pour des CSMs isolées à partir du périoste et de la membrane synoviale, comparativement aux CSMs d'origine médullaire [Shirasawa S *et al.*, 2006].
- Le tissu adipeux pourrait servir d'excellente source de CSMs du fait de la quantité présente dans l'organisme humain et de la disponibilité de déchets opératoires liés à la chirurgie [Mehlhorn AT *et al.*, 2006]. Il est à noter que les CSMs, isolées à partir du tissu adipeux, ont un potentiel d'expansion supérieur, mais un potentiel chondrogénique inférieur à celui des CSMs isolées à partir de la moelle osseuse [Sakaguchi Y *et al.*, 2005 ; Yoshimura H *et al.*, 2007]. Après 2 semaines de culture dans un gel d'alginate en présence de TGF- $\beta$ 1, les CSMs originaires du tissu adipeux expriment 10 fois moins le gène de col2 $\alpha$ 1 et 4 fois moins d'agrécane que celles de la moelle osseuse [Mehlhorn AT *et al.*, 2006].

Le tableau I-1 rassemble les études portant sur les potentiels de prolifération et de différenciation cartilagineuse de CSMs selon leur origine.

**Tableau I-1 : Comparaison des potentiels de prolifération et de différenciation cartilagineuse en fonction de l'origine des CSMs**

Origine de CSMs	Prolifération	Différenciation chondrocytaire		Références
		Expression du collagène II	Synthèse de MEC	
Moelle osseuse	+	+++	+++	<i>Sakaguchi Y et al, 2005</i> <i>Mehlhorn AT et al, 2006</i> <i>Yoshimura H et al, 2007</i>
Périoste	++++	++++	++++	<i>Sakaguchi Y et al, 2005</i> <i>Shirasava S et al, 2006</i> <i>Yoshimura H et al, 2007</i>
Membrane synoviale	+++++	++++	+++++	<i>Sakaguchi Y et al, 2005</i> <i>Yoshimura H et al, 2007</i>
Muscles	++	++	++	<i>Sakaguchi Y et al, 2005</i> <i>Yoshimura H et al, 2007</i>
Tissu adipeux	+++	+	+	<i>Sakaguchi Y et al, 2005</i> <i>Mehlhorn AT et al, 2006</i> <i>Yoshimura H et al, 2007</i>

### III.1.2.3 Caractérisation des CSMs

Les CSMs peuvent être caractérisées par leurs marqueurs de surface cellulaire. Ces cellules présentent, comme toutes les autres, de nombreux marqueurs de surface. La plupart de ces marqueurs sont peu spécifiques et peuvent être retrouvés à la surface de cellules différenciées. Ces marqueurs pourraient seulement être présents sur une cellule souche à un instant particulier ou dans certaines conditions, ce qui est le cas du marqueur CD34 sur le différenciation des CSHs [Engelhardt M *et al.*, 2002]. Les différents marqueurs de surface exprimés par les CSMs humaines actuellement connus sont regroupés dans le Tableau I-2 [Pittenger MF *et al.*, 2004]. Les CSMs expriment les récepteurs tels que CD105 (endogline), CD73 (5' terminal nucleotidase) et CD90 (Thy-1) ainsi que HLA (humain leukocyte antigen) de classe I et  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA). Les CSMs n'expriment pas CD40 et CD154 (CD40 ligand) ni CD80 et CD86 (les molécules de co-stimulation B7-1 et B7-2) [Pittenger MF *et al.*, 2004]. Les premières caractérisations des marqueurs de surface des CSMs, par cytométrie de flux, ont révélé qu'elles exprimaient des molécules de surface dont les ligands étaient présents sur les cellules matures des lignées hématopoïétiques, incluant, CD72 ; CD54

(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1); CD102 (ICAM-2); CD106 (vascular cellular adhesion molecule-1, VCAM-1); CD58 (lymphocyte function-associated antigen-3, LFA-3) et CD166 (activated leukocyte-cell adhesion molecule, ALCAM) [Majumdar MK *et al.*, 2003]. Ceci souligne l'étroite interaction entre ces deux types cellulaires. Les CSMs ne possèdent pas à leur surface les marqueurs hématopoïétiques CD3, CD4, CD11a et surtout CD34 ou CD45 [Pittenger MF *et al.*, 2004]. Cette propriété permet de distinguer aisément les deux populations à partir d'un échantillon de la moelle osseuse [Tableau I-3]. Les CSMs expriment de CD 49 (chaîne  $\alpha 1$  des intégrines) qui ont un rôle important dans la mobilité cellulaire. Pourtant, la liste des marqueurs de surface des CSMs reste incomplète.

**Tableau I-2 : Liste des marqueurs de surface exprimés ou non par les CSMs humains**

*CD = Cluster de Différenciation ; TGF $\beta$ IR = Transform growth factor  $\beta$  receptor type I; TGF $\beta$ IIR = Transform growth factor  $\beta$  receptor type II; HLA = Humain leukocyte antigen; SSEA = Stage specific embryonic antigen.*

<b>Marqueurs présents</b>	CD13, CD29, CD44, CD49a, b, c, e, f, CD51, CD54 (ICAM1), CD58, CD71, CD73, CD90 (Thy-1), CD102, CD105, CD106 (VCAM), CDw119, CD120a, CD120b, CD123, CD124, CD126 (ALCAM), CD127, CD140a, CD166, P75, TGF $\beta$ IR, TGF $\beta$ IIR, HLA-A, B,C, SSEA-3, SSEA-4, D7.
<b>Marqueurs absents</b>	CD3, CD4, CD6, CD9, CD10, CD11a, CD14, CD15, CD18, CD21, CD25, CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD49d, CD50, CD62E,L,S, CD80, CD86, CD95, CD117, CD133, SSEA-1.

Récemment, Diaz-Romero *et al.* ont montré que lorsque les chondrocytes articulaires humains cultivés en monocouche se différencient en fibroblastes, ils expriment les marqueurs CD166, CD105 et CD90 à des niveaux semblables aux CSMs indifférenciées. Ceci suggère que le suivi de l'expression des marqueurs CD166, CD105 et CD90 pourrait être approprié pour évaluer la différenciation des CSMs en chondrocytes [Diaz-Romero J *et al.*, 2005].

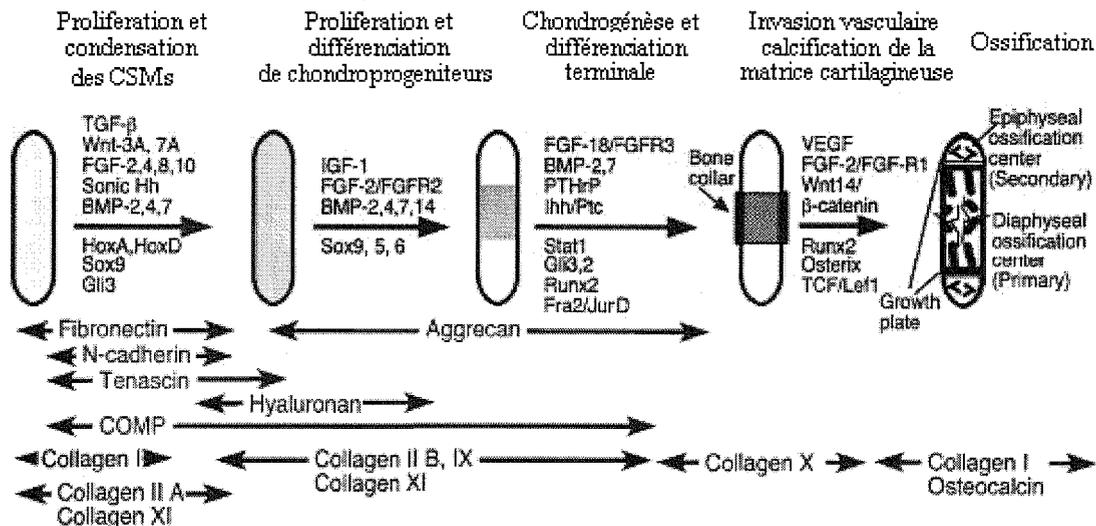
**Tableau I-3 : Expression de marqueurs à la surface des cellules souches hématopoïétiques (CSHs), des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) et des chondrocytes sans culture (liste non exhaustive)**

ND = Non Déterminé ; CD = Cluster de Différenciation

Marqueurs	CSHs	CSMs	Chondrocytes	Références
CD10	+	+	-	Jones EA et al., 2004; Diaz-Romero J et al., 2005
CD13	+	+	-	Jones EA et al., 2004; Diaz-Romero J et al., 2005
CD14	+	-	-	Kuwana M et al., 2003; Diaz-Romero J et al., 2005
CD29	+	+	+	Brakebusch C et al., 2005; Mareschi K et al., 2006; Diaz-Romero J et al., 2005
CD34	+	-	-	Mareschi K et al., 2006; Diaz-Romero J et al., 2005
CD44	+	+	+	Wang L et al., 2000; Mareschi K et al., 2006; Diaz-Romero J et al., 2005
CD45	+	-	ND	Szilvassy SJ et al., 2003 ; Jones EA et al., 2004;
CD49a	+	+	+	Diaz-Romero J et al., 2005
CD49e	+	+	+	Zhou Z et al., 2005; Diaz-Romero J et al., 2005
CD54	+	+	+	Gigant C et al., 2001; Diaz-Romero J et al., 2005
CD55	ND	+	+	Jones EA et al., 2004; Davies ME et al., 1994
CD63	ND	+	+	Risbud MV et al., 2006; Diaz-Romero J et al., 2005
CD71	+	+	+	Szilvassy SJ et al., 2003
CD73	ND	+	ND	Oswald J et al., 2004
CD81	ND	+	+	Baddoo M et al., 2003; Diaz-Romero J et al., 2005
CD82	+	ND	+	Burchert A et al., 1999; Diaz-Romero J et al., 2005
CD90	+	+	- (<5%)	Mareschi K et al., 2006; Diaz-Romero J et al., 2005
CD105	+	+	- (<5%)	Jones EA et al., 2004; Diaz-Romero J et al., 2005
CD106	+	+	+	Szilvassy SJ et al., 2003; Diaz-Romero J et al., 2005
CD120a	+	-	+	Diaz-Romero J et al., 2005
CD120b	+	-	ND	Diaz-Romero J et al., 2005
CD151	ND	ND	+	Diaz-Romero J et al., 2005
CD166	+	+	+	Mareschi K et al., 2006; Diaz-Romero J et al., 2005

*III.1.2.4. La chondrogénèse*

La chondrogénèse est le processus qui permet la formation du cartilage par la différenciation de CSMs au cours du développement du squelette. Les chondrocytes différenciés passent ensuite par une étape de maturation hypertrophique et aboutissent à une ossification endochondrale. Ce processus est régulé par de nombreux facteurs de croissance qui interviennent dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la maturation des cellules. Ces facteurs induisent des changements de l'expression des gènes à l'aide des facteurs de transcription de la famille des Sox entre autres. Ce processus s'effectue en trois étapes : la condensation de CSMs, la différenciation chondrocytaire et l'hypertrophie des chondrocytes (Figure I-19) [Goldring MB *et al.*, 2006].



**Figure I-19 : Représentation schématique des différentes étapes de la chondrogénèse et de l'ostéogénèse au cours du développement des os longs** Différents facteurs de croissances et facteurs de transcription interviennent dans l'expression des gènes dans chaque étape. [Goldring MB *et al.*, 2006]

**La condensation de CSMs**

Cette étape est composée de la sélection, la migration, la prolifération et la condensation des CSMs (Figure I-19). Ces actions sont régulées par des interactions cellules-cellules et cellules-matrice [Hall BK, 2000 ; Tuan RS, 2004]. La condensation correspond à une augmentation de l'adhésion cellulaire et à des modifications du cytosquelette. Préalablement à la condensation, les CSMs produisent une MEC riche en HA et en collagène de types I et IIa [Sandell LJ, 1994]. L'initiation de la condensation

est associée à une augmentation de l'activité de la hyaluronidase et à l'apparition de molécules d'adhésion telles que les N-cadhérines et les N-CAMs (Neural Cell Adhesion Molecules). Le facteur de croissance TGF- $\beta$ , un des premiers stimuli dans la condensation chondrogénique, stimule la synthèse de la fibronectine, qui en retour régule les récepteurs N-CAM. Les syndécanes, un type de protéoglycannes membranaires, se fixent à la fibronectine et régulent négativement les récepteurs N-CAM, définissant ainsi les limites de la condensation. La matrice, contenant aussi la ténascine, la thrombospondine, les protéines COMP, interagit avec les molécules d'adhésion pour activer les voies de signalisation intracellulaires. Les molécules N-cadhérines et N-CAM ne seront plus exprimées à la surface des chondrocytes mais réapparaîtront plus tard à la surface des cellules du péri-chondre [DeLise AM *et al.*, 2000].

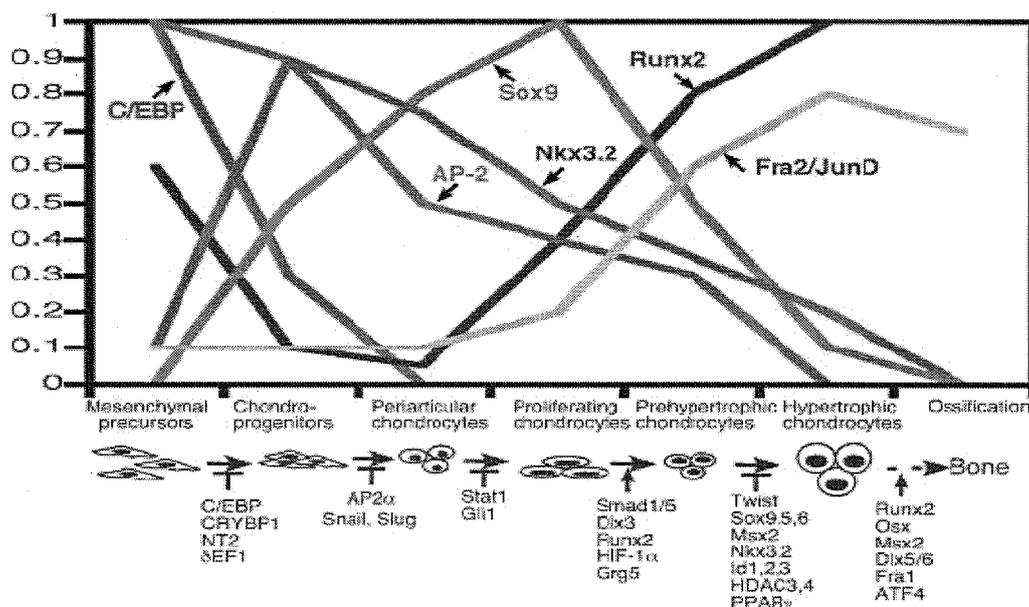
Plusieurs auteurs ont décrit l'implication de nombreux facteurs de transcription mais aussi la présence de nombreux gènes dans le contrôle de la chondrogénèse (Figure I-19) [DeLise AM *et al.*, 2000 ; Eames BF *et al.*, 2003; Hall BK *et al.*, 2000].

#### La différenciation chondrocytaire :

Cette différenciation se caractérise par la formation d'une matrice contenant différents types de collagène tels que les collagènes de type II, IX et XI mais aussi des agrécannes (Figure I-19).

Le facteur de transcription Sox9 est un des premiers facteurs permettant aux cellules de commencer l'étape de condensation (Figure I-20). Dans la phase de différenciation, le facteur de transcription Sox9 permet l'expression du collagène de type IIa (Col2a1) mais aussi l'expression d'autres protéines matricielles du cartilage tels que Colla2 [Eames BF *et al.*, 2003]. Deux autres membres de la famille des facteurs transcriptionnels Sox (L-Sox5 et Sox6) co-exprimés avec Sox9 dans cette étape sont indispensables pour permettre la différenciation des chondro-progéniteurs en chondrocytes [Lefebvre V *et al.*, 1998]. En effet, la présence de LSox5 et Sox6 permet l'expression des collagènes de type II, IX, des agrécannes et des protéines de liaison [Smits P *et al.*, 2001]. Un autre facteur de transcription, le Run2, intervient dans la

phase de différenciation chondrocytaire. Comme le montre la figure I-20, ce facteur est également présent dans les autres étapes telles que la condensation et l'ossification [Ducy P *et al.*, 1997].



**Figure I-20 : Représentation schématique de l'expression des facteurs transcriptionnels lors des différentes étapes de la chondrogénèse et de l'ossification endochondrale**

*Des facteurs de transcription sont soit des inhibiteurs (⊥) soit des activateurs (↑) des différentes étapes. [Goldring MB *et al.*, 2006]*

**L'hypertrophie des chondrocytes :**

Dans cette étape, les chondrocytes différenciés deviennent des chondrocytes hypertrophiques et commencent à exprimer leur seul marqueur spécifique à savoir le collagène de type X [St-Jacques B *et al.*, 1999]. La transcription du collagène de type X est régulée par le facteur de transcription Runx2 dont l'expression est augmentée dans l'étape d'hypertrophie de la chondrogénèse [Shen G *et al.*, 2005]. L'apparition de ce type de collagène indique le stade terminal de la chondrogénèse et le début de l'ostéogénèse où le collagène de type X facilite le dépôt de la matrice osseuse et la calcification [Enomoto H *et al.*, 2002]. La chondrogénèse et l'ostéogénèse sont donc étroitement coordonnées par l'étape d'hypertrophie de chondrocytes. Le suivi de l'expression du collagène de type X est indispensable au contrôle de la chondrogénèse afin de ne pas débiter le processus d'ossification endochondrale.

### III.1.2.5. *Système de culture*

La différenciation en chondrocytes ou chondrogénèse nécessite des conditions spécifiques. Entre autre, il est nécessaire de respecter un environnement 3D. Différents systèmes 3D pourraient initier la chondrogénèse, parmi lesquels nous pouvons citer, les cultures en « micromasses », en « pellet » ou en biomatériaux 3D.

#### Culture en « micromasses » ou en « pellet » :

Comme il l'a été décrit précédemment, la différenciation des CSMs en chondrocytes commence par une phase de condensation des cellules où elles s'agrègent avec une forte densité dans le centre du pré-cartilage. Les cultures *in vitro* à haute densité (« micromasses » ou « pellet ») sont des systèmes de culture qui imitent l'étape de la condensation des CSMs [Weston AD, *et al.*, 2000 ; Sakaguchi Y *et al.*, 2005]. En effet, les changements de la composition de la MEC produite dans ces systèmes de culture sont équivalents à ceux observés *in vivo*, faisant de ces systèmes de bons modèles pour étudier les premières étapes de la chondrogénèse [De Bari C *et al.*, 2004]. Par conséquent, ces deux systèmes de culture sont largement utilisés pour initier la chondrogénèse ou encore étudier les événements de signalisation impliqués dans la différenciation des CSMs en chondrocytes.

#### Culture dans des biomatériaux tridimensionnels :

Les CSMs peuvent également être cultivées dans différents biomatériaux tridimensionnels, afin d'améliorer la prolifération, la synthèse de la MEC pour aller vers une différenciation de CSMs en chondrocytes (cf. paragraphe III .2.).

### **III .2. Biomatériaux**

Les biomatériaux constituent un support de culture et permettent une reconstitution tridimensionnelle de tissus. Les biomatériaux tridimensionnels sont appréciés pour la réparation du cartilage car ils miment la structure native de ce dernier et permettent de mieux promouvoir la multiplication des chondrocytes et la synthèse d'une matrice cartilagineuse que les systèmes de culture en 2 dimensions. En effet, la culture en monocouche ne permet pas le maintien d'un phénotype chondrocytaire. L'élaboration de biomatériaux doit remplir un cahier des charges très strict afin de fournir aux cellules non seulement un environnement biocompatible mais également une stabilité mécanique.

#### ***III.2.1. Cahier des charges***

Les propriétés des biomatériaux doivent être adaptées aux exigences requises par leur application (la nature du comblement) :

Biocompatibilité : les biomatériaux doivent être biocompatibles étant donné qu'ils seront colonisés par des cellules vivantes. Cette biocompatibilité est liée à la fois au matériau en lui-même, au procédé de sa fabrication mais aussi aux produits de sa dégradation. Cette biocompatibilité favorisera l'adhésion, la prolifération cellulaire et l'expression du phénotype à leur contact. De plus, ils doivent éviter le rejet immunitaire et la réponse inflammatoire de l'hôte.

Porosité : les biomatériaux doivent posséder une haute porosité et présenter une importante interconnexion entre les pores afin de permettre la colonisation et la migration cellulaire, ainsi que la diffusion des nutriments et métabolites. En générale, une taille de pore de 100 à 200 µm semble être adéquate.

Propriétés mécaniques : étant donné la présence de stimulations mécaniques dans le cas de différenciation *in vitro* mais aussi de l'environnement mécanique *in vivo*, les biomatériaux doivent supporter des déformations et doivent pouvoir récupérer leur forme tout au long de la régénération.

Biodégradabilité : Les biomatériaux idéaux doivent être totalement biodégradables au fur et à mesure que la néo-matrice se forme. Les produits issus de la

dégradation ne doivent présenter aucune toxicité pour l'organisme hôte. Leur durée de dégradation dépend essentiellement du temps nécessaire à la synthèse de la néo-matrice extracellulaire par les cellules. Il faut noter que la reconstitution d'un tissu fonctionnel peut nécessiter plusieurs mois et les constituants matriciels artificiels doivent donc être choisis en fonction de cet impératif de durée.

### ***III.2.2. Biomatériaux utilisés en ingénierie tissulaire du cartilage***

Plusieurs types de biomatériaux sont actuellement disponibles pour la reconstitution d'un cartilage. Ils peuvent être classés en deux catégories selon leur origine (naturelle ou synthétique).

#### ***III.2.2.1 Biomatériaux d'origine naturelle***

Le souci de biocompatibilité des implants a orienté les chercheurs vers des biomatériaux biocompatibles d'origine naturelle. Les trois biomatériaux naturels les plus utilisés sont l'alginate, l'agarose et le collagène.

#### **L'alginate**

L'alginate se rapporte à une famille de copolymères polyanioniques dérivés des algues de mer brunes et comprenant des résidus 1,4-β-D-mannuroniques (M) et des résidus α-L-guluroniques (G) dans des proportions variables et semble être un biomatériau intéressant. L'alginate de sodium est soluble en solution aqueuse et forme un gel stable à température ambiante, en présence de cations bivalents ( $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) à des concentrations non cytotoxiques, par interaction ionique entre le groupe des acides guluroniques. Sa biodégradabilité et ses propriétés mécaniques varient en fonction de la proportion de M/G, et de la concentration en cations bivalents [Wu SF *et al.*, 2002]. Le gel d'alginate permet de placer les chondrocytes dans un environnement tridimensionnel, afin de maintenir un phénotype différencié sain et de permettre la synthèse des constituants matriciels tels que les protéoglycannes et les collagènes de type II [Marijnissen WJ *et al.*, 2002]. Le fait que les chondrocytes ne se différencient pas dans les gels d'alginate a entraîné leur exploitation intensive dans le domaine de l'ingénierie tissulaire du cartilage [Domm C *et al.*, 2004 ; Heyland J *et al.*, 2006]. De

plus, la combinaison d'alginate avec l'HA, composé présent dans le cartilage natif, pourrait encore améliorer sa résistance mécanique ainsi que sa biocompatibilité. L'utilisation de gel d'alginate/HA comme support matriciel à la culture des chondrocytes est en plein essor actuellement [Gerard C *et al.*, 2005].

### L'agarose

L'agarose est un polysaccharide sous forme purifiée. Il dérive de l'agar obtenu à partir d'algues rouges. Il présente des caractéristiques proches de l'alginate et il est couramment employé en ingénierie tissulaire pour la réparation de cartilage. Il possède également l'avantage d'être injectable sous forme semi-liquide à température ambiante et donc de manière moins-invasive. Le durcissement s'effectue alors, *in situ*, après implantation dans la lésion, sous l'influence de la température corporelle. De plus, l'étude de sa réponse à la pression a montré que la transmission de cette contrainte était complète et immédiate, dans toute la gamme de pressions, de fréquences, de volumes appliqués, et de viscosités examinées [De Rosa E *et al.*, 2006 ; Chowdhury TT *et al.*, 2006].

### Le collagène

Le collagène est une matrice de nature protéique d'origine animale (extrait de la peau) ou humaine (extrait du placenta humain). Le collagène est un excellent biomatériau en raison de ses propriétés mécaniques, son excellente biocompatibilité et sa biodégradabilité [Aigner T *et al.*, 2003]. De plus, il est indispensable au développement cellulaire parce qu'il joue un rôle important en régulant le phénotype chondrogénique et la chondrogénèse, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* [Lee JE *et al.*, 2004]. De manière générale, deux types de collagène sont utilisés :

Le collagène de type I est principalement utilisé pour la fabrication des biomatériaux [Galois L *et al.*, 2004 ; Cortial D *et al.*, 2006]. En effet, il est peu immunogène et son antigénicité peut être réduite par réticulation thermique ou chimique ou par élimination des télopeptides par une digestion avec la pepsine. Malgré tout, des anticorps contre le collagène de type I ont été détectés chez des patients traités avec du collagène de derme bovin [Klopper PJ, 1986]. Cette réaction dépend de l'origine du

collagène ainsi que du site d'implantation [Aragona F *et al.*, 1998].

Le collagène de type II pourrait être un bien meilleur biomatériau pour le cartilage parce qu'il correspond à un composant naturel et majeur du cartilage hyalin. En effet, il a été démontré qu'il induisait une stimulation de la prolifération des chondrocytes et un maintien du phénotype [Nehrer S *et al.*, 1997]. Cette action se fait *via* l'activation de cytokines qui sont inhibées par le collagène de type I [Qi WN *et al.*, 1998]. Cependant, le collagène de type II a été décrit comme responsable de maladies auto-immunes et ne peut donc pas être utilisé comme biomatériau implantable [Takeda T *et al.*, 1996].

De plus, des biomatériaux de ce type (hydrogel d'alginate, d'agarose et du collagène de type I)ensemencés avec des chondrocytes humains ou des CSMs humaines ont déjà été implantés chez l'animal, notamment chez le lapin ou chez le rat [Rahfoth B *et al.*, 1998 ; Kaul G *et al.*, 2006 ; Nöth U *et al.*, 2007].

### *III.2.2.2 Biomatériaux polymériques synthétiques*

Bien que les biomatériaux naturels soient utilisés en ingénierie tissulaire, leur comportement mécanique n'est pas adéquat et ne permet pas une transplantation tissulaire [Yoon DM *et al.*, 2006]. De plus, il existe une certaine hétérogénéité lors de leur préparation [Yoon DM *et al.*, 2006]. C'est pour ces raisons que de nombreuses études s'orientent vers l'utilisation de biomatériaux polymériques synthétiques qui sont préparés avec des polyesters ou des polyéthylènes. En plus d'être moins chers, ils permettent une bonne reproductibilité. Le large éventail des procédés de fabrication permet l'ajustement des propriétés mécaniques, de la porosité, de la biodégradabilité, ainsi que leur biocompatibilité grâce au greffage de peptides naturels (par exemple : peptides RGD, Arginine - Glycine - Acide Aspartique), de facteurs de croissance, de polysaccharides et de l'ADN *etc* [Yoon DM *et al.*, 2006].

### *Les polyesters et leurs copolymères*

L'acide polylactique (PLA) et l'acide polyglycolique (PGA) ainsi que leurs copolymères : l'acide lactique-co-glycolique (PLGA) sont les matrices biorésorbables. Ces composés sont utilisés depuis longtemps pour la confection de fils de suture

chirurgicaux. Des études *in vitro* avec ces composés ont été pratiquées et ces polymères constituent des modèles intéressants pour la culture de chondrocytes ou CSMs [Banu N *et al.*, 2006 ; Xin X *et al.*, 2007]. Cependant, leur application biomédicale a été freinée par la présence de leurs produits de dégradation qui sont acides et susceptibles de produire des réactions immunitaires et inflammatoires [Kim BS *et al.*, 1998]. Actuellement, ce phénomène est mieux contrôlé et plusieurs études ont été publiées démontrant l'usage possible de ces matrices synthétiques en ingénierie tissulaire du cartilage.

#### Les hydrogels à base d'oxyde de polyéthylène

Les hydrogels à base d'oxyde de polyéthylène sont des matrices injectables *in situ* qui évitent la nécessité d'un traitement invasif. Ils sont caractérisés par une excellente biocompatibilité, résorbabilité et malléabilité, ce qui les rend attractifs en ingénierie tissulaire du cartilage [Grant C *et al.*, 2006].

Enfin, une nouvelle conception de "matériau intelligent" est à noter. Ce matériau devra adapter sa réponse, signaler une modification apparue dans l'environnement et dans certains cas, provoquer une action de correction. Il sera, indiscutablement, une matrice de choix à développer dans les années à venir pour la réparation des lésions du cartilage [Kirkpatrick CJ *et al.*, 2006].

### **III .3. Facteurs biochimiques ou physicochimiques**

De nombreux facteurs biochimiques ou physicochimiques tels que les facteurs de croissance, les vitamines et les hormones, jouent un rôle essentiel dans le maintien du phénotype des chondrocytes, l'induction de la différenciation des CSMs en chondrocytes, ainsi que la stimulation de la maturation terminale en chondrocytes hypertrophiques [Moreau JE *et al.*, 2005] (cf. III.1.2.4). Il sera donc intéressant de les utiliser en ingénierie tissulaire.

### **III.3.1. Facteurs de croissance**

Les facteurs de croissance présentent une importance qui n'est plus à démontrer dans la régénération du cartilage ou d'autres tissus. En effet, ils peuvent agir soit sur la prolifération cellulaire [Attisano L *et al.*, 2002], soit sur la synthèse de la MEC [Sakai T *et al.*, 2002].

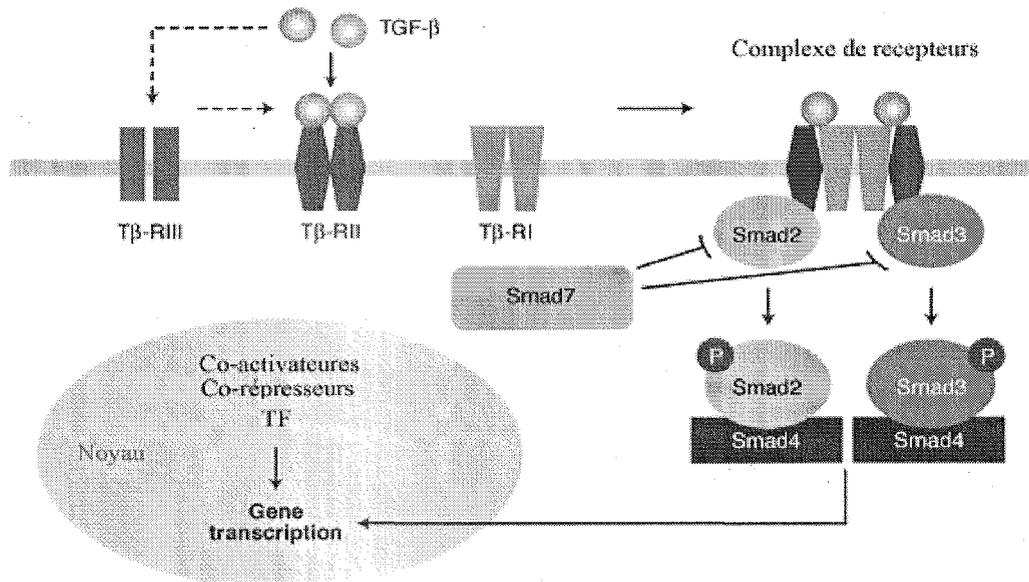
#### **III.3.1.1 Facteurs de croissance de la superfamille du TGF- $\beta$**

La superfamille du TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factors- $\beta$ ) comporte les TGF- $\beta$ s, les BMPs (Bone Morphogenic Proteins) et les activines. Ces cytokines jouent un rôle primordial dans la détermination du devenir cellulaire au cours de l'embryogenèse et contrôlent un large spectre de réponses biologiques chez l'adulte [Roberts AB *et al.*, 1998]. Les effets chondroinductifs de ces molécules ont été également montrés dans de nombreuses études utilisant les CSMs [Mackay AM *et al.*, 1998 ; Barry F *et al.*, 2001].

#### **TGF- $\beta$ s**

Les TGF- $\beta$ s sont des facteurs de croissance modulant la prolifération cellulaire et la synthèse des composants de la MEC. Principalement, trois isoformes appelés TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3 sont distingués [Roberts AB *et al.*, 1998].

Les récepteurs de TGF- $\beta$ s incluent le type I (T $\beta$ -RI, TGF- $\beta$  récepteur type I) et le type II (T $\beta$ -RII, TGF- $\beta$  récepteur type II). Ils transmettent le signal par l'intermédiaire de protéines Smads. Un troisième type de récepteur (T $\beta$ -RIII, TGF- $\beta$  récepteur type III) joue un rôle dans l'attachement du facteur de croissance aux T $\beta$ -RI et T $\beta$ -RII (Figure I-21). La liaison des molécules de TGF- $\beta$ s à T $\beta$ -RII, à la surface des cellules, mène à la phosphorylation des résidus sérine et thréonine du T $\beta$ -RI. Ce récepteur phosphoryle et active ensuite le Smad2/3, en combinaison avec Smad4, ce complexe est transféré au noyau où une fois activé, il recrute d'autres facteurs de transcription qui activent ensemble l'expression des gènes de cible qui exécute les fonctions biologiques des TGF- $\beta$ s [Roberts AB *et al.*, 1998].



**Figure I-21 : Voie de transduction de la signalisation des TGF-βs**

*Les TGF-βs se lient au récepteur Tβ-RII. Cette liaison pourrait être renforcée par la présence de Tβ-RIII. Ce complexe recrute et phosphoryle Tβ-RI menant à l'activation de Smad2 et de Smad3 par la phosphorylation (p). Ce processus est inhibé par Smad7. Les protéines Smad2 et Smad3 activées forment des hétérodimères avec Smad4 et sont transloquées au noyau. Les co-activateurs, les co-répresseurs et d'autres facteurs de transcription (TF) associés au complexe Smads règlent l'expression de gènes. [www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/03005726h.htm]*

Les TGF-βs stimulent la prolifération des chondrocytes et des CSMs mais inhibent la prolifération des cellules telles que les cellules épithéliales, les cellules lymphoïdes et les cellules myéloïdes car ils bloquent la croissance cellulaire à la phase G1 du cycle cellulaire [Kurosaka D *et al.*, 1994]. Ces facteurs de croissance induisent également une augmentation de la synthèse du collagène de type II et des protéoglycannes [Hiraki Y *et al.*, 1988], mais aussi une inhibition des enzymes de l'espace péri-cellulaire impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire, comme la collagénase [Hiraki Y *et al.*, 1988]. Les effets de ces cytokines sur les chondrocytes sont cependant controversés car ils varient en fonction de l'état de maturation des chondrocytes, des couches du cartilage par rapport à la surface articulaire [Itayem R *et al.*, 1997] ainsi que des conditions expérimentales [Redini F *et al.*, 1988 ; Galera P *et al.*, 1992].

Les TGF-βs sont aussi capables d'induire la différenciation des cellules souches en chondrocytes [Barry F *et al.*, 2001]. En effet, ils favorisent l'expression des gènes

chondrogéniques ainsi que la synthèse de la MEC. L'efficacité des différents TGF- $\beta$ s n'est pas identique pour chacun d'eux. Toutes les isoformes de TGF- $\beta$ s peuvent augmenter l'expression des molécules d'adhésion telles que les N-cadhrines, les N-CAM, la ténascine et la fibronectine qui permettent l'interaction cellules-cellules et cellules-matrice pendant la chondrogénèse [Chimal-Monroy J *et al.*, 1999]. Cependant, le TGF- $\beta$ 1 est l'isoforme la plus efficace, suivi par TGF- $\beta$ 3 puis par TGF- $\beta$ 2 [Chimal-Monroy J *et al.*, 1999].

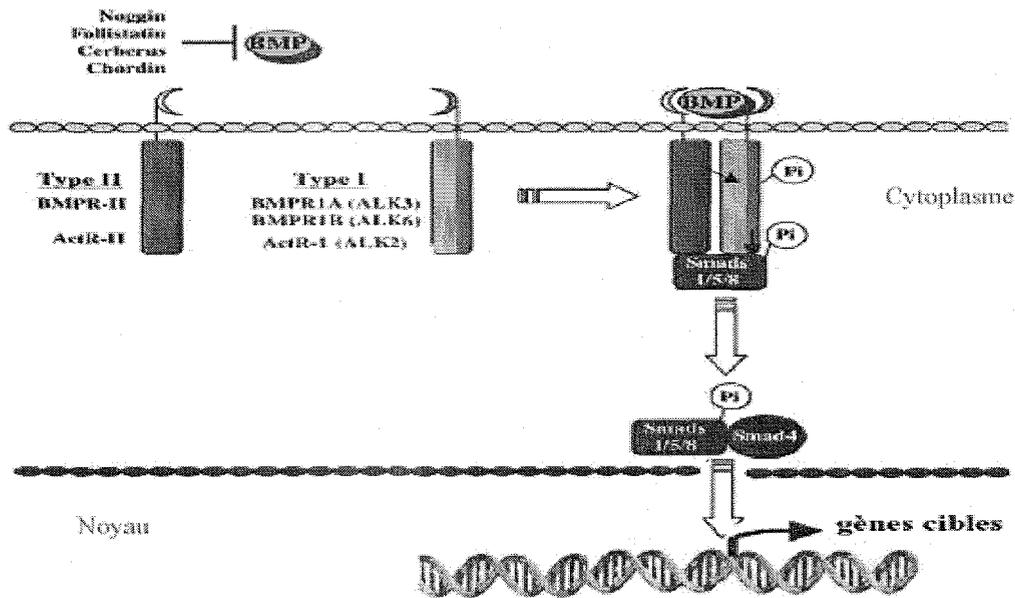
Par ailleurs, une formation uniforme de la MEC au cours de la chondrogénèse induite par TGF- $\beta$ 1 est observée dans les « micromasses » de CSMs, alors que le TGF- $\beta$ 2 et le TGF- $\beta$ 3 entraînent une répartition moins homogène de la MEC [Chimal-Monroy J *et al.*, 1999]. Néanmoins, des études ont montré que TGF- $\beta$ 2 ou TGF- $\beta$ 3 sont plus efficaces pour la différenciation chondrocytaire des CSMs que TGF- $\beta$ 1, car ils induisent 2 fois plus de dépôt des GAGs et de collagène type II que TGF- $\beta$ 1 [MacKay AM *et al.*, 1998 ; Barry F *et al.*, 2001].

### BMPs

Les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) sont de petites glycoprotéines qui font partie de la superfamille de TGF- $\beta$ . Les BMPs comportent plus de 10 types de protéines. Selon leur homologie de la séquence d'acides aminés, les BMPs peuvent être classées principalement en trois groupes tels que le groupe de BMP-2/-4, le groupe de BMP-5/-6/-7 et le groupe de BMP-3. Les BMPs sont des facteurs solubles, synthétisés et sécrétés sous forme de précurseurs inactifs. Ils sont activés par protéolyse, acquièrent une conformation spécifique et se dimérisent par des liaisons covalentes (ponts disulfures) [De Caestecker M *et al.*, 2004].

Les dimères de BMPs se lient à deux types de récepteurs BMPR-I (BMP récepteur type I) et BMPR-II (BMP récepteur type II), pour former un complexe hétérotétramérique. Le complexe BMP-récepteur active par phosphorylation le complexe récepteur-Smad (R-Smads) 1, 5 ou 8 et ainsi initie une cascade de signalisation. Le complexe R-Smads s'associe à Smad4 (qui est aussi un composant de la voie des TGF- $\beta$ s) et permet ainsi sa translocation dans le noyau. Pourtant, cette voie

de transduction peut être bloquée par des inhibiteurs sécrétés tels que les protéines noggine, chordine, follistatine et cerberus. La signalisation par les inhibiteurs empêche la phosphorylation de R-Smads et/ou leur interaction avec Smad4. (Figure I-22) [Canalis E *et al.*, 2003].



**Figure I-22 : Cascade de signalisation des BMPs**

*Les BMPs se lient aux récepteurs BMPR-I et BMPR-II. L'hétérodimère formé est phosphorylé. Cela mène à la phosphorylation et à l'activation du récepteur (R-) Smads (1, 5 ou 8). Les R-Smads réagissent réciproquement avec co-Smad (Smad 4). Cette réaction permet la translocation du complexe au noyau, afin de réagir avec les autres facteurs de transcription, de même que les TGF- $\beta$ s. [Nadiri A, 2005]*

Ces facteurs ont été originellement identifiés et caractérisés par leur capacité à induire *de novo* la formation d'os et de cartilage sur des sites ectopiques [Wozney JM *et al.*, 1988]. Ces protéines sont impliquées non seulement dans le contrôle de la prolifération, la maturation et l'hypertrophie des chondrocytes au cours du développement embryonnaire [Hogan *et al.*, 1996] mais également dans les processus de réparation des tissus osseux [Gerhart TN *et al.*, 1993] et cartilagineux [Sellers LT *et al.*, 1992] suite à des lésions provoquées.

Par ailleurs, il a été montré que les BMPs peuvent également induire la chondrogénèse des CSMs. En effet, BMP-2 et -7 sont capables de provoquer la différenciation chondrogénique et ostéogénique chez le CSMs issues du tissu adipeux [Shea CM *et al.*, 2003 ; Knippenberg M *et al.*, 2006]. La BMP-4, quand à elle, peut

induire la chondrogénèse des CSMs issues des muscles *in vitro* et favoriser la réparation du cartilage *in vivo* [Kuroda R *et al.*, 2006]. La présence de BMP-6, dans le milieu de culture, induit une augmentation significative de l'expression de col2 $\alpha$ 1 mais une diminution de l'expression de col10 $\alpha$ 1 chez les CSMs issues des tissus adipeux [Estes BT *et al.*, 2006]. Cependant, l'expression de col10 $\alpha$ 1 chez les CSMs issues de la moelle osseuse est inhibée par BMP-6 [Estes BT *et al.*, 2006].

### Activines

Les activines contrôlent différents processus physiologiques et jouent un rôle essentiel dans le développement et l'intégrité fonctionnelle de la plupart des tissus [Bilezikjian LM *et al.*, 2006]. Ainsi, elles favorisent l'expression de certaines molécules d'adhésion tels que le N-CAM [Jiang TX *et al.*, 1993] et de la fibronectine [Downie SA *et al.*, 1995] au cours de la chondrogénèse.

#### *III.3.1.2 Autres facteurs de croissance*

Hormis les facteurs de croissance de la superfamille du TGF- $\beta$ , il existe également d'autres facteurs de croissance impliqués seuls ou en combinaison avec les TGF- $\beta$ s ou les BMPs dans la régénération du cartilage.

L'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) stimule la prolifération des chondrocytes différenciés ainsi que la synthèse de constituants matriciels tels que les protéoglycannes. L'IGF-1 induit aussi la différenciation de CSMs en chondrocytes. Cet effet est renforcé en combinaison avec les TGF- $\beta$ s [Longobardi L *et al.*, 2006].

Le bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) a la capacité d'accélérer la croissance cellulaire des chondrocytes et des CSMs. Son action peut être augmentée par la présence d'insuline. Il a été montré que ce facteur de croissance provoque également la chondrogénèse de CSMs avec une augmentation de la synthèse de la MEC et des gènes chondrogéniques [Chiou M *et al.*, 2006].

Le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) est un facteur mitotique pour les chondrocytes et les CSMs [Gruber R *et al.*, 2004]. Il induit non seulement la synthèse de la MEC, après un long temps d'incubation avec les chondrocytes, et inhibe la maturation des chondrocytes vers un phénotype hypertrophique [Schmidt MB *et al.*,

2006]. De plus, le PDGF et le TGF- $\beta$ s ont des effets synergiques sur la chondrogenèse de CSMs [Nakayama N *et al.*, 2004].

### ***III.3.2. Autres facteurs biochimiques ou physicochimiques***

D'autres facteurs biochimiques ou physicochimiques occupent également une place très importante dans le processus de régénération du cartilage.

L'oxygène est un facteur important pour le développement du cartilage. Les chondrocytes sont adaptés à des conditions d'hypoxie, c'est-à-dire que les pressions partielles en oxygène présentes dans le cartilage varient entre 1% et 10% [Silver IA *et al.*, 1975]. C'est aussi le cas pour les CSMs issues de la moelle osseuse qui se trouvent dans un environnement où la pression moyenne en oxygène est d'environ 6,4% [Huang ST *et al.*, 2004]. Cependant, l'effet de l'oxygène, pendant la culture *in vitro*, reste actuellement une question controversée. Dans des conditions hypoxiques ( $O_2 = 5\%$ ), Domm C *et al.* ont observé un effet stimulateur sur la production de la MEC cartilagineuse par les chondrocyte [Domm C *et al.*, 2002]. De même, Malda *et al.* ont démontré une augmentation de la synthèse de GAGs associée à une diminution de l'expression du collagène type I par des chondrocytes cultivés en « pellet » sous des pressions en oxygène de 5% et 1% en comparaison à une culture sous 21% d'oxygène [Malda J *et al.*, 2004]. En revanche, il a été montré une synthèse plus importante de la MEC, en particulier de protéoglycannes, par des chondrocytes cultivés dans des biomatériaux tridimensionnels sous des conditions aérobies [Murphy CL *et al.*, 2001]. Pour le cas des CSMs, il a été prouvé qu'une pression en oxygène de 5% peut favoriser la synthèse de la MEC et l'expression des gènes chondrogéniques mais inhiber la prolifération de CSMs [Wang Y *et al.*, 2005]. Si la pression en oxygène baisse jusqu'à 2%, la chondrogenèse de CSMs pourrait être favorisée au détriment de la prolifération cellulaire [Grayson WL *et al.*, 2006].

L'acide ascorbique (vitamine C) est connu pour induire des modifications du phénotype des chondrocytes en culture. Il augmente la prolifération des cellules, *in vitro*, et assure la maintien des tissus connectifs car il joue un rôle critique dans l'assemblage de la MEC [Meaney Murray M *et al.*, 2003 ; Malpeli M *et al.*, 2004 ].

L'acide ascorbique favorise également la prolifération et la chondrogénèse des CSMs [Lin TM *et al.*, 2005]. De plus, l'acide ascorbique en présence d'IGF induit une augmentation significative de la transcription du collagène de type I dans les CSMs issue de la moelle osseuse [Moreau JE *et al.*, 2005].

Le dexaméthasone, un anti-inflammatoire stéroïdien, retarde la synthèse de collagène de type X dont l'expression est inversement proportionnelle à sa concentration [Quarto *et al.*, 1992]. Par ailleurs, les chondrocytes expriment à nouveau Sox9, et retrouvent leur capacité chondrogénique en présence de dexaméthasone et de TGF- $\beta$ 1 dans le milieu de culture [Malpeli M *et al.*, 2004]. Le dexaméthasone joue également un rôle important dans la prolifération des cellules souches du système squelettique dont elle induit, *in vitro*, une différenciation en chondrocytes, ostéoblastes ou adipocytes [Grigoriadis AE *et al.*, 1988]. De plus, il agit en synergie avec le TGF- $\beta$  pour stimuler l'expression du gène de collagène de type II, d'agrécane et de Sox9 ainsi que la synthèse de la MEC par les CSMs [Chen CW *et al.*, 2005].

#### **III.4. Facteurs biomécaniques**

Au niveau de l'articulation, le cartilage articulaire est soumis en permanence à de nombreuses contraintes mécaniques. Ces dernières influencent différents phénomènes physiques, électriques, et biochimiques au niveau cellulaire, comme la déformation, l'écoulement, la pression hydrostatique, les potentiels de flux, la pression osmotique, les gradients de concentration en éléments nutritifs et en ions, et les changements de pH [Gray ML *et al.*, 1988, Guilak F *et al.*, 1995]. De nombreuses études ont montré que les forces mécaniques stimulaient la synthèse de la MEC, maintenaient la structure et l'intégrité et amélioraient les propriétés mécaniques du tissu cartilagineux [Lee CR *et al.*, 2005].

Les études concernant la relation entre les propriétés mécaniques des cellules et leur microenvironnement ainsi que celles concernant les mécanismes de la mécanotransduction sont donc cruciales pour déterminer les contraintes mécaniques à appliquer en ingénierie tissulaire du cartilage.

Il a été démontré que différents types ou régimes (force, fréquence et durée *etc.*) de contraintes mécaniques pouvaient induire différentes réponses cellulaires. De même, des contraintes identiques appliquées sur des cellules différentes (diverses origines ou modèles de culture) n'ont pas les mêmes effets. Ci-dessous, sera présenté un résumé succinct d'études concernant certains types de stimuli mécaniques appliqués à différents modèles d'étude tels que les explants, les cellules cultivées en monocouche ou dans des biomatériaux tridimensionnels.

#### ***III.4.1. Modèles d'étude***

Les explants peuvent fournir des informations exactes et précises sur la régulation tissulaire du cartilage naturel par des contraintes mécaniques. En effet, les explants représentent le seul type de modèle d'étude sur le cartilage natif *in vitro*. Les résultats obtenus, en utilisant ce modèle, représentent les comportements des chondrocytes se trouvant dans leur MEC native. Ainsi, ce modèle est utile pour comprendre l'homéostasie du cartilage. Cependant, il est difficile de caractériser les réponses cellulaires aux stimuli mécaniques, puisqu'il existe également dans un cartilage intact d'autres facteurs affectant le métabolisme du chondrocyte.

Les cellules cultivées en monocouche permettent d'étudier les effets directs des stimuli mécaniques. Leur microenvironnement peut être entièrement contrôlé. Pourtant, leur utilisation est limitée par un inconvénient : les chondrocytes, cultivés en monocouche, se différencient. De plus, il n'est pas possible d'appliquer des contraintes mécaniques comme la compression dans ces conditions.

Les cellules cultivées dans des biomatériaux tridimensionnels représentent le modèle le plus utilisé pour les études biomécaniques en ingénierie tissulaire du cartilage. En effet, ce modèle permet d'étudier simultanément les comportements mécaniques des cellules et les propriétés biomécaniques des biomatériaux dans lesquels les cellules sont encapsulées. La majorité des études concernent l'application des stimuli mécaniques sur des constructions cellulaires (composées de cellules encapsulées dans des biomatériaux) à base d'agarose, d'alginate ou de PGA.

### **III.4.2. Différents types de contraintes mécaniques**

Les études dans le domaine de l'ingénierie tissulaire du cartilage concernent typiquement 3 types de contraintes mécaniques : la compression, le cisaillement induit par l'écoulement et la pression hydrostatique.

#### **III.4.2.1 Compression**

La compression est la contrainte la plus importante au niveau de l'articulation mais aussi la plus étudiée *in vitro*. Il a été montré que la compression dynamique, de niveaux modérés (0,5-1,0 MPa) et de fréquences physiologiques (0,01-1,0 Hertz), appliquée sur des explants de cartilage peut moduler la viabilité, l'expression des gènes, et aussi la synthèse matricielle des chondrocytes [Steinmeyer J *et al.*, 1997; Wong M *et al.*, 1999].

D'après ces études, de nombreuses expériences, d'une durée allant de quelques heures à quelques semaines, ont été réalisées en appliquant des conditions variées de compression dynamique pour stimuler la prolifération, la différenciation ainsi que l'activité de la biosynthèse dans différentes constructions cellulaires afin de développer un tissu cartilagineux fonctionnel [Xie J *et al.*, 2007].

La compression dynamique présente des avantages sur la synthèse de la MEC des chondrocytes ensemencés dans des biomatériaux variés. La compression dynamique peut également induire la redifférenciation des chondrocytes. De plus, elle peut aussi favoriser la différenciation chondrogénique des CSMs. Bien que pour la majeure partie des études, une compression dynamique physiologique ait des effets positifs sur la synthèse de la MEC, il a été montré que dans certains cas, ces effets pourraient être négatifs. En effet, certaines études ont montrée une dégradation de la matrice, une inhibition de la synthèse de protéoglycannes, voire une perte des propriétés mécaniques [Hunter CJ *et al.*, 2004 ; Kisiday JD *et al.*, 2004]. Ces résultats sont peut-être dus au mode opératoire, à la qualité du tissu prélevé (sain ou pathologique?).

Alors que la compression dynamique induit une augmentation de la synthèse de la MEC, la compression statique a un effet inverse.

Dans le Tableau I-4 sont rassemblés les principaux résultats obtenus sur des échantillons sous mis à différents types de compression.

**Tableau I-4 : Effets de la compression sur la réponse cellulaire en fonction du modèle (liste non exhaustive). GAGs = glycosaminoglycannes**

Biosystème	Type de contrainte	Paramètres de contrainte	Réponses cellulaires	Référence
Explant du cartilage	Compression dynamique	440-940 KPa 0,5 Hz	Protéglycannes ↑ agrécanne ↑	<i>Ching CT et al., 2004</i>
	Compression statique	690 KPa	Protéglycannes ↓ agrécanne ↓	<i>Ching CT et al., 2004</i>
Chondrocytes-Agarose	Compression dynamique	15% strain 1 Hz intermittente	Protéglycannes ↑ GAGs ↑ Prolifération ↑	<i>Lee DA et al., 2000 ; Shelton JC et al., 2003</i>
	Compression dynamique	3% strain 0,01-1 Hz	protéglycannes ↑	<i>Buschmann M D et al., 1999</i>
	Compression dynamique	15% strain 1 Hz intermittente	Protéglycannes ↑ Collagènes ↑	<i>Mauck RL et al., 2003</i>
	Compression dynamique	15% strain 1 Hz intermittente	GAGs ↑ NO ↓	<i>Tina T et al., 2003</i>
	Compression dynamique	5% strain 1 Hz	Protéglycannes ↑	<i>Kisiday JD et al., 2004</i>
	Compression statique	15% strain	Collagène II ↓ Collagène X ↓	<i>Villemure I et al., 2005</i>
	Chondrocytes-Poly (L-lactide-co-ε-caprolactone)	Compression dynamique	10% strain 0,1 Hz intermittente	GAGs ↑ Collagène II ↑
Chondrocytes-Phosphate de calcium	Compression dynamique	5% strain 0,1 Hz	Protéglycannes ↑ Collagènes ↑	<i>Waldman SD et al., 2004</i>
Chondrocytes - gel de Fibrine	Compression dynamique	4% strain 0,1 ou 1 Hz	GAGs ↑ hydroxyproline ↑	<i>Hunter CJ et al., 2004</i>
Chondrocytes dédifférencés-Collagène de type II	Compression dynamique	0,3% strain 0,1 Hz	Protéglycannes ↑	<i>Lee R et al., 2003</i>
Chondrocytes dédifférencés-PEGT/PBT	Compression dynamique	5% strain 1 Hz	GAGs ↑	<i>Demartean O et al., 2003</i>
CSMs-Agarose	Compression dynamique	0-9 KPa 0,15-0,33 Hz	GAGs ↑ Collagène II ↑ Sox9 ↑	<i>Huang CY et al., 2004, 2005</i>
CSMs-Alginate	Compression dynamique	15% strain 1 Hz	col II ↑, Sox9 ↑ agrécanne ↑	<i>Campbell JJ et al., 2006</i>

III.4.2.2. *Pression hydrostatique*

Quand le cartilage est soumis à une charge mécanique, une première résistance à l'écoulement, ainsi que nous le décrirons ci-dessous, peut induire une pression hydrostatique dans le tissu. Bien que l'application de la pression hydrostatique produise un stimulus simple : la pressurisation, les résultats sont contradictoires en ce qui concernent les effets de cette contrainte sur le comportement des chondrocytes.

Une étude récente, appliquant la pression hydrostatique intermittente sur les CSMs cultivées en « pellet », a montré que cette contrainte peut également induire la chondrogénèse des CSMs. De plus, la pression hydrostatique et le TGF- $\beta$ 3 ont un effet synergique sur la chondrogénèse [Miyanishi K *et al.*, 2006].

Dans le Tableau I-5 sont rassemblés les principaux résultats obtenus sur des échantillons soumis à différentes conditions de pression hydrostatique.

**Tableau I-5 : Effets de la pression hydrostatique sur la réponse cellulaire en fonction du modèle** (liste non exhaustive) *GAG = glycosaminoglycannes*

Biosystème	Type de contrainte	Paramètres de contrainte	Réponses cellulaires	Référence
Chondrocytes-agarose	Pression hydrostatique	5 MPa continue	Collagène II ↑ agrécanne ↑ Protéoglycannes ↑	<i>Toyoda T et al., 2003</i>
Explant du cartilage	Pression hydrostatique	5 MPa continue	Protéoglycannes ↓	<i>Hall AC et al., 1991</i>
	Pression hydrostatique	2% strain 1 Hz intermittente	Collagène II ↑ Agrécanne ↑	<i>Adam C et al., 2006</i>
	Pression hydrostatique	0,2 MPa intermittente	Protéoglycannes ↑	<i>Scherer K et al., 2004</i>
Chondrocytes cultivés en monocouche	Pression hydrostatique	1-10 MPa 1 Hz	Protéoglycannes ↑ col II ↑, agrécanne ↑	<i>Ikenoue T et al., 2003</i>
	Pression hydrostatique	5 MPa intermittente	Protéoglycannes ↓(1.5h) ; ↑(20 h)	<i>Parkkinen JJ et al., 1993</i>
Chondrocytes-PGA	Pression hydrostatique	3,44-6,87 MPa intermittente	GAGs ↑ Collagène II ↑	<i>Carver SE et al, 1999</i>
Chondrocytes-collagène	Pression hydrostatique	2,8 MPa 0,015 Hz	Protéoglycannes ↑	<i>Mizuno S et al., 2002</i>
CSMs cultivées en « pellet »	Pression hydrostatique	10 Mpa 1 Hz intermittente	Protéoglycannes ↑ col II ↑, sox-9 ↑ agrécanne ↑	<i>Miyanishi K et al., 2006</i>

### III.4.2.3. Cisaillement

Le cisaillement, issu de l'écoulement dans le cartilage, induit par la compression, est peut-être la base des autres changements cellulaires et biochimiques [Kim YJ *et al.*, 1994]. Hormis l'amélioration du transport de la masse par l'écoulement, les études *in vitro* ont montré également que ce cisaillement peut avoir des effets positifs mais aussi négatifs sur le métabolisme des chondrocytes.

L'effet de ce type de cisaillement sur les constructions cellulaires peut être étudié à l'aide de différents bioréacteurs (cf. chapitre III.5.1). Les constructions cultivées dans un bioréacteur de type «spinner flask», sont suspendues dans le milieu, soumises à une agitation rotative qui provoque un écoulement turbulent. Cet écoulement turbulent induit la formation d'une capsule fibreuse externe ayant des propriétés mécaniques inférieures à la surface des constructions de chondrocytes-PGA [Vunjak-Novakovic G *et al.*, 1999]. En revanche, le bioréacteur à rotation produit des cisaillements laminaires d'approximativement de 0,08 Pa, le long de la surface de la construction cellulaire. Il peut améliorer les propriétés mécaniques et biochimiques des constructions de chondrocytes-PGA [Raimondi MT *et al.*, 2002]. L'étude réalisée dans un bioréacteur à rotation a montré qu'un écoulement constant peut supprimer l'accumulation des GAGs et favoriser le dépôt de collagènes. Par contre, un écoulement dynamique induit une accumulation très élevée des collagènes et des GAGs [Saini S *et al.*, 2003].

Ce type de cisaillement a aussi des effets sur les CSMs. Grayson WL *et al.* ont constaté que la perfusion (0,1 mL/min) peut accroître la prolifération des CSMs ainsi que la sécrétion de fibronectine et d'HSP47 (Heat Shock Protein 47) après 20 jours de culture dans un bioréacteur à perfusion. De plus, la perfusion (1,5 mL/min) peut induire la différenciation ostéogénique en raison de l'augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline et du dépôt de calcium [Grayson WL *et al.*, 2006]. Cependant, l'effet du cisaillement sur la chondrogenèse des CSMs reste à exploiter.

#### III.4.2.4. Contraintes mécaniques complexes

En fait, la charge mécanique perçue par le cartilage articulaire, *in vivo*, ne se résume pas à un seul type de contrainte simple tel que la compression, la pression hydrostatique, ou le cisaillement. Il est donc nécessaire d'étudier la réponse cellulaire à des contraintes mécaniques complexes se trouvant au niveau de l'articulation. Wimmer MA *et al* ont ainsi développé un bioréacteur qui tient compte simultanément de la compression, du cisaillement ainsi que du transport du liquide articulaire dans les constructions cellulaires [Wimmer MA *et al.*, 2004]. Ces auteurs ont montré que les contraintes complexes, obtenues par ce bioréacteur peuvent augmenter l'expression de l'ARNm codant pour le hyaluronate ainsi que de la libération du hyaluronate dans le milieu de culture [Grad S *et al.*, 2005].

Etant donnée la dispersion des résultats de ces études, la synthèse et la détermination des paramètres optimaux s'avèrent difficile. Malgré tout, on peut en conclure que les stimuli mécaniques jouent un rôle très important dans l'ingénierie tissulaire du cartilage. Les effets cellulaires de la contrainte mécanique sont liés à sa durée, à sa fréquence et à son régime. Généralement, il semble qu'une contrainte cyclique soit plus avantageuse pour la synthèse de MEC qu'une contrainte constante. De plus, l'existence d'une interaction entre les stimuli mécaniques et d'autres facteurs tels que les facteurs de croissance, les biomatériaux *etc.* doit être considérée pour contrôler le développement d'un néo-cartilage.

### III.5. Système de culture - Bioréacteurs

Dans le corps humain, les cellules sont toujours stimulées par des signaux mécaniques, électriques et/ou chimiques qui influencent leur comportement. Si ces signaux sont insatisfaisants ou inexistant, le développement du tissu devient désorganisé [Wendt D *et al.*, 2005]. En fait, les tissus biologiques adaptent leur structure et leur composition aux demandes spécifiques et fonctionnelles environnantes [Portner R *et al.*, 2005]. La mise en culture de cellules ou seulement leur mise en

contact avec des matériaux dans un milieu de culture approprié n'est pas suffisante pour obtenir un tissu fonctionnel. Par conséquent, l'utilisation d'un bioréacteur est cruciale.

Le concept des bioréacteurs n'est ni nouveau ni restreint à l'ingénierie tissulaire. Les bioréacteurs sont surtout utilisés dans les industries des micro-organismes, alimentaires, pharmaceutiques *etc.* Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, le bioréacteur se définit comme un appareil qui peut restituer les conditions physiologiques afin de maintenir et favoriser la régénération tissulaire. Les bioréacteurs sont employés pour accroître le nombre de cellules et ainsi former les tissus fonctionnels destinés à la transplantation.

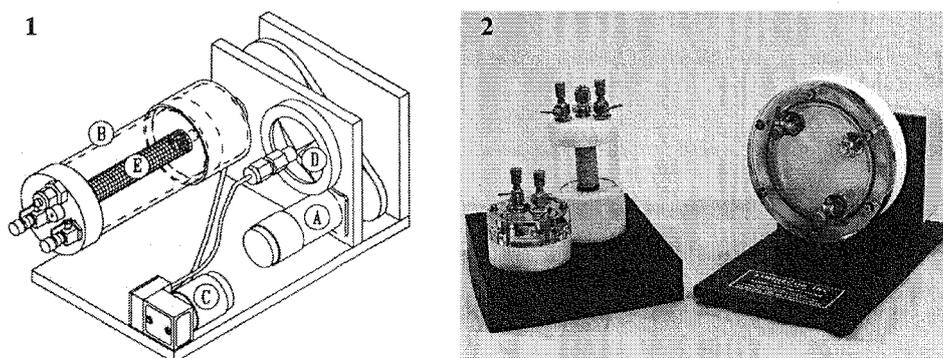
### ***III.5.1. Différents systèmes de bioréacteurs***

Les bioréacteurs courants peuvent être divisés en deux classes principales, le bioréacteur à rotation et le bioréacteur à perfusion.

#### ***III.5.1.1. Bioréacteur à rotation***

Le "rotating-wall vessel"(RWV) est un bioréacteur à rotation très utilisé en ingénierie tissulaire du cartilage. Ce type de bioréacteur se compose de deux cylindres concentriques (Figure I-23). Le cylindre, situé à l'intérieur, reste immobile et permet un échange gazeux avec l'intérieur du bioréacteur tandis que le cylindre extérieur tourne sur lui-même. Entre les deux cylindres se trouvent les constructions cellulaires et le milieu de culture arrivant de façon continue dans ce compartiment. Les constructions cellulaires sont maintenues en permanence en suspension dans le milieu, car la force centrifuge contrebalance la force gravitationnelle en ajustant la vitesse de rotation du cylindre extérieur [Temenoff JS *et al.*, 2000].

La vitesse de rotation peut être ajustée pour produire un flux laminaire non perturbé. Ce système protège les tissus fragiles parce qu'il diminue les efforts de cisaillement et il évite le contact entre les cellules et les parois du bioréacteur [Begley CM *et al.*, 2000]. En outre, le bioréacteur à rotation favorise la croissance uniforme des tissus ainsi qu'un transport efficace de masse dans les constructions [Portner R *et al.*, 2005].



**Figure I-23 : Présentation schématique du bioréacteur à rotation**

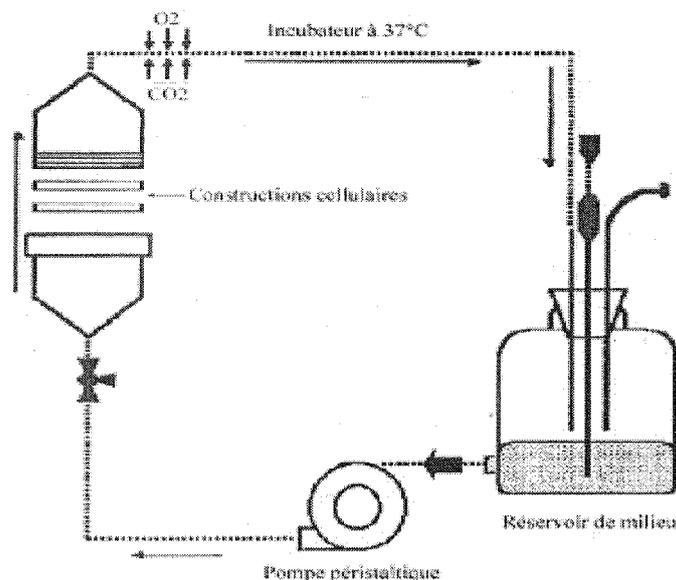
(1) Structure principale du bioréacteur à rotation; (2) Photo de l'appareil "rotating-wall vessel". Un moteur (A) entraîne une ceinture qui fait tourner le compartiment cylindrique de culture (B) le long de son axe horizontal. Un compresseur (C) diffuse l'air dans le compartiment de culture par un filtre de 0,22-µm (D). [Hammond TG et al., 2001]

Un certain nombre d'études a prouvé que la formation du néo-cartilage et l'intégrité mécanique des constructions peuvent être augmentées pendant la culture dans le RWV en comparaison avec les cultures en condition statique ou dans un environnement turbulent d'écoulement, tel qu'un bioréacteur de type «stirred-flask» où l'oxygène et les nutriments dans le milieu de culture sont mélangés à l'aide d'une hélice [Sikavitsas VI et al., 2002]. Une étude récente montre que la production de GAGs par des chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate est plus élevée après culture dans le RWV que dans des conditions statiques [Akmal M et al., 2006]. En culture dans le RWV, le collagène de type II est produit par les chondrocytes dans les régions périphériques mais aussi les régions centrales des constructions cellulaires, de plus, sa quantité est augmentée. En outre, une couche de cellules, contenant le collagène de type I, s'est développée autour des constructions maintenues en condition statique mais n'est pas présente dans les constructions cultivées dans le RWV [Akmal M et al., 2006].

### III.5.1.2. Bioréacteur à perfusion

Un bioréacteur à perfusion est formé d'une chambre immobile de culture qui tient compte de la culture des tissus complexes. Dans le cas d'un bioréacteur à perfusion, le milieu de culture doit être continuellement remplacé pour fournir le gaz et

les aliments aux cellules et pour enlever des déchets métaboliques [Carver SE et al., 1999 ; Martin I *et al.*, 2000]. Ainsi, le système de perfusion se compose habituellement d'oxygénateur, de pompe péristaltique et de réservoir de milieu (Figure I-24).



**Figure I-24 : Présentation schématique de bioréacteur à perfusion**  
[Carver SE *et al.*, 1999]

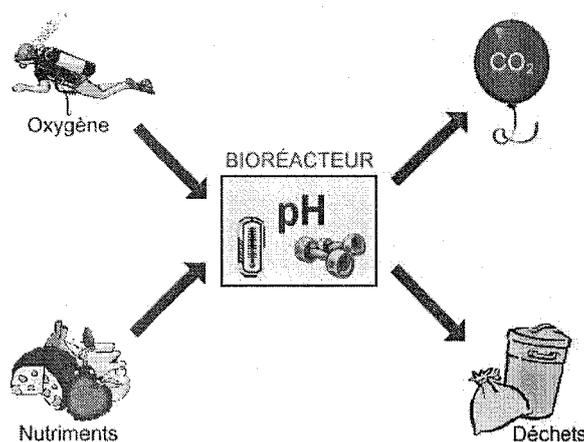
Tout ou une partie du milieu de culture peut être recyclé avec ou sans un approvisionnement en milieu frais. De plus, le milieu de perfusion peut traverser la chambre de culture, et par la suite les constructions cellulaires maintenues statiques. Des contraintes mécaniques telles que le cisaillement et les forces hydrostatiques peuvent alors facilement être appliquées sur les constructions cultivées [Sodian R *et al.*, 2002].

Il a été montré que les constructions de chondrocytes-PGA mises sous perfusion pendant la culture, produisaient une quantité plus importante d'ADN que celles cultivées en condition statique. La synthèse de la MEC a été également modulée par la perfusion. Neuf jours de perfusion continue ont permis d'améliorer la synthèse et le dépôt de GAGs approximativement de 40% par comparaison aux cultures en conditions statiques [Davisson T *et al.*, 2002 ; Raimondi MT *et al.*, 2006]. En outre, le pH du milieu dans un bioréacteur à perfusion reste constant (7.4-6.96 pendant plus de 2 semaines), contrairement, à ce qui peut être observé en conditions statiques [Pazzano D *et al.*, 2000]

### **III.5.2. Avantages des bioréacteurs**

#### *III.5.2.1. Contrôle des paramètres physico-chimiques*

Les bioréacteurs permettent de créer un environnement physico-chimique qui se rapproche des conditions intracorporelles, ce qui favorise la régénération cellulaire [Portner R *et al.*, 2005]. Ainsi, les cellules sont continuellement approvisionnées en oxygène et en nutriments et débarrassées du gaz carbonique et des déchets. Les paramètres de culture, tels que le pH, la température et les contraintes mécaniques, sont constamment contrôlés et régulés. De plus, ces conditions peuvent être modifiées pour permettre l'étude de leurs influences sur la croissance et sur la qualité des différents types de cellules. Les technologies orientées vers les bioréacteurs proposent donc des avantages exceptionnels pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. Le principe de fonctionnement d'un bioréacteur est présenté sur la figure I-25.



**Figure I-25 : Principe du fonctionnement d'un bioréacteur**

#### *III.5.2.2. Répartition des cellules dans le biomatériau*

Selon le type de biomatériau et plus précisément la porosité et l'interconnexion entre les pores, la qualité de la répartition des cellules dans le biomatériau dépendra du biomatériau utilisé. En effet, pour des biomatériaux avec une porosité élevée et une haute interconnectivité de pores, la répartition uniforme des cellules peut être obtenue en utilisant des bioréacteurs de type «stirred-flask» [Vunjak-Novakovic G *et al.*, 1996]. En revanche, pour des biomatériaux épais ou moins poreux et moins interconnectifs, le moyen le plus efficace est la perfusion d'une suspension de cellules directement par les

pores d'un biomatériau afin d'augmenter le transport de convection des cellules dans tout ce dernier [Wendt D *et al.*, 2003 et 2005]. Il a été montré que l'ensemencement des chondrocytes ou des CSMS dans les biomatériaux en céramiques ou faits de biopolymères par une perfusion directe est plus efficace et plus uniforme que par un chargement statique ou un bioréacteur de type «stirred-flask» [Wendt D *et al.*, 2003, Braccini A *et al.* 2005].

### *III.5.2.3. Amélioration du transport de masse dans le biomatériau*

La maîtrise du transfert des nutriments et des déchets métaboliques est souvent considérée comme un des plus grands défis en ingénierie tissulaire. La structure et la composition des constructions cellulaires cultivées en condition statique sont souvent peu homogènes. En effet, ces constructions cellulaires contiennent une région centrale nécrotique et hypoxique et des couches denses de cellules vivantes situées à la périphérie des constructions. Dans la culture réalisée en condition statique, la diffusion du milieu de culture ne permet d'atteindre les cellules que sur une profondeur de 100 à 200  $\mu\text{m}$  [Carver SE *et al.* 1999].

L'avantage des bioréacteurs est de proposer des écoulements de milieu de culture dynamiques qui permettent une pénétration jusqu'au centre des constructions afin d'y apporter un approvisionnement en oxygène et en nutriments, et en même temps d'y reprendre des déchets métaboliques. Les systèmes de bioréacteurs permettent donc d'améliorer l'apport de nutriments ainsi que le métabolisme de toutes les cellules dans un biomatériau.

Après plusieurs semaines de culture dans un bioréacteur à rotation, des auteurs ont réussi à fabriquer une construction cartilagineuse dont les propriétés biochimiques et biomécaniques sont plus intéressantes que celles d'une construction cultivée en condition statique et plus proches du cartilage natif [Marsano A *et al.* 2006 ; Wendt D *et al.*, 2006].

*III.5.2.4. Application de contraintes mécaniques contrôlées*

Comme il l'a été décrit dans le paragraphe III.4.2., les stimuli mécaniques peuvent moduler le métabolisme des chondrocytes ainsi que la chondrogenèse de CSMs. C'est pourquoi, des bioréacteurs permettent l'application de stimuli mécaniques sur les constructions cellulaires dans un souci d'augmenter la différenciation de cellules et/ou le développement de tissu. Différents types de bioréacteurs peuvent fournir des contraintes mécaniques variées telles que la compression, le cisaillement, l'étirement, pour modifier la régénération du cartilage. Dans ce cas, la magnitude, la fréquence ainsi que le mode d'application constant ou intermittent de ces contraintes sont donc bien contrôlés.

En effet, il a été décrit que l'application de compression dynamique ou de cisaillement sur des chondrocytes encapsulés dans un biomatériau tridimensionnel stimule la synthèse de GAGs et augmente les propriétés mécaniques des tissus obtenus [Mauck RL *et al.*, 2000 ; Waldman SD *et al.*, 2003]. La compression dynamique peut également amener les CSMs à produire des collagènes de type II et exprimer un phénotype chondrogénique [Campbell JJ *et al.*, 2006].

L'application de forces mécaniques spécifiques fournies par les bioréacteurs sur les constructions cellulaires peut non seulement améliorer la synthèse cellulaire mais diriger également la différenciation des cellules multipotentes vers des lignées spécifiques.

## **CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES**

## **I. Culture cellulaire**

Les études sont réalisées sur deux types de cellules : les chondrocytes et les CSMs. Ces cellules, isolées à partir de prélèvements humains, sont cultivées en monocouche et multipliées au cours des passages. Pour certaines expériences, ces cellules sont cultivées, à l'issue de l'expansion en monocouche, dans des biomatériaux (hydrogel d'alginate/HA).

### ***I.1. Isolation des cellules à partir des prélèvements***

Les chondrocytes sont isolés des têtes fémorales humaines, prélevées lors d'un geste chirurgical réalisé chez des patients (âgés de 50 à 85 ans) ayant subi une pose de prothèse totale de hanche. Les CSMs humaines sont isolées à partir de prélèvements de moelle osseuse humaine obtenus lors de cette opération.

Ces prélèvements sont réalisés conformément aux procédures approuvées par les textes sur l'expérimentation humaine et les comités éthiques des hôpitaux.

Répartition des échantillons en fonction du type d'étude :

- Phénotype des cellules cultivées en monocouches : 12 patients ;
- Influence de la stimulation mécanique d'une contrainte d'entrechoquement : 6 patients ;
- Influence de la stimulation mécanique d'une compression dynamique intermittente : 2 patients ;
- Influence de la stimulation biochimique des facteurs de croissance : 3 patients.

#### ***I.1.1. Réactifs principaux***

- Dulbecco's Modified Eagle Medium Nut Mix F-12 (DMEM/F12) : réf. 21331, Invitrogen, France.
- DMEM-Low Glucose (1000mg/L) (DMEM-LG) (réf. 31885, Invitrogen, France)
- Antibiotiques :
  - ✧ 100 U/mL de pénicilline (réf. 15070, Invitrogen, France)
  - ✧ 100 µg/mL de streptomycine (réf. 15710, Invitrogen, France)
  - ✧ 1 µg/mL d'amphotéricine B (réf. 15290, Invitrogen, France).

- Solution de chlorure de sodium (NaCl) stérile à 0,9% (réf. Braun, France).
- Pronase (réf. P5147, Sigma Aldrich, France) reconstituée à 2 mg/mL dans du chlorure de sodium (NaCl) 0,9% additionné d'antibiotiques.
- Collagénase B (ref. 1088831, Roche Applied Science, USA) reconstituée à 2 mg/mL dans du DMEM/F12 additionné d'antibiotiques.
- Sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté (réf. F9665, Sigma, France)
- Glutamine (réf. 25030, Invitrogen, France) à 2mM
- Solution Leucoplate (réf. 3101.002, Sobioda, France) : pour lyser les globules rouges dans la moelle osseuse.
- Milieux de culture :

**Tableau II-1 : Milieux de culture pour l'expansion en monocouche**

	Milieu I (pour chondrocytes)	Milieu II (pour CSMs)
DMEM/F-12	●	
DMEM-LG		●
SVF décomplémenté à 10%	●	●
Glutamine à 2 mM	●	●
Antibiotiques	●	●

### *1.1.2. Méthodologie*

#### *1.1.2.1. Isolation des chondrocytes humains de la tête fémorale*

Le cartilage hyalin des têtes fémorales est découpé en petits morceaux d'environ 1mm<sup>3</sup> et rincé trois fois dans du NaCl à 0,9% additionné d'antibiotiques. Il est ensuite digéré pendant 2 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> dans la solution de pronase à 2 mg/mL. Les morceaux de cartilage sont rincés à nouveau avec du NaCl à 0,9% puis digérés pendant une nuit à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> dans la solution de collagénase B. Après numération de la suspension cellulaire obtenue, une centrifugation à 300g pendant 5 minutes est réalisée afin de récupérer le culot cellulaire qui sera suspendu dans le milieu I. Les chondrocytes sont ainsi isolés du cartilage et prêts pour la mise en culture.

*I.1.2.2. Isolation des CSMs humaines de la moelle osseuse*

La moelle osseuse est placée dans un tube de 50 mL (réf. 227261, Dutscher, France) contenant 1 mL de solution héparinée supplémentée en antibiotiques. La moelle osseuse est reprise dans 25 mL de milieu II puis centrifugée à 300g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est repris dans 20 mL de milieu II. Le comptage cellulaire est réalisé à partir de 10  $\mu$ L de la suspension mélangée avec 190  $\mu$ L de solution Leucoplate qui lyse les globules rouges. Après 3 minutes d'incubation, les cellules sont comptées au moyen d'une cellule de Thoma (réf. A4500T, Bioblock, France) par observation microscopique.

***I.2. Culture en monocouche, passage et congélation***

*I.2.1. Réactifs*

- Tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) (réf. 14190, Invitrogen, France) sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ .
- Solution de digestion : solution de trypsine-EDTA à 0,5% (réf. 25300, Sigma, France).
- Solution de congélation : DMSO (diméthyl sulfoxyde, réf. D5879, Sigma Aldrich, France) dilué à 10% (v/v) dans du SVF.

*I.2.2. Méthodologie*

*I.2.2.1. Mise en culture en monocouche*

Les chondrocytes :  $10^6$  chondrocytes obtenus lors de l'étape décrite dans le paragraphe I.1.1.2 sont dilués dans 10 mL de milieu I et cultivés dans une boîte de culture de 75  $\text{cm}^2$  (soit  $1,3 \cdot 10^4$  cellules par  $\text{cm}^2$ ) (réf. 353136, Dutscher, France). Les chondrocytes sont incubés en atmosphère humide à 37°C avec 5%  $\text{CO}_2$ . Le milieu est ensuite changé 2 fois par semaine jusqu'à l'obtention d'un tapis cellulaire à sub-confluence (90%). Ceci est le passage 0 (P0).

Les CSMs :  $3,75 \cdot 10^6$  cellules issues de la moelle osseuse obtenues lors de l'étape décrite dans le paragraphe I.1.2.2 sont diluées dans 10 mL milieu II puis mises dans une boîte de culture de 75  $\text{cm}^2$  (soit  $5 \cdot 10^4$  cellules par  $\text{cm}^2$ ). Les cellules sont incubées en atmosphère humide à 37°C avec 5%  $\text{CO}_2$ . Après 48 h de culture, il faut

vérifier la présence de cellules adhérentes et changer le milieu de culture pour enlever les débris cellulaires en suspension dans le milieu. Le milieu sera ensuite changé 2 fois par semaine jusqu'à l'obtention d'un tapis cellulaire à sub-confluence (90%). Ceci est le passage 0 (P0).

#### *1.2.2.2. Passage*

Lorsque les cellules de P0 sont arrivées à 90% de confluence, elles sont prêtes pour faire un passage. D'abord, elles sont lavées 2 fois avec du tampon PBS. Puis 5 mL de trypsine-EDTA à 0,5% sont ajoutés dans chaque boîte de culture pour décoller les cellules. Les boîtes de culture sont ensuite incubées pendant 5 minutes à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub>. Afin d'inhiber l'action de la trypsine, 5 mL de milieu de culture contenant du SVF (Milieu I ou II) sont ajoutés dans chaque boîte de culture. Les cellules en suspension sont alors récupérées dans un tube de 50 mL afin d'être centrifugées (300g, 5 minutes). Enfin, les cellules sontensemencées au premier passage (P1) avec une concentration de 10<sup>6</sup> (pour les chondrocytes) et 0,5.10<sup>6</sup> (pour les CSMs) par une boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup>.

Les cellules peuvent continuer à se multiplier *via* un certain nombre de passages selon leur utilisation. Ainsi, pour la caractérisation du phénotype et du profil d'expression des gènes, les chondrocytes et les CSMs sont multipliés en monocouche jusqu'au passage 5. Par contre, pour réaliser les stimulations biochimiques ou mécaniques, les chondrocytes et les CSMs sont ensuiteensemencés respectivement dans les biomatériaux à P2 et P4.

#### *1.2.2.3. Congélation des cellules*

Le culot cellulaire obtenu après la digestion est suspendu à 10<sup>6</sup>/mL dans du milieu de congélation, puis réparti dans des cryotubes (réf. C23954, Fisher, France). Après une incubation à 4°C (pendant 1h), à -20°C (pendant 30min) et ensuite à -80°C (pendant une nuit), les cellules sont définitivement conservées dans l'azote liquide.

Pour la décongélation, les cellules placées dans les cryotubes sont plongées dans un bain-marie à 37°C jusqu'à la fonte totale du contenu du cryotube. Les cellules sont ensuite lavées avec du milieu I ou II pour éliminer le DMSO. Enfin, les cellules sont

ensemencées dans des boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> et cultivées jusqu'à sub-confluence.

### ***1.3. Ensemencement des cellules dans des biomatériaux tridimensionnels***

Le passage des cellules (chondrocytes en P2 et CSMs en P4) dans des hydrogels d'alginate/HA permet d'étudier leurs réponses lors de stimulations biochimiques et mécaniques.

#### ***1.3.1. Réactifs***

- Solution d'alginate/HA (2%) : la poudre d'alginate, de viscosité moyenne, issue de l'algue *Macrocystis Pyrifera* (A-2033, Sigma-Aldrich, France), et celle d'HA (réf. 25177, Accros, France) sont mélangées dans des proportions de 4:1 et stérilisées par autoclavage (121°C, 20 minutes) avant d'être solubilisées dans du NaCl 0,9%. La concentration finale d'alginate est de 16 g/L, celle d'HA est de 4 g/L.
- Solution de chlorure de calcium stérile (CaCl<sub>2</sub>) (réf. C4901, Sigma-Aldrich, France) est à 102 mM dans l'eau distillée.
- DMEM–High Glucose (4500mg/L) (DMEM-HG) (réf. 411965 Invitrogen, France)
- Solution Hépès à 5 mM (pour maintenir le pH du milieu à 7.4)
- Solution de CaCl<sub>2</sub> stérile à 1 mM (pour maintenir l'intégrité structurale des billes ou des cylindres)
- Pyruvate de Sodium (réf. P-5282, Sigma, France) à 100 µg/mL
- Proline (réf. P-5607, Sigma, France) à 40 µg/mL
- L-acide ascorbique 2P (réf. A-8960, Sigma, France) à 50 µg/mL
- Dexaméthasone (réf. D2915, Sigma, France) à 100 nM
- Milieux de culture pour des constructions cellulaires à base d'alginate/HA :

Tableau II-2 : Milieux de culture utilisés avec les biomatériaux d'alginate/HA

	Billes		Cylindres	
	Milieu III (chondrocytes)	Milieu IV (CSMs)	Milieu V (chondrocytes)	Milieu VI (CSMs)
DMEM/F-12	●		●	
DMEM-HG		●		●
SVF décomplémenté à 10%	●	●	●	●
5 mM Hépès	●	●		
1 mM CaCl <sub>2</sub>	●	●	●	●
Glutamine à 2 mM	●	●	●	●
Antibiotiques	●	●	●	●
Pyruvate de Sodium à 100 µg/mL		●		●
Proline à 40 µg/mL		●		●
L-acide ascorbique 2P à 50 µg/mL		●		●
Dexaméthasone à 100 nM		●		●

### I.3.2. Méthodologie

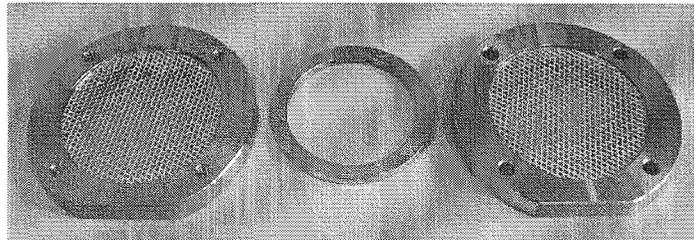
#### I.3.2.1. Fabrication des billes d'alginate/HA

Pour ensemercer les cellules dans l'hydrogel d'alginate/HA, le culot cellulaire (chondrocytes ou CSMs) est mis en suspension dans la solution d'Alginate/HA (2%) à raison de  $3 \cdot 10^6$  cellules/mL. Cette solution est ensuite versée goutte par goutte dans un tube de 50 mL contenant une solution de CaCl<sub>2</sub> à 102 mM. Cette opération est réalisée à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille (réf. G1811/2, Terumo, Belgique). Au contact du CaCl<sub>2</sub>, l'alginate/HA polymérise et forme une bille d'environ 2 mm de diamètre. Les billes sont alors laissées pendant 15 minutes dans la solution de CaCl<sub>2</sub> à 102 mM. Avant leur mise en culture définitive, les billes sont lavées 3 fois avec une solution de NaCl à 0,9% pour éliminer le CaCl<sub>2</sub> résiduel, puis une fois dans le milieu III (pour les chondrocytes) ou le milieu IV (pour les CSMs).

Des billes sans cellules, fabriquées avec la même solution d'alginate/HA, servent de blanc réactif et sont appelées «billes blanches».

*I.3.2.2. Fabrication des cylindres d'alginate/HA*

Le principe de polymérisation de l'hydrogel d'alginate/HA est le même lors de la fabrication des billes ou, comme ici, pour la fabrication des cylindres. Seulement, au lieu de déposer directement la solution d'alginate/HA, avec ou sans cellules, dans la solution de  $\text{CaCl}_2$ , cette solution est injectée dans un moule inox développé par l'Institut de Biomécanique de Berne [Wong M *et al.*, 2001] (Figure II-1) à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille (réf. G2111/2, Terumo, Belgique). Ce moule est ensuite immergé dans la solution de  $\text{CaCl}_2$  à 102 mM, pendant 15 minutes, pour la polymérisation de l'alginate/HA. Ensuite, la construction cellulaire d'alginate/HA est libérée du moule, afin d'être lavée 3 fois dans une solution de NaCl à 0,9% pour éliminer le  $\text{CaCl}_2$  résiduel, puis une fois dans le milieu V ou le milieu VI respectivement. Puis, des poinçons stériles (diamètre intérieur 5 mm) (réf. 505, CSP, France) sont utilisés pour créer des petits cylindres d'alginate/HA afin de les mettre en culture dans des plaques 6 puits (réf. C22416, Fisher, France).



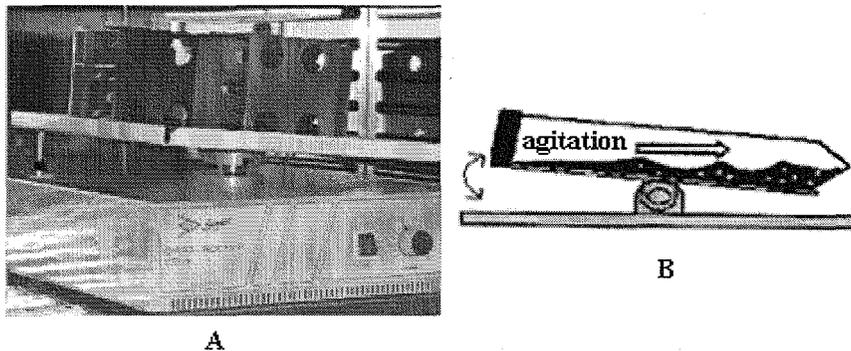
**Figure II-1 : Moule développé par l'Institut de Biomécanique de Berne pour la création de cylindre d'alginate/HA [Wong M *et col.*, 2001]**

## II. Stimulations mécaniques

Différents types de contraintes mécaniques (entrechoquement et compression dynamique intermittente) sont appliqués sur des chondrocytes et CSMs cultivés dans des billes ou des cylindres d'alginate/HA, dans le but d'étudier la réponse cellulaire à des stimulations mécaniques.

### II.1. Entrechoquement

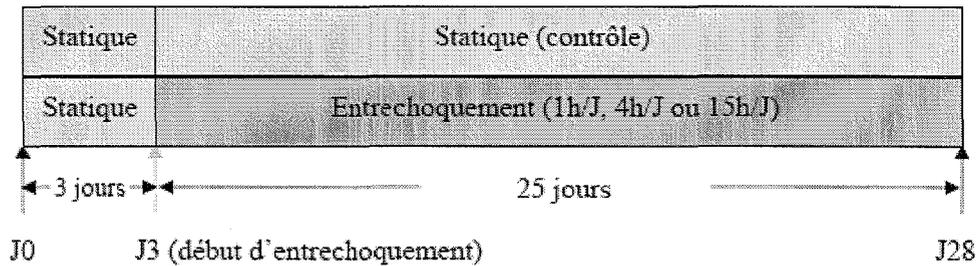
L'entrechoquement des billes d'alginate/HA entre elles est réalisé à l'aide d'un agitateur tridimensionnel (Gyro-Rocker<sup>TM</sup>, STUART, UK) (Figure II-2A), à travers un système de type « lit fluidisé ». L'installation des tubes, sur l'agitateur mis à 37°C, permet de simuler un mouvement tridimensionnel (Figure II-2B). Une vitesse de 30 tours par minute est choisie pour exécuter cet entrechoquement.



**Figure II-2 : Appareil permettant l'entrechoquement**

*A : Agitateur tridimensionnel Gyro-Rocker<sup>TM</sup>, B : Schéma du processus d'agitation*

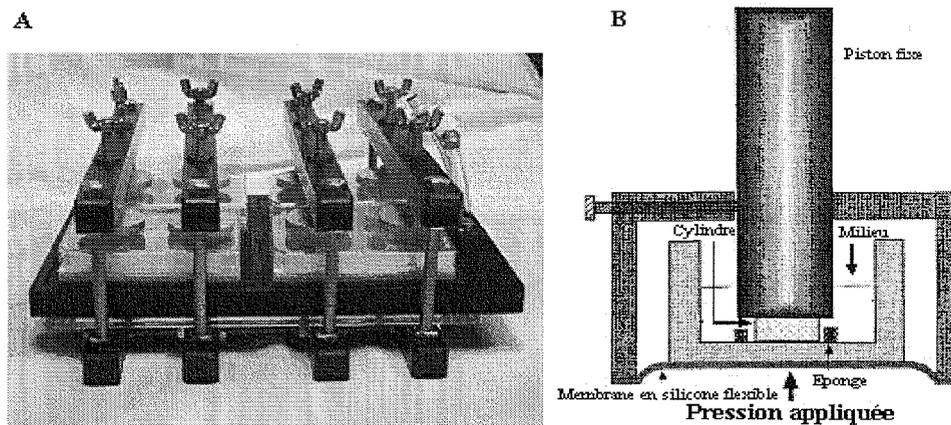
Pour réaliser une contrainte d'entrechoquement, des billes d'alginate/HA ensemencées en chondrocytes ou CSMs, obtenus lors de l'étape décrite dans le paragraphe I.3.2.1, sont réparties 10 par 10 dans des tubes de 15 mL (réf. 188271 Dutscher, France) avec 10 mL de milieu III (pour les chondrocytes) ou milieu IV (pour les CSMs). Ce moment est compté comme le jour 0 (J0). A partir de J3, une partie des billes est soumise à l'entrechoquement 1h par jour (1h/J), une autre partie 4h par jour (4h/J), une autre encore 15h par jour (15h/J) pendant 25 jours. Les billes restantes sont cultivées en condition statique comme contrôle. Le milieu est renouvelé 2 fois par semaine (Figure II-3).



**Figure II-3 : Représentation schématique du protocole d'entrechoquement**

## II.2. Compression dynamique intermittente

La compression dynamique est réalisée à l'aide d'un système de compression Flexcell (Flexcell International, USA) (Figure II-4A). La pression d'air, générée par un compresseur, est appliquée par le dessous du puits, dont le fond est composé d'une membrane flexible en silicone. La déformation de la membrane provoque une élévation du puits et comprime l'échantillon contre le bouchon (Figure II-4B). La forme du signal de pression, son amplitude et sa fréquence sont des paramètres pilotés par le logiciel FX-3000 (Flexcell International, USA).



**Figure II-4 : Appareil de compression et son principe**

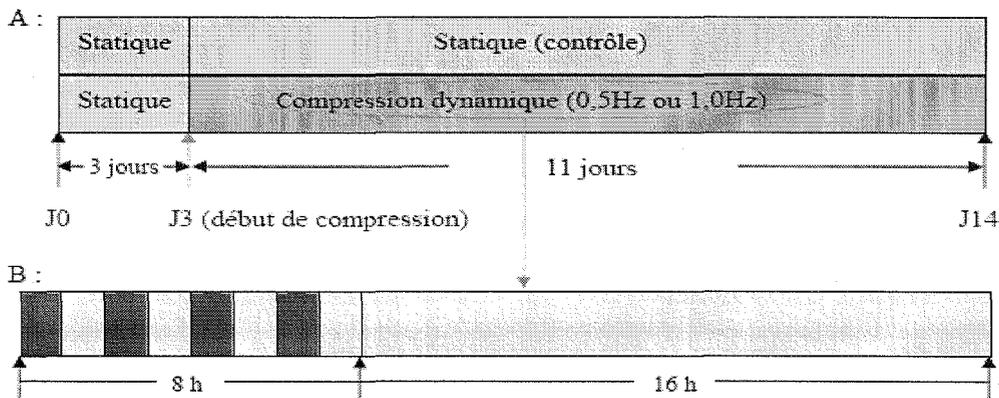
*A : Appareil de compression Flexcell (Flexcell International, USA) développé par la société Flexcell ; B : Présentation schématique du principe du système de compression.*

Pour appliquer une compression dynamique sur les constructions cellulaires, les cylindres d'alginate/HA ensemencés avec des chondrocytes ou des CSMs, obtenus de l'étape décrite dans le paragraphe I.3.2.2 sont cultivés dans des plaques de compression de 6 puits (réf. BF-3000C/10, Dunn labortechnik GmbH, Allemagne). Chaque cylindre est placé au centre du puits dans un anneau de maintien (diamètre = 5

mm) en présence de 3 mL de milieu V (pour les chondrocytes) ou milieu VI (pour les CSMs). Le puits est ensuite refermé avec un bouchon à vis mis en contact avec l'échantillon. Dans un premier temps, les cylindres sont mis en culture statique à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Ce moment est compté comme le jour 0 (J0). A partir de J3, une partie des cylindres est soumise à la compression pendant 11 jours, les autres cylindres restant sous culture statique sont utilisés comme contrôle (Figure II-5). Le milieu est renouvelé 2 fois par semaine.

Les paramètres de la compression dynamique choisis sont les suivants :

- ✧ Force : 200 KPa
- ✧ Fréquences : 0,5 Hertz ou 1,0 Hertz
- ✧ Intermittence : 30min on, 30min off
- ✧ Durée de compression : 8h par jour (4h sous compression, 20 h sous culture statique)



**Figure II-5 : Représentation schématique du protocole de compression dynamique intermittente**

*A : Représentation schématique du protocole de compression ; B : Représentation schématique d'un jour de compression dynamique. Le rectangle en rouge représente le temps sous compression, celui en jaune représente le temps sous culture statique.*

### III. Stimulations biochimiques

Deux types de facteurs de croissance tels que TGF- $\beta$ 1 et BMP-2 sont appliqués sur des chondrocytes et CSMs cultivés dans des billes ou des cylindres d'alginate/HA, dans le but d'étudier la réponse cellulaire à des stimulations biochimiques.

#### III.1. Réactifs

- Milieux de culture pour les stimulations biochimiques :

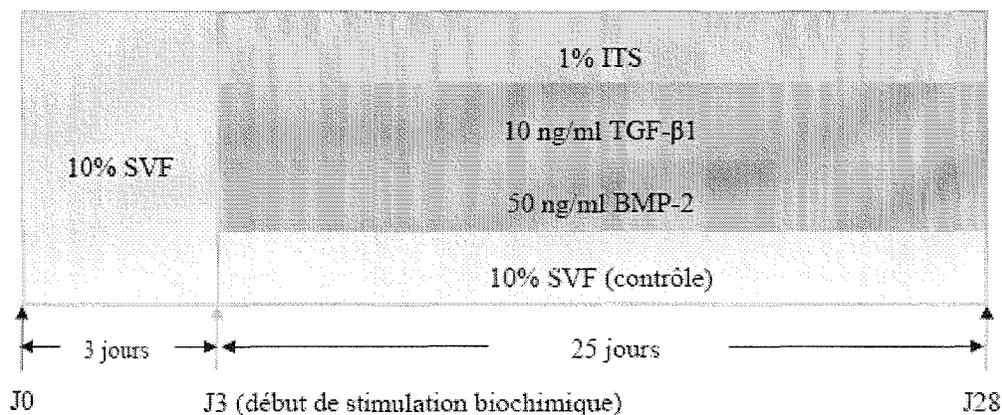
**Tableau II-3 : Milieux de culture pour les stimulations biochimiques des chondrocytes ou des CSMsensemencés dans des billes d'alginate/HA**

	Milieu avec SVF		Milieu avec ITS	
	Milieu VII (chondrocytes)	Milieu VIII (CSMs)	Milieu IX (chondrocytes)	Milieu X (CSMs)
DMEM/F-12	●		●	
DMEM-HG		●		●
SVF décomplémenté à 10%	●	●		
ITS à 1%			●	●
1 mM CaCl <sub>2</sub>	●	●	●	●
Glutamine à 2 mM	●	●	●	●
Antibiotiques	●	●	●	●
Pyruvate de Sodium à 100 $\mu$ g/mL	●	●	●	●
Proline à 40 $\mu$ g/mL	●	●	●	●
L-acide ascorbique 2P à 50 $\mu$ g/mL	●	●	●	●
Dexaméthasone à 100 nM	●	●	●	●

- Milieu contenant du TGF- $\beta$ 1 : TGF- $\beta$ 1 (réf. 240-BM-010, R&D, France) dissout dans le milieu IX (pour les chondrocytes) ou le milieu X (pour les CSMs) à une concentration finale 10 ng/mL
- Milieu contenant de la BMP-2 : BMP-2 (réf. 355-BM-010, R&D, France) dissoute dans le milieu IX (pour les chondrocytes) ou le milieu X (pour les CSMs) à une concentration finale 50 ng/mL

### **III.2. Méthodologie**

Pour appliquer la stimulation biochimique sur les cellules, des billes d'alginate/HAensemencées avec des chondrocytes ou CSMs sont réparties dans des plaques de 6 puits à raison de 20 billes par puits. 4 mL de milieu VII (pour les chondrocytes) ou de milieu VIII (pour les CSMs) contenant de 10% SVF est alors ajouté dans chaque puits et les constructions cellulaires sont ainsi cultivées à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Ce moment est compté comme le jour 0 (J0). A partir de J3, une partie des billes est cultivée dans le milieu IX (pour les chondrocytes) ou le milieu X (pour les CSMs) contenant 1% ITS, une autre partie dans le milieu contenant 10 ng/mL TGF-β1, une autre encore dans le milieu contenant 50 ng/mL BMP-2 pendant 25 jours. Les autres billes restantes, cultivées dans le milieu contenant de 10% SVF, sont utilisées comme contrôle (Figure II-6). Le milieu est renouvelé 2 fois par semaine.



**Figure II-6 : Représentation schématique du protocole de stimulation biochimique**

#### **IV. Méthodologies analytiques**

Lors de la phase d'expansion des chondrocytes et des CSMs, l'expression qualitative et quantitative des marqueurs de surface cellulaire ainsi que l'expression des gènes d'intérêt permettant de suivre l'évolution du phénotype chondrocytaire sont analysées.

Pour l'étude de la stimulation biochimique ou mécanique, les paramètres cellulaires tels que la viabilité, l'activité métabolique, le cycle cellulaire, l'expression des gènes et des protéines matricielles est analysée systématiquement.

##### ***IV.1. Analyse de viabilité cellulaire, apoptose et nécrose***

La viabilité cellulaire ainsi que l'apoptose et la nécrose ont été mesurées à l'aide du Kit Vybrant / Apoptosis™.

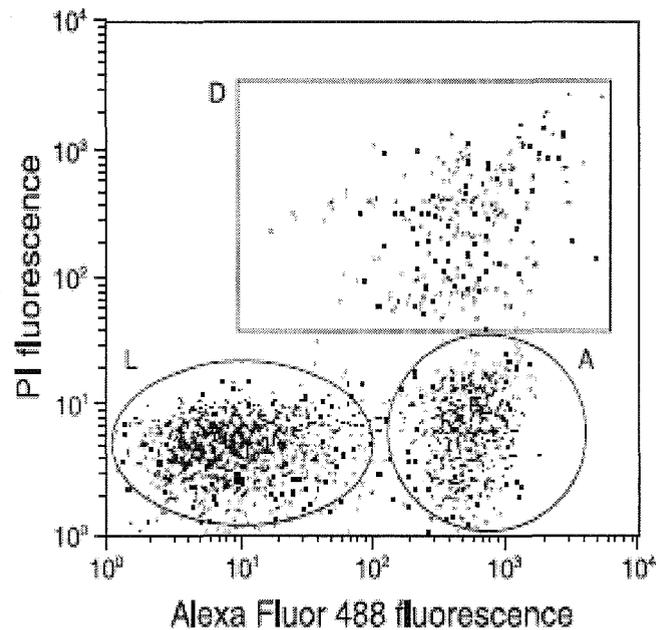
##### ***IV.1.1. Principe***

L'apoptose est un processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. C'est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. L'apoptose se distingue de la nécrose, ou de la mort accidentelle des cellules, par des changements morphologiques et biochimiques caractéristiques, tels que le tassement et la fragmentation de la chromatine nucléaire, le rétrécissement du cytoplasme, et la perte d'asymétrie membranaire. Dans les cellules vivantes normales, la phosphatidylsérine (PS) se situe sur la surface cytoplasmique de la membrane cellulaire. Cependant, pour les cellules apoptotiques, la PS est transférée du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmique, s'exposant ainsi à l'environnement cellulaire externe. L'anticoagulant humain, annexine V, est une protéine phospholipide-liante et  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante qui a une affinité élevée pour la PS. L'annexine V, marquée avec un fluorophore ou de la biotine, peut identifier les cellules apoptotiques en se liant aux PSs exposées sur le feuillet extérieur.

Contrairement à l'apoptose, la nécrose est la forme principale de mort cellulaire, lors d'accidents traumatiques, suite à certaines pathologies ou lors de déficits

métaboliques. Pour les cellules nécrotiques, la membrane plasmique étant détruite, elle permet l'entrée de certaines molécules telles que l'iodure de propidium (IP).

Le kit Vybrant / Apoptosis™ contient de l'annexine V recombinante conjuguée au fluorochrome Alexa Fluor® 488, ainsi qu'une solution d'IP permettant de marquer l'acide nucléique des cellules nécrotiques. Ainsi, les cellules apoptotiques fixeront l'annexine V couplée à l'Alexa 488 et émettront une fluorescence verte tandis que les cellules nécrotiques fixeront l'IP et émettront une fluorescence rouge. Enfin, les cellules vivantes n'émettront aucune fluorescence. Ainsi, les trois populations cellulaires peuvent être séparées en cytométrie en flux par leur différence d'émission de fluorescence (Figure II- 7).



**Figure II-7 : Détermination de l'état physiologique des cellules**

*Sur ce scattogramme, les cellules non fluorescentes (L) correspondent aux cellules vivantes. Les cellules exprimant une fluorescence verte (A) correspondent aux cellules apoptotiques. Les cellules exprimant une double fluorescence verte et rouge (D) correspondent aux cellules en nécrose.*

#### *IV.1.2. Réactifs*

- Solution de Citrate-EDTA : citrate de sodium (réf. S4641, Sigma Aldrich, France) et EDTA (réf. 15706, Sigma, France) sont dissouts dans l'eau distillée à une concentration finale de 55mM et 50mM respectivement.

- Kit Vybrant/Apoptosis<sup>TM</sup> (réf. V13241, Molecular Probe, France.)
  - ✧ Tampon annexine-liant 5X contient 50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4, dilué 5 fois dans l'eau déionisée avant l'utilisation ;
  - ✧ Solution d'annexine V couplée au fluorochrome Alexa Fluor® 488 ;
  - ✧ Solution d'iodure de Propidium (IP) à 1 mg/mL utilisée à 100 µg/mL après une dilution en tampon annexine-liant 1X.

#### *IV.1.3. Méthodologie*

Pour les cellules encapsulées dans des billes ou des cylindres d'alginate/HA, 500µL de solution de citrate-EDTA sont versés sur chaque biosystème afin de dissoudre l'alginate. Les cellules sont ainsi récupérées après centrifugation (300g, 5min).

Les culots cellulaires sont suspendus dans 100 µl de tampon annexine-liant 1X puis 2,5 µl d'annexine V couplée au fluorochrome Alexa Fluor® 488 et 1 µL de IP (100 µg/mL) sont ajoutés à la suspension cellulaire. Les suspensions sont ensuite incubées pendant 15 minutes, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après cette période d'incubation, 200 µl de tampon d'annexine-liant 1X sont à nouveau ajoutés dans chaque tube. Après une délicate homogénéisation, les échantillons sont prêts pour l'analyse en cytométrie.

Les cellules sont analysées en mesurant l'émission de fluorescence à 530 nm et 575 nm correspondant, respectivement, à l'émission de fluorescence de l'Alexa 488 et de l'IP.

Un contrôle négatif (cellules sans marquage) est préparé et analysé en même temps que les échantillons. Ce contrôle permet d'analyser l'auto-fluorescence des cellules.

#### *IV.2. Analyse de l'activité métabolique*

La mesure de l'activité métabolique des cellules a été réalisée par le test de Alamar Blue<sup>TM</sup> et le dosage de l'ADN.

#### *IV.2.A. Principe*

Le test Alamar Blue™ (réf. BUF 012B, Serotec, France) est conçu pour mesurer quantitativement la prolifération cellulaire et la cytotoxicité de drogues sur les cellules. Ce composé comprend un indicateur colorimétrique sensible à l'activité métabolique cellulaire. Plus précisément, l'Alamar Blue™ est composé d'un indicateur Rédox qui change de couleur en fonction de la réduction chimique du milieu de culture. En outre, ce test a plusieurs avantages non négligeables par rapport à d'autres tests métaboliques (lactate deshydrogénase, MTT). En effet, l'Alamar Blue™, n'est pas un toxique cellulaire et le test ne nécessite pas la lyse des cellules, ce qui permet ainsi de suivre l'évolution du signal de manière cinétique.

Des cellules saines et/ou en prolifération produisent des composés réducteurs tels que FADH<sub>2</sub>, NADH, NADPH et ont une activité cytochromique préservée qui contribue à réduire l'Alamar Blue™. Par contre, des cellules atteintes par un stimulus cytotoxique ne réduisent pas l'Alamar Blue™ et produisent des composés oxydants.

La mesure de l'activité cellulaire est donc basée sur le taux d'oxydo/réduction de l'Alamar Blue™ déterminé par la mesure densitométrique à 570 nm (A570, absorbance du composé réduit) et à 600 nm (A600, absorbance du composé oxydé). Le pourcentage de réduction reflétant l'activité métabolique, est alors déterminé par la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction} = \frac{(A570_{\text{échantillon}} \times 117216) - (A600_{\text{échantillon}} \times 80586)}{(A600_{\text{blanc}} \times 155677) - (A570_{\text{blanc}} \times 14652)} \times 100\%$$

Le dosage d'ADN contenu dans chaque bille nous permet de normaliser nos résultats du test Alamar Bleu en fonction de la quantité d'ADN. Les résultats seront donc exprimés sous la forme de « % de réduction / µg ADN ».

#### *IV.2.B. Réactifs*

- DMEM Nut Mix F-12 sans rouge de phénol (réf. 51200, GibcoBRL, France).

- Alamar Blue™ (réf. DAL1100, Biosource) utilisé à 10% (v/v dans DMEM Nut Mix F-12 sans rouge de phénol).
- Hoechst 33258 (réf. H3569, Invitrogen, France) à 0,1 µg/mL dans un tampon Hoechst (Tris 10 mM, 1 mM EDTA, 0,1 M de NaCl à pH 7.4).
- ADN de thymus de veau (réf. D4764, Sigma, France)

#### *IV.2.C. Méthodologie*

##### *IV.2.C.1. Test de Alamar Bleu*

A la fin de la stimulation mécanique ou biochimique, trois billes ou trois cylindres de chaque groupe sont isolés dans des plaques de 48 puits (réf. 677180, Dutscher, France). Afin d'éliminer l'interférence du rouge de phénol présent dans le milieu de culture, les constructions cellulaires sont lavées dans 0,5 mL/puits de DMEM Nut Mix F-12 sans rouge de phénol pendant 15 minutes. Puis 0,5 mL d'une solution d'Alamar Blue™ à 10% sont ajoutés dans chaque puits, y compris trois puits sans constructions cellulaires utilisés comme « blanc réactif ». Après une incubation de 4 heures (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), le milieu de chaque puits est enlevé et les absorbances à 570 nm et à 630 nm sont mesurées en utilisant un spectrophotomètre (DU 640, Beckman USA).

##### *IV.2.C.2. Dosage de l'ADN*

3 billes d'alginate sont lysées dans un tampon citrate-EDTA (55 mM citrate, 50 mM EDTA), pendant 10 minutes à 37°C puis centrifugées à 1500 tours/min pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est ensuite conservé à -20°C jusqu'au dosage.

Les culots cellulaires des 3 billes sont repris dans 100 µl de tampon Hoechst et les cellules sont lysées par 3 séries de congélation/décongélation dans l'azote liquide. Pour le dosage, 2 mL de solution Hoechst sont ajoutés à chaque échantillon. Une gamme étalon de 0 à 0,5 µg/mL est établie à partir d'ADN de thymus de veau.

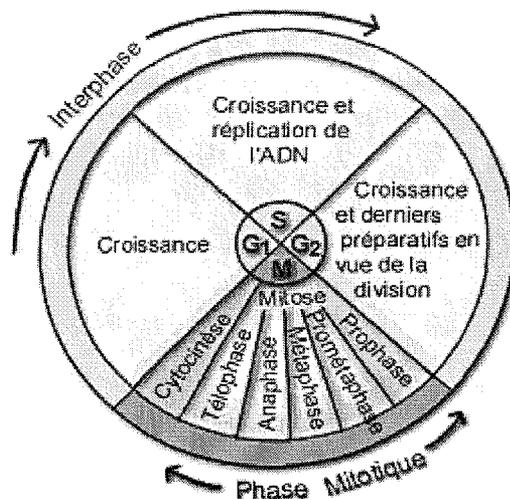
Le dosage est effectué à une longueur d'onde d'excitation de 356 nm et une longueur d'émission de 458 nm sur un spectrofluorimètre (Hitachi U2001, Japon).

### **IV.3. Analyse du cycle cellulaire**

La cytométrie en flux est une méthode rapide pour mesurer la teneur des cellules en ADN, et fournit un outil commode de recherche pour surveiller la régulation du cycle des cellules.

#### **IV.3.1. Principe**

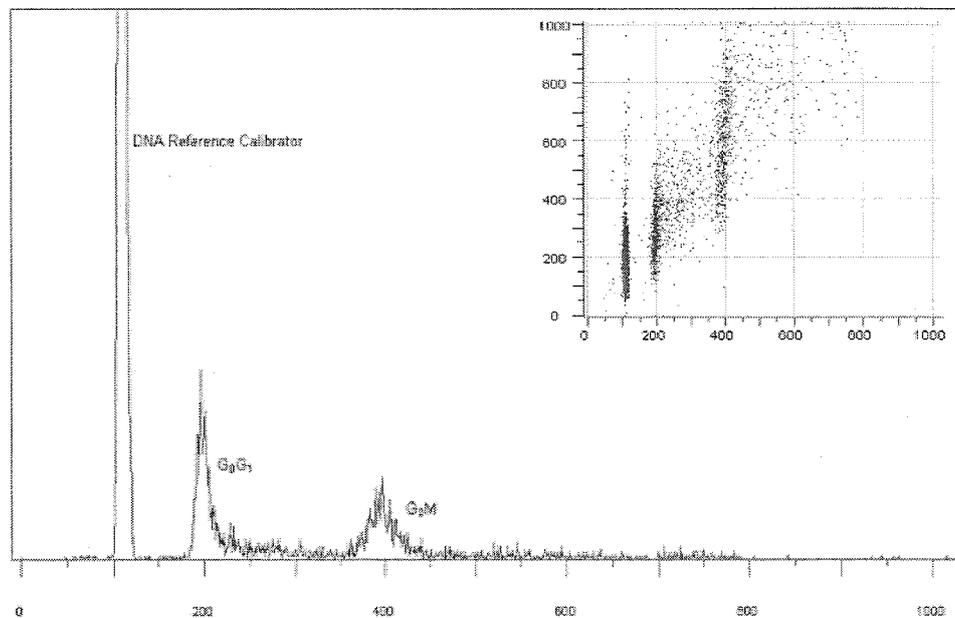
Le cycle cellulaire comprend plusieurs phases (Figure II-8). Durant la première phase (phase G1), la cellule croit et devient plus large. Il y a synthèse des protéines permettant la division. A partir d'une certaine taille, elle entre dans la deuxième phase (phase S), dans laquelle débute la synthèse de l'ADN. La cellule duplique son matériel héréditaire (réplication de l'ADN) et une copie de chacun de ses chromosomes est effectuée. Durant la phase suivante (phase G2), la cellule contrôle que la réplication de l'ADN a bien été réalisée (réparation post-réplivative) et prépare la division cellulaire. Les chromosomes sont séparés durant la mitose (phase M) et la cellule se divise en deux cellules filles (cytokénèse). A travers ce mécanisme, les deux cellules filles sont dotées des mêmes chromosomes que ceux de la cellule mère. Après la division, les cellules retournent en phase G1.



**Figure II-8: Différentes phases du cycle cellulaire**

Les méthodes d'analyse du cycle cellulaire, par cytométrie en flux, sont basées sur l'émission de la fluorescence des noyaux marqués à l'iodure de propidium. Une population à croissance exponentielle de cellules aura une distribution de son contenu

d'ADN montrant un premier pic de cellules en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, une vallée de cellules en phase S, et un deuxième pic contenant des cellules en phase G<sub>2</sub>/M. Les cellules de la phase G<sub>2</sub>/M ont deux fois plus de contenu d'ADN que les cellules de la phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Les cellules en phase S possèdent une teneur en ADN comprise entre 2N et 4N et correspondent à l'espace situé entre les 2 pics (Figure II-9).



**Figure II-9 : Analyse des phases du cycle cellulaire par cytométrie en flux**

#### *IV.3.2. Réactifs*

- Kit DNA Prep Reagent (réf. PN 6607055, Beckman coulter, USA) contenant:
  - ✧ DNA Prep™ LPR : détergents non ioniques, salins et stabilisateurs.
  - ✧ DNA Prep™ Stain: 50µg/mL iodure de Propidium, RNase [Type III-A, Bovine Pancrease (4KU/mL)], <0,1% NaN<sub>3</sub>, etc.
- DMEM Nut Mix F-12 sans rouge de phénol (réf. 51200, Gibco BRL, France)

#### *IV.3.3. Méthodologie*

A l'issue des stimulations mécaniques ou biochimiques, les biomatériaux d'alginate/HA contenant les cellules sont répartis dans des tubes à hémolyse (réf. 080053 Dutscher, France). Les hydrogels sont dissous selon le protocole décrit dans le

paragraphe IV.1.3 et les cellules sont récupérées. Les culots cellulaires sont suspendus dans 25 µl de DMEM sans rouge de phénol, puis perméabilisés en ajoutant 25 µl de solution DNA prep LPR et suivi d'une agitation pendant 30-60 secondes au vortex. Les cellules sont ensuite marquées avec l'iodure de propidium en ajoutant 250 µl de solution DNA-Prep Stain, puis mise en agitation pendant 30-60 secondes. Enfin, les cellules sont analysées en cytométrie en flux, dans l'heure qui suit le marquage.

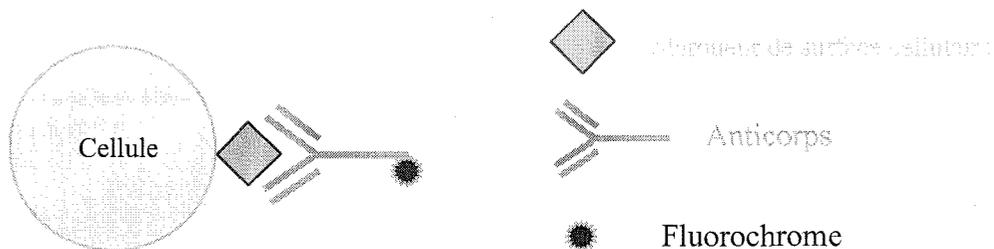
#### ***IV.4. Analyse de l'expression des marqueurs de surface cellulaire***

Pour caractériser le phénotype des cellules (chondrocytes et CSMs) en fonction du passage, nous avons analysé l'expression de certains marqueurs de surface cellulaire tels que le CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 et CD166. Ces travaux ont été réalisés en cytométrie de flux par immunomarquage direct.

##### ***IV.4.1. Marquage par immunofluorescence directe***

###### ***IV.4.1.1. Principe***

Les récepteurs exprimés à la surface des cellules sont reconnus spécifiquement par un anticorps directement couplé à un fluorochrome (Figure II-10).



**Figure II-10 : Principe du marquage par immunofluorescence directe**

###### ***IV.4.1.2. Réactifs***

- DMEM Nut Mix F-12 sans rouge de phénol.
- Solution de blocage : albumine de sérum bovin (BSA, réf. A-9667, Sigma Aldrich, France) dissoute dans DMEM sans rouge de phénol à 0,5% (p/v) pour empêcher tout marquage aspécifique des anticorps.

- Solution d'immunomarquage : anticorps dilués dans la solution de blocage afin d'obtenir une concentration finale appropriée (Tableau II-4).

**Tableau II-4 : Anticorps impliqués dans les immunomarquages directs**

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Isotype	Concentration finale	Fournisseur (réf.)
Anti-CD34/PE	Humain	IgG (Souris)	2 µL / tube	BD (réf. 555822)
Anti-CD45/FITC	Humain	IgG (Souris )	5 µL / tube	Dako (réf. F0861)
Anti-CD73/PE	Humain	IgG (Souris)	2 µL / tube	BD (réf. 550257)
Anti-CD90/FITC	Humain	IgG (Souris)	2 µL / tube	BD (réf. 555595)
Anti-CD105/FITC	Humain	IgG (Souris)	5 µL / tube	Dako (réf. LS133)
Anti-CD166/FITC	Humain	IgG (Souris)	5 µL / tube	Dako (réf. LS172)
Contrôle isotypique/PE	Humain	IgG (Souris)	5 µL / tube	Dako (réf. X0928)
Contrôle isotypique/FITC	Humain	IgG (Souris)	5 µL / tube	Dako (réf. X0927)

#### *IV.4.1.3. Méthodologie*

Les échantillons cellulaires (chondrocytes et CSMs de P0 à P5), conservés à -80°C sont décongelés et lavés une fois avec la solution de blocage, puis ils sont répartis à raison de  $5 \cdot 10^5$  cellules par tube. Ensuite, les cellules sont lavées par centrifugation (300 g, 5 min) et les culots cellulaires sont resuspendus dans 100 µL de solution d'immunomarquage incluant soit différents anticorps, soit IgG-PE/FITC (contrôle isotypique) ou dans 100 µL de la solution de blocage (contrôle négatif). A l'issue d'une incubation pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, 0,5 mL de DMEM sans rouge de phénol sont ajoutés dans chaque tube, puis une centrifugation (5 min, 300 g) est faite afin d'éliminer les anticorps en excès. Le culot cellulaire est alors repris dans 300 µL de DMEM sans rouge de phénol avant d'être analysé en cytométrie en flux (EPICS XL Coulter ; Beckman-Coulter).

#### *IV.4.2. Quantification du nombre de marqueurs de la surface cellulaire*

##### *IV.4.2.1. Principe*

L'immunomarquage étant réalisé en conditions saturantes et la fixation du fragment F(ab')<sub>2</sub> étant considérée comme monovalente, chaque site antigénique est théoriquement occupé par un anticorps monoclonal. Il existe alors une équivalence entre le nombre d'anticorps fixés et le nombre de sites antigéniques par cellule [Poncelet et al, 1996]. Ainsi, les valeurs d'intensité moyenne de fluorescence (IMF) peuvent être transformées en nombre de sites antigéniques.

Le calibrant se présente sous forme de microsphères, simulant les cellules, recouvertes de quantités croissantes d'immunoglobulines de souris, ce qui permet après marquage à l'aide d'un fluorochrome et analyse cytométrique de tracer une droite d'étalonnage reliant l'IMF (unité arbitraire) au nombre de sites antigéniques par cellule (unité absolue). La quantification du nombre de récepteurs exprimés à la surface des cellules est réalisée en reliant l'IMF au nombre de sites antigéniques par cellule par un étalonnage adapté.

##### *IV.4.2.2. Réactifs*

➤ Le kit Quantum™ Simply Cellular® (réf. 810B, Bangs Laboratoires, France) :

Ce kit est destiné à la quantification en immunofluorescence directe. Il se compose de 5 populations de microsphères, d'un blanc (contrôle négatif) et de quatre populations de microsphères ayant différentes capacités de liaison aux anticorps monoclonaux d'IgG.

##### *IV.4.2.3. Méthodologie*

Parallèlement aux marquages cellulaires, un mélange d'une goutte de chaque population de microsphères est préparé, dans un tube à hémolyse, en ajoutant 50 µL de solution de blocage. Les microsphères sont ensuite marquées de la même manière que dans le paragraphe IV.4.1.3.

*IV.4.3. Analyse des échantillons cellulaires en cytométrie en flux*

*IV.4.3.1. Principe*

La cytométrie en flux est une technique permettant de faire défiler des particules, molécules ou cellules à grande vitesse devant un faisceau laser. La lumière émise (par diffusion ou fluorescence) permet de classer la population suivant plusieurs critères.

La cytométrie en flux (CMF) est définie comme l'étude précise de particules isolées (cellules, bactéries...) entraînées par un flux liquide. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule, à leur structure interne ou à l'auto fluorescence de certaines cellules comme les végétaux, le phytoplancton, *etc.* Ces signaux mesurés sont également relatifs aux propriétés optiques induites de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires. Ces signaux séparés par des filtres optiques sont collectés par des photo-multiplificateurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur.

*IV.4.3.2. Méthodologie*

Les cellules sont analysées sur un cytomètre (EPICS XL Coulter; Beckman-Coulter). Un minimum de 10 000 évènements a été collecté lors de chaque analyse. La population cellulaire est repérée sur le scattogramme en fonction de la taille et de la granulosité de cellules. Une fenêtre prenant en compte uniquement cette population est dessinée afin d'éliminer les débris cellulaires, ou les doublets et triplets de cellules. Ainsi, les valeurs de SSC (Side Scatter) et de FSC (Forward Scatter) sont réglées de façon à bien visualiser la population cellulaire et les microsphères de calibration.

Sur l'histogramme de fluorescence, la tension du photomultiplicateur (PMT) est

réglée de manière à ce que les cellules non marquées (le contrôle négatif qui permet de s'affranchir de l'autofluorescence des cellules) ainsi que les cellules incubées en présence d'immunoglobulines non spécifiques (le contrôle isotypique qui permet de s'affranchir de la fluorescence du marquage aspécifique) apparaissent négatives. La tension du PMT ne doit plus être touchée après ce réglage afin de ne pas faire d'erreur sur la lecture des intensités de fluorescence des échantillons analysés. L'intensité de fluorescence de la population cellulaire est mesurée automatiquement par le cytomètre et analysés à l'aide du logiciel SYSTEM II® (Beckman Coulter). De plus, la tension du PMT est réglée de la même manière pour les microsphères de calibration que pour les échantillons cellulaires. Lors de la quantification, il apparaît ainsi sur l'histogramme de fluorescence plusieurs pics correspondant aux diverses populations de microsphères de calibration.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux, sont exprimés soit en pourcentage de cellules positives, soit en intensité moyenne de fluorescence (IMF).

Une représentation reliant en abscisse l'IMF et en ordonnée les valeurs de capacité liante des anticorps des microsphères de calibration données par le fournisseur est ensuite effectuée. La droite d'étalonnage est réalisée par un logiciel de quantification (QuickCal V2.3 Bangs Laboratoires, France). Après avoir retiré à l'IMF de l'échantillon choisi, la valeur de l'IMF du contrôle négatif, la valeur du nombre de sites par cellule est extrapolée à partir de la droite d'étalonnage. Cette IMF est alors transformée en nombre de sites de marqueurs membranaires.

#### ***IV.5. Analyse de la synthèse matricielle par histologie***

Les colorations à l'HES (Hématoxyline-Erythrosine –Safran), au Rouge Sirius et au Bleu Alcian sont utilisées respectivement pour visualiser la morphologie des cellules, le collagène et les GAGs.

##### ***IV.5.1. Principe***

L'HES est un colorant standard, permet de visualiser la morphologie des cellules puisque l'hématoxyline colore les noyaux en violet foncé, l'éosine se fixe sur les

éléments acidophiles et leur confère une coloration rose (cytoplasme), tandis que le safran se lie aux collagènes (coloration jaune).

Le Rouge Sirius est un colorant anionique du collagène. La réaction se produit entre les groupements sulfoniques du colorant et les groupements basiques présents sur les molécules de collagène.

Le Bleu Alcian permet la mise en évidence de GAGs carboxylés, sulfatés ou phosphatés.

#### *IV.5.2. Réactifs*

- Solution de fixation : ParaFormaldéhyde (PFA) 4%, 10 mM de CaCl<sub>2</sub> dans un tampon cacodylate (réf. C0250, Sigma, France) à 0,1 M.
- Solution de lavage : 50 mM de BaCl<sub>2</sub> (réf. B0750, Sigma, France) dans un tampon cacodylate à 0,1 M.
- Alcool absolu (réf.) est dilué à 70° et 95° dans de l'eau distillée ;
- Solution d'acide picrique à 0,1% : acide picrique (réf. 20.642, Prolabo, France)
- Solution de bleu alcian à 0,1% : Bleu Alcian 8GX Gurr (réf. M/N24, Searle Diagnostic, France)
- Solution de Kernechtrot à 0,1% : 0,5 g Kernechtrot (réf. 5189, Merck, USA) et 25 g de sulfate d'aluminium (réf. 21070.297, Prolabo, France) sont dissouts dans 500 mL d'eau distillée.
- Résine de montage PERTEX (réf. 02407831, Baler, France)

#### *IV.5.2. Méthodologie*

Les constructions cellulaires sont fixées à l'aide d'une solution de fixation à température ambiante pendant 4 heures. Elles sont ensuite placées toute une nuit à 4°C dans une solution de lavage. Les constructions subissent ensuite une série de déshydratation progressive dans des bains croissants d'alcool (alcool 70° pendant 1h minimum, alcool 95° 2 fois 1 heure, alcool absolu 3 fois 1 heure). L'alcool est ensuite éliminé par 3 bains de 15 minutes dans du toluène.

Pour l'inclusion en paraffine, les prélèvements sont placés dans des cassettes en plastique de façon à les laisser s'imbiber dans un bain de paraffine liquide (58°C)

pendant 2 à 3 heures. Les prélèvements sont ensuite inclus, définitivement, dans la paraffine et les blocs sont solidifiés par la diminution de la température.

Des coupes de 5 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome (LEICA RM 2135, France). Les lames sont ensuite colorées avec un appareil à coloration automatisé (Tissue TekDRS, Sakaura, Japon). Les colorants utilisés sont l'HES, le Rouge Sirius et le Bleu Alcian :

- L'HES (Hématoxyline-Erythrosine-Safran) : L'hématoxyline (0,5 %, 5 min), l'éosine (1 %, 5 min), et le safran (1 %, 5 min).

- La coloration au Rouge Sirius est réalisée avec une solution saturée en acide picrique à 0,1 %. Les lames sont alors rincées dans un bain d'acide chlorhydrique 0,01N pendant 2 min puis dans une solution d'alcool à 95 °C et enfin dans de l'alcool absolu pendant 2 min. Elles sont ensuite déshydratées et montées avec la résine synthétique PERTEX.

- La coloration au Bleu alcian est réalisée avec une solution de bleu Alcian à 0,1% pendant 2 heures, puis des rinçages à l'eau courante. Un bain de 10 min dans la solution de Kernechtrot est ensuite réalisé. Les échantillons sont ensuite déshydratés dans des bains d'alcool croissants (1 min alcool 95 °C, et 5 min alcool absolu).

Après les colorations, les échantillons peuvent être observés sous le microscope (réf. Labophoto-2, Nikon, Japon). Les lames colorées au Rouge Sirius, sont dans un premier temps, observées en lumière classique puis en lumière polarisée en disposant les lames à 45° sous un microscope équipé de deux filtres spécifiques. La lumière polarisée permet de visualiser l'architecture du réseau collagénique.

#### ***IV.6. Analyse de l'expression des gènes par RT-PCR quantitative***

L'étude de l'expression des gènes est réalisée par RT-PCR (Reverse transcription - Polymerase Chain Reaction) quantitative.

Les gènes étudiés lors des différentes PCR sont les gènes codants pour : des protéines matricielles (Collagènes de type I, II, III et X, COMP), des protéoglycannes (Agrécanne, Versican), un facteur de transcription impliqué dans la chondrogénèse et le phénotype chondrocytaire (Sox9), ou encore une protéine de référence (RP 29,

codant pour une protéine ribosomiale).

#### *IV.6.1. Principe*

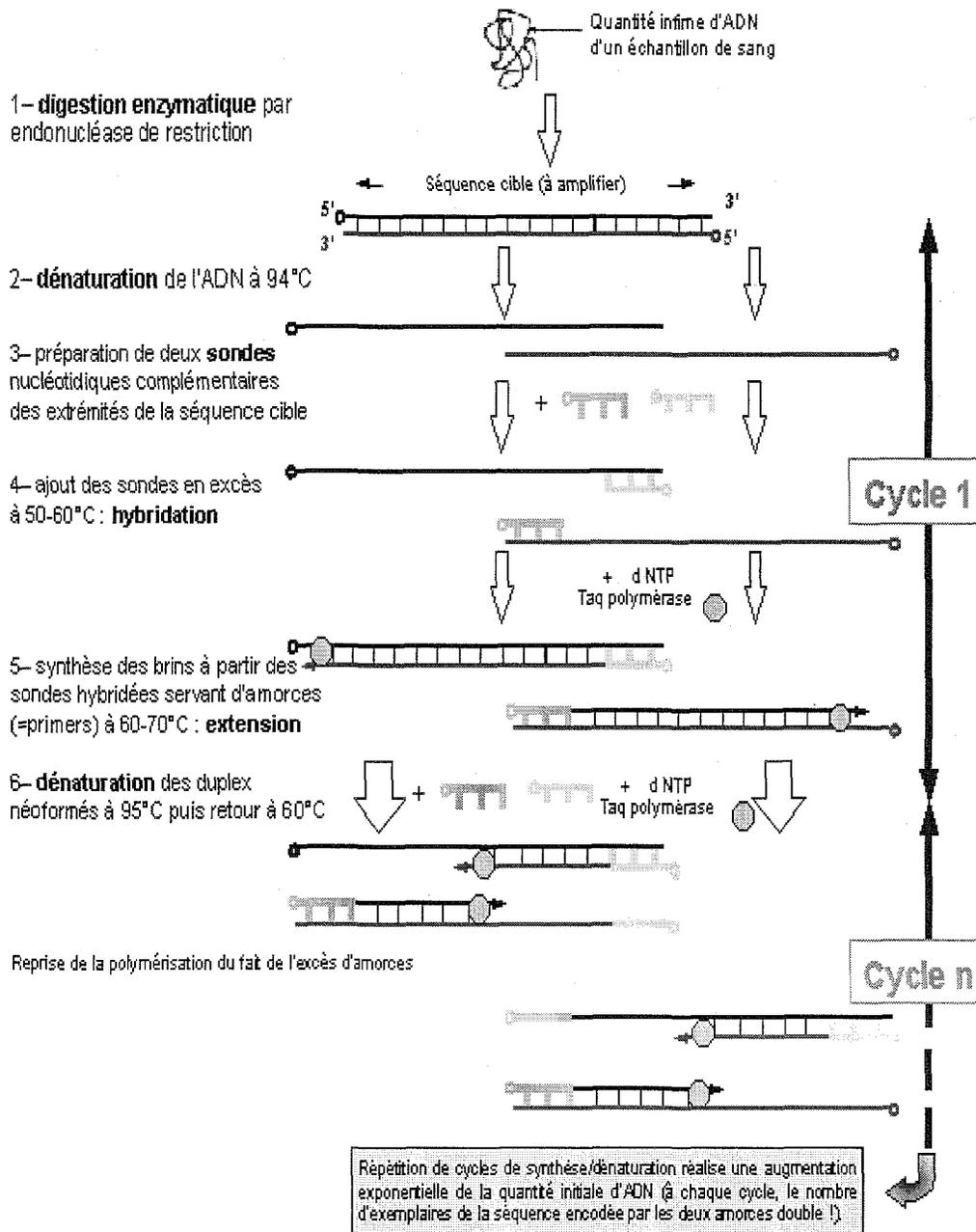
##### *IV.6.1.1. PCR (Polymérase Chaîne Réaction)*

L'étude de l'expression des gènes est réalisée en biologie moléculaire à l'aide d'une technique, appelée PCR (Polymérase Chaîne Réaction) pour l'amplification en chaîne de l'ADN par une polymérase. Cette technique permet d'obtenir à partir d'un échantillon, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. Pour cela il est nécessaire d'extraire les ARN totaux des cellules et de rétro transcrire (RT) les ARN en ADNc. Cet ADNc va servir de matrice à la technique de PCR pour connaître l'expression des gènes à étudier à l'aide d'amorces spécifiques. Pour chaque gène étudié, il est possible de déterminer quantitativement le taux d'expression de ce gène dans la cellule.

##### *IV.6.1.2. PCR quantitative (PCRq)*

Comme la PCR classique, la réaction de PCRq se déroule en trois étapes : dénaturation, hybridation et élongation (Figure II-11). A la différence d'une PCR classique, la PCRq utilise des molécules se liant à l'ADN double brin de manière non spécifique qui permet la quantification de l'amplicon formé en temps réel.

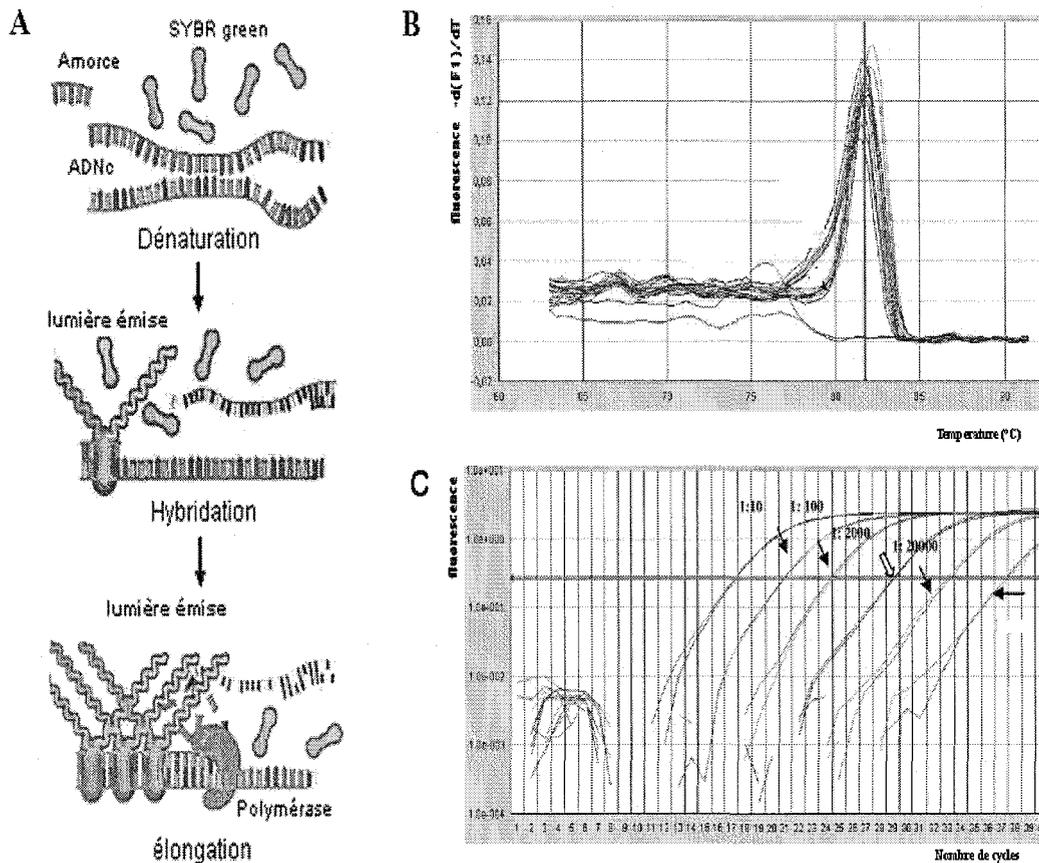
La molécule la plus couramment utilisée dans la PCRq est le SyBR Green. Le SyBR Green est un fluorophore capable d'émettre une fluorescence quand il est lié à de l'ADN double brin. Au début de la réaction, le mélange réactionnel contient de l'ADN dénaturé, les amorces et le fluorophore non lié. Après l'hybridation des amorces, le fluorophore se lie au double brin. La liaison à l'ADN se traduit par une augmentation de la fluorescence. Pendant l'étape d'élongation, le nombre de molécules de fluorophore liés à l'ADN synthétisé augmente, ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence (Figure II-12A). La fluorescence est mesurée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle grâce à un thermocycleur piloté par un ordinateur qui permet l'acquisition et le suivi en temps réel des données ainsi que leur traitement.



**Figure II-11 Principe de la technique de PCR**

Les brins d'ADN complémentaires sont dénaturés à 95°C puis les amorces spécifiques se fixent sur les brins et enfin la polymérase synthétise les brins complémentaires à l'aide des oligonucléotides présents dans le milieu réactionnel.

[<http://www.inrp.fr/Access/biotic/biomol/techgen/html/schempcr.htm>]



**Figure II-12 Principe de la PCR en temps réel avec un fluorophore (SYBR Green)**  
*A : SYBR Green non fixé à l'ADN n'émet pas de fluorescence. Lors de l'hybridation, les amorces se fixent sur les brins d'ADN complémentaire avec insertion de la sonde. Pendant l'élongation, l'intensité de fluorescence croît avec l'insertion des sondes dans les doubles brins formés. B : Courbe de fusion ; C : Quantification de l'expression d'un gène en fonction d'une gamme d'ADN complémentaire.*

#### IV.6.1.3. Exploitation des données de PCRq

##### Courbe de fusion

A la fin des cycles, l'appareil réalise une courbe de fusion, lors de laquelle la température est élevée à 95 °C où l'ADN double brin se dissocie, entraînant la libération du SYBR Green dans le milieu et une diminution progressive de la fluorescence. Lorsqu'une quantité de 50 % de l'ADN double brin est dissociée, la fluorescence chute brutalement, c'est à cette température que correspond la température de fusion du produit synthétisé. En traçant la courbe dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température, nous obtenons un maximum qui correspond à cette température de fusion ( $T_m$ ). La position du  $T_m$  sur l'axe des

températures est donc caractéristique d'un amplicon donné et doit toujours apparaître à la même position (Figure II-12B).

#### Gamme d'ADNc

La PCRq permet de faire une quantification relative de l'expression des gènes d'intérêt dans des échantillons donnés par rapport à un gène de référence (RP29 dans cette étude), dont l'expression ne varie pas en fonction des conditions expérimentales. Il permet aussi de faire une quantification absolue (détermination en nombre de copies) par rapport à une gamme d'ADNc.

Cette gamme est réalisée, en parallèle des échantillons, afin de pouvoir quantifier l'expression des différents gènes. Pour cela, l'ADNc correspondant au gène à étudier est dosé, puis dilué pour faire une gamme de  $10^{-3}$  à  $10^{-7}$   $\mu\text{g/mL}$  (Figure II-12C). Cette gamme est analysée en même temps que les échantillons et permet de quantifier le gène étudié.

#### *IV.6.2. Réactifs*

- RNeasy mini kit (réf. 74106, Qiagen, France)
- Amorces de polydT 12-18 (réf. 18418-012, Invitrogen, France)
- Transcriptase inverse M-MLV (réf. 28025-013, Invitrogen, France)
- SYBR Green (réf. 204145, Qiagen, France)
- QZAquick<sup>®</sup> Kit (réf. 28104 Qiagen, France)
- Amorces de chaque gène (Tableau II-5) : (MWG-Biotech AG France)

**Tableau II-5 : Amorces et conditions de PCRq pour chaque gène**

Nom d'amorce		Sequence (5'-3')	Tm
Collagène 1	Reverse	GGACCACTTTCACCCTTGT	60°C
	Forward	AGGTGCTGATGGCTCTCCT	
Collagène 2	Reverse	ATCTCAGGGCTGAGGCAGT	60°C
	Forward	GCAGGATGGGCAGAGGTAT	
Collagène 2a	Reverse	ACAGTCTTGCCCCACTTAC	55°C
	Forward	GACAATCTGGCTCCCAAC	
Collagène 3	Reverse	GCCAACGTCCACACCAAATT	62°C
	Forward	AACACGCAAGGCTGTGAGACT	
Collagène 10	Reverse	CTCCAGGATCACCTTTTGGGA	60°C
	Forward	GCTAAGGGTGCCCCACTTAC	
Agrécanne	Reverse	TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA	63°C
	Forward	TCGAGGACAGCGAGGCC	
Versican	Reverse	CTTCCACAGTGGGRGGTCTT	62°C
	Forward	TGTTCTCCCACTACCCTTG	
Sox9	Reverse	CCTGGGATTGCCCGA	55°C
	Forward	GAGCAGACGCACATCTC	
COMP	Reverse	TCTGCATCAAAGTCGTCCTG	60°C
	Forward	ACAATGACGGAGTCCCTGAC	
Ostéocalcine	Reverse	TCAGCCAACCTCGTCACAGTC	62°C
	Forward	GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT	
RP 29	Reverse	AGACGCGGCAAGAGCGAGAA	60°C
	Forward	AAGATGGGTCACCAGCAGCTCTACTG	

### *IV.6.3. Méthodologie*

Les ARN totaux des cellules sont d'abord extraits et rétro transcrits en ADNc. Puis, la PCR en temps réel est réalisée par mise en présence de SYBR Green avec le produit de RT ainsi que les amorces des différents gènes à étudier. Les fragments de PCR doivent être courts, de 100 à 350 paires de bases. Le programme permet d'obtenir toutes les données nécessaires à l'analyse du gène cible.

#### *IV.6.3.1. Extraction des ARN totaux*

L'extraction des ARN totaux s'effectue sur un culot cellulaire. Les cellules cultivées en monocouche ont été trypsinées puis récupérées après centrifugation. En ce qui concerne les chondrocytes encapsulés dans des billes, 30 billes sont nécessaires. Les hydrogels des billes sont déstructurés dans une solution de Citrate-EDTA pendant 10 à 15 minutes. Le mélange alginate - cellules est homogénéisé avec la pipette puis centrifugé 30 secondes à 1200 tours/min (réf. 5145R, Eppendorf, Allenmand) de façon à récupérer le culot cellulaire. Les cellules sont lavées, 5 fois avec du PBS, de façon à éliminer toute trace d'alginate et donc toute interférence possible lors de l'extraction d'ARN et de RT-PCR.

L'extraction d'ARN s'effectue selon les recommandations du fournisseur en utilisant le kit d'extraction des ARN, RNeasy mini kit. Le dosage des ARN est réalisé par spectrofluorimétrie (réf. F2000, Hitachi, Japon), par la lecture de la DO aux longueur d'onde de 260nm et 280nm. La longueur d'onde à 260 nm permet de détecter les acides nucléiques et la longueur d'onde à 280 nm permet de détecter les protéines. Le rapport  $DO_{260}/DO_{280}$  permet de déterminer la qualité de l'échantillon, puis la concentration en ARN de l'échantillon est déterminée de la manière suivante : [ARN]  $\mu\text{g/mL} = DO_{260} \times \text{Dilution} \times 40$

#### *IV.6.3.2. Rétro Transcription (RT)*

L'ADNc est obtenu à partir de 500 ng d'ARN par transcription inverse en utilisant des amorces de polydT 12-18 se fixant sur la séquence poly-Adénylée des ARN messagers. Ces amorces, contrairement aux amorces à fixation aléatoire, nous

permettent d'obtenir l'ADNc uniquement des ARN messagers. La synthèse du brin d'ADNc est réalisée selon les recommandations du fournisseur dans le tampon de RT, en présence des amorces polydT par une transcriptase inverse M-MLV pendant 90 min à 37 °C. Les ARN restants sont dénaturés par la chaleur (5 min, 95 °C).

#### *IV.6.3.3. Réaction de PCRq en temps réel*

La réaction de PCRq s'effectue dans des capillaires placés dans le thermocycler (réf. Light Cycler, Roche, USA). Elle se déroule par la mise en présence de 10 µl de SYBR Green, de 2 µl de solution de RT diluée au ¼ et 2 µl de chaque amorce (10 pM) de chaque gène. La PCR dure 1 heure avec le maintien de l'activité polymérase. A chaque cycle, chaque capillaire passe devant le système optique où la fluorescence est mesurée. Après le dernier cycle de PCR, la courbe de fusion est réalisée.

#### *IV.6.3.4. Construction de la gamme d'ADNc*

Le contenu d'échantillons de PCR, ayant subi une amplification spécifique d'un gène cible, est récupéré et ensuite purifié en utilisant le kit d'extraction d'ADN selon les recommandations du fournisseur. Un dosage spectrophotométrique est effectué afin de déterminer la concentration en ADN de la manière suivante :

$$[\text{ADN}] \mu\text{g/mL} = \text{DO}_{260} \times \text{Dilution} \times 50.$$

Cette solution mère est ensuite diluée pour obtenir notre gamme de concentrations du gène considéré. Puis, elle est analysée en même temps que les échantillons et permet de quantifier le gène étudié.

### *IV.7. Analyse de l'expression de protéines collagéniques*

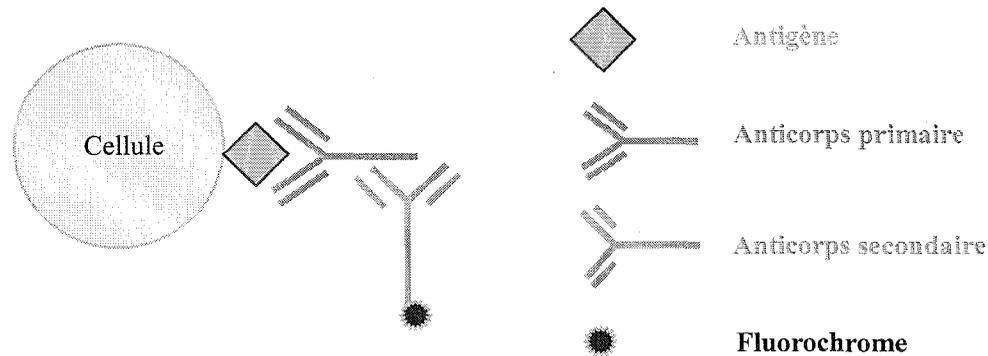
L'expression des protéines de collagènes de type I et type II est analysée en microscopie confocale à balayage laser par immunomarquage indirect.

#### *IV.7.1. Marquage par immunofluorescence indirecte*

##### *IV.7.1.1 Principe*

Les protéines collagéniques présentes dans la matrice néo-synthétisée à la surface des cellules sont reconnues spécifiquement par un anticorps (anticorps

primaire). Afin de mettre en évidence la formation du complexe antigène-anticorps primaire, un deuxième anticorps est utilisé (anticorps secondaire). Ce dernier est couplé à un fluorochrome et il est dirigé spécifiquement contre la partie Fc (fragment commun) de l'anticorps primaire. (Figure II-13).



**Figure II-13 : Principe du marquage par immunofluorescence indirecte**

*IV.7.1.2. Réactifs*

- DMEM Nut Mix F-12 sans rouge de phénol.
- Solution de blocage : 0,5% BSA préparée dans DMEM sans rouge de phénol.
- Solution d'immunomarquage : anticorps (Tableau II-6) dilués soit 1/50 pour les anticorps primaire, soit 1/50 pour l'anticorps secondaire dans la solution de blocage.
- Solution de fixation : Paraformaldéhyde (PAF) (réf : P6148, Sigma) dissout dans tampon PBS à 4% (p/v).

**Tableau II-6 : Anticorps impliqués dans les immunomarquages indirects**

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Isotype	Fournisseur (réf.)
Anti collagène type I	Humain	IgG (Lapin)	Calbiochem (réf. 234183)
Anti collagène type II	Humain	IgG (Lapin)	Calbiochem (réf. 234187)
IgG-Alexa Fluor® 488	Lapin	IgG (Chèvre)	Molecular Probes (réf. A-11008)

#### *IV.7.1.3. Méthodologie*

Les constructions cellulaires d'alginate/HA sont coupées en deux à l'aide d'un scalpel puis lavées dans 500 µl de solution de blocage pendant 15 min. Elles sont ensuite incubées avec 100 µl de solution d'immunomarquage contenant soit l'anticorps anti-collagène I, soit l'anticorps anti-collagène II. A l'issue d'une incubation de 45 minutes, à température ambiante, les échantillons sont lavés dans 500 µl de solution de blocage pendant 10 min. Ensuite, les échantillons sont incubés dans 100 µl de solution d'immunomarquage incluant l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome pendant 45 minutes, à température ambiante et à l'abri de la lumière, puis rincés avec du DMEM sans rouge de phénol pendant 10 minutes. Après 10 minutes de fixation, à température ambiante et à l'abri de la lumière, dans 500µl de solution de fixation, les échantillons sont prêts pour être observés en microscopie confocale à balayage laser.

Un contrôle négatif, échantillon incubé seulement avec de la solution de blocage, est préparé en même temps.

#### *IV.7.2. Observation en microscopie confocale à balayage laser*

Après un marquage par immunofluorescence indirecte, on observe l'expression des protéines de collagènes autour des cellules encapsulées dans les billes d'alginate/HA en microscopie confocale.

##### *IV.7.2.1 Principe*

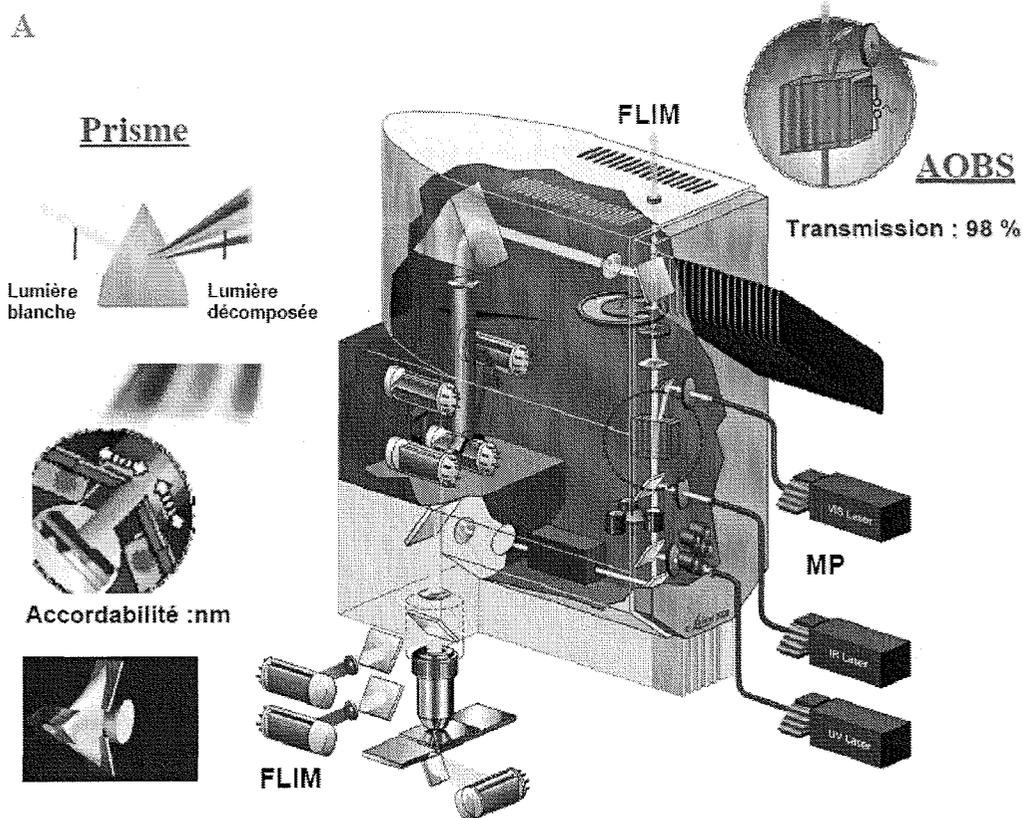
La microscopie confocale à balayage laser permet de visualiser des échantillons avec une haute résolution (200 nm latéral, 400 nm spatial) en éliminant la lumière parasite et permet une analyse tridimensionnelle des échantillons biologiques.

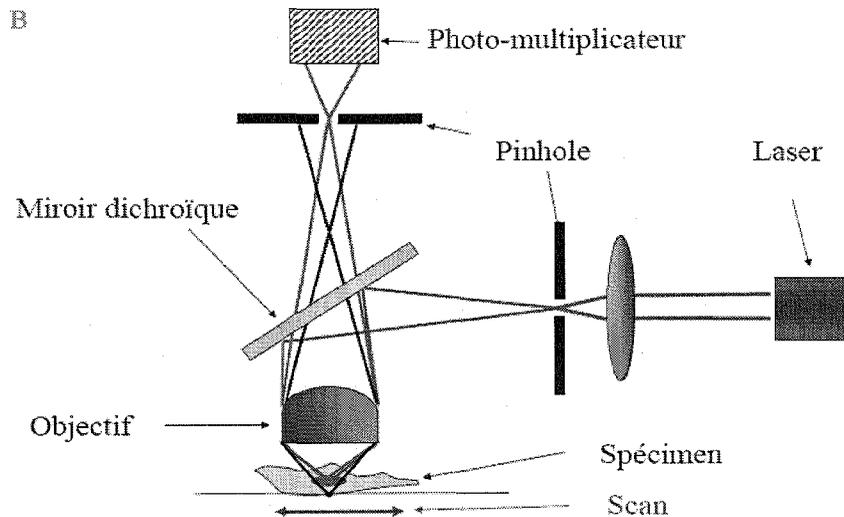
Le principe d'un microscope confocal à balayage laser utilise un faisceau laser d'excitation qui est envoyé sur des miroirs galvanométriques (miroirs de balayage) qui, en pivotant sur leur axe, vont permettre le balayage rapide (400-1000 hertz) de l'ensemble du champ d'illumination. La lumière d'émission récupérée *via* l'objectif est descannée suivant le même trajet, puis parvient au détecteur (tube photomultiplicateur) *via* successivement un élément dispersif (miroir dichroïque ou prisme), puis le

diaphragme de détection (Pinhole en anglais). Le signal photo-électrique généré par le photomultiplicateur est amplifié puis envoyé à l'ordinateur, où il est numérisé (dynamique 8-12 bits), puis affiché sur le moniteur. L'ordinateur gère les miroirs de balayage, le moteur pas à pas (ou la platine galvanométrique) contrôlant le déplacement en z de la platine et l'ouverture de Pinhole (Figure II-14A).

L'illumination du spécimen par la lumière laser ainsi que la détection du signal provenant du plan de mise au point sont réduites à un point, grâce à l'utilisation de deux diaphragmes de faible diamètre. Ces deux diaphragmes sont conjugués dans les plans confocaux. Ainsi, la lumière émise hors du plan de mise au point n'atteint pas le détecteur et seuls les objets situés dans le plan de mise au point contribuent à la constitution de l'image (Figure II-14B).

Ainsi, à l'aide de la microscopie confocale à balayage laser, on peut visualiser l'expression des protéines de collagènes après un marquage par immunofluorescence indirect en détection de fluorescence excitée de fluorochrome couplé à l'anticorps secondaire.





**Figure II-14 : Représentation schématique de la microscopie confocale à balayage laser**  
 A : Représentation schématique de la structure de la microscopie confocale à balayage laser ; B : Représentation schématique du principe de la microscopie confocale à balayage laser. [<http://confocal.medecine.uhp-nancy.fr>]

#### IV.7.2.2. Méthodologie

L'observation de l'expression de protéines collagéniques est réalisée en microscopie confocale Leica TCS SP2-AOBS (Leica Microsystems, Germany) équipée d'un filtre opto-acoustique accordable, de laser solides argon (457nm, 476nm, 488nm, 514 nm), laser hélium-néon (543 nm et 633 nm) et oscillateur femtoseconde VERDI (600-1100 nm), avec un objectif (x40/1,4 ; à immersion à eau). La longueur d'onde d'excitation de 488 nm et la longueur d'onde d'émission de 519 nm correspondant au fluorochrome (Alexa Fluor 488) couplé à l'anticorps secondaire ont été optimisées. Des images de haute résolution (512 x 512 pixels) sont obtenues, avec une taille de voxel : 250nm x 250nm x 400nm et avec un critère Rayleigh de 1.

#### IV.8. Analyse statistique

Toutes les données sont présentées en moyenne  $\pm$  *erreur standard de la moyenne*. Pour chaque patient, 3 intra-essais ont été réalisés. Les différences statistiques entre les groupes d'expériences ont été analysées par une analyse de variance de l'ANOVA à une direction à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, USA). Un test T de *Turky* a été effectué et les valeurs *p* inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives statistiquement.

## **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS**

## **I. Influence de l'expansion en monocouche sur l'expression de marqueurs de surface cellulaire et l'expression de gènes d'intérêts**

Les chondrocytes et les CSMs sont les deux types de cellules les plus utilisées en ingénierie tissulaire du cartilage. Avant de les ensemercer dans des biomatériaux, l'expansion cellulaire en monocouche est une étape essentielle pour obtenir une quantité suffisante de cellules. Cependant, une dédifférenciation rapide des chondrocytes et une diminution de la capacité de différenciation de CSMs, après un certain nombre de passages, a déjà décrit et peuvent limiter leur application dans la réparation du cartilage [Kafienah W *et al.*, 2002 ; Goldring MB *et al.*, 2006].

Le but de notre étude est de trouver un compromis entre l'expansion cellulaire en monocouche et le maintien et/ou l'apparition des caractéristiques chondrocytaires des cellules. L'expression des marqueurs de surface (CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 et CD166) ainsi que l'expression de certains gènes d'intérêt pour la définition du phénotype chondrocytaire (collagènes de type I, II, III et X, agrécanne, versican et Sox 9) ont été analysées pour chaque passage, de P0 à P5, lors de l'expansion en monocouche de chondrocytes et de CSMs.

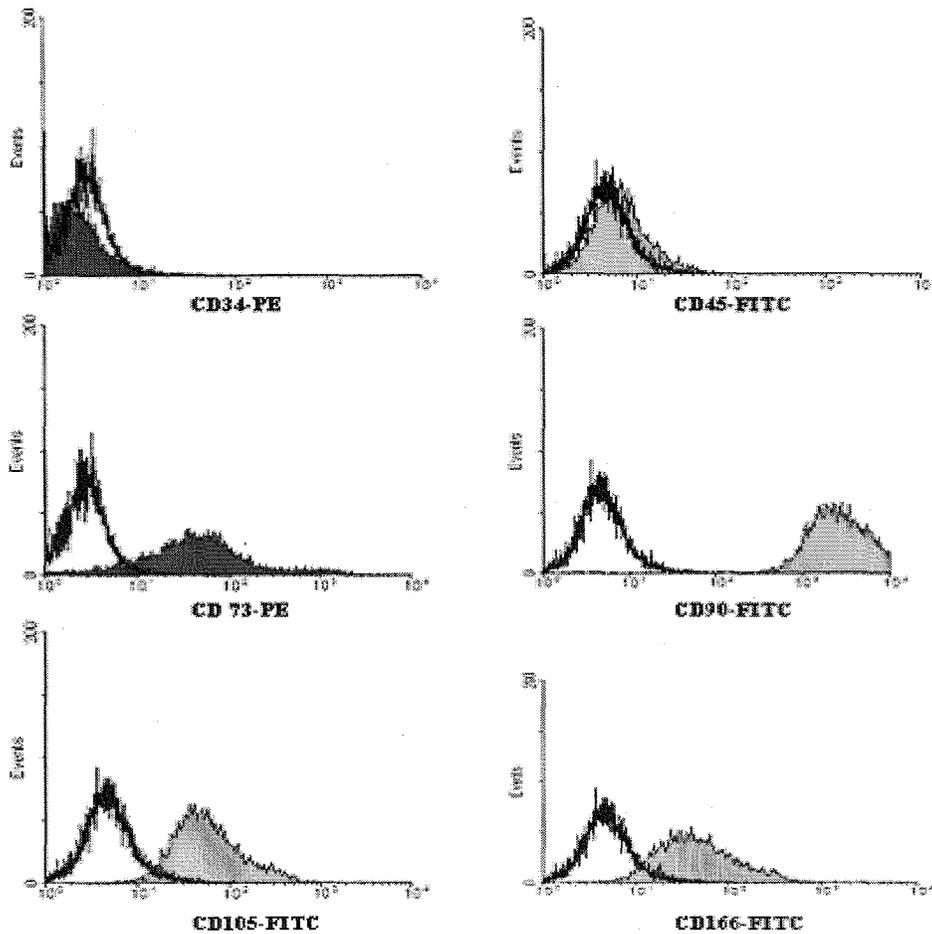
### ***1.1. Evolution des marqueurs de surface cellulaire et des gènes d'intérêt exprimés par les chondrocytes humains cultivés en monocouche en fonction du passage***

#### ***1.1.1. Expression des marqueurs de surface cellulaire***

Sur la Figure III-1 sont présentés des exemples d'histogrammes de fluorescence obtenus lors de l'analyse qualitative, par cytométrie en flux, des marqueurs de surface exprimés par des chondrocytes cultivés en monocouche.

L'histogramme blanc représente l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) obtenue lors de l'analyse du contrôle isotypique (cellules incubées avec un anticorps isotypique). L'histogramme gris représente l'IMF obtenue lors de l'analyse des échantillons cellulaires. La superposition des ces deux histogrammes montre que les chondrocytes humains n'expriment ni le marqueur de surface CD34 ni le marqueur de surface CD45. En revanche, ces cellules expriment les marqueurs CD73, CD90,

CD105 et CD166.



**Figure III-1 : Expression des marqueurs CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 et CD166 à la surface de chondrocytes humains (CMF) Les chondrocytes ont été marqués avec des anticorps monoclonaux spécifiques des les marqueurs indiqués dans chaque histogramme.**

□ : cellules marquées avec un anticorps isotypique,

■ : cellules marquées avec les anticorps monoclonaux spécifiques du marqueur de surface étudié et couplés à un fluorochrome (PE ou FITC).

La Figure III-2 représente la proportion de cellules positives pour un marqueur de surface cellulaire.

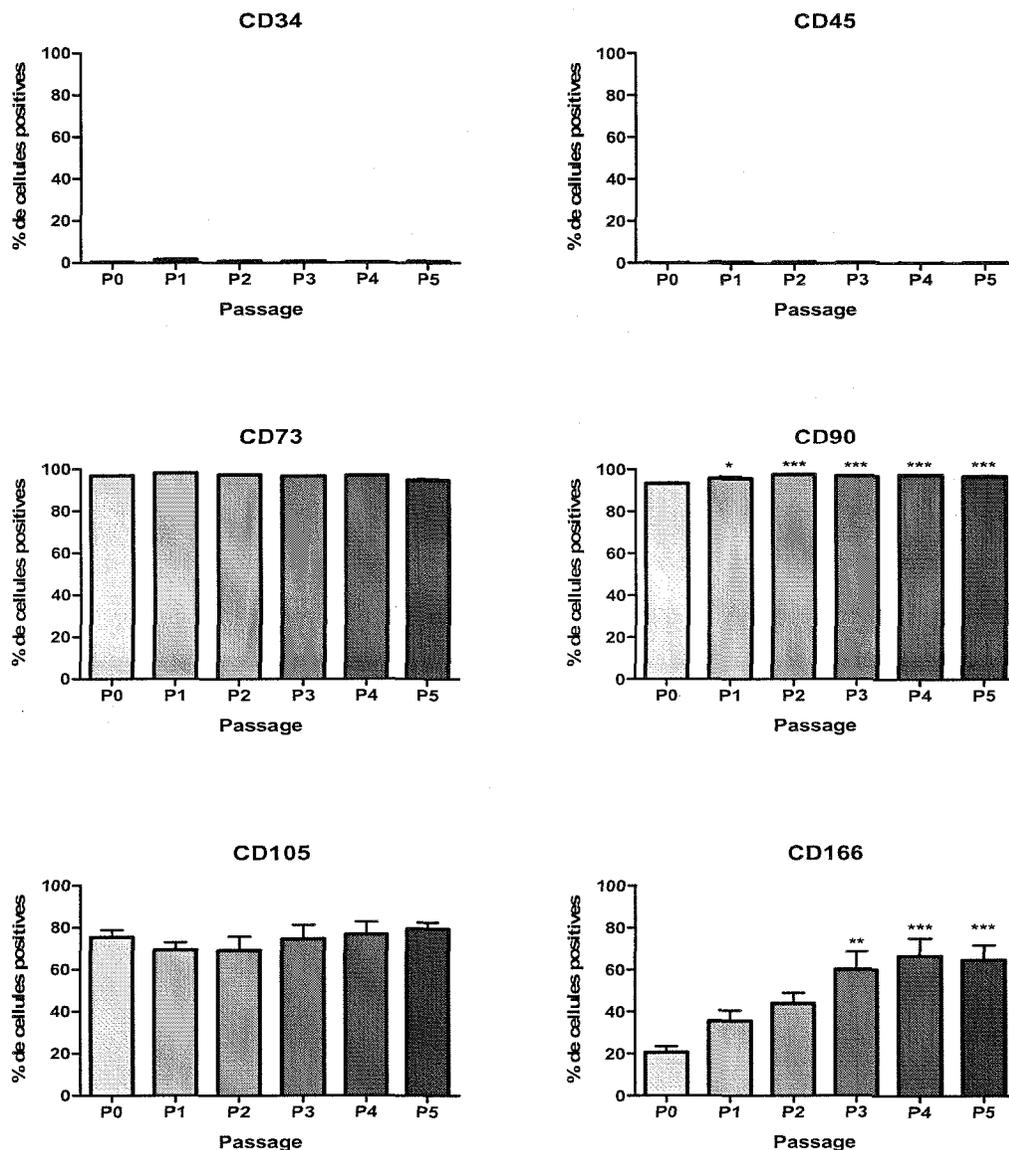
Il apparaît que, pour les marqueurs CD34 et CD45, le pourcentage de cellules positives est inférieur à 5%, quel que soit le passage.

Pour les marqueurs de surface CD73 et CD105, aucune variation significative n'est observée en fonction des passages [CD73 :  $96,8 \pm 1,2\%$  (P0) versus  $94,7 \pm 2,6\%$  (P5) ; CD105 :  $75,3 \pm 10,9\%$  (P0) versus  $79,3 \pm 11,2\%$  (P5)].

Pour le marqueur de surface CD90, bien qu'une différence significative soit

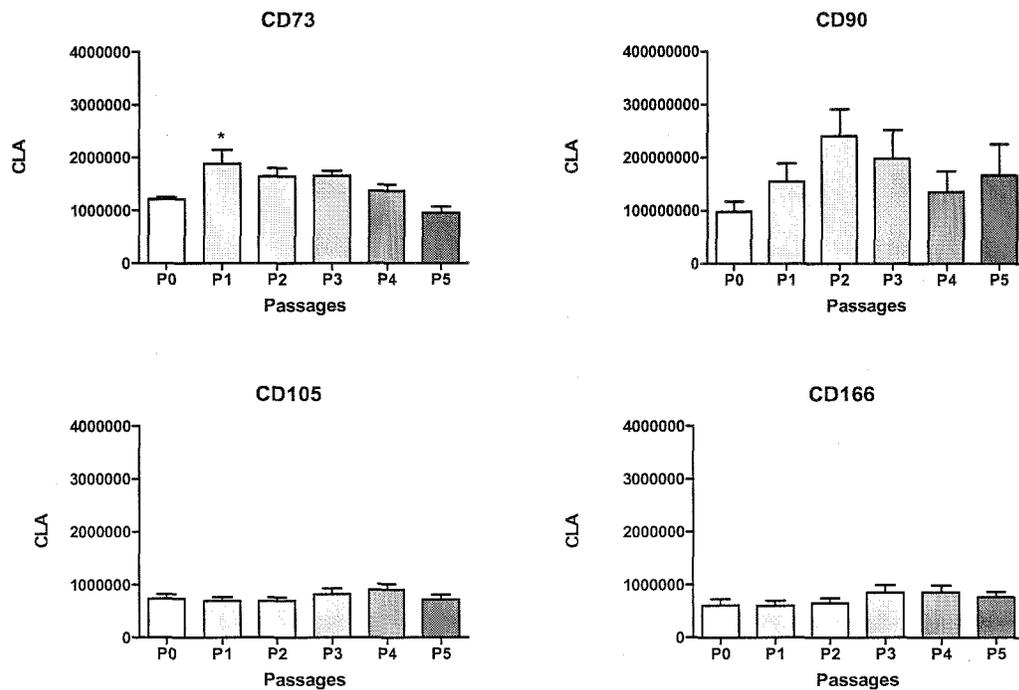
observée entre P0 et les autres passages (P1 versus P0 :  $P < 0,05$  ; P2 à P5 versus P0 :  $P < 0,001$ ), le pourcentage de cellules exprimant ce marqueur reste toujours supérieur à 95% tout le temps de l'expansion.

En revanche, pour le marqueur CD166, son expression à P0 est très faible par rapport aux précédents marqueurs ( $20,4 \pm 8,9\%$  versus  $96,8 \pm 1,2\%$ ,  $93,2 \pm 1,3\%$  et  $75,3 \pm 10,9\%$  pour CD73, CD90 et CD105 respectivement). Néanmoins, il apparaît que son expression augmente significativement en fonction du passage ( $P < 0,01$  dès P3).



**Figure III-2 : Pourcentage de cellules positives pour un marqueur de surface exprimé par des chondrocytes humains cultivés en monocouche (P0 à P5). (CMF). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne ( $n=4$ ). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , P1, P2, P3, P4, P5 versus P0.**

La Figure III-3 représente la Capacité Liante en Anticorps (CLA) pour chaque marqueur cellulaire exprimé à la surface des chondrocytes humains. Bien qu'aucune variation significative de la CLA ne soit observée pour les marqueurs CD73 et CD90 au cours de l'expansion en monocouche ( $P > 0,05$ ), il semble cependant qu'il existe une tendance à une réponse biphasique pour ces marqueurs. En effet, nous observons une augmentation de la CLA entre P0 et P1 pour CD73 et P0 et P2 pour CD90. Au-delà de P2, le nombre de ces marqueurs à la surface des chondrocytes tend à diminuer jusqu'à P5.



**Figure III-3 : Capacité liante en anticorps (CLA) pour les marqueurs cellulaires exprimés à la surface des chondrocytes humains cultivés en monocouche (P0 à P5). (CMF). Les valeurs d'IMF pour chaque marqueur sont transformées en nombre de sites antigéniques à l'aide de la droite d'étalonnage constituée d'après l'analyse simultanée de microsphères de calibration (cf. Matériel et Méthodes paragraphe IV.4.3.2). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne ( $n=4$ ). \* $P < 0,05$ , P1, P2, P3, P4, P5 versus P0.**

### *I.1.2. Expression de gènes d'intérêt*

Le Figure III-4 présente les résultats de l'expression de gènes d'intérêt (collagènes de type I, II, IIA, III et X, agrécanne, versican et Sox 9) obtenus par analyse en PCR quantitative.

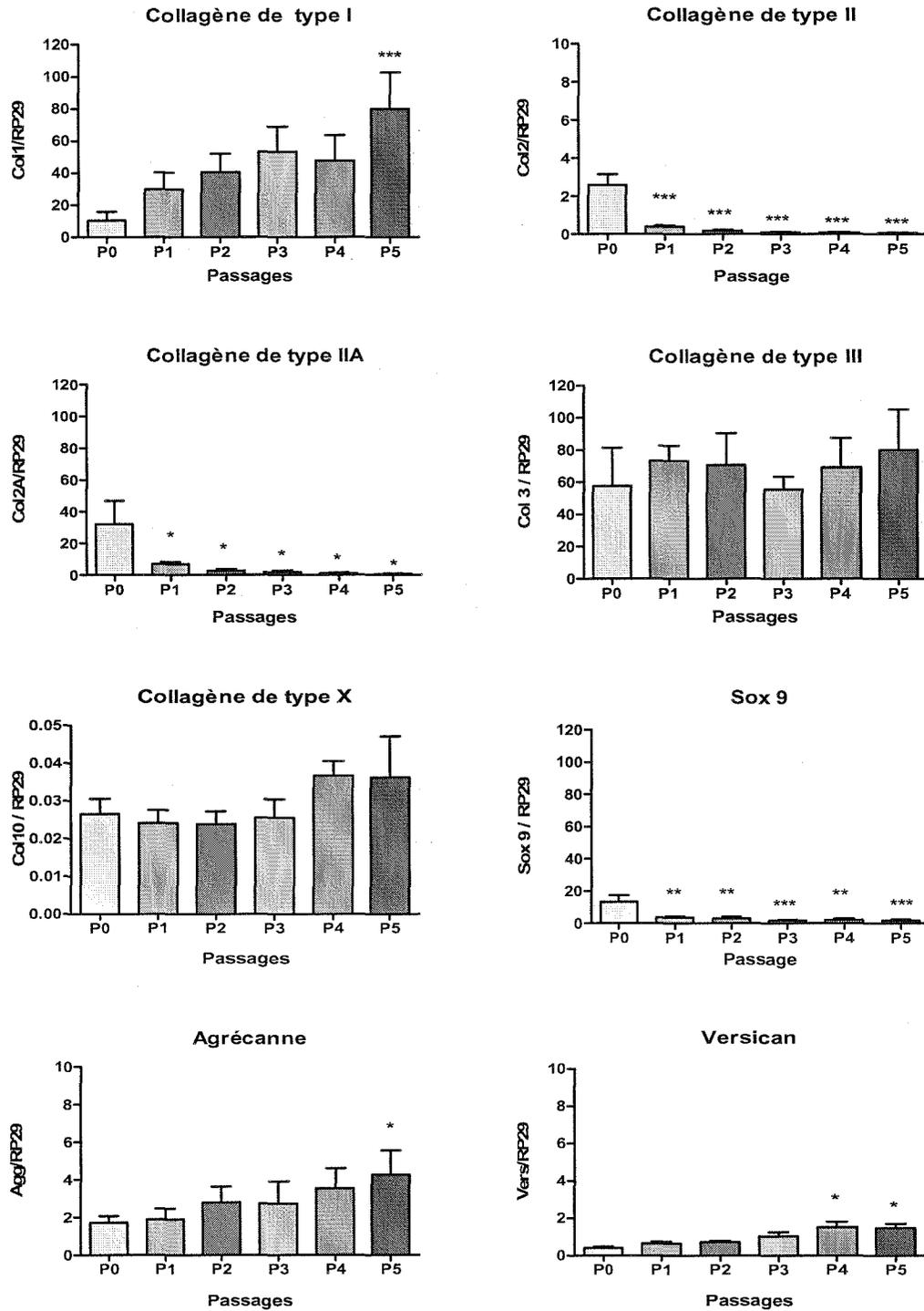


Figure III-4 : Expression de gènes codant pour les différentes protéines d'intérêt exprimés par des chondrocytes en fonction du passage. Les données, obtenues par PCRq, ont été normalisées et sont exprimées sous forme du rapport : gène / RP29. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne ( $n=4$ ). \*  $P<0,05$  ; \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$ , P1, P2, P3, P4, P5 versus P0.

L'expression des gènes codant pour le collagène de type I, l'agrécane et le versican semble augmenter en fonction du passage. Cette évolution ne devient significative qu'à partir de P5 pour le collagène de type I ( $P < 0,001$ ) ainsi que pour l'agrécane ( $P < 0,05$ ) et de P4 pour le versican ( $P < 0,05$ ).

En revanche, l'expression des gènes codant pour les collagènes de type II et IIA ainsi que pour Sox9 diminue significativement à partir de P1.

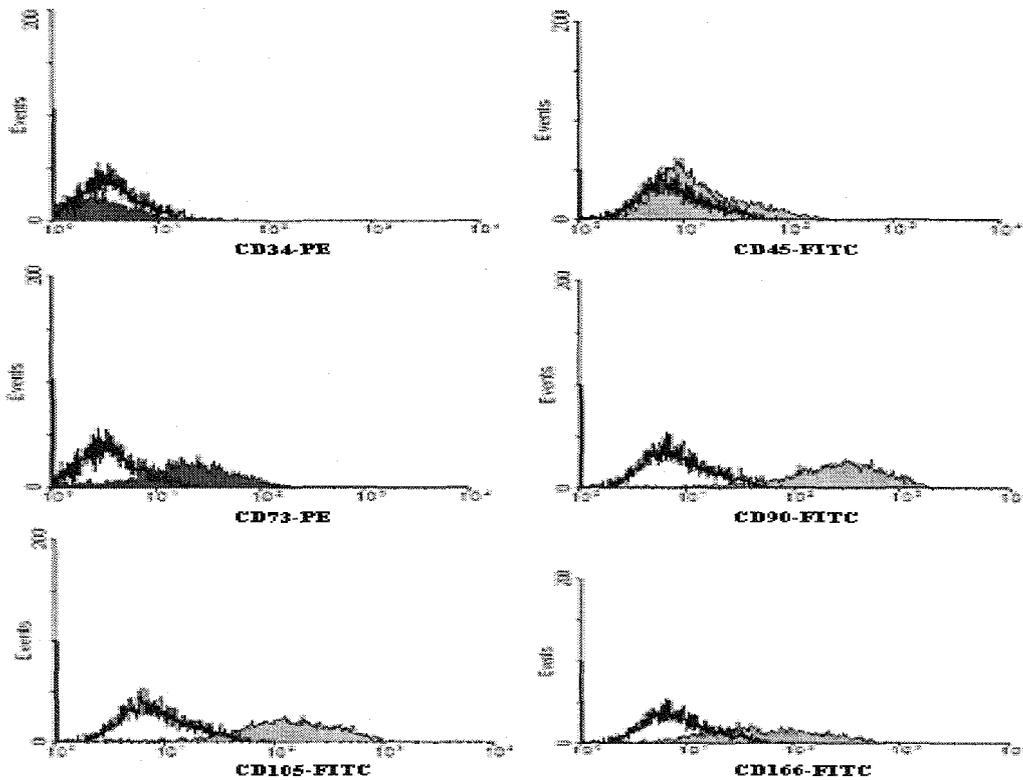
Enfin, pour certains gènes tels que le collagène de type III et X, aucune évolution significative n'est observée en fonction du passage ( $P > 0,05$ ).

## ***1.2. Evolution des marqueurs de surface cellulaire et de gènes d'intérêt exprimés par les CSMs humains cultivés en monocouche en fonction du passage***

### ***1.2.1. Expression des marqueurs de surface cellulaire***

Sur la Figure III-5 sont représentés des exemples d'histogrammes de fluorescence, obtenus lors de l'analyse cytométrique, des marqueurs de surface exprimés par des CSMs cultivées en monocouche.

De la même façon que pour les chondrocytes, l'histogramme blanc et l'histogramme gris représentent, l'IMF obtenue lors de l'analyse du contrôle isotypique et des échantillons cellulaires, respectivement. La superposition de ces deux histogrammes montre que les CSMs humaines n'expriment ni le marqueur de surface CD34, ni le marqueur de surface CD45. En revanche, ces cellules expriment les marqueurs CD73, CD90, CD105 et CD166.



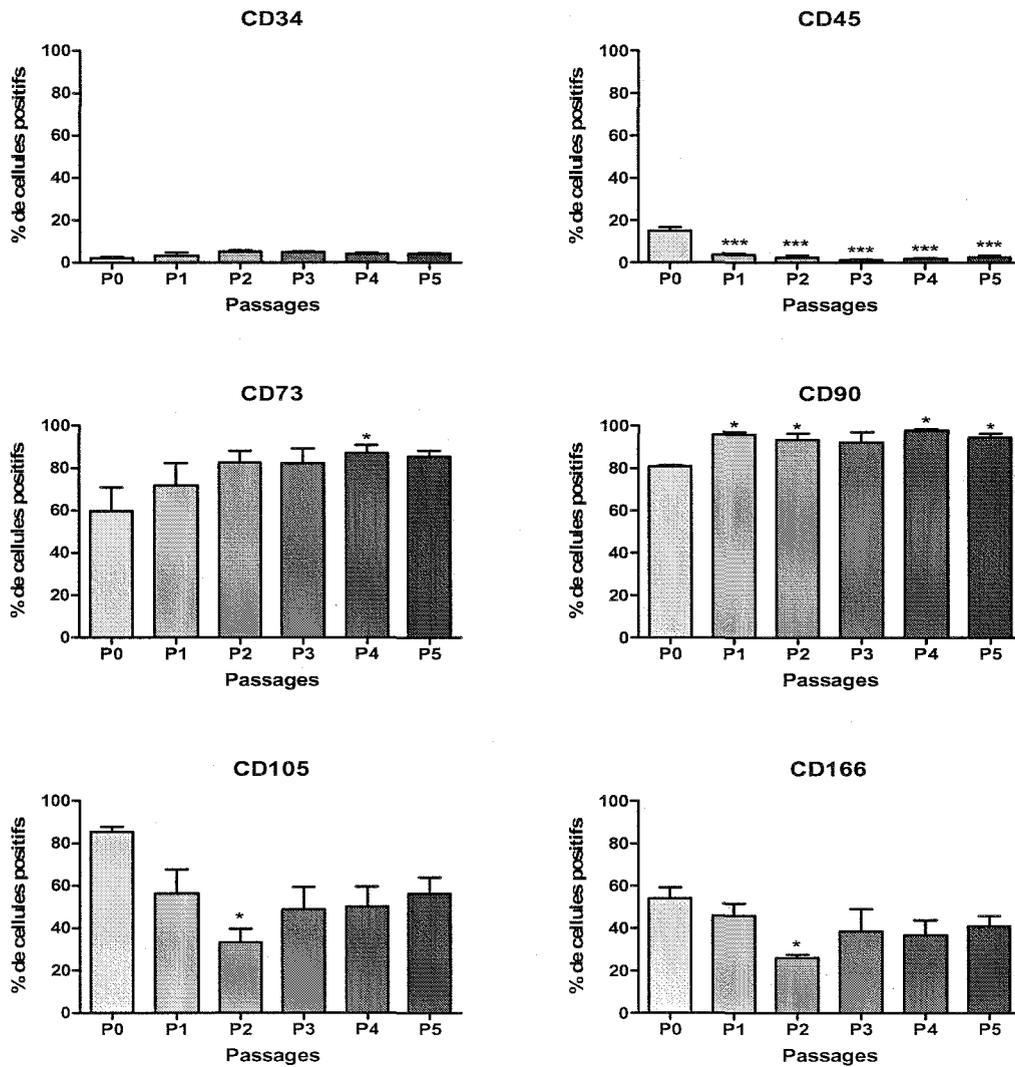
**Figure III-5 : Expression des marqueurs CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 et CD166 à la surface de CSMs humaines (CMF). Les CSMs ont été marquées avec des anticorps monoclonaux spécifiques des marqueurs étudiés.**

□ : cellules marquées avec un anticorps isotypique,  
■ : cellules marquées avec les anticorps monoclonaux spécifiques du marqueurs de surface étudiés et couplés à un fluorochrome (PE ou FITC).

La Figure III-6 représente la proportion de cellules exprimant les marqueurs de surface cellulaire.

Il apparaît que pour le marqueur CD34, le pourcentage de cellules positives est inférieur à 5%, quels que soient les passages. En revanche, pour le marqueur CD45, le pourcentage de cellules positives à P0 est de  $14,9 \pm 3,5\%$  puis diminue significativement, à partir de P1, pour se stabiliser à moins de 5% jusqu'à P5 ( $P < 0,001$ ).

Pour le marqueur de surface CD73, le pourcentage de cellules CD73<sup>+</sup> semble augmenter de P0 à P2. Au-delà de P2, ce pourcentage se stabilise pour rester supérieur à 80% jusqu'à la fin de l'expansion en monocouche.

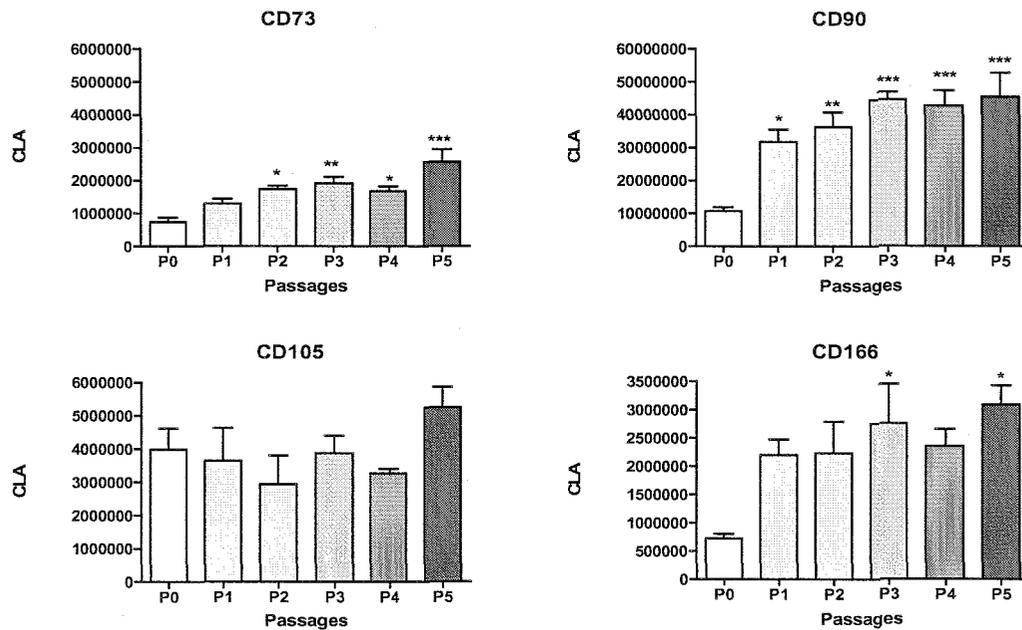


**Figure III-6 : Pourcentage de cellules positives pour un marqueur de surface exprimé par des CSMs humaines cultivées en monocouche (P0 à P5). (CMF). Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne ( $n=4$ ). \*  $P<0,05$ , \*\*\* $P<0,001$ , P1, P2, P3, P4, P5 versus P0.**

Pour le marqueur de surface CD90, le pourcentage de cellules CD90<sup>+</sup> augmente significativement entre P0 et P1 pour atteindre 95% à P1 ( $P<0,05$ ).

Enfin, pour les marqueurs CD105 et CD166, une évolution biphasique est observée. En effet, une diminution significative du pourcentage de cellules CD105<sup>+</sup> et CD166<sup>+</sup> est observée de P0 à P2 ( $P<0,05$ ), puis ces proportions semblent augmenter à P3 pour se stabiliser jusqu'à P5.

La Figure III-7 représente la CLA pour chaque marqueur cellulaire exprimé à la surface de CSMs humaines.

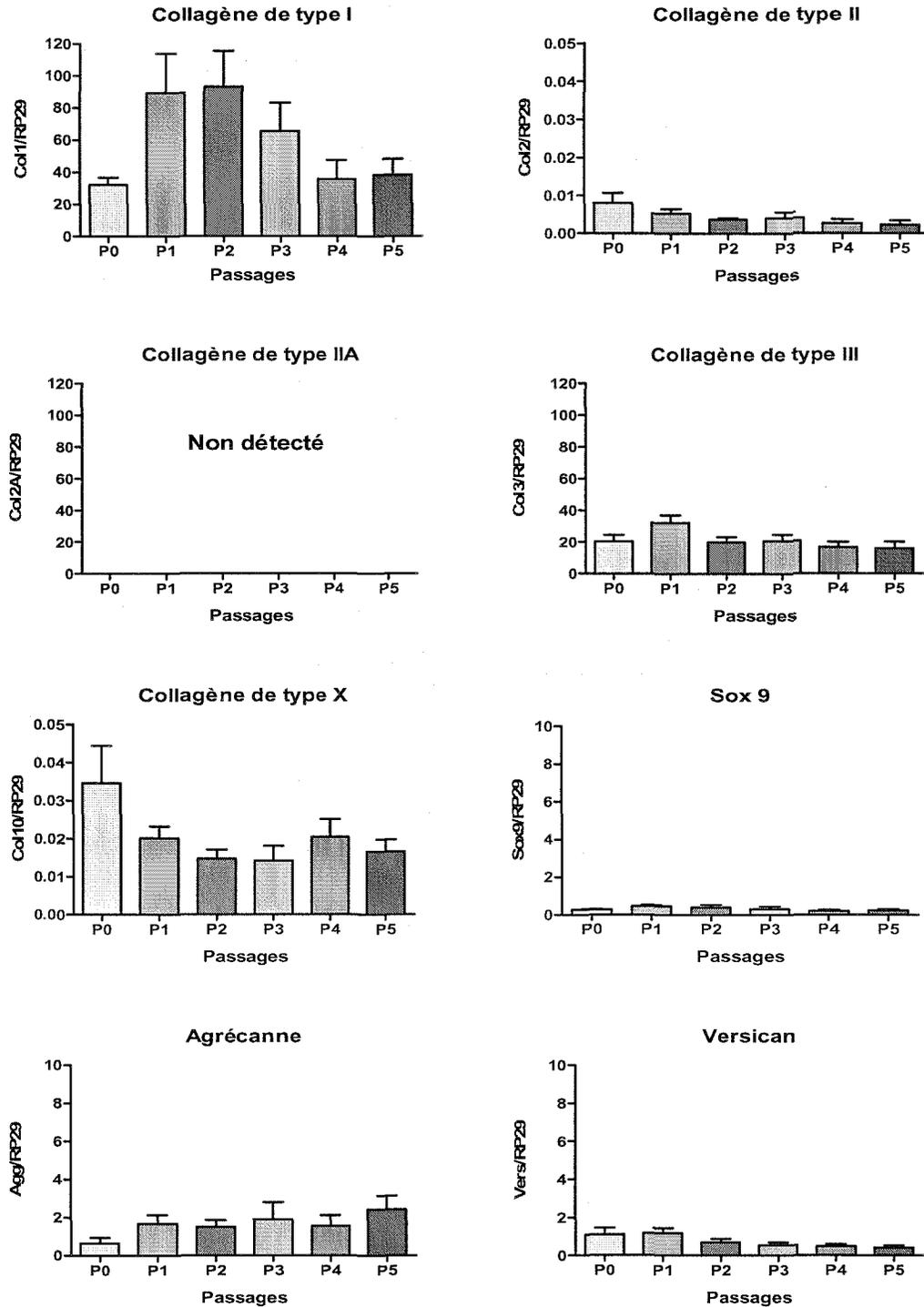


**Figure III-7 : Capacité liante en anticorps (CLA) pour chaque marqueur cellulaire exprimé à la surface des CSMs humaines cultivées en monocouche (P0 à P5).** (CMF) Les valeurs d'IMF de chaque marqueur sont transformées en nombre de sites antigéniques à l'aide de la droite d'étalonnage constituée d'après l'analyse simultanée de microsphères de calibration (cf. Matériel et Méthodes paragraphe IV.4.3.2). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne ( $n=4$ ). \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$ , P1, P2, P3, P4, P5 versus P0.

Pour les marqueurs CD73, CD90 et CD166, la CLA augmente régulièrement en fonction du passage. Cette évolution devient significative à partir de P1, P2 et P3 pour le marqueur CD73, CD90 et CD166 respectivement. En revanche, pour le marqueur de surface CD105, aucune variation significative de la CLA n'est notée en fonction du passage.

### I.2.2. Expression de gènes d'intérêt

Sur la Figure III-8 sont présentés les résultats de l'expression de gènes d'intérêts (collagènes de type I, II, IIA, III et X, agrécanne, versican et Sox 9) obtenus par analyse en PCR quantitative.



**Figure III-8 : Expression de gènes codant pour des différentes protéines d'intérêt exprimés par des CSMs en fonction du passage. Les données obtenues en PCRq sont normalisées et exprimées sous forme du rapport : gène / RP29. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne ( $n=4$ ).**

Aucune variation significative de l'expression des gènes d'intérêt n'est notée lors de l'expansion en monocouche des CSMs ; bien qu'il semble que le rapport de gène col I/RP29 soit plus important que les autres rapports des gènes. De plus, il

semble que le gène codant pour le collagène de type I suive une évolution biphasique au cours des passages et soit plus exprimé de P1 à P2. Toutefois notons que le collagène de type II est très peu exprimé. Enfin, aucune trace du gène codant pour le Col IIA n'a été détectée au cours de l'expansion en monocouche des CSMs

### ***I.3. Discussion***

Dans cette partie, nous avons contrôlé l'influence de l'expansion cellulaire en monocouche sur le phénotype des cellules ainsi que sur leur état de différenciation. Nous avons étudié l'essentiel des marqueurs phénotypiques issus des chondrocytes ainsi que des CSMs : d'une part, les clusters de différenciation caractéristiques des états de différenciation, d'autre part, les paramètres matriciels. Cette étape est primordiale pour définir les paramètres d'étude régissant la suite de nos travaux.

*Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression des marqueurs de surface cellulaire caractérisant les CSMs ainsi que leur état de différenciation : CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 et CD166. Dans un souci de comparaison, nous avons réalisé la même étude sur les chondrocytes.*

D'une part, nos résultats montrent, que les chondrocytes et les CSMs présentent un phénotype CD34<sup>+</sup> et CD45<sup>-</sup>.

Rappelons que le marqueur CD34 est une molécule de surface exprimée sur les cellules hématopoïétiques de morphologie indifférenciée, en particulier d'origine médullaire [Baumhueter S *et al.*, 1994].

De même, le marqueur CD45 est une molécule transmembranaire exprimée à la surface de toutes les cellules hématopoïétiques nucléées ainsi que de leurs précurseurs, excepté les érythrocytes et les plaquettes matures [Trowbridge IS *et al.*, 1994].

Ainsi, nos résultats, en accord avec de nombreuses études, confirment que les cellules amplifiées en monocouche ne sont pas des CSHs. Par ailleurs, la sélection de CSMs vis-à-vis des CSHs, à partir de la moelle osseuse, repose, tout d'abord, sur la capacité d'adhésion des CSMs au plastique, comme l'a décrit Rhodes NP *et al.* [Rhodes NP *et al.*, 2004]. Bien qu'il existe une contamination faible de cellules

hématopoïétiques lors du premier ensemencement (% de cellules CD45<sup>+</sup>=14,15%), ce pourcentage devient négligeable dès P1 et ce jusque P5 (à P5 : % de cellules CD45<sup>+</sup><5%). Ce résultat est également décrit par d'autres études qui rencontrent fréquemment une contamination de cellules hématopoïétiques dans les cultures de CSMs issues de la moelle osseuse obtenue de donneurs adultes [Mareschi K *et al.*, 2006].

D'autre part, nos résultats montrent que les chondrocytes et les CSMs possèdent le phénotype CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> et CD166<sup>+</sup> durant toute la durée de l'expansion en monocouche.

Le marqueur CD73 est une enzyme catabolique de la déphosphorylation de ribonucléosides monophosphates qui métabolise spécifiquement l'AMP en adénosine [Eltzschig HK *et al.*, 2006]. Ce marqueur joue également un rôle dans l'adhérence cellulaire [Airas L *et al.*, 1995]. Enfin, Krampera M *et al.* le décrivent comme étant associé à la différenciation de CSMs. En effet, ces auteurs ont montré que *son expression diminuait fortement après différenciation de ces cellules*. Il serait également exprimé sur les cellules engagées dans la phase de prolifération. [Krampera M *et al.*, 2005].

Le marqueur CD90/Thy-1 est une glycoprotéine de surface cellulaire exprimée sur une minorité de chondrocytes issus du cartilage articulaire sain (<5%) [Summers KL *et al.*, 1995]. Lorsque les chondrocytes sont mis en culture en monocouche, Diaz-Romero J *et al.* ont rapporté que ces cellules se mettaient à exprimer cette glycoprotéine, dès les premiers jours de l'expansion. Selon ces auteurs, le marqueur CD90 pourrait être considéré comme un marqueur du stade de différenciation des chondrocytes [Diaz-Romero J *et al.*, 2005]. En ce qui concerne les CSMs, plusieurs études ont montré que le marqueur CD90 était exprimé à leur surface et plus particulièrement à la surface des CSMs indifférenciées [Krampera M *et al.*, 2005]. Par ailleurs, *son expression diminue une fois que les CSMs s'engagent dans la voie de différenciation chondrocytaire ou ostéogénique* [Krampera M *et al.*, 2005 ; Wiesmann A *et al.*, 2006 ].

Le marqueur CD105/Endogline est une protéine transmembranaire associée aux récepteurs de TGF- $\beta$ s et forme un complexe qui entre dans la voie de signalisation des TGF- $\beta$ s [Barry FP *et al.*, 1999]. Chez les chondrocytes, son expression est inversement proportionnelle à la capacité de synthèse de la matrice cartilagineuse, ainsi que l'a observé Dell'Accio F *et al.*, chez le rat [Dell'Accio F *et al.*, 2001]. ***La protéine transmembranaire CD105 serait donc un marqueur prédictif permettant d'évaluer la capacité des chondrocytes à former une matrice cartilagineuse.*** Par ailleurs, le marqueur CD105 est également présent à la surface des CSMs [Cheifetz S *et al.*, 1992]. Il a été montré que les cellules progénitrices exprimant le marqueur CD105 étaient capables de s'engager dans la voie de différenciation chondrocytaire [Majumdar MK *et al.*, 2000].

Le marqueur CD166/ALCAM intervient dans les interactions cellule-cellule [Swart GW, 2002]. Il est exprimé à la surface des CSMs lors des phases de prolifération [Swart GW, 2002]. Récemment, sa présence a été montrée à la surface des chondrocytes, après culture en monocouche, donc à la surface de cellules en voie de dédifférenciation [Diaz-Romero J *et al.*, 2005]. ***Son expression diminue dès lors que les cellules sont engagées dans la voie de différenciation ostéogénique*** [Bruder SP *et al.*, 1997]. ***Il est donc un marqueur du stade de différenciation.***

Nos résultats seront discutés dans un premier temps en fonction du pourcentage de cellules positives par un marqueur puis en fonction du nombre de sites par cellules. Ces deux paramètres peuvent, en effet, varier indépendamment l'un de l'autre [Gigant C *et al.*, 2001].

En ce qui concerne les chondrocytes, comme le montre le tableau III-1, le pourcentage de cellules CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup> et CD105<sup>+</sup> ne varie pas en fonction du passage. Dans ce cas, nous avons observé une synergie avec l'évolution du nombre du site. D'après les études réalisées sur ces marqueurs, il apparaît que les chondrocytes présentent un caractère dédifférencié (CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup> et CD166<sup>+</sup>), avec une capacité de synthèse de la matrice cartilagineuse moindre (CD105<sup>+</sup>) dès la mise en culture en monocouche [Diaz-Romero J *et al.*, 2005].

Pour les CSMs, nous avons observé un phénomène différent des chondrocytes. En effet, le pourcentage de cellules CD73<sup>+</sup> et CD90<sup>+</sup> augmente après P1, et se stabilise alors que le nombre de sites augmente de P1 à P5. Comme il a été montré, ces marqueurs étaient plus fortement exprimés à la surface de CSMs non engagées dans une voie de différenciation [Krampera M *et al.*, 2005 ; Wiesmann A *et al.*, 2006]. Il se pourrait, qu'à P0, il existe une faible proportion de cellules déjà engagées dans une différenciation cellulaire. Ces précurseurs mésenchymateux se dédifférencieraient au cours des passages, justifiant le nombre de sites plus important à la surface des cellules à P5. En revanche, pour les marqueurs CD105 et CD166, une évolution biphasique du pourcentage de cellule exprimant ces récepteurs est observée, traduisant une variation du phénotype entre P0-P2 et P2-P5, pour aboutir, à P5, à un phénotype maintenu « indifférencié ».

Le suivi de la proportion de cellules positives pour les marqueurs étudiés montre que pour les CSMs, le phénotype de ces cellules varie entre P0 et P5. Il ne se stabilise qu'à partir de P2, passage pour lequel les cellules retrouvent un phénotype indifférencié.

Le tableau III-2 compare le nombre de sites de ces marqueurs à la surface de chaque type cellulaire.

Le nombre de sites du marqueur CD73 à la surface des CSMs et des chondrocytes est similaire au cours des passages. Ce marqueur est non seulement un facteur de différenciation, mais il est également associé aux cellules engagées dans un stade de prolifération [Krampera M *et al.*, 2005]. Ces résultats sont en adéquation avec des études antérieures, qui montrent que la culture en monocouche favorise non seulement la prolifération des CSMs ou des chondrocytes mais aussi la dédifférenciation de ces derniers [Domm C *et al.*, 2002 ; Diaz-Romero J *et al.*, 2005].

**Tableau III-1 : Comparaison de la proportion de chondrocytes ou de CSMs positifs pour un marqueur.** Les résultats présentés dans ce tableau montrent, tout d'abord, l'évolution du marqueur étudié entre P0 et P5 (schématisée par des flèches) ainsi que la proportion de cellules positives pour le marqueur obtenue à P5.

Proportion de cellules positives (%)	Chondrocytes	CSMs
CD34	Non exprimé	Non exprimé
CD45	Non exprimé	Non exprimé (14.9% à P0)
CD73	→ >90%	↗ → >80%
CD90	→ >90%	↗ → >90%
CD105	→ >80%	↘ ↗ ≈ 60%
CD166	↗ >60%	↘ ↗ ≈ 40%
<b>Conclusion</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Cellule dans un stade de prolifération</li> <li>● Caractère dédifférencié</li> <li>● Capacité moindre de synthèse d'une matrice extracellulaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Cellule dans un stade de prolifération</li> <li>● Phénotype maintenu « indifférencié »</li> <li>● Présence de précurseurs mésenchymateux qui se dédifférencieraient au cours des passages ?</li> </ul>

**Tableau III-2 : Comparaison du nombre de sites CD73, CD90, CD105 et CD166 à la surface de chondrocytes ou de CSMs.** Les résultats, présentés dans ce tableau, montrent, tout d'abord, l'évolution du nombre de sites par cellule entre P0 et P5 (schématisée par des flèches) ainsi que le nombre approché de sites du marqueur obtenu à P5.

Nombre de sites	Chondrocytes	CSM	Conclusion
CD73	↗ ↘ ≈ 1-2x10 <sup>6</sup>	↗ ≈ 2x10 <sup>6</sup>	Etat de prolifération : <b>Chondrocytes = CSMs</b>
CD90	→ ≈ 2x10 <sup>8</sup>	↗ ≈ 5x10 <sup>7</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Chondrocytes engagés dans un état de dédifférenciation</li> <li>● CSMs non engagés dans la voie de différenciation chondrocytaire ou ostéogénique</li> </ul>
CD105	→ ≈ 1x10 <sup>6</sup>	→ ≈ 5x10 <sup>6</sup>	Capacité de synthèse d'une MEC: <b>Chondrocytes &gt; CSMs</b>
CD166	→ ≈ 1x10 <sup>6</sup>	↗ ≈ 3x10 <sup>6</sup>	Maturité des cellules : <b>Chondrocytes &gt; CSMs</b>

Par ailleurs, les chondrocytes expriment environ 6 fois plus de marqueur CD90 que les CSMs. Selon Diaz-Romero J *et al.*, ce marqueur est d'autant plus exprimé à la surface des chondrocytes que les cellules sont à un stade dédifférencié [Diaz-Romero J *et al.*, 2005]. Par contre, pour les CSMs, nous avons observé un nombre de sites plus faible à P0, qui traduit la présence de cellules « précurseur » déjà en stade de différenciation. Ces cellules semblent, au cours des passages, se dédifférencier pour retrouver, à partir de P3, un phénotype indifférencié. Comme l'a indiqué Bruder SP *et al.* [Bruder SP *et al.*, 1997], les cellules ne sont donc pas encore engagées dans une voie de différenciation.

En revanche, les marqueurs CD105 et CD166 sont, de manière générale, plus exprimés par les CSMs par rapport aux chondrocytes. Ces données montrent que les chondrocytes possèdent non seulement une capacité de synthèse matricielle plus importante que les CSMs et que ces chondrocytes sont également des cellules plus matures que les CSMs.

En conclusion, le pourcentage de cellules positives pour un marqueur nous informe qualitativement sur le phénotype des cellules. Cette donnée semble indispensable pour le suivi du phénotype d'un type de cellule au cours de l'expansion en monocouche. En revanche, dès que l'on veut pouvoir comparer les stades de différenciation entre les chondrocytes et les CSMs, nos résultats montrent que les variations entre les deux types de cellules se situent au niveau du nombre de sites par cellule.

Par ailleurs, il apparaît que si les 2 types de cellules expriment les marqueurs qualitativement et quantitativement, les variations de ces expressions témoignent de capacités différentes, entre les cellules, à synthétiser une matrice extracellulaire mais également d'un état d'avancement différent dans leurs stades de différenciation. Ceci implique qu'il faut être vigilant quand au choix d'utilisation des cellules en fonction du passage. En effet, selon les passages, le phénotype des cellules peut varier. Il faut donc trouver le bon compromis entre la quantité de cellules et le maintien de leur phénotype. Ainsi, à l'issue de cette étude, il semblerait que, pour les chondrocytes, le compromis

entre dédifférenciation des cellules et expansion doit se faire avant P2 tandis que pour les CSMs, le compromis entre stabilité du phénotype et expansion peut se faire à partir de P3.

*Dans un deuxième temps, nous avons étudié d'une part l'expression des gènes (collagène de type II, IIA, Sox9 et agrécanne) spécifiques aux chondrocytes natifs, des gènes (collagène de type I, III et versican) spécifiques des chondrocytes dédifférenciés, et d'autre part l'expression des gènes (collagène de type X) spécifiques des chondrocytes hypertrophiques.*

Rappelons que les collagènes de type II et IIA ainsi que Sox9 sont des marqueurs phénotypiques du chondrocyte natif. Lors de la dédifférenciation des chondrocytes, leur expression est diminuée [Domm C *et al.*, 2002]. Les collagènes de type II et IIA ainsi que Sox 9 sont exprimés également chez les CSMs engagées dans la chondrogenèse [Goldring MB *et al.*, 2006].

Les collagènes de type I et III sont des marqueurs spécifiques des fibroblastes, une quantité très faible du collagène de type I et III est exprimée par les chondrocytes natifs [Cremer MA *et al.*, 1998 ; Aigner T *et al.*, 1993]. Une fois que les chondrocytes s'engagent dans un processus de dédifférenciation, l'expression des collagènes de type I et III augmente [Domm C *et al.*, 2002]. De plus, les collagènes de type I et III sont exprimés chez les CSMs indifférenciées [Silva WA *et al.*, 2003].

Le collagène de type X est exprimé par les chondrocytes hypertrophiques. L'apparition du collagène de type X marque le début de l'étape hypertrophique dans la chondrogenèse de CSMs [Shen G *et al.*, 2005].

L'agrécanne est un des protéoglycannes principaux présents dans la MEC du cartilage [Kolettas E *et al.*, 1995]. Il est également exprimé chez les CSMs engagées dans la chondrogenèse [Goldring MB *et al.*, 2006]. Il peut aussi être détecté chez les fibroblastes synoviaux [Scaife S *et al.*, 2004].

Enfin, le versican est une glycoprotéine qui fait partie de la famille des chondroïtine et kératane sulfates. Une quantité très faible de versican est observé chez les chondrocytes natifs. Son expression augmente lors de la dédifférenciation. Il a été

montré que le versican, exprimé chez les CSMs engagées dans l'étape de condensation, peut favoriser la prolifération de CSMs mais inhiber la chondrogénèse [Zhang Y *et al.*, 2001].

Comme l'indique le tableau III-1, dès P1, l'expression des gènes codant pour le collagène de type II ainsi que Sox9 diminue significativement alors que l'expression du gène codant pour le collagène de type I augmente. Ceci indique une dédifférenciation des chondrocytes au cours de l'expansion cellulaire en monocouche. Nos résultats sont en accord avec ceux de Chua KH *et al.*, qui ont observé une diminution du rapport de l'expression de col II/col I ainsi que de l'expression du gène codant pour les agrécannes en fonction du passage [Chua KH *et al.*, 2005]. L'augmentation de l'expression du versican observée à la fin de l'expansion peut s'expliquer par le fait que ces gènes sont également exprimés chez les chondrocytes dédifférenciés [Scaife S *et al.*, 2004].

En ce qui concerne les CSMs, nos résultats montrent que, quels que soient les passages, les cellules expriment une quantité importante de collagènes de type I et III. Par contre, une quantité très faible de gènes spécifiques des chondrocytes tels que les collagènes de type II et IIA, Sox9, agrécane et versican est détectée chez les CSMs, ce qui signifie que les CSMs maintiennent leur état indifférencié lors de la culture en monocouche.

**Tableau III-3 : Comparaison de l'expression de gènes par des chondrocytes ou des CSMs.** Les résultats, présentés dans ce tableau, montrent, l'évolution de l'expression de gènes étudiés entre P0 et P5 (schématisée par des flèches)

L'expression de gènes	Chondrocytes (Chon)	CSM
Collagène de type I	à partir de P1 ↗, significative à P5	→
Collagène de type II	à partir de P1 ↘	→ faible
Collagène de type IIA	à partir de P1 ↘	Non détecté
Collagène de type III	→	→
Collagène de type X	→	→ faible
Sox9	à partir de P1 ↘	→ faible
Agrécane	à partir de P1 ↗ significative à P5	→
Versican	à partir de P1 ↗ significative à P4 et P5	→
<b>Conclusion</b>	à partir de P1, Chon dédifférenciés	CSMs indifférenciées

***Conclusion générale***

Nos résultats démontrent que l'expansion cellulaire en monocouche peut induire une dédifférenciation évidente des chondrocytes à partir de P2. Ainsi, les chondrocytes de P1 cultivés en monocouche seront retenus pour êtreensemencés dans des biomatériaux au cours des expériences suivantes.

En revanche, les CSMs cultivées en monocouche jusqu'à P5, ne perdent pas leur phénotype indifférencié et présentent un phénotype stable à partir de P3. Étant donné qu'une quantité suffisante de cellules peut être obtenue à partir de P3, les CSMs seront alors multipliées par culture en monocouche jusqu'à P3 avant d'êtreensemencées dans des biomatériaux.

## **II. Influence de la stimulation mécanique sur la réponse des chondrocytes et des CSMs encapsulés dans un hydrogel d'alginate/HA : effets des entrechoquements**

Il est bien connu que la culture dans un système tridimensionnel ainsi que la stimulation mécanique peuvent favoriser le maintien d'un phénotype chondrocytaire dans le cas des chondrocytes, et également la chondrogenèse de CSMs ainsi que l'expression d'une MEC de type cartilagineux [cf. étude bibliographique paragraphe III.2.2 et III.4].

Ainsi que nous l'avons déterminé précédemment et afin de respecter un compromis entre l'expansion cellulaire en monocouche et le maintien des phénotypes indifférenciés des CSMs ou chondrocytaire, nous avons soumis des chondrocytes (P2) et des CSMs (P4), encapsulés dans une matrice tridimensionnelle (hydrogel d'alginate/HA), à une contrainte mécanique d'entrechoquement des billes dans un système de type « lit fluidisé », après différents temps de contrainte, choisis pour représenter une « activité quotidienne ».

Cette technique permettra d'appliquer certaines contraintes mécaniques (cisaillement dû aux mouvements des fluides, faible compression) aux billes grâce à l'entrechoquement entre elles. Cependant, les contraintes dans ce cas ne sont pas maîtrisées, elles ne seront définies qu'en terme de durée et de cycle d'agitation.

Les principaux paramètres étudiés, dans cette partie, ont été les paramètres liés aux activités métaboliques [viabilité, activités métaboliques (NADPH, FADH *etc.*), prolifération] et aux activités de synthèse de la MEC.

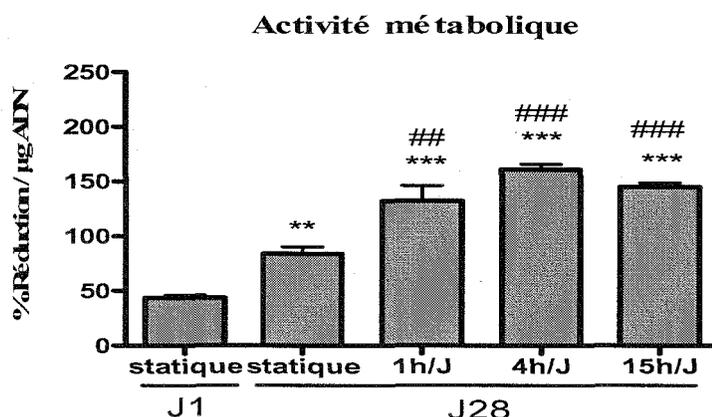
### **II.1. Réponse des chondrocytes**

#### *II.1.1. Activité métabolique*

L'activité métabolique des chondrocytes a été évaluée après 1 jour et 28 jours de culture grâce à un dosage biochimique colorimétrique (Alamar Blue<sup>®</sup>). Les résultats sont ensuite ramenés à la quantité d'ADN présente dans les biomatériaux.

Il apparaît, sur la Figure III-9, que quel que soit le traitement (statique, entrechoquement), l'activité métabolique des chondrocytes augmente après 28 jours de culture ( $P < 0,01$ ). Par ailleurs, la contrainte d'entrechoquement semble avoir une action

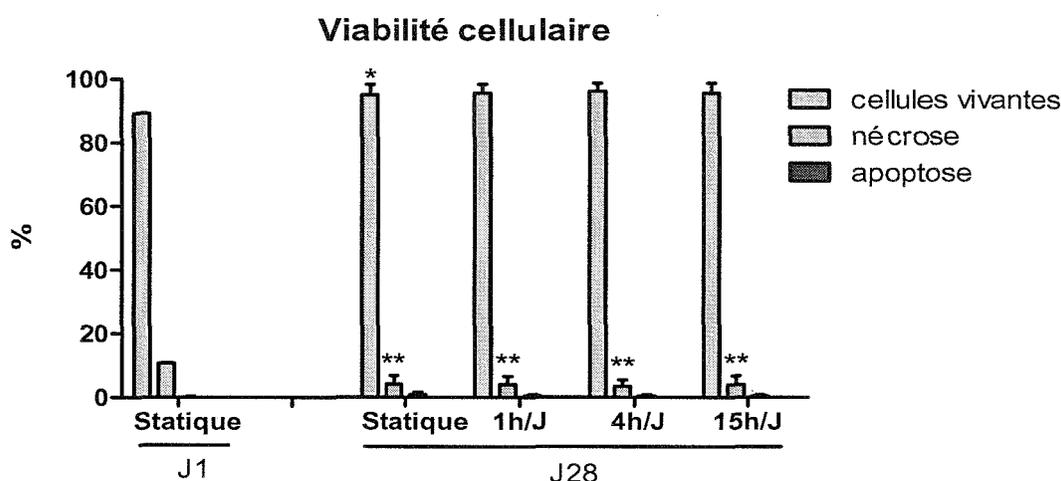
positive sur l'activité métabolique. En effet, une augmentation significative est notée quelle que soit la condition d'entrechoquement ( $P < 0,001$ ). Notons cependant qu'une activité métabolique maximale après 4h/J d'entrechoquement est observée.



**Figure III-9 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur l'activité métabolique des chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate/HA. (Test Alamar Bleu).** Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne ( $n=3$ ) \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , J28 versus J1 ; ### $P < 0,01$ , #### $P < 0,001$ , Entrechoquement versus statique en J28.

### II.1.2. Viabilité cellulaire

La viabilité des chondrocytes est contrôlée, après 1 jour et 28 jours de culture, en utilisant un Kit Vybrant/Apoptosis<sup>TM</sup> qui permet de distinguer trois populations cellulaires : vivantes, nécrotiques et apoptotiques, en cytométrie en flux.



**Figure III-10 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur la viabilité des chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate/HA. (Test du Vybrant/Apoptosis<sup>TM</sup>)** Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne ( $n=3$ ). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , J28 versus J1.

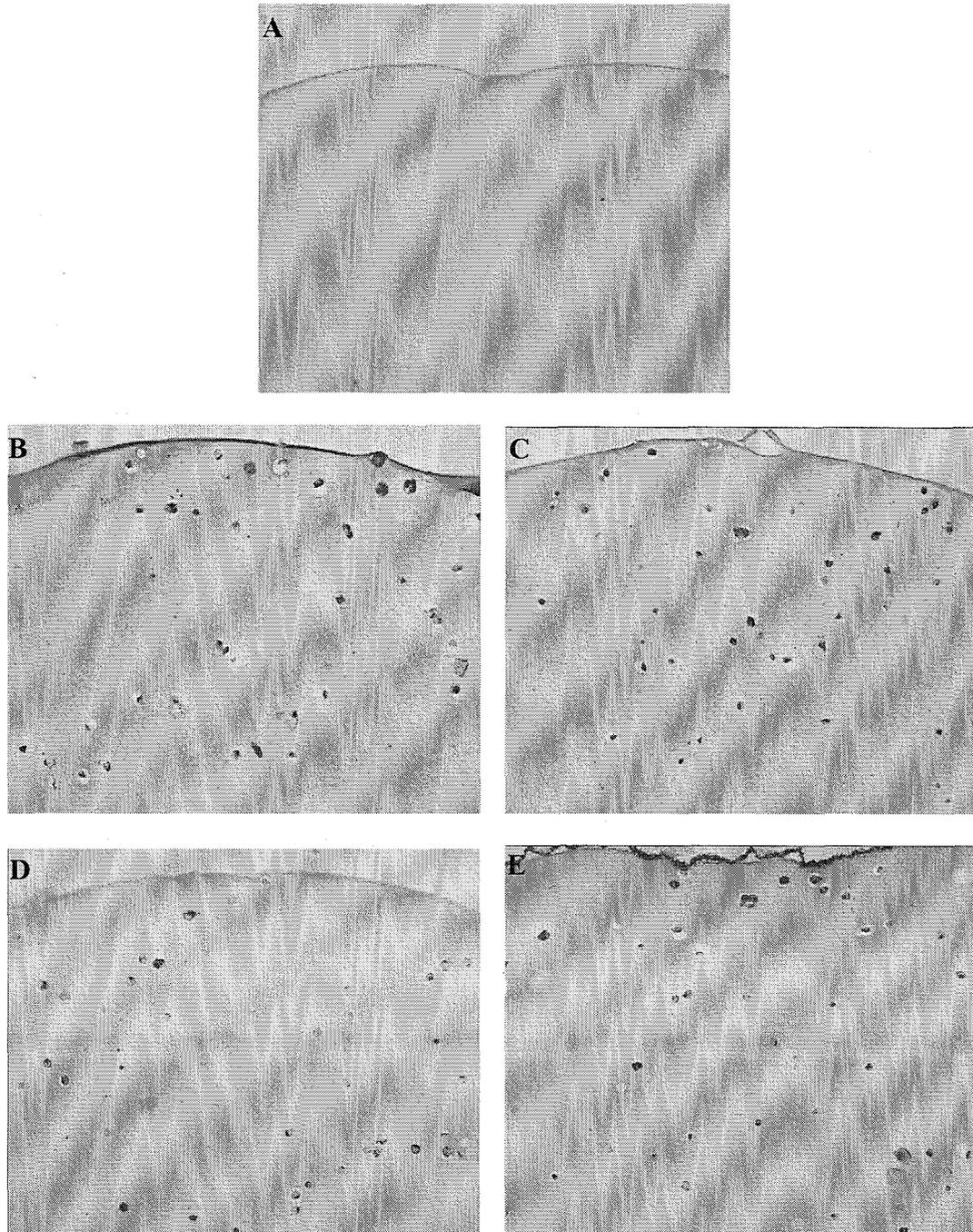
La Figure III-10 représente la proportion de cellules vivantes, nécrotiques et apoptotiques avec ou sans action de contrainte d'entrechoquement. Il apparaît, qu'après 28 jours de culture, plus de 90% de cellules sont vivantes. Bien que le taux de nécrose soit de 10,7% à J1, il n'est que de 4% à J28.

Aucune différence significative entre les cellules cultivées en condition statique et celles soumises à différentes conditions d'entrechoquement n'a été observée ( $P > 0,05$ ).

De même, aucun signe d'apoptose n'est noté (<1%).

Pour compléter ces résultats, une étude histologique, par coloration au HES, a été réalisée sur les billes après 28 jours de culture.

La Figure III-11 représente les images obtenues après coloration au l'HES. Aucune coloration n'est observée sur la bille blanche. Dans les biomatériaux contenant les cellules, les chondrocytes apparaissent encapsulés uniformément. Ces cellules se présentent sous une forme ronde et sont bien colorées. Aucun corps apoptotique n'est trouvé quels que soient les biomatériaux ou les conditions de culture, confirmant ainsi les résultats obtenus en cytométrie en flux.



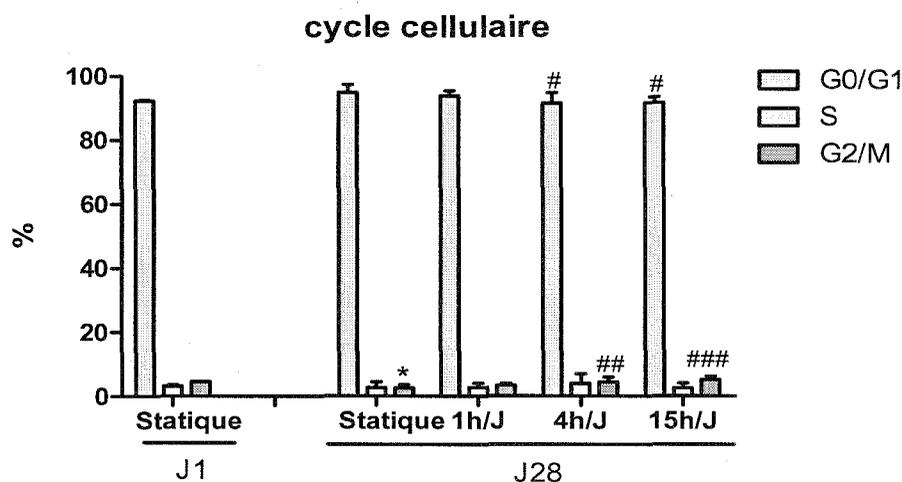
**Figure III-11 : Coloration à l'HES sur les chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate/HA (J28). A : bille blanche ; B : bille cultivée en condition statique ; C : bille soumise à 1h/J d'entrechoquement ; D : bille soumise à 4h/J d'entrechoquement ; E : bille soumise à 15h/J d'entrechoquement**

### *II.1.3. Cycle cellulaire*

L'étude du cycle cellulaire a été réalisée sur les chondrocytes après 1 jour et 28 jours de culture. Cette approche originale nous permet de connaître l'état métabolique des cellules vis à vis de la prolifération par analyse de la proportion de cellules en

phase de quiescence (phase G0/G1), de synthèse d'ADN (phase S) ou encore de mitose (phase G2/M). Les phases S et G2/M permettent de connaître la proportion de cellules qui prolifèrent et qui sont en cours de division, respectivement.

La figure III-12 montre que la population cellulaire en phase G2/M des chondrocytes cultivés en condition statique baisse significativement à J28 comparativement à J1 (4,5% à J1 *versus* 2,6% à J28,  $P < 0,05$ ). Cette variation s'explique par une augmentation de la proportion des cellules en phase G2/M.



**Figure III-12: Influence de la contrainte d'entrechoquement sur le cycle cellulaire de chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate/HA. (CMF).** Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne ( $n=3$ ). \* $P < 0,05$  J28 *versus* J1 ; # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$ , Entrechoquement *versus* statique à J28.

Nous notons également une variation significative du cycle cellulaire entre les cellules cultivées en condition statique ou sous entrechoquement. En effet, il existe une augmentation de la proportion de cellules en phase G2/M après 4h/J et 15h/J d'entrechoquement (4h/J : 4,5%, 15h/J : 5,1% *versus* statique : 2,6%), avec pour corollaire une baisse de cellules en phase G0/G1. Une tendance similaire est observée pour une agitation de 1h/J, mais elle n'atteint pas la significativité. Cependant, aucune variation significative de la proportion des cellules en phase S n'est observée ( $P > 0,05$ ).

#### II.1.4. Expression de gènes d'intérêt

La Figure III-13 présente les résultats de l'étude de l'expression de gènes, obtenus par l'analyse de PCRq, qui a été réalisée sur les chondrocytes après 28 jours de culture.

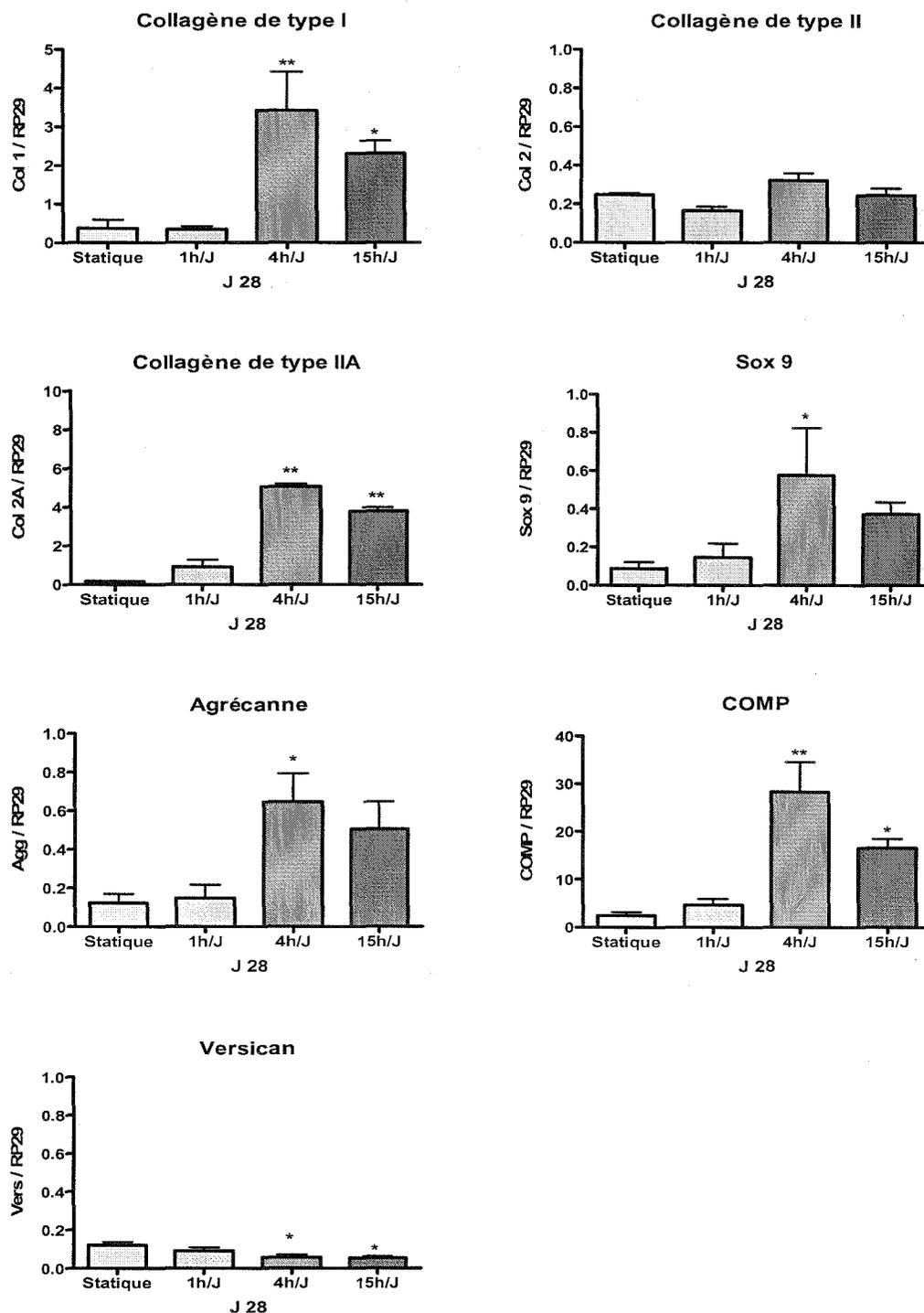


Figure III-13 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur l'expression de gènes codant pour différentes protéines d'intérêt exprimés par les chondrocytes, après 28 jours de culture. (PCRq) Les données ont été normalisées par rapport au gène RP29 et sont exprimées sous forme du rapport : gène / RP29. Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne ( $n=3$ ). \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , Entrechoquement versus statique à J28.

L'expression de gènes codant pour le collagène de type I et IIA ainsi que celle pour les agrécannes, COMP et Sox9 n'augmentent qu'après 4h/J et 15h/J d'entrechoquement comparativement à la condition statique. De plus, il semble que cette augmentation soit plus importante chez les chondrocytes soumis à 4h/J d'entrechoquement qu'à 15h/J de l'entrechoquement. Cependant, la différence entre les deux n'est pas significative.

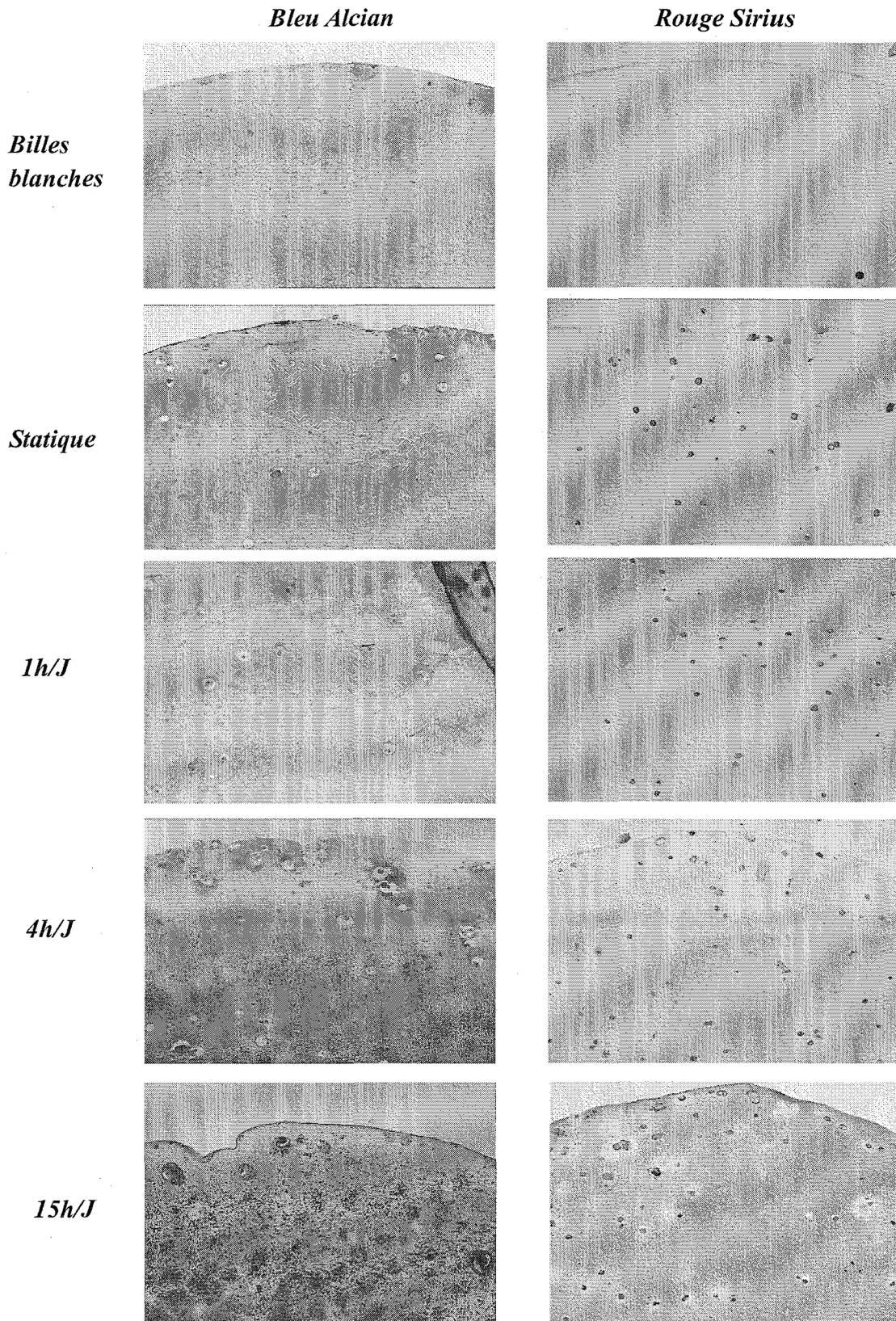
En revanche, une diminution de l'expression du gène codant pour le versican est observée chez les chondrocytes soumis à 4h/J et 15h/J d'entrechoquement.

Enfin, aucune différence significative de l'expression du gène codant pour le collagène de type II n'est observée entre les différentes conditions, bien que l'analyse montre l'existence d'une tendance similaire.

#### *II.1.5. Synthèse de la matrice extracellulaire*

Une étude histologique a été réalisée sur les chondrocytes, après 28 jours de culture, par une coloration au Bleu Alcian ou au Rouge Sirius pour visualiser les GAGs et le collagène, respectivement.

La Figure III-14 montre que la synthèse de GAGs augmente après entrechoquement, comparativement aux billes en condition statique. Cependant, il semble que la synthèse des fibres de collagènes ne soit pas modifiée par l'entrechoquement. En fait, aucune synthèse *de novo* de collagènes n'est observée à la périphérie des chondrocytes. Enfin, aucune coloration n'a été observée dans la bille blanche.



**Figure III-14** Influence de la contrainte d'entrechoquement sur la synthèse de la matrice extracellulaire par les chondrocytes, après 28 jours de culture. *Etude réalisée par coloration au Bleu Alcian (Gauche) ou au Rouge Sirius (Droite), pour observer respectivement la présence de GAGs et de collagène. (Objectif x40)*

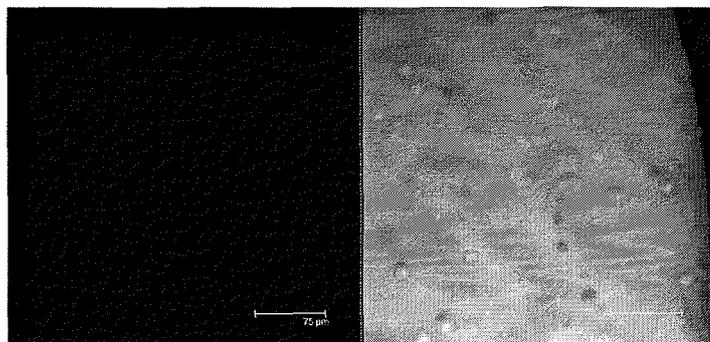
*II.1.6. Synthèse de collagènes de type I et II*

En complément de l'étude histologique, une analyse de l'expression de collagènes de type I et II synthétisés par des chondrocytes a été réalisée en microscopie confocale.

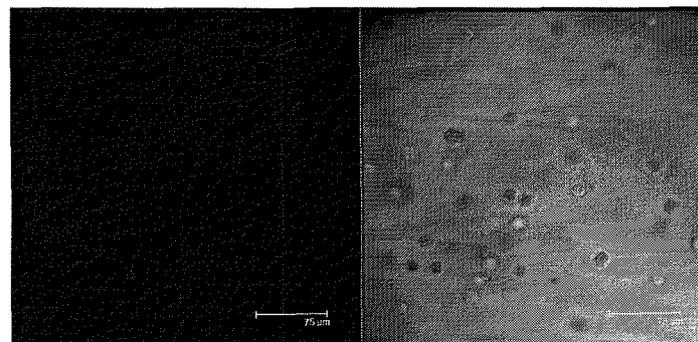
La Figure III-15 représente les images obtenues par un marquage de collagènes de type I ou II en immunofluorescence indirecte. Il apparaît que ni le collagène de type I, ni le collagène de type II ne sont exprimés par les chondrocytes après 1 jour de culture. Cependant, une expression de ces deux types de collagène est observée dans l'espace péricellulaire des chondrocytes, après 28 jours de culture en condition statique.

Par ailleurs, il semble que les chondrocytes soumis à une contrainte d'entrechoquement expriment une quantité plus importante de ces deux types de collagène en comparaison avec ceux cultivés en condition statique. D'après l'intensité moyenne de fluorescence observée, il semble que le marquage soit plus intense pour les billes soumises à la contrainte d'entrechoquement de 4h/J, notamment en ce qui concerne le collagène de type II.

*Collagène de type I*



*Collagène de type II*



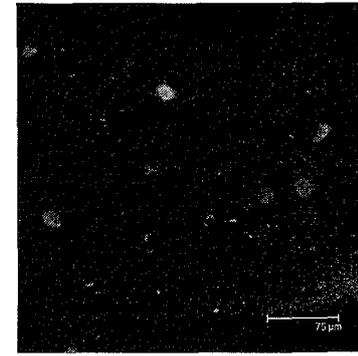
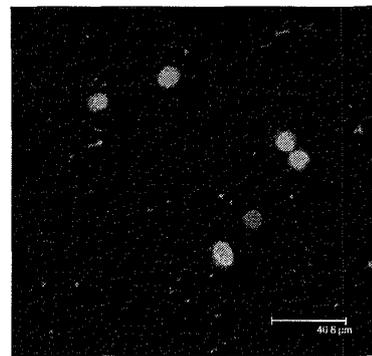
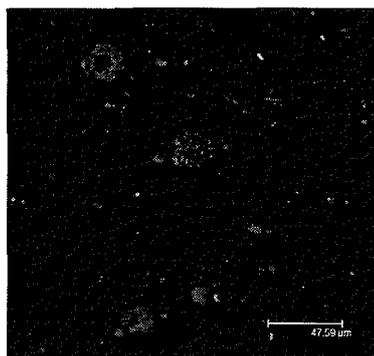
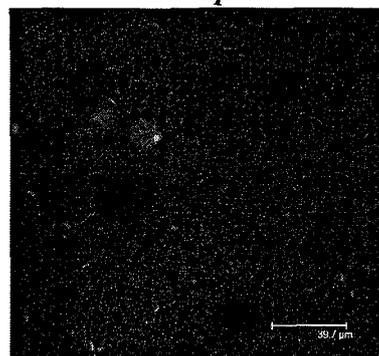
*J28*

*Statique*

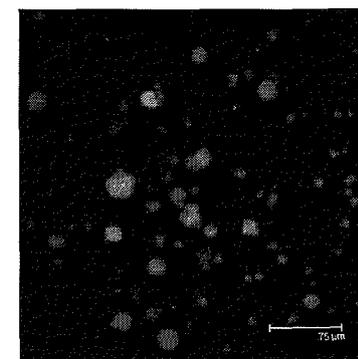
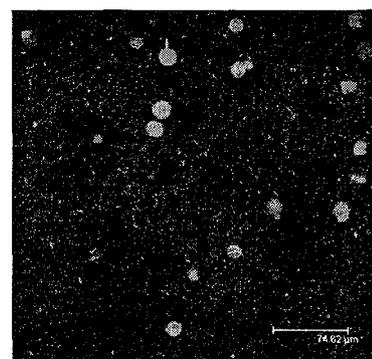
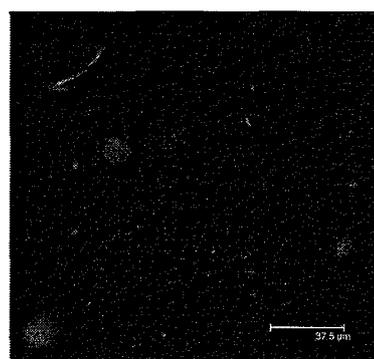
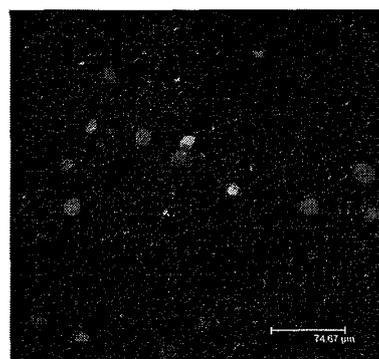
*1h/J*

*4h/J*

*15h/J*



*Collagène de type I*



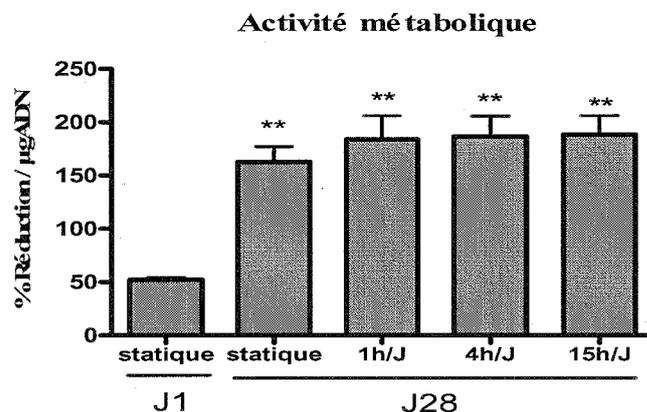
*Collagène de type II*

**Figure III-15 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur la synthèse des collagènes de type I et II dans la matrice péri-cellulaire des chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate/HA. Etude réalisée par immunofluorescence indirecte et observation par microscopie confocale (Objectif x40, immersion eau, ON=0.8). La coloration verte représente la présence du collagène de type I ou II, selon le cas.**

## II.2. Réponses des CSMs

### II.2.1. Activité métabolique

La Figure III-16 représente l'activité métabolique des CSMs évaluée après 1 jour et 28 jours de culture par un test « Alamar Blue ». Les résultats sont ensuite ramenés à la quantité d'ADN présente dans les biomatériaux.



**Figure III-16 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur l'activité métabolique des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA. (Test Alamar Bleu)** Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne ( $n=3$ ). \*\* $P<0,01$ , J28 versus J1.

Après 28 jours de culture, les CSMs présentent une activité métabolique significativement plus importante qu'à J1 ( $P<0,01$ ). Cependant, aucune différence significative n'est observée en fonction du traitement, bien qu'il semble y avoir une tendance à l'augmentation lorsque les cellules sont soumises à une contrainte d'entrechoquement ( $P>0,05$ ).

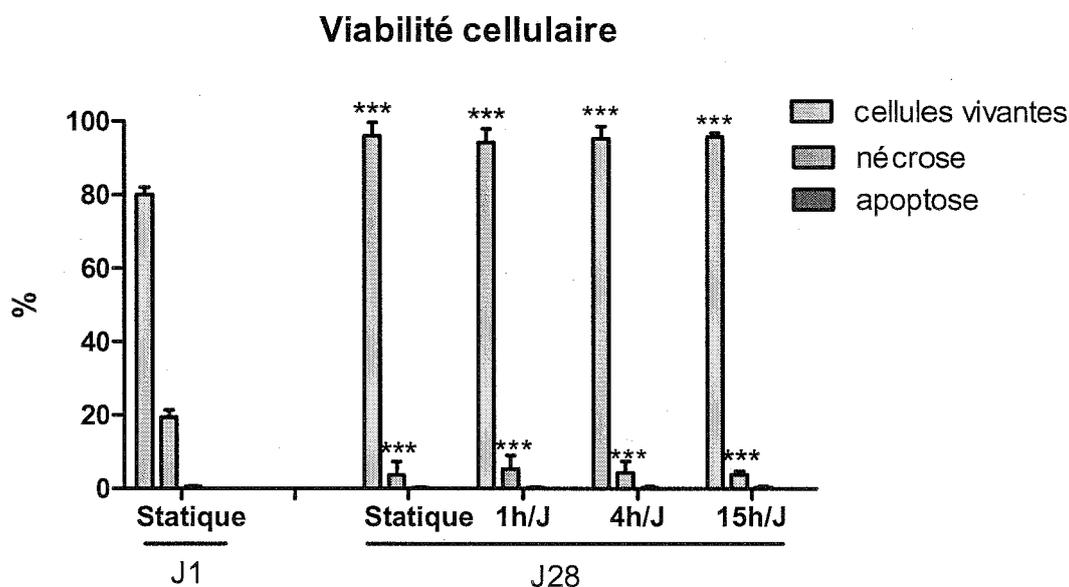
### II.2.2. Viabilité cellulaire

De la même façon que pour les chondrocytes, les résultats présentés sur la Figure III-17 sont obtenus après analyse de la viabilité cellulaire par un Kit Vybrant/Apoptosis™, après 1 jour et 28 jours de culture.

Il apparaît que la viabilité cellulaire augmente significativement, après 28 jours de culture ( $P<0,001$ ). En effet, à J1, le taux de viabilité n'est que de 80% et la nécrose représente 20% des cellules. Cependant, après 28 jours de culture, il y a plus de 90% de cellules vivantes, et moins de 5% de cellules nécrotiques.

Par ailleurs, l'application de la contrainte mécanique n'a pas d'influence sur la viabilité cellulaire.

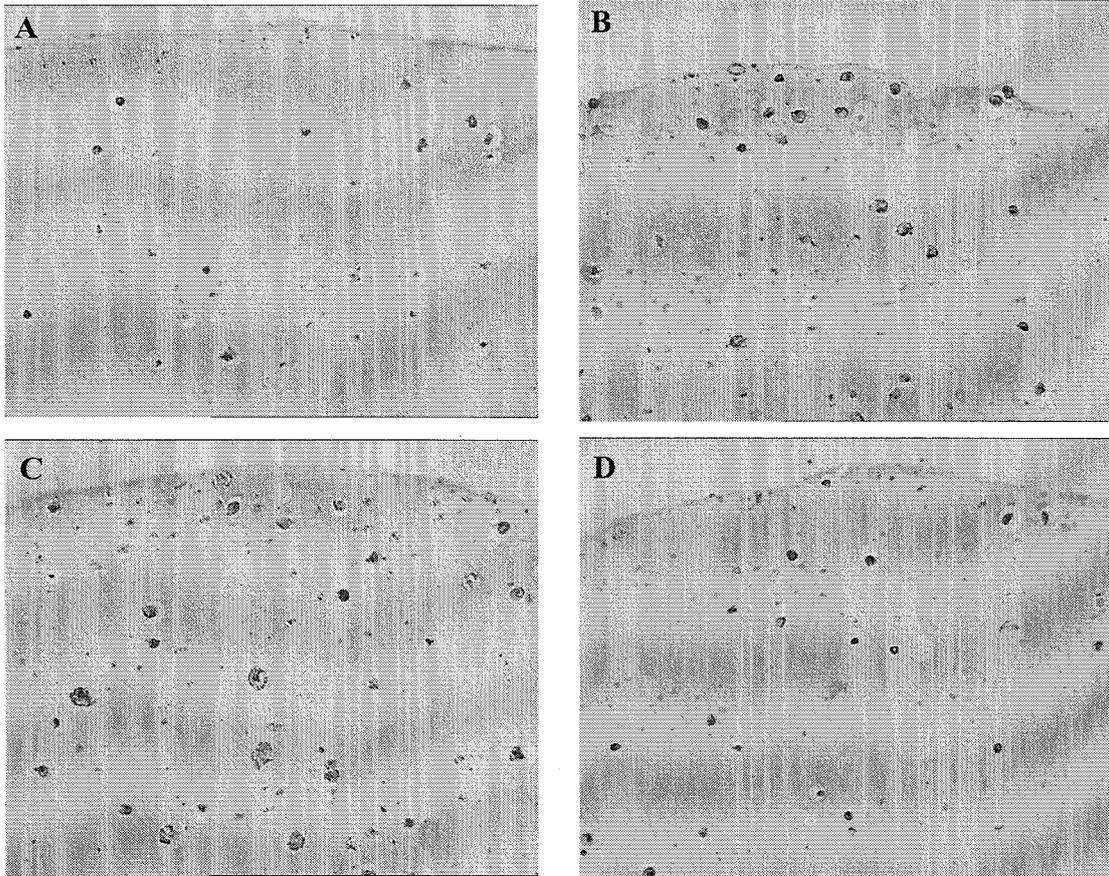
Enfin, et de même que pour les chondrocytes, le taux d'apoptose est toujours inférieur à 1%.



**Figure III-17 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur la viabilité des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA. (Test Vybrant/Apoptosis<sup>TM</sup>) Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (n=3). \*\*\* $P < 0,001$ , J28 versus J1.**

En complément de ces résultats, une étude histologique a été réalisée. La Figure III-18 représente les résultats de cette étude, après 28 jours de culture, en utilisant la coloration au HES.

Comme dans le cas des chondrocytes, les CSMs se présentent rondes et bien colorées dans la bille d'alginate/HA. La distribution cellulaire apparaît uniforme. Aucune cellule apoptotique n'est mise en évidence, confirmant les résultats précédents.

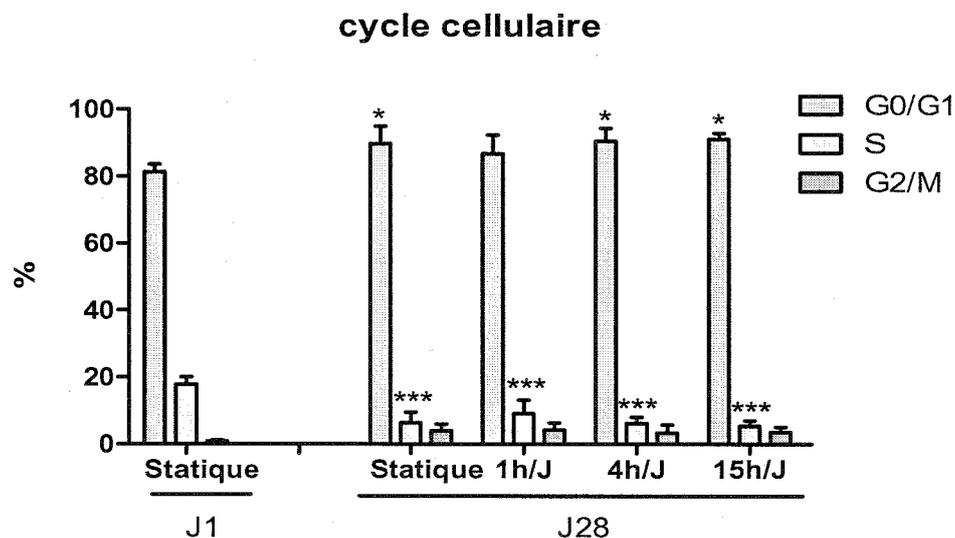


**Figure III-18 :** Coloration à l'HES sur les CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA (J28). *A : bille cultivée en condition statique ; B : bille soumise à 1h/J d'entrechoquement ; C : bille soumise à 4h/J d'entrechoquement ; D : bille soumise à 15h/J d'entrechoquement*

### *II.2.3. Cycle cellulaire*

Les résultats de l'étude du cycle cellulaire, réalisée sur les CSMs, après 1jour et 28 jours de culture sont présentés sur la Figure III-19.

Ils montrent une augmentation significative de la population cellulaire en phase G0/G1 et une diminution de celle en phase S, après 28 jours de culture, comparativement à J1. Aucune variation de la population cellulaire n'est observée entre les CSMs cultivées en condition statique et celles soumises à une contrainte d'entrechoquement ( $P>0,05$ ), quelle que soit la phase du cycle cellulaire.



**Figure III-19 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur le cycle cellulaire des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA. (CMF) Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne ( $n=3$ ). \* $P<0,05$ , \*\*\* $P<0,001$ , J28 versus J1.**

#### II.2.4. Expression de gènes d'intérêt

Le Figure III-20 présente les résultats de l'étude de l'expression de gènes obtenus, par l'analyse de PCRq, réalisée sur les CSMs, après 28 jours de culture.

Etant donné l'absence de significativité statistique mais la présence de tendances que serait validée si le nombre d'échantillons était plus élevé, nous discuterons ces résultats en restant prudent quand aux conclusions.

Ils montrent que l'expression de gènes codant pour le versican diminue après 1h/J et 4h/J d'entrechoquement, comparativement aux celles restées en condition statique.

Pour certains gènes tels que le collagène de type II, III et X, Sox9 ainsi que l'agrécanne, aucune évolution significative n'est observée. Cependant, on remarque une tendance à l'augmentation en fonction de la durée de la contrainte pour COMP ainsi que pour le collagène de type I.

Seule une diminution significative est notée pour le versican après 1h/J et 4h/J de contrainte d'entrechoquement.

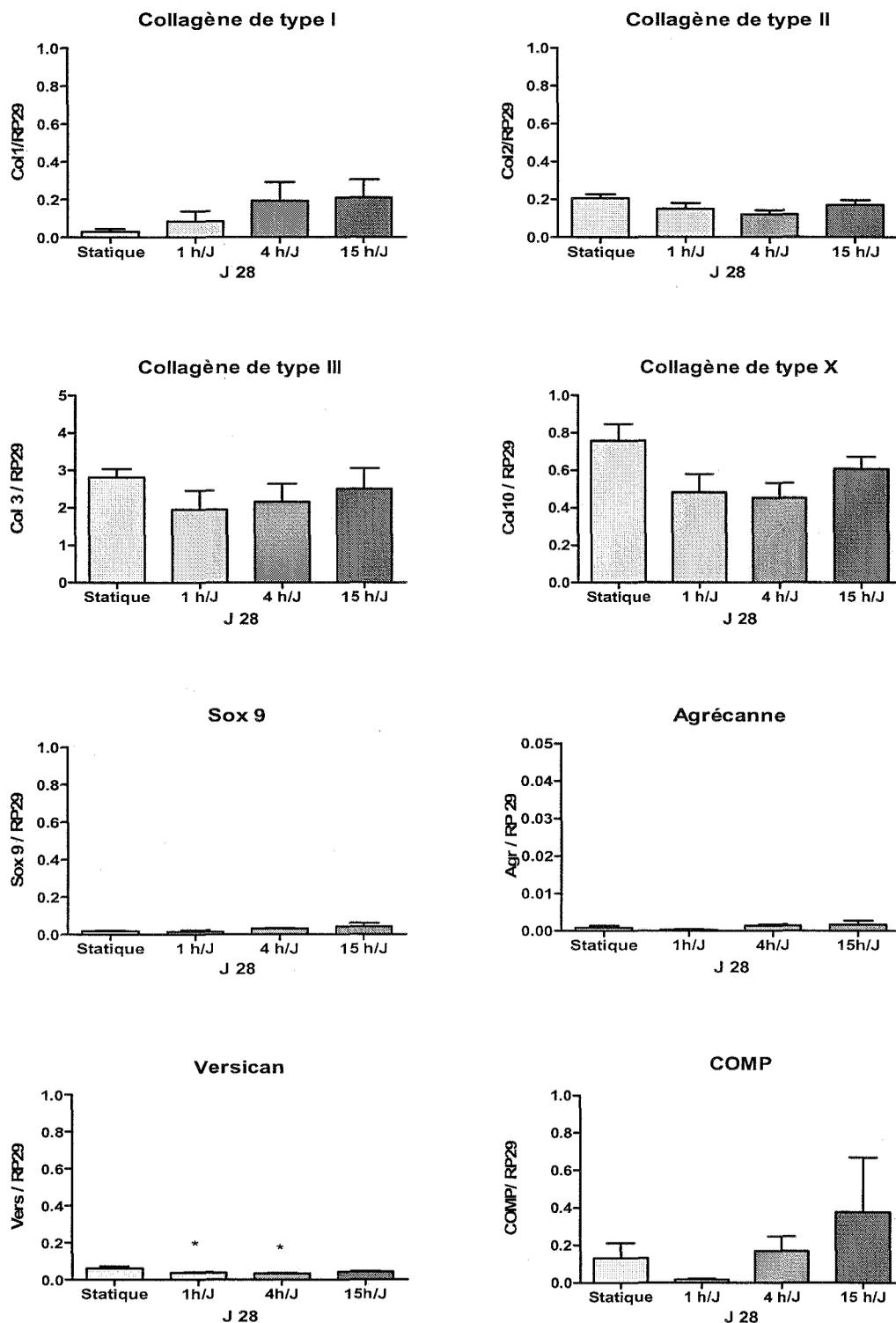


Figure III-20 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur l'expression de gènes codant pour différentes protéines d'intérêt exprimés par des CSMs, après 28 jours de culture. (PCRq) Les données ont été normalisées par rapport au gène RP29 et sont exprimées sous forme du rapport : gène / RP29. Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (n=3). \*P<0,05, Entrechoquement versus statique à J28.

### *II.2.5. Synthèse de la matrice extracellulaire*

La Figure III-21 montre les résultats de coloration des GAGs et des collagènes obtenus par colorations histologiques au Bleu Alcian et au Rouge Sirius, respectivement.

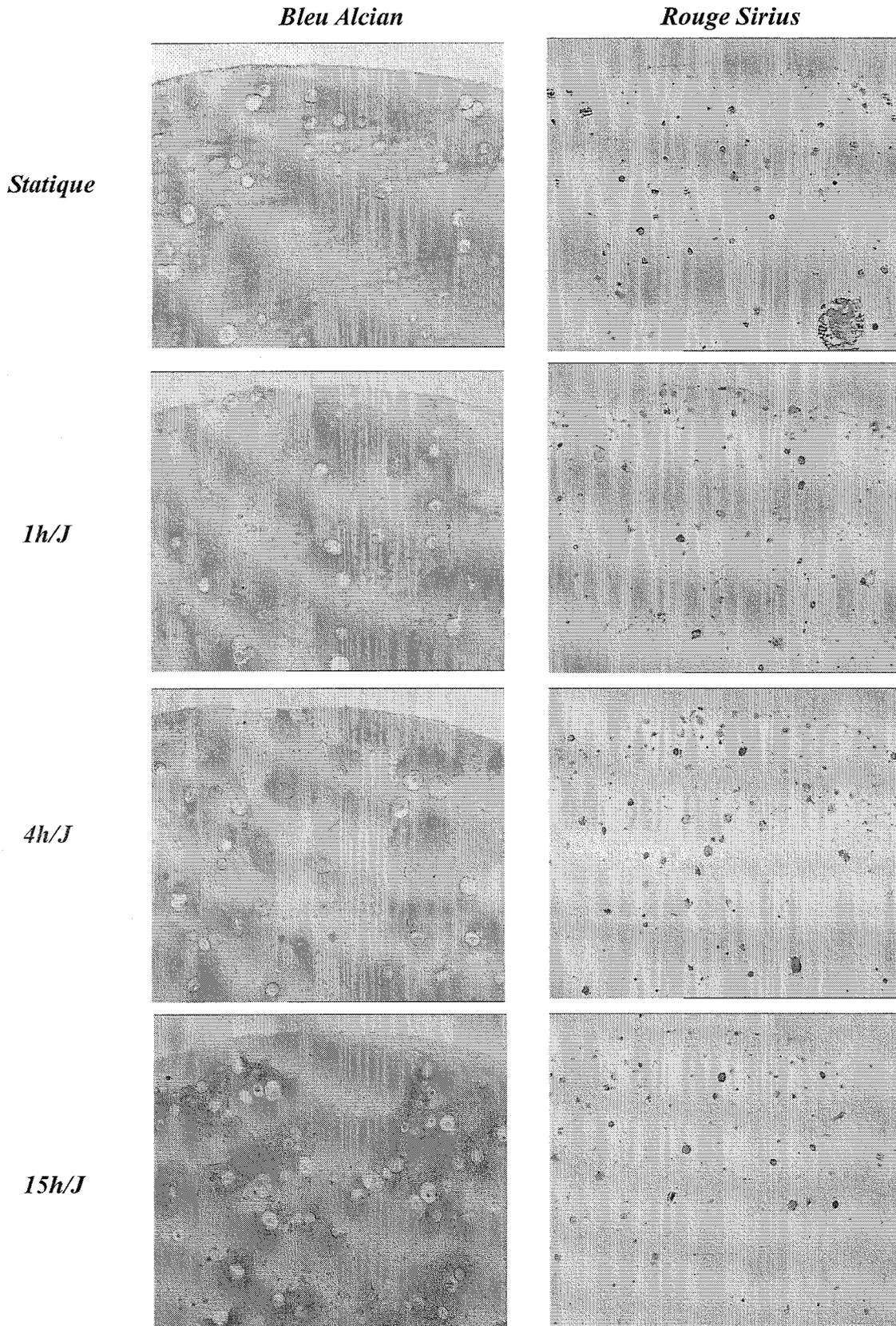
Il apparaît que la synthèse de GAGs, dans l'espace extracellulaire, des CSMs augmente significativement après entrechoquement. Cependant, aucune synthèse *de novo* de collagène n'est observée dans l'espace péricellulaire quelles que soient les conditions.

### *II.2.6. Synthèse de collagènes de type I et II*

Nous avons également étudié la synthèse de collagènes de type I et II sur les CSMs après 1 jour et 28 jours de culture, par microscopie confocale.

La Figure III-22 représente les images obtenues par immunofluorescence indirecte après marquage des collagènes de type I ou II.

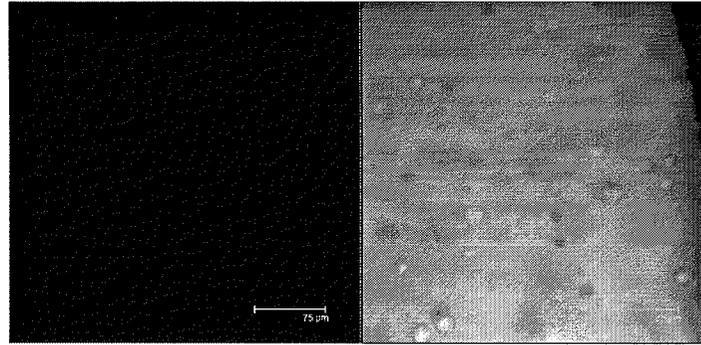
Il apparaît que, à J1, les CSMs n'expriment ni le collagène de type I ni le collagène de type II. En revanche, après 28 jours de culture, une expression de collagène de type I et de type II est observée dans l'espace péricellulaire des cellules. Les deux types de collagènes sont exprimés de manière similaire, cependant il semble que la contrainte d'entrechoquement ait une action positive sur cette expression quelle que soit la durée.



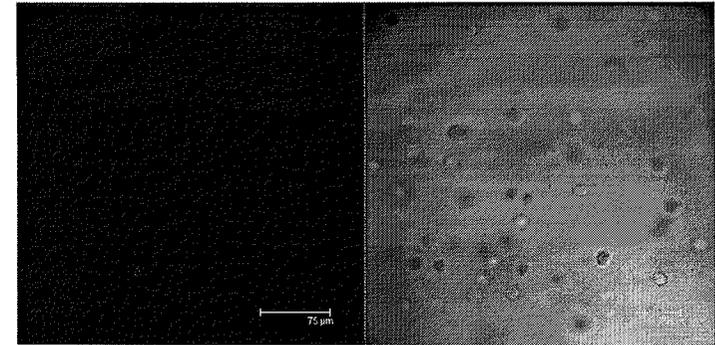
**Figure III-21 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur la synthèse de la matrice extracellulaire par les CSMs, après 28 jours de culture. Etude réalisée par la coloration au Bleu Alcian (Gauche) et au Rouge Sirius (Droite). (Objectif x40)**

J1

*Collagène de type I*



*Collagène de type II*



J28

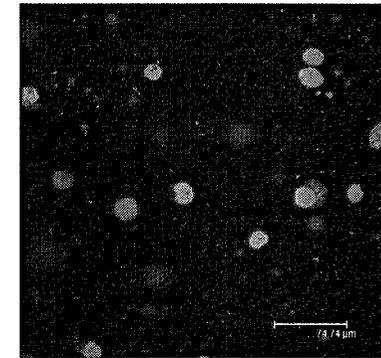
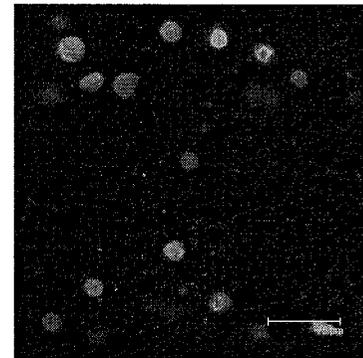
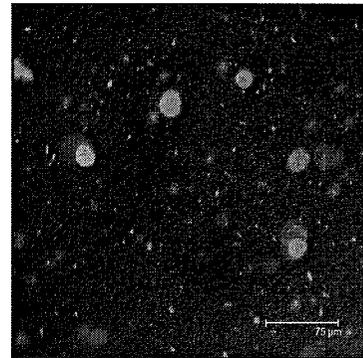
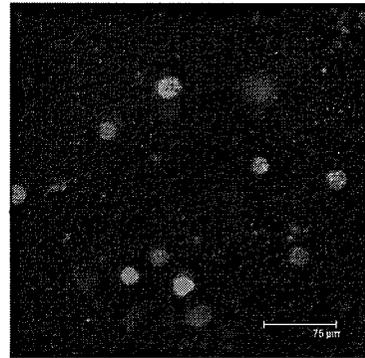
*Statique*

*1h/J*

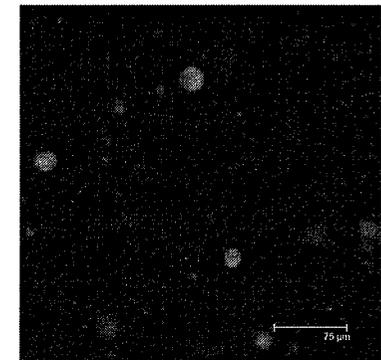
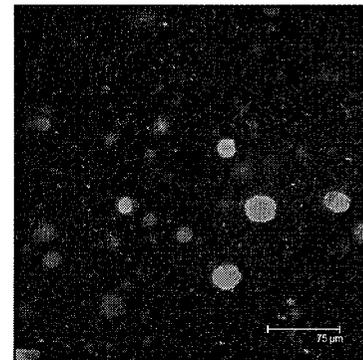
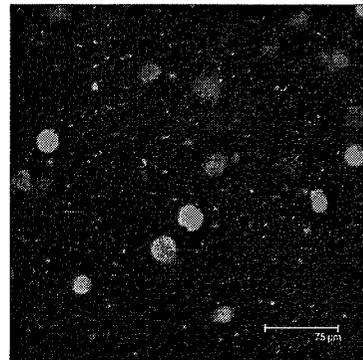
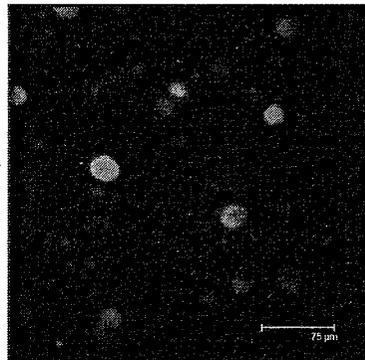
*4h/J*

*15h/J*

*Collagène de type I*



*Collagène de type II*



**Figure III-22 : Influence de la contrainte d'entrechoquement sur la synthèse des collagènes de type I et II dans la matrice péri-cellulaire des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA. Etude réalisée par immunofluorescence indirecte et observation par microscopie confocale (Objectif x40, immersion eau, ON=0.8). La coloration verte représente la présence du collagène de type I ou II, selon le cas.**

### **II.3. Discussion**

Il est bien connu qu'en ingénierie tissulaire du cartilage, un certain nombre de paramètres est incontournable : le choix des cellules, les biomatériaux, les stimulations environnementales telles que les contraintes mécaniques [Stoltz JF *et al.*, 2005]. Il est important, pour le maintien et/ou l'obtention du phénotype chondrocytaire, que les cellules soient placées dans un environnement tridimensionnel [Domm C *et al.*, 2002]. En effet, les matériaux tridimensionnels miment la structure native du cartilage et peuvent fournir aux cellules non seulement un environnement biocompatible mais également une stabilité mécanique. Enfin, les contraintes mécaniques peuvent influencer les réactions cellulaires telles que l'activité métabolique, l'expression des gènes ainsi que la synthèse de la MEC [Lee CR *et al.*, 2005 ; Stoltz JF *et al.*, 2006]. Les stimulations mécaniques jouent donc un rôle très important dans la régulation des activités cellulaires du chondrocyte ainsi que dans l'induction de la différenciation chondrocytaire des CSMs.

Nous avons, dans cette partie, tenu compte de ces deux paramètres. Nous avons ensemencé les chondrocytes et les CSMs, obtenus après expansion en monocouche, dans un hydrogel d'alginate/HA. Nous avons étudié les réponses cellulaires (activité métabolique, prolifération cellulaire et cycle cellulaire), l'expression de gènes d'intérêt ainsi que la synthèse de la MEC en réponse à une contrainte mécanique d'entrechoquement de trois durées différentes (1h/J, 4h/J et 15h/J). Cela nous a permis d'évaluer les effets d'une contrainte mécanique en fonction de la durée et ainsi optimiser les conditions de stimulation.

Nos résultats ont montré que l'hydrogel d'alginate/HA est biocompatible, et n'induit pas de phénomène d'apoptose. En effet, au bout de 28 jours de culture, on observe une viabilité cellulaire supérieure à 95%. Le pourcentage plus faible observé à J1 peut être dû à un phénomène d'adaptation cellulaire, ainsi qu'il l'a déjà été démontré [Yang JW *et al.*, 2007]. De plus, il apparaît que les billes d'alginate/HA supportent bien les stimulations mécaniques dues à l'entrechoquement des billes entre elles ou aux mouvements de fluide. En effet, leur intégrité a été maintenue au cours

des 28 jours de culture.

L'alginate de sodium est un hydrogel, très utilisé en ingénierie tissulaire du cartilage [Domm C *et al.*, 2004]. Il n'entraîne pas l'utilisation de produits toxiques vis-à-vis des cellules et permet la formation d'un hydrogel stable en présence d'ions bivalents tels que les ions calcium. La libération des cellules des hydrogels d'alginate est également réalisée sans l'utilisation d'enzymes protéolytiques [Domm C *et al.*, 2004]. Ces hydrogels d'alginate nous ont donc servi de modèle de référence. De plus, l'addition de HA à l'intérieur de l'alginate permet d'associer les propriétés physico-chimiques de l'alginate aux propriétés biologiques de l'HA naturellement présent dans le cartilage [Miralles G *et al.*, 2001].

Une fois ces paramètres définis, nous avons évalué les effets d'une contrainte d'entrechoquement de 1h/J, 4h/J et 15h/J sur les deux types cellulaires choisis. Nous avons observé que les contraintes d'entrechoquement avaient un effet différent tant du point de vue de leur durée que de la cellule étudiée.

#### ***Paramètres métaboliques :***

Bien qu'elles n'aient pas d'effet délétère sur les cellules (viabilité cellulaire stable), les contraintes d'entrechoquement agissent sur l'activité métabolique des cellules de manière différente, en fonction du type cellulaire. En effet, nous avons montré que 4h/J ou 15h/J de contrainte augmentaient l'activité métabolique des chondrocytes, ainsi que la prolifération cellulaire (augmentation de 75% de la phase G2/M). En revanche, aucune modification de ces paramètres n'est observée sur les CSMs placées dans des conditions similaires. Cette augmentation de l'activité métabolique et de la prolifération a déjà été montrée sur des chondrocytes murins placées dans des conditions similaires [Gigant-Huselstein C *et al.*, 2003 ; Freyria AM *et al.*, 2004]. Cette amélioration, ou ce maintien des caractéristiques métaboliques des cellules peut être dû à la présence d'un flux de milieu qui améliorerait le transport des nutriments pour les cellules situées à la surface de la bille jusqu'au centre de la bille. Le flux de milieu peut être augmenté par les chocs qui se produisent entre les billes. En

effet, cette diffusion facilitée permettrait d'optimiser l'apport de nutriments, les échanges gazeux, ainsi que l'élimination des déchets métaboliques qui, dans ce cas, peuvent sortir de la bille. Le renouvellement de milieu étant assuré toutes les 48 heures, toutes les conditions sont donc remplies pour que les cellules se trouvent dans un environnement optimal [Gigant-Huselstein C *et al.*, 2003].

Cette hypothèse est confirmée par le fait que le plateau de réponse cellulaire se trouve à 4h/J d'entrechoquement. 1h/J d'entrechoquement ne semble pas entraîner de contrainte suffisante, bien qu'une tendance à la hausse des paramètres métaboliques apparaisse. Par ailleurs, 15h/J d'entrechoquement n'améliore pas la réponse cellulaire.

Du point de vue du métabolisme, il est possible de dire que l'application d'une contrainte d'entrechoquement (4 h/J, 30 tours/min) soit suffisante pour optimiser les paramètres de métabolisme.

#### ***Expression de gènes d'intérêt et synthèse de la MEC :***

Au niveau de l'expression de gènes d'intérêt et de la synthèse de la MEC, nous notons également des différences sur l'action des contraintes sur les chondrocytes et les CSMs.

En effet, chez les chondrocytes, l'ensemble des gènes spécifiques du phénotype chondrocytaire est augmenté significativement (ou montre une tendance à l'augmentation). Des résultats similaires ont été observés pour des chondrocytes bovins ensemencés dans des éponges de collagènes de type I [Freyria AM *et al.*, 2004]. De même, une synthèse augmentée de GAGs ainsi que de collagène de type II a été observé après 4h/J de contrainte quotidienne. Il semble donc que la contrainte d'entrechoquement de 4h/J soit suffisante. Ces contraintes couplées à l'ensemencement dans un biomatériau tridimensionnel, permettent aux chondrocytes de se redifférencier et retrouver un phénotype chondrocytaire au cours du temps (28 jours de culture).

En revanche, aucune augmentation de l'expression des gènes « chondrocytaires » n'est observée chez les CSMs, bien que la synthèse de GAGs soit augmentée après l'effet d'une contrainte d'entrechoquement. Cependant, nous notons la présence des deux types de collagènes (I et II) après 28 jours de culture, ce qui peut être le signe que

les CSMs soient entrées dans la voie de différenciation chondrocytaire.

Il faut néanmoins noter que l'application de l'entrechoquement a induit une diminution de l'expression de gène codant pour le versican après une contrainte de 1h/J et 4h/J. Comme nous l'avons décrit précédemment, le versican, est exprimé par les CSMs engagées dans l'étape de condensation et peut favoriser la prolifération de CSMs mais inhiber la chondrogénèse. Ainsi, cette diminution de l'expression de versican pourrait confirmer nos résultats et expliquer la baisse de prolifération cellulaire et la tendance à l'augmentation de la synthèse de GAGs et de collagènes.

En conclusion, nous pouvons dire que le couplage biomatériau tridimensionnel-contrainte mécanique d'entrechoquement favorise le retour d'un phénotype chondrocytaire sur des chondrocytes dédifférenciés. En revanche, ces contraintes ne semblent pas suffisantes pour induire fermement la chondrogénèse de CSMs, bien qu'elles permettent l'initialisation d'une différenciation à visée chondrocytaire. Il est possible que l'amplitude de la contrainte ne soit pas suffisante, ou qu'il soit nécessaire de combiner à des paramètres de facteurs biochimiques tels que les facteurs de croissance. De plus, 28 jours de culture peuvent se révéler une durée insuffisante pour, d'une part induire la différenciation chondrocytaire finale de CSMs, et d'autre part pour permettre la synthèse d'une MEC fonctionnelle.

Par ailleurs, ainsi que nous l'avons dit, ces contraintes sont mal définies et relativement faible par rapport aux contraintes proches du MPa qui s'exercent sur le cartilage *in vivo*. Nous avons donc testé l'effet d'un autre type de contrainte mécanique, la compression, sur la redifférenciation et la chondrogénèse.

### **III. Influence de la stimulation mécanique sur la réponse des chondrocytes et des CSMs encapsulés dans un hydrogel d'alginate/HA : effets de la compression dynamique intermittente**

La compression est la contrainte principale rencontrée au niveau de l'articulation. D'après la littérature, les caractéristiques temporelles d'une contrainte (intermittente, constante *etc.*) ne sont pas à négliger au regard de la contrainte physique. En effet, il semble qu'une contrainte dynamique intermittente soit plus avantageuse pour la synthèse de la MEC qu'une contrainte dynamique continue ou encore qu'une contrainte statique (cf. Etude Bibliographique paragraphe III.4.2.1). Par ailleurs, d'après nos résultats, il semble que la contrainte d'entrechoquement telle qu'elle a été définie ne soit pas suffisante pour induire réellement une synthèse matricielle et un phénotype chondrocytaire. En outre, cette contrainte n'est pas contrôlée.

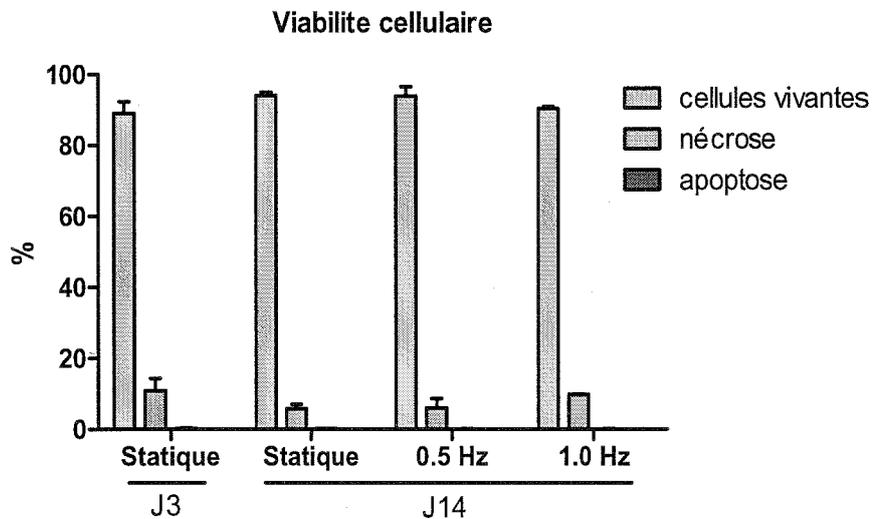
Ainsi, dans cette partie, nous avons continué l'étude de l'influence de la stimulation mécanique, en appliquant une contrainte contrôlée de compression. Notre choix s'est porté sur une contrainte de compression dynamique intermittente de 200 kPa, à deux fréquences différentes (0,5 Hz ou 1,0 Hz), pendant 14 jours de culture, à raison de 4 heures par jour pour des chondrocytes ou des CSMs encapsulés dans le même type de biomatériau que pour les entrechoquements (hydrogel d'alginate/HA). Ces paramètres ont été choisis en fonction des conditions physiologiques. Bien que la fréquence 0.5 Hz soit plus proche d'un état naturel, il a été montré que dans d'autre condition que celle sus-citée, une fréquence de 1 Hz pouvait avoir un impact positif sur la synthèse matricielle [Fawzi-Grancher S *et al.*, 2006]. Les deux fréquences seront donc prises en compte.

*Notons cependant que les résultats présentés ci-dessous sont des travaux préliminaires et devront être confirmés par la suite. De plus, le nombre d'échantillons est faible et les tests statistiques effectués lorsque c'était possible n'ont qu'une valeur relative.*

### III.1. Réponses des chondrocytes

#### III.1.1. Viabilité cellulaire

Les résultats présentés sur la Figure III-23 sont obtenus lors de l'analyse de la viabilité des chondrocytes, par le test Vybrant/Apoptosis™, après 3 jours et 14 jours de culture, en condition statique ou sous compressions dynamiques intermittentes (0,5 ou 1 Hz, 4 heures par jour).



**Figure III-23 : Influence de la compression dynamique intermittente sur la viabilité des chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate/HA. (Test Vybrant/Apoptosis™) Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne ( $n=2$ ).**

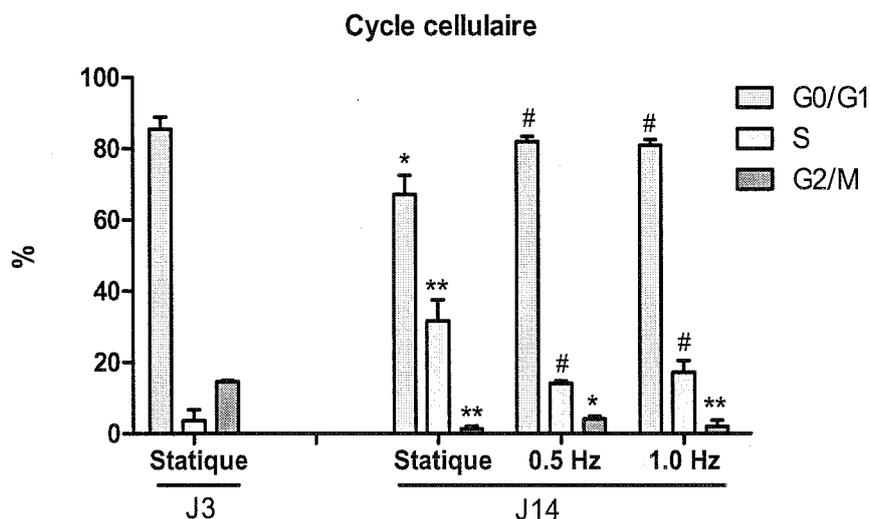
Ces résultats montrent une viabilité cellulaire supérieure à 90% dans les cylindres d'Alg/HA, quelles que soient les conditions de culture. De plus, il n'y a aucune différence significative de la viabilité cellulaire entre les cellules cultivées en condition statique et celles soumises à une compression dynamique à 0,5Hz ou 1 Hz. Enfin, le taux d'apoptose observé dans chaque condition reste inférieur à 1%.

#### III.1.2. Cycle cellulaire

La Figure III-24 montre l'influence de la compression dynamique intermittente sur le cycle cellulaire des chondrocytes, après 3 et 14 jours de culture.

Il apparaît, tout d'abord, que lorsque les cellules sont cultivées dans des conditions statiques, après 14 jours de culture, les proportions de ces cellules en phases G0/G1 ou G2/M diminuent significativement comparativement à J3 (G0/G1 : 85,5% à

J3 *versus* 67,2% à J14,  $P < 0,05$  ; G2/M : 14,5% à J3 *versus* 1,3% à J14,  $P < 0,01$ ). Cette baisse s'accompagne d'une augmentation significative de la population cellulaire en phase S (3,7% à J3 *versus* 31,5% à J14,  $P < 0,01$ ).



**Figure III-24 : Influence de la compression dynamique intermittente sur le cycle cellulaire des chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate/HA. (CMF) Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne ( $n=2$ ). \* $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,01$  J14 *versus* J3 ; # $P < 0,05$ , Compression *versus* statique à J14.**

Par ailleurs, à J14, lorsque les cellules sont soumises à une compression dynamique intermittente et quelle que soit la fréquence, la population cellulaire en phase G0/G1 augmente significativement par rapport aux cellules maintenues dans des conditions statiques tandis que celle dans la phase S diminue (G0/G1 phase: 82% à 0,5 Hz et 81% à 1Hz *versus* 67,2% en statique ; S phase : 14,1% à 0,5 Hz et 17,2% à 1 Hz *versus* 31,5 % en statique).

### III.1.3. Expression de gènes d'intérêt

La Figure III-25 présente les résultats de l'expression des gènes d'intérêt (Collagènes de type I, II, IIA, X, Agrécanne, Versican, Sox9 et COMP), obtenus lors de l'analyse par PCRq réalisée sur des chondrocytes ensemencés dans des gels d'Alg/HA, après 3 jours et 14 jours de culture.

Bien qu'aucune différence significative n'apparaisse, dû au fait du faible échantillonnage, plusieurs tendances se dégagent. Ce sera donc sur ces tendances que

nous analyserons nos résultats.

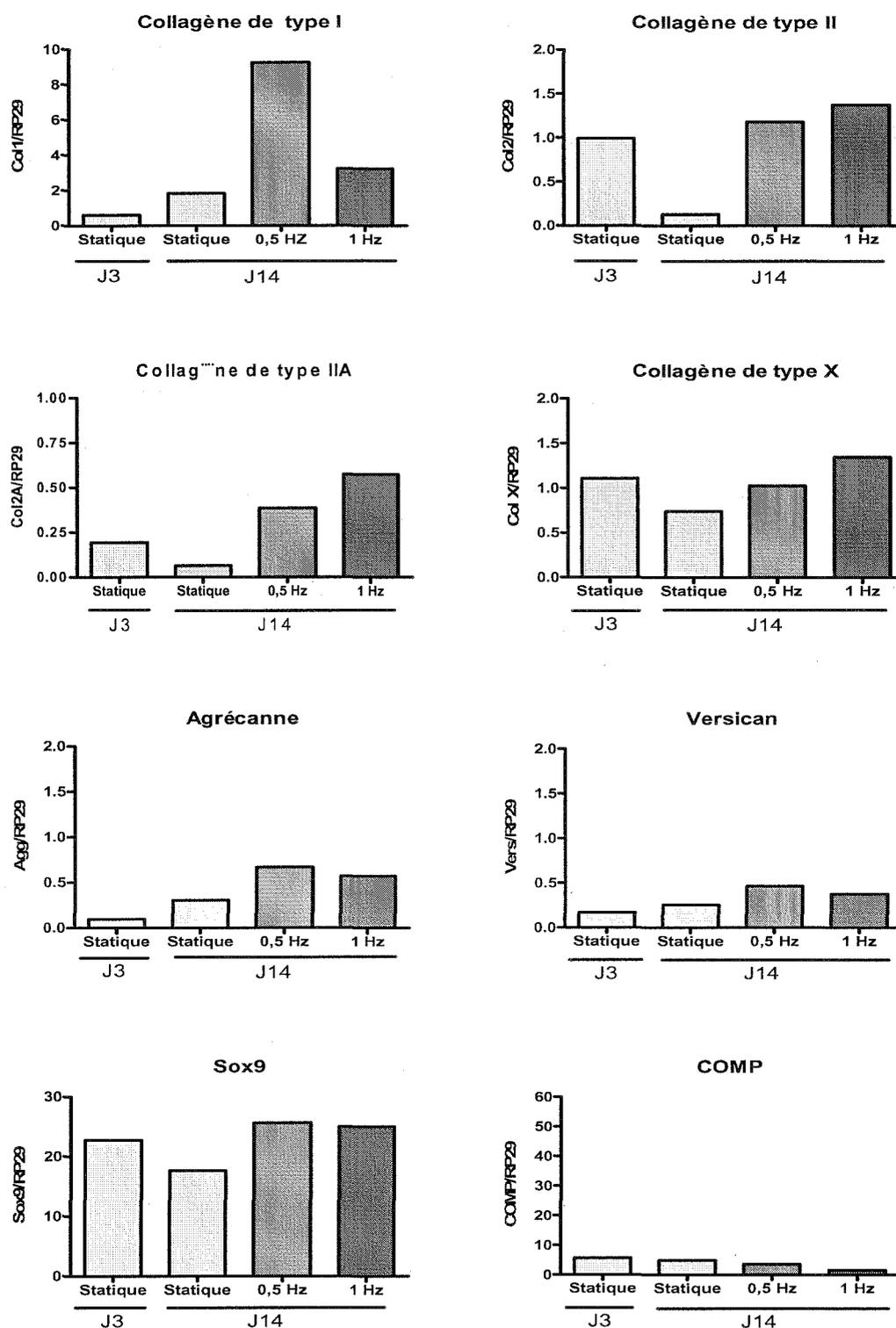


Figure III-25 : Influence d'une compression dynamique (0,5 ou 1 Hz) et intermittente (4h/jour) sur l'expression de gènes d'intérêt exprimés par des chondrocytes après 3 et 14 jours de culture. (PCRq) Les données ont été normalisées par rapport au gène RP29 et sont exprimées sous la forme du rapport : gène étudié / RP29. (n=1).

En premier lieu, il apparaît que l'ensemble de l'expression des gènes d'intérêt tend à diminuer lorsque les cellules sont maintenues dans des conditions statiques pendant 14 jours.

En revanche, dès que les cylindres d'Alg/HA sont soumis à une compression dynamique, 4 heures par jour, il apparaît que l'expression des gènes codant pour les collagènes de type I, II, IIA, X, agrécanne, versican et Sox 9 augmente tandis qu'une diminution de l'expression du gène codant pour COMP est observée, que la fréquence de compression soit de 0,5 Hz ou de 1 Hz.

Enfin, lorsque l'on compare les résultats obtenus lors d'une stimulation à une fréquence de 0,5 Hz par rapport à une fréquence de 1 Hz, une augmentation relativement plus importante de l'expression des gènes codant pour le collagène de type I, l'agrécanne et le versican est observée pour la fréquence de 0,5 Hz tandis que l'expression des gènes codant pour les collagènes de type II, IIA et X semble plus élevée à la fréquence de 1 Hz.

### **III.2. Réponses des CSMs**

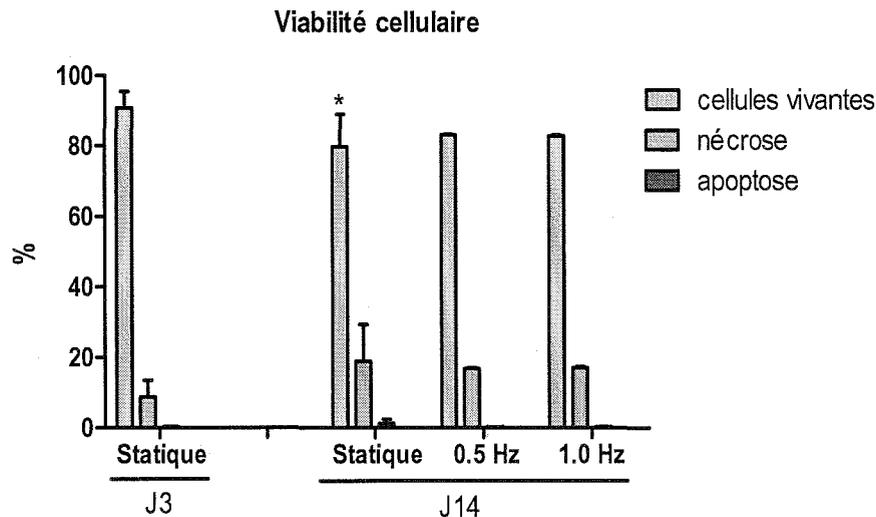
#### *III.2.1. Viabilité cellulaire*

La Figure III-26 présente les résultats obtenus lors de l'analyse de la viabilité des CSMs, après 3 jours et 14 jours de culture, en condition statique ou sous compression dynamique intermittente (0,5 ou 1 Hz, 4 heures par jour).

Il apparaît, tout d'abord, qu'il y a significativement moins de cellules vivantes et plus de cellules nécrotiques à J14 en condition statique qu'à J1, dans les mêmes conditions (vivantes : 79,8% à J14 *versus* 90,8% à J1 ; nécrotiques : 18,9% à J14 *versus* 8,8% à J1).

Lorsque les cylindres d'Alg/HAensemencés en CSMs sont soumis à une compression dynamique et intermittente, il semble que la proportion de cellules vivantes et nécrotiques ne varie pas par rapport aux cellules maintenues en condition statique ( $P > 0,05$ ).

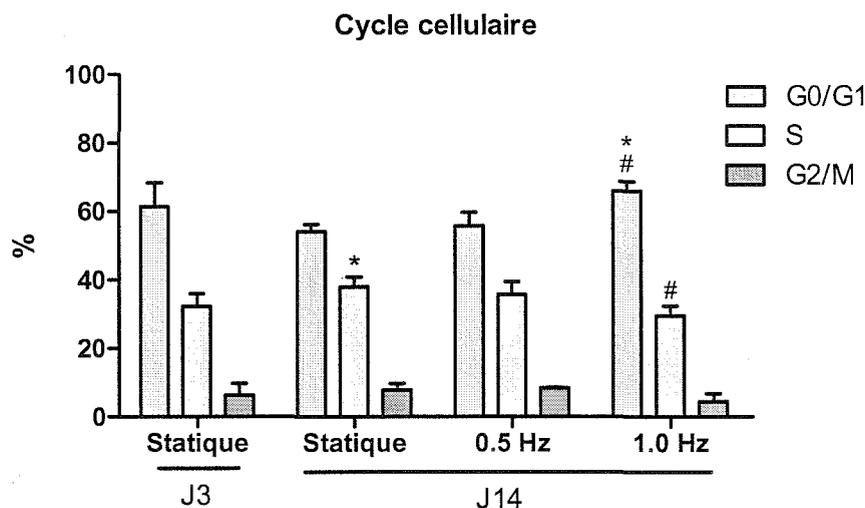
Par ailleurs, le taux d'apoptose observé dans tous les groupes est toujours inférieur à 1%.



**Figure III-26 : Influence de la compression dynamique intermittente sur la viabilité des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA. (Test Vybrant/Apoptosis™)** Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne ( $n=2$ ). \* $P<0,05$ , J14 versus J1.

### III.2.2. Cycle cellulaire

La Figure III-27 montre l'influence de la compression dynamique intermittente sur le cycle cellulaire des CSMs, après 3 et 14 jours de culture.



**Figure III-27 : Influence de la compression dynamique intermittente sur le cycle cellulaire des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA. (CMF)** Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne ( $n=2$ ). \* $P<0,05$ , J14 versus J1 ; # $P<0,05$ , Compression versus statique à J14.

Les résultats obtenus en condition statique, après 14 jours de culture, montrent une diminution de la proportion de cellules en phase G0/G1 et une augmentation

significative de la proportion de cellules en phase S comparativement à J3 (32,3% à J1 *versus* 38% à J14,  $P < 0,05$ ).

Lorsque les cylindres d'Alg/HAensemencés en CSMs sont soumis à une compression dynamique intermittente, aucun changement de la distribution du cycle cellulaire n'est observé après une compression dynamique à une fréquence de 0,5 Hz en comparaison aux cellules maintenues en condition statique ( $P > 0,05$ ). En revanche, la compression dynamique à une fréquence de 1 Hz induit une augmentation significative de la population cellulaire dans la phase G0/G1 (66% à 1 Hz *versus* 54,1% en statique,  $P < 0,05$ ) accompagnée d'une diminution significative de la population cellulaire dans la phase S (29,6% à 1 Hz *versus* 38% en statique,  $P < 0,05$ ).

### *III.2.3. Expression de gènes d'intérêt*

La Figure III-28 présente les résultats de l'expression des gènes d'intérêt (Collagènes de type I, II, IIA, X, Agrécanne, Versican, Sox9 et COMP), obtenus lors de l'analyse par PCRq réalisée sur des CSMsensemencées dans des gels d'Alg/HA, après 3 jours et 14 jours de culture.

Les résultats montrent qu'après 14 jours de culture et quels que soient les traitements (statique ou compression), l'expression des gènes codant pour les collagènes de type II et X, agrécanne ainsi que pour le versican augmente par rapport aux résultats obtenus en condition statique à J3.

En revanche, l'expression des gènes codant pour les collagènes de type I, IIA et COMP diminue après 14 jours de culture en condition statique mais augmente lors de la mise sous compression dynamique, en comparaison avec les cellules cultivées en condition statique à J3.

Par contre, l'expression de gène codant pour Sox9 diminue après 14 jours de culture quelque soit le traitement (statique ou compression).

Il semble que la compression dynamique intermittente à la fréquence de 1 Hz a induit une diminution de l'expression de gènes codant pour les collagènes de type II, X, tandis que la compression dynamique intermittente à la fréquence de 0,5 Hz a induit

une diminution de l'expression des gènes codant pour le versican et Sox 9, comparativement à la condition statique.

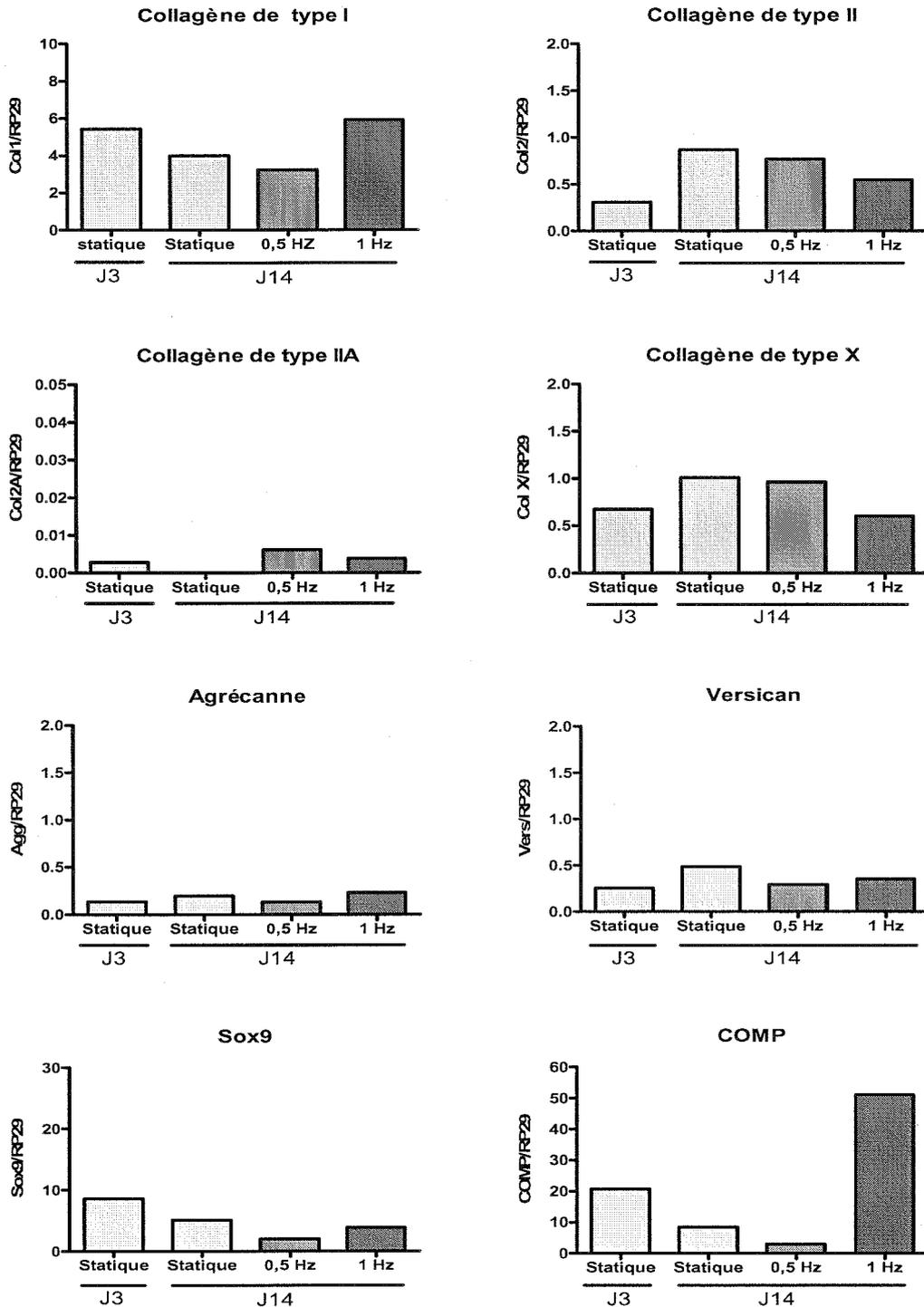


Figure III-28 : Influence d'une compression dynamique (0,5 ou 1 Hz) et intermittente (4h/jour) sur l'expression de gènes d'intérêt exprimés par des CSMs, après 3 et 14 jours de culture. (PCRq) Les données ont été normalisées par rapport au gène RP29 et sont exprimées sous forme du rapport : gène/RP29. (n=1).

En revanche, une augmentation importante de l'expression des gènes codant pour le collagène de type I et COMP a été notée après une compression dynamique intermittente de fréquence 1Hz, comparativement à la condition statique.

#### *III.2.4. Synthèse de collagènes de type I et II*

Afin d'appréhender l'expression des collagènes de type I et II dans la matrice extracellulaire par des CSMs, nous avons également observé, par microscopie confocale, la répartition de ces protéines dans une matrice néo-formée de 14 jours de culture, après compression dynamique intermittente ou sans contrainte. La Figure III-29 représente les images obtenues par immunofluorescence indirecte.

L'observation de la répartition des collagènes de type I et II dans une matrice néo-formée après 14 jours de culture, montre que quelles que soient les conditions, ces protéines ont plutôt une répartition péricellulaire qu'extracellulaire.

Il apparaît également que l'expression des collagènes de type I et II augmente après stimulation mécanique, quelle que soit la fréquence par comparaison avec les conditions statiques. De plus, il semblerait que le collagène de type II soit plus fortement exprimé lorsque les cellules sont soumises à une compression dynamique à une fréquence de 0,5 Hz. En revanche, il semblerait qu'aucune différence ne soit observée sur l'expression du collagène de type I dans des matrices soumises à une compression de 0,5 Hz ou 1 Hz.

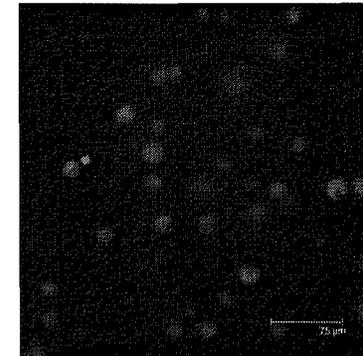
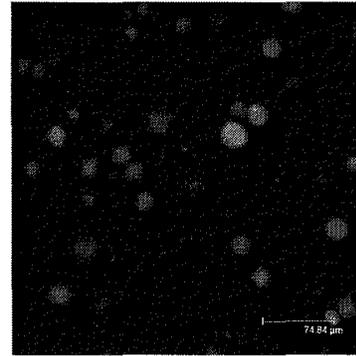
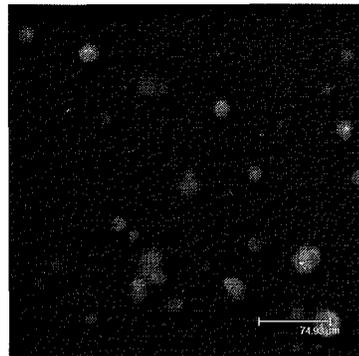
J14

*Statique*

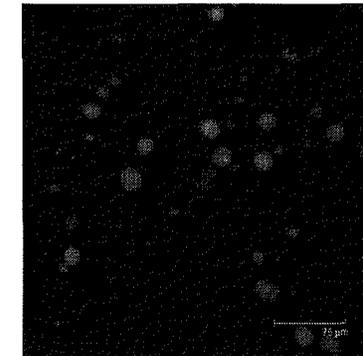
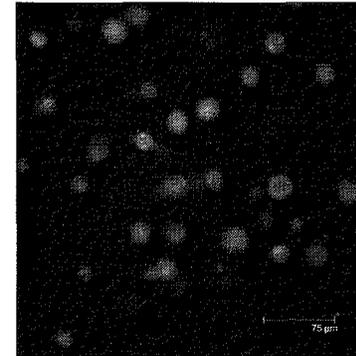
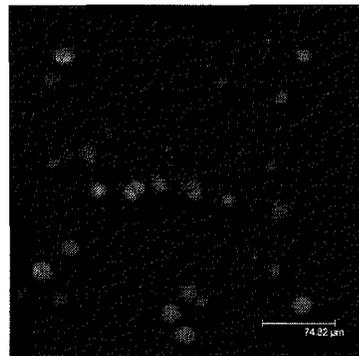
*Compression (0.5 Hz)*

*Compression (1 Hz)*

*Collagène de type I*



*Collagène de type II*



**Figure III-29 : Influence de compression dynamique intermittente sur la synthèse de collagènes de type I et II dans la matrice péri-cellulaire des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA. Etude réalisée par immunofluorescence indirecte et observation par microscopie confocale (Objectif x40, immersion eau, ON=0.8) La coloration verte représente la présence du collagène de type I ou II, selon le cas.**

### **III.3. Discussion**

La compression est la contrainte principale qui s'applique sur le cartilage. Elle peut atteindre des valeurs très élevées, allant jusqu'à 20 MPa lors de mouvements physiques plus intenses [kerin A *et al.*, 2002]. La compression est également une contrainte connue pour moduler l'activité métabolique des chondrocytes ainsi que les propriétés biomécaniques du cartilage. Si la compression statique (1 KPa à 3 MPa) est décrite pour induire une diminution de la synthèse des protéoglycannes ainsi que des protéines, la compression dynamique est, quand à elle, décrite pour modifier les activités métaboliques des chondrocytes [Buschmann MD *et al.*, 1999 ; Park S *et al.*, 2004]. Ces effets dépendent fortement de l'intensité de la contrainte mais aussi de la fréquence du signal mécanique. Chowdhury TT *et al.* ont montré qu'il existait également une régulation temporelle du métabolisme des chondrocytes lorsqu'ils sont soumis à une compression dynamique. Une compression dynamique intermittente semblerait être plus bénéfique qu'une compression dynamique continue [Chowdhury TT, *et al.*, 2003]. Ces paramètres agissent également sur les métabolismes et les capacités de synthèse de MEC cartilagineuse des CSMs [Park SH *et al.*, 2006].

Dans nos travaux préliminaires, nous avons choisi le meilleur compromis possible entre nos biomatériaux dont les caractéristiques mécaniques sont loin de celles du cartilage natif, et les contraintes physiologiques. Nous avons défini comme protocole une contrainte de 200 KPa, pour laquelle nous avons contrôlé le maintien de l'intégrité physique de l'hydrogel alginate/HA à deux fréquences non seulement physiologiques mais également décrites pour influencer les activités cellulaires, 0,5 Hz et 1 Hz.

#### ***Paramètres métaboliques :***

Premièrement, nous avons observé que la compression dynamique intermittente n'a pas un effet délétère sur les cellules, aucune augmentation de nécrose ou apparition d'un phénomène d'apoptose n'ayant été observées. Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui montrent que les chondrocytes cultivés dans un biomatériau de chitosan maintiennent une viabilité supérieure à 95% jusqu'après 3 semaines sous compression dynamique (0,1 Hz, amplitude 5-15%) [Fehrenbacher A *et al.*, 2006]. Park

SH *et al.*, ont également montré que la compression dynamique (1 Hz) n'avait aucune influence sur la viabilité de CSMS de lapin encapsulées dans un hydrogel d'alginate [Park SH *et al.*, 2006].

En revanche, la compression dynamique semble avoir un effet sur la prolifération cellulaire. En condition statique, ou en dehors de toute stimulation, les chondrocytes ou les CSMS semblent en être à un stade de prolifération (phase de synthèse de l'ADN augmentée). Or après compression, nous notons une inhibition de cette phase, qui semble plus importante chez les chondrocytes. Ces données semblent être en contradiction avec d'autres études décrites dans la littérature. En effet, il a été montré que la compression dynamique (15% strain 0,3 Hz - 3 Hz) induisait une augmentation de la prolifération des chondrocytes encapsulés dans un gel d'agarose [Chowdhury TT *et al.*, 2006 ; Lee DA *et al.*, 2000]. Cependant, les différences notées sur les paramètres de contraintes ainsi que sur la nature des biomatériaux utilisés peuvent expliquer ces variations.

Ainsi que nous l'avons déjà montré dans notre laboratoire, il serait possible que cette inhibition de la prolifération s'explique par l'entrée des cellules dans une phase de synthèse de la MEC [Fawzi-Grancher S *et al.*, 2006].

#### ***Expression de gènes d'intérêt et synthèse de la MEC :***

D'après les résultats préliminaires portant sur l'expression de gènes d'intérêt, il semble que les deux types cellulaires concernés répondent de manière différente.

Effectivement, les chondrocytes semblent être impliqués dans un processus de synthèse de la MEC, avec une tendance à l'augmentation de gènes codant pour les collagènes de type I, II, IIA, et dans une plus faible mesure, pour les agrécannes, avec une réponse meilleure à la fréquence de 1 Hz pour les marqueurs strictement chondrocytaires (le collagène de type II).

En revanche, on observe une variation faible de l'expression de ces gènes en regard de la contrainte mécanique pour les CSMS. Ces résultats ne nous permettant pas de discuter le bénéfice d'une fréquence par rapport à l'autre.

En conclusion, il est possible de dire que la compression dynamique intermittente agit sur la redifférenciation des chondrocytes et/ou la différenciation chondrocytaire des CSMs encapsulés dans un hydrogel d'alginate et pourrait entraîner un processus de chondrogénèse à plus long terme. En effet ces travaux ont porté sur une durée de 14 jours, ce qui n'est pas suffisant pour avoir une réponse définitive.

Cependant, il est déjà possible de dire que les conditions de contraintes devront être évaluées en fonction du type cellulaire, les chondrocytes semblent répondre plus favorablement à 1 Hz par rapport à 0.5 Hz.

Ces travaux préliminaires devront être poursuivis pour pouvoir, *in fine*, définir clairement le protocole de contrainte pour arriver à un transfert vers un bioréacteur capable d'assurer la néo-génèse du nouveau cartilage.

#### **IV. Influence de la stimulation biochimique sur les chondrocytes et les CSMs encapsulés dans un hydrogel d'alginate/HA**

Dans les deux parties précédentes, nous avons étudié l'influence de deux types de contrainte mécanique sur les réactions cellulaires des chondrocytes et CSMs encapsulés dans un gel d'alginate/HA. Bien que nos résultats aient montré que les contraintes mécaniques peuvent avoir des avantages sur le maintien du phénotype chondrocytaire ainsi que sur l'induction de la chondrogénèse, il est bien connu que les facteurs de croissance jouent un rôle essentiel dans la régénération du cartilage. Ils peuvent agir soit sur la prolifération cellulaire soit sur la synthèse de la MEC du chondrocyte [Sakai T *et al.*, 2002] et peuvent également contrôler le processus de la chondrogénèse.

Ainsi, dans cette partie, nous avons pour but d'explorer les effets de deux types de facteurs de croissance tels que le TGF- $\beta$ 1 et le BMP-2 sur les chondrocytes et CSMs cultivés en hydrogel d'alginate/HA sur l'activité métabolique, la prolifération, le cycle cellulaire, l'expression de gènes d'intérêt ainsi que la synthèse de collagènes.

En raison de la présence de facteurs de croissance dans le SVF, nous avons utilisé un substitut sérique, l'ITS, pour éviter les interférences ou les synergies entre les facteurs de croissance ajoutés et les facteurs de croissance présents dans le sérum. De plus, il a été montré que si la présence de 10% de SVF est connue pour favoriser la prolifération cellulaire, elle peut inhiber, en revanche, la synthèse matricielle [Fawzi-Grancher S *et al.*, 2006].

*De même que dans le cas des études sur la compression, ces travaux sont des préliminaires. Il sera nécessaire de confirmer les résultats par des expérimentations supplémentaires et les tests statistiques sont simplement indicatifs et les valeurs sont toutes relatives.*

##### ***IV.1. Réponses des chondrocytes***

###### ***IV.1.1. Activité métabolique***

L'activité métabolique des chondrocytes a été évaluée après 1 jour et 28 jours de culture grâce à un test d'Alamar Bleu.

Il apparaît, sur la Figure III-30 que il n'y a pas de changement significatif de l'activité métabolique des chondrocytes en fonction du temps ou des conditions de culture.

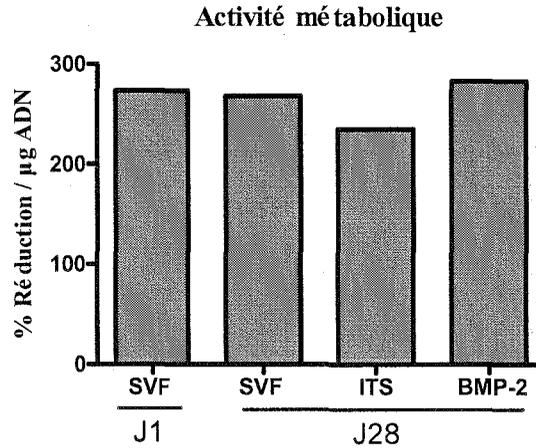


Figure III-30 : Effet de la BMP-2 sur l'activité métabolique des chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate/HA. (Test du Bleu Alamar) (n=1)

#### IV.1.2. Viabilité cellulaire

La Figure III-31 présente les résultats obtenus lors de l'analyse de la viabilité cellulaire en utilisant un Kit Vybrant/Apoptose™ après 1 jour et 28 jours de culture.

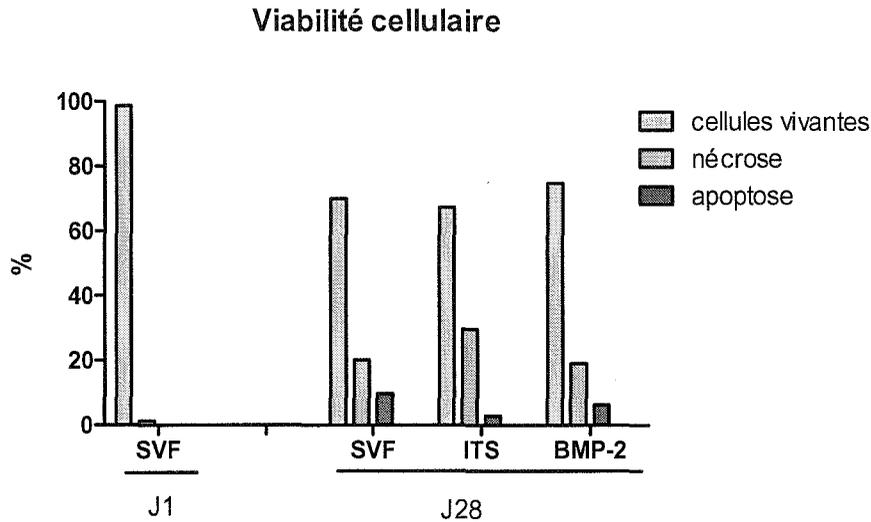


Figure III-31 : Effet de la BMP-2 sur la viabilité des chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate/HA. (Test Vybrant/Apoptosis™) (n=1).

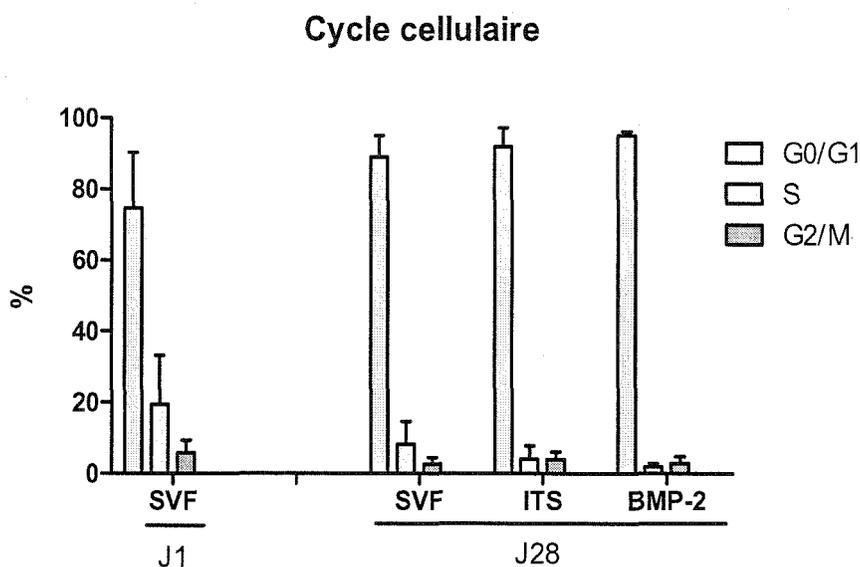
Il apparaît que la population de chondrocytes vivants à J1 diminue en comparaison avec celles des chondrocytes à J28 (98,6% versus 70%) et la population de cellules nécrotiques augmente (1,4% à J1 versus 20,2% à J28). De plus, il semble

que la présence de 1% d'ITS dans le milieu de culture induise une augmentation de la nécrose. Par ailleurs, on observe l'apparition d'une population apoptotique élevée (9,8%) dans le groupe de 10% de SVF comparativement aux études précédentes (<1%). Cependant, ses résultats sont représentatifs d'une seule expérimentation. Il est donc difficile de conclure.

#### *IV.1.3. Cycle cellulaire*

Les résultats de l'étude du cycle cellulaire réalisée sur les chondrocytes après 1 jour et 28 jours de culture sont présentés sur la Figure III-32.

Il apparaît que la population cellulaire en phase G0/G1 a augmenté, parallèlement la population cellulaire en phase S a diminué après 28 jours de culture en comparaison avec J1. Par ailleurs, il en ressort que la présence d'ITS et de BMP-2 a induit une augmentation de la population cellulaire dans la phase G0/G1 ainsi qu'une diminution de la population cellulaire dans la phase S comparativement au groupe 10% de SVF à J28.



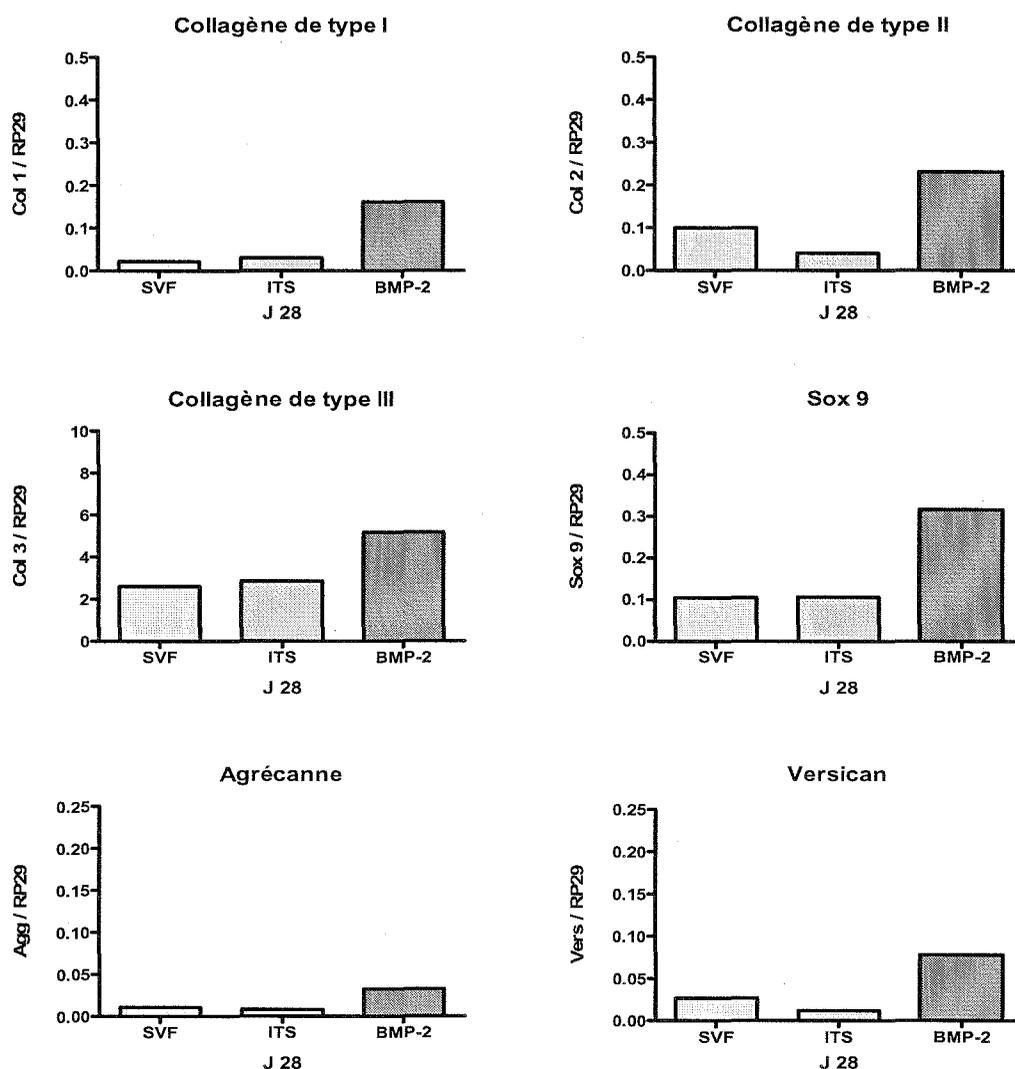
**Figure III-32 : Effet de la BMP-2 sur le cycle cellulaire des chondrocytes encapsulés dans un gel d'alginate/HA. (CMF) (n=1).**

#### *IV.1.4. Expression de gènes d'intérêt*

Sur la Figure III-33 sont présentés les résultats de l'étude de l'expression de gènes obtenus par l'analyse de PCRq qui a été réalisée sur les chondrocytes après 28

jours de culture.

D'après nos résultats, une tendance à l'augmentation de l'expression des collagènes de type I, II, III, Sox9, agrécanne et versican a été observée pour les chondrocytes cultivés dans un milieu contenant de la BMP-2 en comparaison avec ceux du groupe 10% de SVF ou 1% d'ITS.



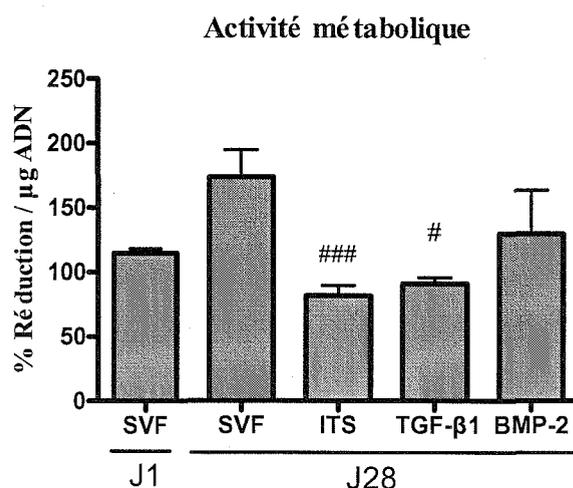
**Figure III-33 : Influence de la BMP-2 sur l'expression de gènes codant pour différentes protéines d'intérêt exprimés par des chondrocytes, après 28 jours de culture. (PCRq) Les données ont été normalisées et sont exprimées sous forme du rapport : gène / RP29. (n=1).**

## IV.2. Réponses des CSMs

### IV.2.1. Activité métabolique

Les résultats de l'analyse de l'activité métabolique des CSMs encapsulées dans un hydrogel d'alginate/HA et cultivées dans différentes conditions sont présentés sur la Figure III-34.

Il semble que l'activité métabolique des CSMs augmente après 28 jours de culture dans un milieu contenant 10% de SVF. En revanche, la présence de 1% d'ITS ou de TGF- $\beta$ 1 dans le milieu de culture induit une diminution significative de l'activité métabolique en comparaison avec celle du groupe 10% de SVF à J28.



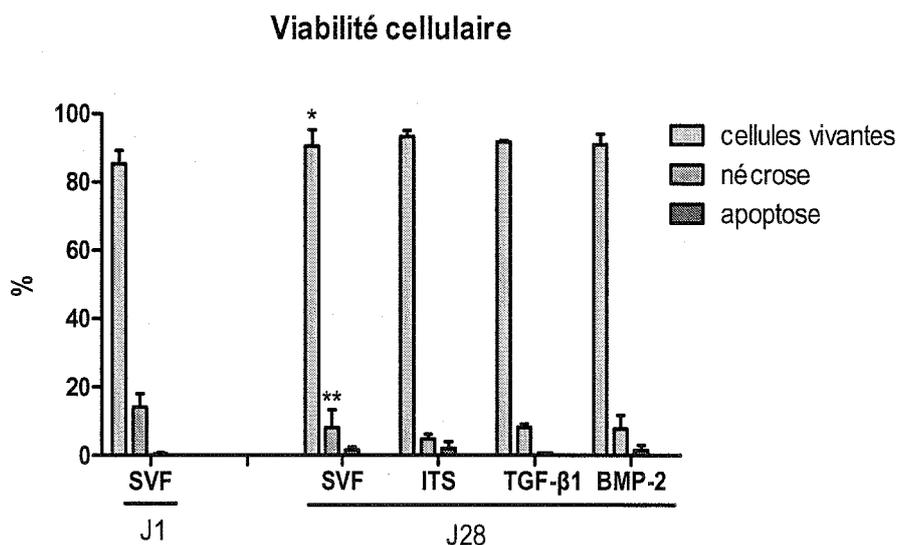
**Figure III-34 : Effet de facteurs de croissance (TGF- $\beta$ 1 et BMP-2) sur l'activité métabolique des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA. (Test Bleu Alamar) Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard ( $n=2$ ). # $P<0,05$ , ### $P<0,001$ , versus le groupe 10% de SVF à J28.**

### IV.2.2. Viabilité cellulaire

La Figure III-35 présente les résultats obtenus par analyse de la viabilité cellulaire après 1 jour et 28 jours de culture.

Contrairement à ce qui a été observé pour les chondrocytes, il apparaît que, après 28 jours de culture, la population de cellules vivantes a augmenté (85,3% à J1 versus 90,5% à J28) et la population de cellules nécrotiques a diminué (14,1% à J1 versus 8,0% à J28) quel que soit le traitement. De plus, la proportion de cellules apoptotiques reste très faible (<2%). Aucune variation entre les différentes conditions de culture n'a

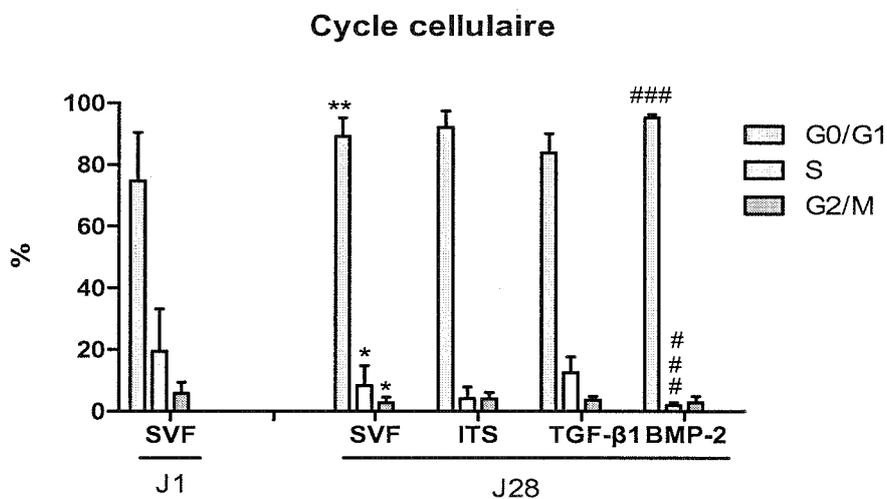
été observée ( $P > 0,05$ ).



**Figure III-35 : Effet de facteurs de croissance (TGF-β1 et BMP-2) sur la viabilité des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA. (Test Vybrant/Apoptosis™)** Les résultats sont exprimés en moyenne ± erreur standard de la moyenne (n=2). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , J14 versus J1.

#### IV.2.3. Cycle cellulaire

Les résultats de l'étude du cycle cellulaire réalisée sur les chondrocytes après 1 jour et 28 jours de culture sont présentés sur la Figure III-36.



**Figure III-36 : Effet de TGF-β1 et BMP-2 sur le cycle cellulaire des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA. (CMF)** Les résultats sont exprimés en moyenne ± erreur standard de la moyenne (n=2). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  J14 versus J1; ### $P < 0,001$  versus le groupe 10% SVF à J28.

Il est montré que la population cellulaire en phase G0/G1 a augmenté, parallèlement à la baisse de la population en phase S et phase G2/M après 28 jours de culture, comparativement à J1. Par ailleurs, il apparaît que la présence de BMP-2 a induit une augmentation significative de la population cellulaire dans la phase G0/G1 ainsi qu'une diminution significative de la population cellulaire dans la phase S en comparaison avec celles du groupe 10% de SVF. Enfin, il semble que l'addition d'ITS et de TGF- $\beta$ 1 dans le milieu de culture n'a pas d'effet notable sur le cycle cellulaire des CSMs.

#### *IV.2.4. Expression de gènes d'intérêt*

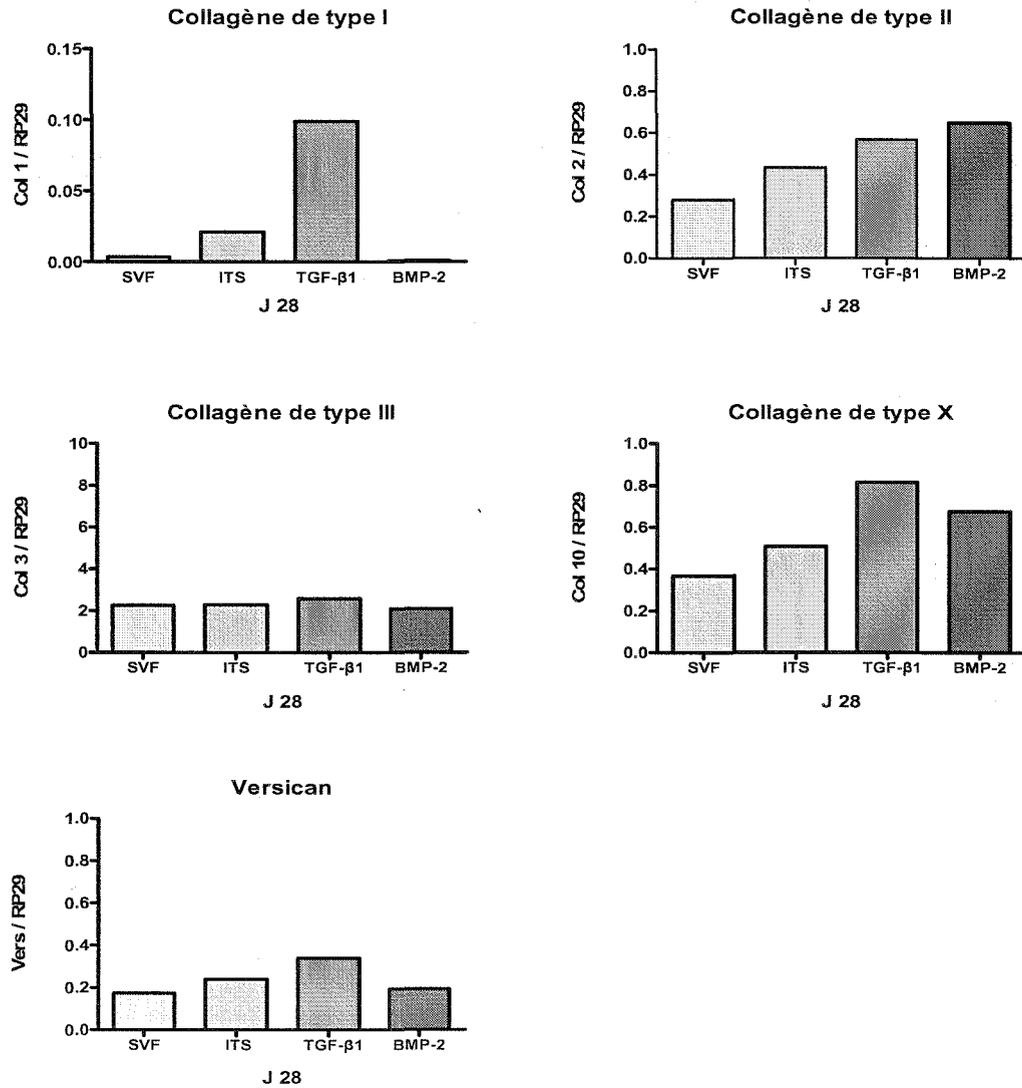
La Figure III-37 présente les résultats de l'étude de l'expression de gènes obtenus par l'analyse de PCRq qui a été réalisée sur les chondrocytes après 28 jours de culture.

Aucune variation n'est observée pour le collagène de type III et le versican quel que soit le traitement. En revanche, il semble que le TGF- $\beta$ 1 et la BMP-2 induisent une tendance à l'augmentation de collagènes de type II et type X. Le TGF- $\beta$ 1 semble induire une augmentation sur l'expression de gène codant pour le collagène de type I tandis que la BMP-2 inhibe son expression. Cependant, notons que ces résultats ne représentent qu'une seule expérimentation. Il est donc nécessaire d'être prudent quand aux conclusions.

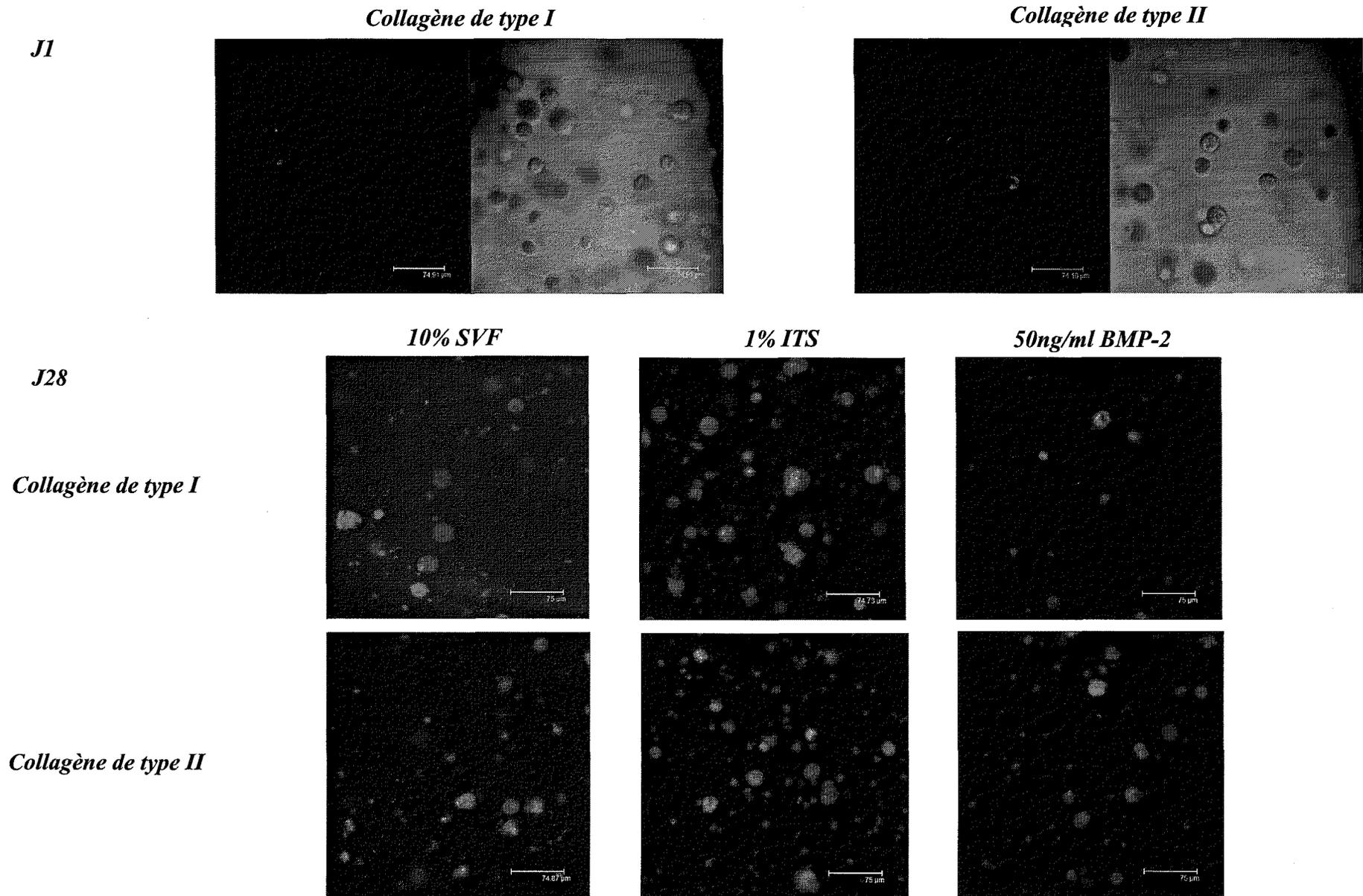
#### *IV.2.5. Synthèse de collagènes de type I et II*

Nous avons également étudié la synthèse de collagènes de type I et II par les CSMs après 28 jours de culture.

La Figure III-38 représente les images obtenues par immunofluorescence indirecte. Il apparaît que, à J1, les CSMs n'expriment ni le collagène de type I ni celui de type II. Après 28 jours de culture, l'expression de collagènes de type I et II est observée dans l'espace péricellulaire des CSMs quelles que soient les conditions expérimentales. De plus, le collagène de type II semble être plus exprimé que le collagène de type I en présence de BMP-2.



**Figure III-37 : Influence de facteurs de croissance (TGF-β1 et BMP-2) sur l'expression de gènes codant pour différentes protéines d'intérêt exprimés par des CSMs, après 28 jours de culture. (PCRq) Des données ont été normalisées et sont exprimées sous forme du rapport : gène / RP29. (n=1).**



**Figure III-38 : Influence de BMP-2 sur la synthèse de collagènes de type I et II dans la matrice péri-cellulaire des CSMs encapsulées dans un gel d'alginate/HA. Etude réalisée par immunofluorescence indirecte et observation par microscopie confocale (Objectif x40, immersion eau, ON=0.8) La coloration verte représente la présence du collagène de type I ou II, selon le cas.**

### **IV.3. Discussion**

Les deux facteurs de croissance que nous avons utilisés font partie de la superfamille de TGF- $\beta$ s. Ils sont largement utilisés en ingénierie tissulaire, notamment le TGF- $\beta$ 1 qui est connu pour favoriser la synthèse de collagènes. Il a été montré que le TGF- $\beta$ 1 et la BMP-2 peuvent induire la redifférenciation ainsi que la chondrogénèse de cellules cultivées en monocouche, en «micromasses» ou en «pellet» (cf. étude bibliographique, paragraphe III.1.1). Cependant, les effets de la combinaison de facteurs de croissance avec des biomatériaux tridimensionnels sur les comportements cellulaires ne sont pas bien clairs. Nous avons donc, dans cette partie, étudié leurs effets sur les cellules encapsulées dans un hydrogel d'alginate/HA.

Contrairement aux expérimentations précédentes, ces travaux ont été réalisés en absence de SVF pour éviter les interférences (synergies ou antagonismes) entre les différents facteurs de croissance présents dans le sérum et les facteurs de croissance étudiés. Cependant, les composés sériques sont nécessaires au maintien d'un bon état métabolique des cellules en culture. Nous avons donc remplacé le SVF par un substitut, l'ITS, ainsi que des composés (acide ascorbique, proline, pyruvate de sodium et dexaméthasone) couramment utilisés dans les milieux chondrogéniques et connus pour améliorer la prolifération cellulaire et/ou de la synthèse de la MEC [Yong SC *et al.*, 2005].

Par ailleurs, les concentrations choisies en facteurs de croissance étaient de 10 ng/mL et de 50 ng/mL pour le TGF- $\beta$ 1 et le BMP-2 respectivement, ces deux concentrations étant les plus couramment utilisées en ingénierie tissulaire [Bosnakovski D *et al.*, 2005 ; Mehlhorn AT *et al.*, 2006 ; Park Y *et al.*, 2005 ; Leguen E *et al.*, 2007].

Ces travaux restent préliminaires, l'ensemble des possibilités d'étude n'a pas été abordé. En effet, dans un premier temps, les deux facteurs de croissance ont été testés sur les CSMs, mais seule l'action de BMP-2 a été étudiée sur les chondrocytes. Des effets de ces facteurs de croissance, ainsi que du substitut de SVF, l'ITS, ont donc été analysés sur les paramètres de métabolisme et de synthèse matricielle, en comparaison avec les travaux effectués sur l'influence de contraintes mécaniques.

Etant donné le caractère préliminaire de cette étude, nous nous limiterons à l'observation de ces premiers travaux et à la suggestion d'hypothèses, qui devront bien entendu être confirmées.

***Paramètres métaboliques :***

Il apparaît que, du point de vue du métabolisme cellulaire, les chondrocytes semblent plus stables vis-à-vis du traitement. En effet, aucune variation de l'activité métabolique n'est notée quelles que soient les conditions expérimentales.

En revanche, les CSMs, se révèlent plus sensibles au manque de SVF, ce qui a déjà été montré pour d'autres types cellulaires [Fawzi-Grancher S *et al.*, 2006]. Il semblerait néanmoins que la prolifération cellulaire soit plus faible dans tous les cas au bout de 28 jours de culture, sans qu'il y ait réellement de corrélation avec la présence de facteurs de croissance.

***Expression de gènes d'intérêt et synthèse de la MEC :***

Il semble que la BMP-2 entraîne une augmentation de la synthèse de gènes codant pour la MEC cartilagineuse. Nos résultats peuvent être confirmés par une étude récente qui montre qu'il existe un effet synergique entre le fait que l'ensemencement de chondrocytes dans le gel d'alginate soit proche de la situation dans le tissu natif et l'action de BMP-2, ces deux facteurs réunis pouvant favoriser la redifférenciation de chondrocytes [Grunder T *et al.*, 2004].

De même, la BMP-2 semble favoriser l'expression de gène codant pour le collagène de type II ainsi que la synthèse du collagène de type II, ce qui signifie l'initiation de la chondrogénèse pour les CSMs. Ce résultat est, par ailleurs, confirmé par l'étude de l'expression des collagènes, qui montre une apparition de ce type de collagène.

Cependant, ces travaux ne nous permettent pas de conclure. Il nous semble que ces facteurs de croissance pourraient favoriser la redifférenciation ainsi que la chondrogénèse. Mais les conditions d'utilisation de ces facteurs de croissance restent controversées. Il est donc nécessaire de poursuivre ces travaux en appliquant

différentes concentrations de facteurs de croissance, la combinaison de ces deux types de facteurs de croissance, ainsi que le couplage facteurs de croissance-contraintes mécaniques.

**CHAPITRE IV : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Les chondrocytes sont les cellules uniques situées au sein du cartilage. Les CSMs représentent une source cellulaire alternative pour l'ingénierie tissulaire du cartilage grâce à leur potentiel de différenciation en chondrocytes. De nombreux facteurs mécaniques et biochimiques, ainsi que leur mode de culture (2D ou 3D) dans des biomatériaux peuvent intervenir dans les processus de la redifférenciation et de la chondrogénèse.

L'objectif de cette étude était de définir un ensemble de protocoles bien contrôlés des premières phases de la reconstruction d'un cartilage :

- expansion cellulaire,
- définition des stimulations environnementales, tant mécaniques que biochimiques.

En effet, il était important de maîtriser ces étapes avant de s'engager sur la voie de la reconstruction d'un néo-cartilage.

Tous ces travaux ont été réalisés en parallèle sur des chondrocytes et des CSMs, ce qui nous permettra par la suite d'opérer un choix judicieux des cellules à utiliser plus en aval dans l'étude, et également d'avoir la réponse des cellules natives du tissu pour chaque protocole.

Dans un premier temps, nos travaux avaient pour but de définir un compromis entre l'expansion cellulaire en monocouche, nécessaire pour avoir un nombre suffisant de cellules pour envisager la reconstruction tissulaire, et le maintien d'un phénotype chondrocytaire ou indifférencié selon la cellule étudiée.

En analysant l'évolution, au cours des passages (P0 à P5), d'une part des marqueurs phénotypiques de cellules souches (CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 et CD166), et d'autre part des gènes codant pour les marqueurs phénotypiques spécifiques de l'état des chondrocytes (collagène de type II, IIA, X, Sox 9, agrécanne, mais aussi collagène de type I, III, versican *etc.*), nous avons pu définir les conditions précises d'utilisation de ces cellules.

Nous en avons conclu qu'il était dangereux d'utiliser des chondrocytes après le second passage, puisqu'au delà ces cellules se dédifférencient. Par ailleurs, en ce qui

concerne les CSMs, nous avons défini que leur phénotype indifférencié, au travers de l'expression quantitative des clusters de différenciation membranaire (CD73, CD90, CD105, CD166) se stabilisait après le passage et qu'il était donc possible de les utiliser au moins jusqu'au 4<sup>ème</sup> ou 5<sup>ème</sup> passage sans qu'il y ait modification du phénotype indifférencié des CSMs.

Dans un deuxième temps, en raison de l'importance des contraintes mécaniques sur le maintien du phénotype chondrocytaire ainsi que pour la chondrogénèse, nous avons étudié l'influence d'un type de contrainte mécanique tel que l'entrechoquement sur le comportement des chondrocytes et des CSMs ensemencés dans un biomatériau tridimensionnel (hydrogel d'alginate/HA).

Nos résultats ont montré que l'hydrogel d'alginate/HA peut constituer un biomatériau propice pour la culture des chondrocytes et des CSMs soumis à une stimulation mécanique. Cette contrainte mécanique appliquée sur les constructions cellulaires (cellules-alginate/HA) a amélioré l'ensemble des activités métaboliques, la prolifération, l'expression de certains gènes chondrogéniques ainsi qu'un début de la synthèse matricielle. Cependant, ces effets sont étroitement liés aux paramètres caractérisant la contrainte tels que la durée, ainsi qu'au type cellulaire. En effet, 4h/J d'entrechoquement peut être considéré comme condition optimale. Néanmoins, bien que nos résultats soient encourageants, il apparaît que l'entrechoquement seul ne soit pas suffisant pour avoir des résultats satisfaisants.

Dans un troisième temps, nous avons alors étudié, de façon préliminaire, les effets d'une contrainte mécanique, s'exerçant *in vivo* sur le cartilage, la compression dynamiques intermittente, sur ces deux types de cellules encapsulées dans le même biomatériau.

Nos résultats ont montré qu'une compression dynamique intermittente (200 KPa, 4h/jour) n'est pas délétère pour les cellules mais peut inhiber la prolifération cellulaire. Cette baisse de prolifération pourrait être liée à une néo-synthèse matricielle, qui est étroitement liée à la fréquence ainsi qu'au type cellulaire. Cependant, des travaux

complémentaires seront toutefois nécessaires pour confirmer nos résultats.

Enfin, une étude préliminaire a été conduite sur la réponse des cellules incorporées dans les biomatériaux aux stimulations biochimiques. Lors de cette étude préliminaire, nous avons testé la réponse des chondrocytes ou des CSMs, en terme de métabolisme et de synthèse matricielle vis-à-vis de deux facteurs de croissance : le TGF- $\beta$ 1 et la BMP-2.

Nos résultats ont montré que le TGF- $\beta$ 1 et la BMP-2 semblent capables, ainsi qu'il a déjà été montré, d'induire l'expression de gènes chondrogéniques par les cellules encapsulées dans un hydrogel d'alginate/HA. Cette étude nécessite également d'être confirmée par des études complémentaires.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux que nous avons menés sur le phénomène de la redifférenciation de chondrocytes ainsi que sur la chondrogénèse de CSMs en présence de contraintes mécaniques et de facteurs de croissance a permis par l'analyse des réponses cellulaires de chondrocytes et celles de CSMs soumis aux stimulations mécaniques et biochimiques, d'optimiser les conditions de culture pour favoriser la formation un néo-cartilage *in vitro*.

Par ailleurs, ces travaux devront être confirmés, et pourront donner lieu à des études complémentaires afin de répondre aux questions suivantes :

- Est-ce qu'il existe des effets synergiques entre les contraintes mécaniques et des facteurs de croissance sur la redifférenciation ainsi que sur la chondrogénèse?
- Quelle est la voie de signalisation de la mécanotransduction et celle des facteurs de croissance? Ces voies se recoupent-elles?
- Est-ce que les constructions cellulaires obtenues *in vitro* par ces moyens peuvent former un cartilage structurel et fonctionnel *in vivo*.

Enfin, il sera nécessaire d'étudier d'autres biomatériaux, qui présenteraient des propriétés mécaniques plus proche du cartilage natif. Dans ce but, une étude préliminaire a été initiée sur des cellulesensemencées dans des éponges de collagène de type I, mais ces travaux ne sont qu'à leurs débuts.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Aderian C, Kyriacos A. Principles of cell mechanics for cartilage tissue *engineering Ann Biomed Eng.* 2003; 31: 1-11.
- Adolphe M, Benya P. Different types of cultured chondrocytes: the in vitro approach to study of Biological regulation, in Biological Regulation of the chondrocyte, *Adolphe M.* 1992, 105-139.
- Afoke NY, Byers PD, Hutton WC. Contact pressures in the human hip joint. *J Bone Joint Surg Br.* 1987; 69 : 536-541.
- Aigner T, Bertling W, Stoss H *et al.* Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest.* 1993; 91: 829-837.
- Aigner T, Stove J. Collagens-major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003; 55 : 1569-1593.
- Airas L, Hellman J, Salmi M *et al.* An electromagnetic compressive force by cell exciter stimulates chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 2006; 12 : 3107-3117.
- Airas L, Hellman J, Salmi M *et al.* CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J Exp Med.* 1995; 182 :1603-1608.
- Akmal M, Anand A, Anand B *et al.* The culture of articular chondrocytes in hydrogel constructs within a bioreactor enhances cell proliferation and matrix synthesis. *J Bone Joint Surg Br.* 2006; 88: 544-553.
- Alsalameh S, Amin R, Gemba T *et al.* Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 2004; 50 : 1522-1532.
- Andersson S, Nilsson B, Hessel T *et al.* Degenerative joint disease in ballet dancers. *Clin Orthop.* 1989; 238 : 233-236.
- Aragona F, D'Urso L, Marcolongo R. Immunologic aspects of bovine injectable collagen in humans. *Eur Urol.* 1998; 33 : 129-133.
- Armstrong CG, Mow VC. Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration, and water content. *J Bone Joint Surg Am.* 1982; 64 : 88-94.
- Arokoski JP, Jurvelin JS, Väättäinen U *et al.* Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. *Scand J Med Sci Sports.* 2000; 10 : 186-198.
- Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science.* 2002; 296 : 1646-1647.
- Aydellote KA, Schumahcer BL, Kuettner KE. Heterogeneity of articular chondrocytes,

- in articular cartilage and osteoarthritis. *New York Raven Press*. 1992; 237-249.
- Bader DL and Kempson GE. The short-term compressive properties of mature human articular cartilage. *Biomed Mater Eng*. 1994; 4 : 245-256.
- Bader DL, Kempson GE, Egan J *et al*. The effects of selective matrix degradation on the short-term compressive properties of mature human articular cartilage. *Biochim Biophys Acta*. 1992; 1116 : 147-154.
- Bank RA, Krikken M, Beekman B *et al*. A simplified measurement of degraded collagen in tissues: application in healthy, fibrillated and osteoarthritic cartilage. *Matrix Biol*. 1997; 16 : 233-243.
- Bank RA, Soudry M, Maroudas A *et al*. The increased swelling and instantaneous deformation of osteoarthritic cartilage is highly correlated with collagen degradation. *Arthritis Rheum*. 2000; 43 : 2202-2210.
- Banu N, Tsuchiya T, Sawada R. Effects of a biodegradable polymer synthesized with inorganic tin on the chondrogenesis of human articular chondrocytes. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 77 : 84-89.
- Barry FP, Boynton RE, Liu B *et al*. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow : differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res*. 2001; 268 : 189-200.
- Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S *et al*. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 265 : 134-139.
- Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C *et al*. Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood*. 1994; 84 : 2554-2565.
- Begley CM, Kleis SJ. The fluid dynamic and shear environment in the NASA/JSC rotating-wall perfused-vessel bioreactor. *Biotechnol Bioeng*. 2000; 70 : 32-40.
- Bergmann G, Deuretzbacher G, Heller M *et al*. Hip contact forces and gait patterns from routine activities. *J Biomech*. 2001; 34 : 859-871.
- Bilezikjian LM, Blount AL, Donaldson CJ *et al*. Pituitary actions of ligands of the TGF-beta family: activins and inhibins. *Reproduction*. 2006; 132 : 207-215.
- Bliddal H, Christensen R. The management of osteoarthritis in the obese patient: practical considerations and guidelines for therapy. *Obes Rev*. 2006; 7 : 323-331.
- Bobbert M. Ethical questions concerning research on human embryos, embryonic stem cells and chimeras. *Biotechnol J*. 2006; 1 : 1352-1369.
- Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G *et al*. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res*. 2005; 319 : 243-253.
- Boyer LA, Mathur D, Jaenisch R. Molecular control of pluripotency. *Curr Opin Genet*

*Dev.* 2006; 16 : 455-462.

Braccini A, Wendt D, Jaquiere C *et al.* Three-dimensional perfusion culture of human bone marrow cells and generation of osteoinductive grafts. *Stem Cells.* 2005; 23 : 1066-1072.

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A *et al.* Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1994; 331 : 889-895.

Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A *et al.* Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop Relat Res.* 1996; 326 : 270-283.

Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem.* 1997; 64 : 278-294.

Buckwalter JA, Lane NE. Athletics and osteoarthritis. *Am J Sports Med.* 1997; 25 : 873-881.

Buckwalter JA, Rosenberg LC. Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. *Electron Microsc Rev.* 1998; 1 : 87-112.

Buckwalter JA, Roughley PJ, Rosenberg LC. Age-related changes in cartilage proteoglycans : quantitative electron Microscopy studies. *Microsc Res Tech.* 1994(a); 8 : 398-408.

Burton-Wurster N, Liu W, Matthews GL *et al.* TGF beta 1 and biglycan, decorin, and fibromodulin metabolism in canine cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2003; 11 : 167-176.

Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinsky AJ *et al.* Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte / agarose culture. *J Cell Sci.* 1995; 108 : 1497-1508.

Buschmann MD, Kim YJ, Wong M *et al.* Stimulation of aggrecan synthesis in cartilage explants by cyclic loading is localized to regions of high interstitial fluid flow. *Arch Biochem Biophys.* 1999; 366 : 1-7.

Campbell JJ, Lee DA, Bader DL. Dynamic compressive strain influences chondrogenic gene expression in human mesenchymal stem cells. *Biorheology.* 2006; 43 : 455-470.

Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev.* 2003; 24 : 218-235.

Cancedda R, Mastrogiacomo M, Bianchi G *et al.* Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone. *Novartis Found Symp.* 2003; 249 : 133-143.

Carver SE, Heath CA. Increasing extracellular matrix production in regenerating cartilage with intermittent physiological pressure. *Biotechnol Bioeng.* 1999; 62 : 166-174.

Carver SE, Heath CA. Semi-continuous perfusion system for delivering intermittent physiological pressure to regenerating cartilage. *Tissue Eng.* 1999; 5 : 1-11.

Cheifetz S, Bellón T, Calés C *et al.* Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1992; 267 : 19027-19030.

Chen CW, Tsai YH, Deng WP *et al.* Type I and II collagen regulation of chondrogenic differentiation by mesenchymal progenitor cells. *J Orthop Res.* 2005; 23 : 446-453.

Chen J, Horan RL, Bramono D *et al.* Monitoring mesenchymal stromal cell developmental stage to apply on-time mechanical stimulation for ligament tissue engineering. *Tissue Eng.* 2006; 12 : 3085-3095.

Chimal-Monroy J, Diaz de Leon L. Expression of N-cadherin, N-CAM, fibronectin and tenascin is stimulated by TGF-beta1, beta2, beta3 and beta5 during the formation of precartilaginous condensations. *Int J Dev Biol.* 1999; 43 : 59-67.

Ching CT, Chow DH, Yao FY *et al.* Changes in nuclear composition following cyclic compression of the intervertebral disc in an *in vivo* rat-tail model. *Med Eng Phys.* 2004; 26 : 587-594.

Chiou M, Xu Y, Longaker MT. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 343 : 644-652.

Chowdhury TT, Bader DL, Lee DA. Dynamic compression counteracts IL-1beta induced iNOS and COX-2 activity by human chondrocytes cultured in agarose constructs. *Biorheology.* 2006; 43 : 413-429.

Chowdhury TT, Bader DL, Shelton JC *et al.* Temporal regulation of chondrocyte metabolism in agarose constructs subjected to dynamic compression. *Arch Biochem Biophys.* 2003; 417 : 105-111.

Chowdhury TT, Knight MM. Purinergic pathway suppresses the release of .NO and stimulates proteoglycan synthesis in chondrocyte/agarose constructs subjected to dynamic compression. *J Cell Physiol.* 2006; 209 : 845-853.

Chowdhury TT, Salter DM, Bader DL *et al.* Integrin-mediated mechanotransduction processes in TGFbeta-stimulated monolayer-expanded chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 318 : 873-881.

Chua KH, Aminuddin BS, Fuzina NH *et al.* Insulin-transferrin-selenium prevent human chondrocyte dedifferentiation and promote the formation of high quality tissue engineered human hyaline cartilage. *Eur Cell Mater.* 2005; 179 : 58-67.

Cornwall MW. Biomechanics of noncontractile tissues. *Phys Ther.* 1984; 64 : 1869-1873.

Cortial D, Gouttenoire J, Rousseau CF *et al.* Activation by IL-1 of bovine articular chondrocytes in culture within a 3D collagen-based scaffold. An *in vitro* model to

address the effect of compounds with therapeutic potential in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2006; 14 : 631-640.

Coulombel L. Adult stem cells: being is not being. *Med Sci.* 2003; 19 : 683-694.

Cremer MA, Rosloniec EF, Kang AH. The cartilage collagens: a review of their structure, organisation, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J Mol Med.* 1998; 76 : 275-288.

Davisson T, Kunig S, Chen A *et al.* Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage. *J Orthop Res.* 2002; 20 : 842-848.

Davisson T, Sah RL, Ratcliffe A. Perfusion increases cell content and matrix synthesis in chondrocyte three-dimensional cultures. *Tissue Eng.* 2002; 8 : 807-816.

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P *et al.* Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001; 44 : 1928-1942.

De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP. Failure of in vitro-differentiated mesenchymal stem cells from the synovial membrane to form ectopic stable cartilage in vivo. *Arthritis Rheum.* 2004; 50 : 142-150.

De Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15 : 1-11.

De Lise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage.* 2000; 8 : 309-334.

De Rosa E, Urciuolo F, Borselli C *et al.* Time and space evolution of transport properties in agarose-chondrocyte constructs. *Tissue Eng.* 2006; 12 : 2193-2201.

Dell'Accio F, De Bari C, Luyten FP. Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage in vivo. *Arthritis Rheum.* 2001; 44 : 1608-19.

Demarteau O, Wendt D, Braccini A *et al.* Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 310 : 580-588.

Diaz-Romero J, Gaillard JP, Grogan SP *et al.* Immunophenotypic analysis of human articular chondrocytes: changes in surface markers associated with cell expansion in monolayer culture. *J Cell Physiol.* 2005; 202 : 731-742.

Domm C, Schünke M, Christesen K *et al.* Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension. *Osteoarthr Cartil.* 2002; 10 : 13-22.

Domm C, Schünke M, Steinhagen J *et al.* Influence of various alginate brands on the redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate bead culture under high and low oxygen tension. *Tissue Eng.* 2004; 10 : 1796-1805.

Downie SA, Newman SA. Different roles for fibronectin in the generation of fore and hind limb precartilaginous condensations. *Dev Biol.* 1995; 172 : 519-530.

Draper JS, Moore HD, Ruban LN *et al.* Culture and characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 2004; 13 : 325-336.

D'Souza AL, Masuda K, Otten LM *et al.* Differential effects of interleukin-1 on hyaluronan and proteoglycan metabolism in two compartments of the matrix formed by articular chondrocytes maintained in alginate. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 374 : 59-65.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V *et al.* Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 1997; 89 : 747-754.

Eames BF, de la Fuente L, Helms JA. Molecular ontogeny of the skeleton. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2003; 69 : 93-101.

Elder SH, Goldstein SA, Kimura JH *et al.* Chondrocyte differentiation is modulated by frequency and duration of cyclic compressive loading. *Ann Biomed Eng.* 2001; 29 : 476-482.

Elder SH, Kimura JH, Soslowsky LJ *et al.* Effect of compressive loading on chondrocyte differentiation in agarose cultures of chick limb-bud cells. *J Orthop Res.* 2000; 18 : 78-86.

Eltzschig HK, Weissmuller T, Mager A *et al.* Nucleotide metabolism and cell-cell interactions. *Methods Mol Biol.* 2006; 341 : 73-87.

Engelhardt M, Lubbert M, Guo Y. CD34(+) or CD34(-): which is the more primitive? *Leukemia.* 2002; 16 : 1603-1608.

Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M *et al.* Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem.* 2000; 275 : 8695-8702.

Estes BT, Wu AW, Guilak F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis Rheum.* 2006; 54 : 1222-1232.

Eyre DR, Wu JJ, Fernandes RJ *et al.* Recent developments in cartilage research: matrix biology of the collagen II/IX/XI heterofibril network. *Biochem Soc Trans.* 2002; 30 : 893-899.

Eyre DR. Collagens and cartilage matrix homeostasis. *Clin Orthop Relat Res.* 2004; 427 : S118-S122.

Fawzi-Grancher S, De Isla N, Faure GC *et al.* Optimisation of biochemical condition and substrates in vitro for tissue engineering of ligament. *Ann Biomed Eng.* 2006; 34 : 1767-1777.

Fawzi-Grancher S, Slimani S, Kolopp-Sarda MN *et al.* Effect of cyclic stretching and foetal bovine serum (FBS) on proliferation and extra cellular matrix synthesis of

- fibroblast. *Biomed Mater Eng.* 2006; 16, S137-144.
- Fehrenbacher A, Steck E, Roth W *et al.* Long-term mechanical loading of chondrocyte-chitosan biocomposites in vitro enhanced their proteoglycan and collagen content. *Biorheology.* 2006; 43 : 709-720.
- Flannery CR, Little CB, Hughes CE *et al.* Expression and activity of articular cartilage hyaluronidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 251 : 824-829.
- Font B, Eichenberger D, Goldschmidt D *et al.* Structural requirements for fibromodulin binding to collagen and the control of type I collagen fibrillogenesis. *Eur J Biochem.* 1998; 254 : 580-587.
- Freyria AM, Cortial D, Ronziere MC *et al.* Influence of medium composition, static and stirred conditions on the proliferation of and matrix protein expression of bovine articular chondrocytes cultured in a 3-D collagen scaffold. *Biomaterials.* 2004; 25 : 687-697.
- Fukui N, Purple CR, Sandell LJ. Cell biology of osteoarthritis: the chondrocyte's response to injury. *Curr Rheumatol Rep.* 2001; 3 : 496-505.
- Galera P, Vivien D, Pronost S *et al.* Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) up-regulation of collagen type II in primary cultures of rabbit articular chondrocytes (RAC) involves increased mRNA levels without affecting mRNA stability and procollagen processing. *J Cell Physiol.* 1992; 153 : 596-606.
- Galois L, Freyria AM, Grossin L *et al.* Cartilage repair: surgical techniques and tissue engineering using polysaccharide- and collagen-based biomaterials, *Biotheology.* 2004 ; 41 : 433-443.
- Gerard C, Catuogno C, Amargier-Huin C *et al.* The effect of alginate, hyaluronate and hyaluronate derivatives biomaterials on synthesis of non-articular chondrocyte extracellular matrix. *J Mater Sci Mater Med.* 2005; 16 : 541-551.
- Gerhart TN, Kirker-Head CA, Kriz MJ *et al.* Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res.* 1993; 293 : 317-326.
- Ghivizzani SC, Oligino TJ, Robbins PD *et al.* Cartilage injury and repair. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2000; 11 : 289-307.
- Gigant C, Latger-Cannard V, Bensoussan D *et al.* Quantitative expression of adhesion molecules on granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood, bone marrow, and cord blood CD34+ cells. *J Hematother Stem Cell Res.* 2001; 10 : 807-814.
- Gigant-Huselstin C, Dumas D, Huber P *et al.* Influence of mechanical stress on extracellular matrixes synthesized by chondrocytes seeded onto alginate and hyaluronate-based 3D biosystems. *J Mechanics Med Biol.* 2003; 3 : 59-70.
- Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem.*

2006; 97 : 33-44.

Grad S, Lee CR, Gorna K *et al.* Surface motion upregulates superficial zone protein and hyaluronan production in chondrocyte-seeded three-dimensional scaffolds. *Tissue Eng.* 2005; 11 : 249-256.

Grande DA, Mason J, Light E *et al.* Stem cells as platforms for delivery of genes to enhance cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2003; 85 : 111-116.

Grant C, Twigg P, Egan A *et al.* Poly (vinyl alcohol) hydrogel as a biocompatible viscoelastic mimetic for articular cartilage. *Biotechnol Prog.* 2006; 22 : 1400-1406.

Gray ML, Pizzanelli AM, Grodzinsky AJ *et al.* Mechanical and physiochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. *J Orthop Res.* 1988; 6 : 777-792.

Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R *et al.* Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol.* 2006; 207 : 331-339.

Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population : effect of dexamethasone. *J Cell Biol.* 1988; 106 : 2139-2151.

Gruber R, Karreth F, Kandler B *et al.* Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under *in vitro* conditions. *Platelets.* 2004; 15 : 29-35.

Grunder T, Gaissmaier C, Fritz J *et al.* Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *Osteoarthr Cartil.* 2004; 12 : 559-567.

Guilak F, Jones WR, Ting-Beall HP *et al.* The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 1999; 7 : 59-70.

Guilak F, Ratcliffe A, Lane N *et al.* Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis. *J Orthop Res.* 1994; 12 : 474-484.

Guilak F, Ratcliffe A, Mow VC. Chondrocyte deformation and local tissue strain in articular cartilage: a confocal microscopy study. *J Orthop Res.* 1995; 13 : 410-421.

Guillot PV, O'Donoghue K, Kurata H *et al.* Fetal stem cells : betwixt and between. *Semin Reprod Med.* 2006; 24 : 340-347.

Hall AC, Urban JP, Gohl KA. The effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in articular cartilage. *J Orthop Res.* 1991; 9 : 1-10.

Hall BK. A role for epithelial-mesenchymal interactions in tail growth/morphogenesis and chondrogenesis in embryonic mice. *Cells Tissues Organs.* 2000; 166 : 6-14.

Hammond TG, Hammond JM. Optimized suspension culture : the rotating-wall vessel. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001; 281 : F12-25.

Hangody L, Kish G, Karpati Z *et al*. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects : application in clinical practice. *Orthopedics*. 1998; 21 : 751-756.

Hasler EM, Herzog W, Wu JZ, *et al*. Articular cartilage biomechanics: theoretical models, material properties, and biosynthetic response. *Crit Rev Biomed Eng*. 1999; 27 : 415-488.

Hayes DW, Brower R, John KJ. Articular cartilage. Anatomy, injury, and repair. *Clin Podiatr Med Surg*. 2001; 18 : 35-53.

Heyland J, Wiegandt K, Goepfert C *et al*. Redifferentiation of chondrocytes and cartilage formation under intermittent hydrostatic pressure. *Biotechnol Lett*. 2006; 28 : 1641-1648.

Hiraki Y, Inoue H, Hirai R *et al*. Effect of transforming growth factor beta on cell proliferation and glycosaminoglycan synthesis by rabbit growth-plate chondrocytes in culture. *Biochim Biophys Acta*. 1988; 969 : 91-99.

Huang CY, Hagar KL, Frost LE *et al*. Effects of cyclic compressive loading on chondrogenesis of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2004; 22 : 313-323.

Huang CY, Stankiewicz A, Ateshian GA *et al*. Anisotropy, inhomogeneity, and tension-compression nonlinearity of human glenohumeral cartilage *in finite* deformation. *J Biomech*. 2005; 38 : 799-809.

Huang ST, Vo KC, Lyell DJ *et al*. Developmental response to hypoxia. *FASEB J*. 2004; 18 : 1348-1365.

Hunter CJ, Mouw JK, Levenston ME. Dynamic compression of chondrocyte seeded fibrin gels : effects on matrix accumulation and mechanical stiffness. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004; 12 : 117-130.

Hunziker EB. Articular cartilage repair : basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002; 10 : 432-463.

Hwang NS, Varghese S, Zhang Z *et al*. Chondrogenic differentiation of human embryonic stem cell-derived cells in arginine-glycine-aspartate-modified hydrogels. *Tissue Eng*. 2006; 12 : 2695-2706.

Ikenoue T, Trindade MC, Lee MS *et al*. Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure *in vitro*. *J Orthop Res*. 2003; 21 : 110-116.

Itayem R, Mengarelli-Widholm S, Hulth A. Ultrastructural studies on the effect of transforming growth factor-beta 1 on rat articular cartilage. *APMIS*. 1997; 105 : 221-228.

- Jiang TX, Yi JR, Ying SY *et al.* Activin enhances chondrogenesis of limb bud cells: stimulation of precartilaginous mesenchymal condensations and expression of N-CAM. *Dev Biol.* 1993; 155 : 545-557.
- Jones EA, English A, Henshaw K *et al.* Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50 : 817-827.
- Kafienah W, Jakob M, Demarteau O *et al.* Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage : comparison of adult nasal and articular chondrocytes. *Tissue Eng.* 2002; 8 : 817-826.
- Kaul G, Cucchiari M, Arntzen D *et al.* Local stimulation of articular cartilage repair by transplantation of encapsulated chondrocytes overexpressing human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in vivo. *J Gene Med.* 2006; 8 : 100-111.
- Kawasaki K, Ochi M, Uchio Y *et al.* Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels. *J Cell Physiol.* 1999; 179 : 142-148.
- Kerin A, Patwari P, Kuettner K *et al.* Molecular basis of osteoarthritis : biomechanical aspects. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59 : 27-35.
- Kerin A, Patwari P, Kuettner K *et al.* Molecular basis of osteoarthritis : biomechanical aspects. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59 : 27-35.
- Kerr CL, Gearhart JD, Elliott AM *et al.* Embryonic germ cells : when germ cells become stem cells. *Semin Reprod Med.* 2006; 24 : 304-313.
- Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 1998; 16 : 224-230.
- Kim YJ, Sah RL, Grodzinsky AJ *et al.* Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior : physical stimuli. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 311 : 1-12.
- Kirkpatrick CJ, Fuchs S, Peters K *et al.* Visions for regenerative medicine : interface between scientific fact and science fiction. *Artif Organs.* 2006; 30 : 822-827.
- Kisiday JD, Jin M, DiMicco MA *et al.* Effects of dynamic compressive loading on chondrocyte biosynthesis in self-assembling peptide scaffolds. *J Biomech.* 2004; 37 : 595-604.
- Klopper PJ. Collagen in surgical research. *Eur Surg Res.* 1986; 18 : 218-223.
- Knippenberg M, Helder MN, Zandieh Doulabi B *et al.* Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 342 : 902-908
- Kolettas E, Buluwela L, Bayliss MT *et al.* Expression of cartilage-specific molecules is retained on long-term culture of human articular chondrocytes. *J Cell Sci.* 1995; 108 : 1991-1999.

- Kolettas E, Buluwela L, Bayliss MT *et al.* Expression of cartilage-specific molecules is retained on long-term culture of human articular chondrocytes. *J Cell Sci.* 1995; 108 : 1991-1999.
- Korhonen RK, Laasanen MS, Töyräs J *et al.* Fibril reinforced poroelastic model predicts specifically mechanical behavior of normal, proteoglycan depleted and collagen degraded articular cartilage. *J Biomech.* 2003; 36 : 1373-1379.
- Krampera M, Pasini A, Rigo A *et al.* HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. *Blood.* 2005; 106 : 59-66.
- Kujala UM, Kettunen J, Paananen H *et al.* Knee osteoarthritis in former runners, soccer players, weight lifters, and shooters. *Arthritis Rheum.* 1995; 38 : 539-546.
- Kuroda R Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells. *Arthritis Rheum.* 2006; 54 : 433-442.
- Kurosaka D, Nagamoto T. Inhibitory effect of TGF-beta 2 in human aqueous humor on bovine lens epithelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35 : 3408-3412.
- Langelier ER, Suetterlin CD, Hoemann UA *et al.* The chondrocyte cytoskeleton in mature articular cartilage : Structure and distribution of actin, tubulin, and vimentin filaments. *J Histochem Cytochem.* 2000; 48 : 1307-1320.
- Larsen NE, Lombard KM, Parent EG *et al.* Effect of hylan on cartilage and chondrocyte cultures. *J Orthop Res.* 1992; 10 : 23-32.
- Lee CR, Grad S, Maclean JJ *et al.* Effect of mechanical loading on mRNA levels of common endogenous controls in articular chondrocytes and intervertebral disk. *Anal Biochem.* 2005; 341 : 372-375.
- Lee CR, Grodzinsky AJ, Spector M. Biosynthetic response of passaged chondrocytes in a type II collagen scaffold to mechanical compression. *J Biomed Mater Res.* 2003; 64A : 560-569.
- Lee DA, Knight MM, Bolton JF *et al.* Chondrocyte deformation within compressed agarose constructs at the cellular and sub-cellular levels. *J Biomech.* 2000; 33 : 81-95.
- Lee DA, Noguchi T, Frean SP *et al.* The influence of mechanical loading on isolated chondrocytes seeded in agarose constructs. *Biorheology.* 2000; 37 : 149-161.
- Lee DA, Noguchi T, Knight MM *et al.* Response of chondrocyte subpopulations cultured within unloaded and loaded agarose. *J Orthop Res.* 1998; 16 : 726-733.
- Lee JE, Kim KE, Kwon IC *et al.* Effects of the controlled-released TGF-beta 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen / chitosan / glycosaminoglycan scaffold. *Biomaterials.* 2004; 25 : 4163-4173.
- Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and

Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* 1998; 17 : 5718-5733.

Leguen E, Chassepot A, Decher G *et al.* Bioactive coatings based on polyelectrolyte multilayer architectures functionalized by embedded proteins, peptides or drugs. *Biomol Eng.* 2007; 24 : 33-41.

Leo AJ, Grande DA. Mesenchymal stem cells in tissue engineering. *Cells Tissues Organs.* 2006; 183 : 112-122.

Lin TM, Tsai JL, Lin SD *et al.* Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells Dev.* 2005; 14 : 92-102.

Lindenhayn K, Perka C, Spitzer R *et al.* Retention of hyaluronic acid in alginate beads: aspects for *in vitro* cartilage engineering. *J Biomed Mater Res.* 1999; 44 : 149-155.

Linsenmayer TF, Eavey RD, Schmid TM. Type X collagen : a hypertrophic cartilage-specific molecule. *Pathol immunopathol Res.* 1988; 7 : 14-19.

Longobardi L, O'Rear L, Aakula S *et al.* Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. *J Bone Miner Res.* 2006; 21 : 626-636.

Luyten FP, Dell'Accio F, De Bari C. Skeletal tissue engineering: opportunities and challenges. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2001; 15 : 759-769.

Mackay AM, Beck SC, Murphy JM *et al.* Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.* 1998; 4 : 415-428.

Mahomed MN, Beaver RJ, Gross AE. The long-term success of fresh, small fragment osteochondral allografts used for intraarticular post-traumatic defects in the knee joint. *Orthopedics.* 1992; 15 : 1191-1199.

Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D *et al.* Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci.* 2003; 10 : 228-241.

Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE *et al.* Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J Cell Biochem.* 2006; 97 : 744-754.

Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE *et al.* Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res.* 2000; 9 : 841-848.

Malda J, van Blitterswijk CA, van Geffen M *et al.* Low oxygen tension stimulates the redifferentiation of dedifferentiated adult human nasal chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004; 12 : 306-313.

Mallein-Gerin F, van der Rest M. La culture de chondrocytes : outil d'analyse de la différenciation et de l'organisation moléculaire du cartilage. *Medecine/sciences*. 1996 ; 12 : 1087-1096.

Malpeli M, Randazzo N, Cancedda R *et al*. Serum-free growth medium sustains commitment of human articular chondrocyte through maintenance of Sox9 expression. *Tissue Eng*. 2004; 10 : 145-155.

Maraudas A, Mizrahi J, Katz EP *et al*. Physicochemical properties and functional behaviour of normal and osteoarthritic human cartilage. *Articular Cartilage Biochemistry. Third Edition*. 1986.

Marcelino J, McDevitt CA. Attachment of articular cartilage chondrocytes to the tissue form of type VI collagen. *Biochem Biophys Acta*. 1995; 1249: 180-188.

Marijnissen WJ, van Osch GJ, Aigner J *et al*. Alginate as a chondrocyte-delivery substance in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2002; 23 : 1511-1517.

Marlovits S, Zeller P, Singer P *et al*. Cartilage repair : generations of autologous chondrocyte transplantation. *Eur J Radiol*. 2006; 57 : 24-31.

Maroudas A, Ziv I, Weisman N *et al*. Studies of hydration and swelling pressure in normal and osteoarthritic cartilage. *Biorheology*. 1985; 22 : 159-169.

Marsano A, Wendt D, Quinn TM *et al*. Bi-zonal cartilaginous tissues engineered in a rotary cell culture system. *Biorheology*. 2006; 43 : 553-60.

Martin I, Ruyschaert JM. Common properties of fusion peptides from diverse systems. *Biosci Rep*. 2000; 20 : 483-500.

Mauck RL, Soltz MA, Wang CC *et al*. Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *J Biomech Eng*. 2000; 122 : 252-260.

Mauck RL, Wang CC, Oswald ES *et al*. The role of cell seeding density and nutrient supply for articular cartilage tissue engineering with deformational loading. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003; 11 : 879-890.

Meaney Murray M, Rice K *et al*. The effect of selected growth factors on human anterior cruciate ligament cell interactions with a three-dimensional collagen-GAG scaffold. *J Orthop Res*. 2003; 21 : 238-244.

Mehlhorn AT, Niemeyer P, Kaiser S *et al*. Differential expression pattern of extracellular matrix molecules during chondrogenesis of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng*. 2006; 12 : 2853-2862.

Mehlhorn AT, Schmal H, Kaiser S *et al*. Mesenchymal stem cells maintain TGF-beta-mediated chondrogenic phenotype in alginate bead culture. *Tissue Eng*. 2006; 12 : 1393-1403.

- Minas T, Nehrer S. Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. *Orthopedics*. 1997; 20 : 525-538.
- Miralles G, Baudoin R, Dumas D *et al.* Sodium alginate sponges with or without sodium hyaluronate: in vitro engineering of cartilage. *J Biomed Mater Res*. 2001; 57 : 268-278.
- Miyaniishi K, Trindade MC, Lindsey DP *et al.* Dose- and time-dependent effects of cyclic hydrostatic pressure on transforming growth factor-beta3-induced chondrogenesis by adult human mesenchymal stem cells in vitro. *Tissue Eng*. 2006; 12 : 2253-2262.
- Mizuno S, Tateishi T, Ushida T *et al.* Hydrostatic fluid pressure enhances matrix synthesis and accumulation by bovine chondrocytes in three-dimensional culture. *J Cell Physiol*. 2002; 193 : 319-327.
- Moreau JE, Chen J, Bramono DS *et al.* Growth factor induced fibroblast differentiation from human bone marrow stromal cells in vitro. *J Orthop Res*. 2005; 23 : 164-174.
- Moreau JE, Chen J, Horan RL *et al.* Sequential growth factor application in bone marrow stromal cell ligament engineering. *Tissue Eng*. 2005; 11 : 1887-1897.
- Mow VC, Fithian DC, Kelly MA. Fundamentals of articular cartilage and meniscus biomechanics. In: Articular cartilage and knee joint function: basic science and arthroscopy. Ed: Ewing JW. Raven, New York 1990; 1-18.
- Mow VC, Holmes MH, Lai WM. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. *J Biomech*. 1984; 17 : 377-384.
- Mow VC, Wang CC, Hung CT. The extracellular matrix, interstitial fluid and ions as a mechanical signal transducer in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 1999; 7 : 41-58.
- Mueller FJ, Seroby N, Schraufstatter IU *et al.* Adhesive interactions between human neural stem cells and inflamed human vascular endothelium are mediated by integrins. *Stem Cells*. 2006; 24 : 2367-2372.
- Muir H, Hardingham TE. Cartilage matrix biochemistry. *Textbook of Rheumatic Disease*. 1986; 177-198.
- Murphy CL, Sambanis A. Effect of oxygen tension and alginate encapsulation on restoration of the differentiated phenotype of passaged chondrocytes. *Tissue Eng*. 2000; 7 : 791-803.
- Nakayama N, Han CY, Cam L *et al.* A novel chordin-like BMP inhibitor, CHL2, expressed preferentially in chondrocytes of developing cartilage and osteoarthritic joint cartilage. *Development*. 2004; 131 : 229-140.
- Naumann A, Dennis JE, Awadallah A *et al.* Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *J Histochem Cytochem*. 2002; 50 : 1049-1058.

Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A *et al.* Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated *in vitro*. *J Biomed Mater Res.* 1997; 38 : 95-104.

Noth U, Rackwitz L, Heymer A *et al.* Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. *J Biomed Mater Res A.* 2007 May 14 [Epub ahead of print]

O'Driscoll SW. The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1998; 80 : 1795-1812.

Oemega T, Thompson R. Histology and pathobiochemistry of the cartilage-bone in osteoarthritis. In osteoarthritic Disorders, *The American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 1995; 205-217.

Park S, Hung CT, Ateshian GA. Mechanical response of bovine articular cartilage under dynamic unconfined compression loading at physiological stress levels. *Osteoarthr Cartil.* 2004; 12 : 65-73.

Park Y, Sugimoto M, Watrin A *et al.* BMP-2 induces the expression of chondrocyte-specific genes in bovine synovium-derived progenitor cells cultured in three-dimensional alginate hydrogel. *Osteoarthr Cartil.* 2005; 13 : 527-536.

Parkkinen JJ, Ikonen J, Lammi MJ *et al.* Effects of cyclic hydrostatic pressure on proteoglycan synthesis in cultured chondrocytes and articular cartilage explants. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 300 : 458-465.

Pazzano D, Mercier KA, Moran JM *et al.* Comparison of chondrogenesis in static and perfused bioreactor culture. *Biotechnol Prog.* 2000; 16 : 893-896.

Peyron J, Stanescu V. Cartilage articulaire normal de l'adulte. Anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement. *Encycl Med Chir Appareil locomoteur.* 1994; 14 : 3-10.

Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res.* 2004; 95 : 9-20.

Poole AR, Rizkalla G, Reiner A *et al.* Changes in the extra-cellular matrix of articular cartilage in human osteoarthritis. In: Trends in research and treatment of joint diseases. *Springer Verlag.* 1992; 3-12.

Poole CA. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat.* 1997; 191 : 1-13.

Portner R, Nagel-Heyer S, Goepfert C *et al.* Bioreactor design for tissue engineering. *J Biosci Bioeng.* 2005; 100 : 235-245.

Qi WN, Scully SP. Effect of type II collagen in chondrocyte response to TGF-beta 1 regulation. *Exp Cell Res.* 1998; 241 : 142-150.

Rahfoth B, Weisser J, Sternkopf F *et al.* Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits. *Osteoarthr. Cartil.* 1998; 6 : 50-65.

- Raimondi MT, Boschetti F, Falcone L *et al.* Mechanobiology of engineered cartilage cultured under a quantified fluid-dynamic environment. *Biomech Model Mechanobiol.* 2002; 1 : 69-82.
- Raimondi MT, Moretti M, Cioffi M *et al.* The effect of hydrodynamic shear on 3D engineered chondrocyte systems subject to direct perfusion. *Biorheology.* 2006; 43 : 215-222.
- Redini F, Galera P, Mauviel A *et al.* Transforming growth factor beta stimulates collagen and glycosaminoglycan biosynthesis in cultured rabbit articular chondrocytes. *FEBS Lett.* 1988; 234 : 172-176.
- Rhodes NP, Srivastava JK, Smith RF *et al.* Heterogeneity in proliferative potential of ovine mesenchymal stem cell colonies. *J Mater Sci Mater Med.* 2004; 15 : 397-402.
- Ricard-Blum S, Ruggiero F. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol.* 2005; 53 : 430-442.
- Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab.* 1998; 2-3 : 111-119.
- Robins SP. Functional properties of collagen and elastin. *Baileys Clinical Rheumatology.* 1988; 2 : 1-35.
- Roth V, Mow VC. The intrinsic tensile behaviour of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age. *J Bone Joint Surg.* 1980; 62A: 1102-1117.
- Roughley PJ, Lee ER. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech.* 1994; 28 : 385-397.
- Roughley PJ. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater.* 2006;12 : 92-101.
- Saini S, Wick TM. Concentric cylinder bioreactor for production of tissue engineered cartilage: effect of seeding density and hydrodynamic loading on construct development. *Biotechnol Prog.* 2003; 19 : 510-521.
- Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K *et al.* Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* 2005; 52 : 2521-2529.
- Sakai T, Yasuda K, Tohyama H *et al.* Effects of combined administration of transforming growth factor-beta1 and epidermal growth factor on properties of the in situ frozen anterior cruciate ligament in rabbits. *J Orthop Res.* 2002; 20 : 1345-1351.
- Sakai T, Yasuda K, Tohyama H *et al.* Effects of combined administration of transforming growth factor-beta1 and epidermal growth factor on properties of the in situ frozen anterior cruciate ligament in rabbits. *J Orthop Res.* 2002; 20 : 1345-1351.
- Salingcamboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K *et al.* Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res.* 2003;

287 : 289-300.

Salter, RB, Simmonds DF, Malcolm BW *et al.* The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg.* 1980; 62A : 1232-1251.

Sandell LJ. *In situ* expression of collagen and proteoglycan genes in notochord and during skeletal development and growth. *Microsc Res Tech.* 1994; 28 : 470-482.

Sandy J. Extracellular metabolism of aggrecan in articular cartilage and osteoarthritis. *Raven Press, New York.* 1992; 1-5.

Sarzi-Puttini P, Cimmino MA, Scarpa R *et al.* Osteoarthritis : an overview of the disease and its treatment strategies. *Semin Arthritis Rheum.* 2005; 35 : 1-10.

Scaife S, Brown R, Kellie S *et al.* Detection of differentially expressed genes in synovial fibroblasts by restriction fragment differential display. *Rheumatology.* 2004; 43 : 1346-1352.

Schinagl RM, Gurskis D, Chen AC *et al.* Depth-dependent confined compression modulus of full-thickness bovine articular cartilage. *J Orthop Res.* 1997; 15 : 499-506.

Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on *in vivo* cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006; 14 : 403-412.

Schönherr E, Sunderkotter C, Iozzo RV *et al.* Decorin, a novel player in the insulin-like growth factor system. *J Biol Chem.* 2005; 280 : 15767-15772.

Sellers LT, Wei T, Dal Mas EC. Intravertebral gas defect. *Spine.* 1992; 17 : 961-964.

Setton LA, Mow VC, Muller FJ *et al.* Mechanical behavior and biochemical composition of canine knee cartilage following periods of joint disuse and disuse with remobilization. *Osteoarthritis Cartilage.* 1997; 5 : 1-16.

Shea CM. BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem.* 2003; 90 : 1112-1127.

Shelton JC, Bader DL, Lee DA. Mechanical conditioning influences the metabolic response of cell-seeded constructs. *Cells Tissues Organs* 2003; 175 : 140-150.

Shen G, Darendeliler MA. The adaptive remodeling of condylar cartilage : a transition from chondrogenesis to osteogenesis. *J Dent Res.* 2005; 84 : 691-699.

Shen G, Rabie AB, Zhao ZH *et al.* Forward deviation of the mandibular condyle enhances endochondral ossification of condylar cartilage indicated by increased expression of type X collagen. *Arch Oral Biol.* 2006; 51: 315-324.

Shieh AC, Athanasiou KA. Principles of cell mechanics for cartilage tissue engineering. *Ann Biomed Eng.* 2003; 31 : 1-11.

Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y *et al.* *In vitro* chondrogenesis of human

- synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem.* 2006; 97 : 84-97.
- Shlopov BV, Lie WR, Mainardi CL *et al.* Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum.* 1997; 40 : 2065-2074.
- Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG. Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. *J Biomed Mater Res.* 2002; 62 : 6-48.
- Silva WA, Covas DT, Panepucci RA *et al.* The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2003; 21 : 661-669.
- Silver IA. Measurement of pH and ionic composition of pericellular sites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1975; 271 : 261-272.
- Simmons EJ, Bertone AJ, Weisbrode SE. Instability-induced osteoarthritis in the metacarpophalangeal joint of horses. *Am J Vet Res.* 1999; 60 : 7-13.
- Smith RL, Donlon BS, Gupta MK *et al.* Effects of fluid-induced shear on articular chondrocyte morphology and metabolism *in vitro.* *J Orthop Res.* 1995; 13 : 824-831.
- Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z *et al.* The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell.* 2001; 1 : 277-290.
- Sodian R, Lemke T, Fritsche C *et al.* Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering. *Tissue Eng.* 2002; 8 : 863-870.
- Steinmeyer J, Ackermann B, Raiss RX. Intermittent cyclic loading of cartilage explants modulates fibronectin metabolism. *Osteoarthritis Cartilage.* 1997; 5 : 331-341.
- St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 1999; 13 : 2072-2086.
- Stoltz JF, de Isla N, Giant-Huselstein C, Bensoussan D *et al.* Mechanobiology and cartilage engineering : The underlying pathophysiological phenomena. *Biorheology* 2006; 43 : 171-180.
- Stoltz JF, Netter P, Giant-Huselstein C *et al.* Mécanobiologie du chondrocyte. Application à l'ingénierie du cartilage. *Bull Acad Natl Med,* 2005, 189 : 1803-1816.
- Summers KL, O'Donnell JL, Hoy MS *et al.* Monocyte-macrophage antigen expression on chondrocytes. *J Rheumatol.* 1995; 22 : 1326-1334.
- Swart GW. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. *Eur J Cell Biol.* 2002; 81 : 313-321.
- Szirmai J. Structure of cartilage. In Aging of connective and skeletal tissue. *Nordiska*

*Bokhandelns Forlag*. 1969; 163-184.

Takeda T, Sudo N, Kitano H *et al.* Type II collagen-induced autoimmune ear disease in mice: a preliminary report on an epitope of the type II collagen molecule that induced inner ear lesions. *Am J Otol.* 1996; 17 : 69-75.

Tarnowski M, Sieron AL. Adult stem cells and their ability to differentiate. *Med Sci Monit.* 2006; 12 : 154-63.

Temenoff JS, Mikos AG. Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials.* 2000; 21 : 431-440.

Toyoda T, Seedhom BB, Kirkham J *et al.* Upregulation of aggrecan and type II collagen mRNA expression in bovine chondrocytes by the application of hydrostatic pressure. *Biorheology.* 2003; 40 : 79-85.

Toyoda T, Seedhom BB, Yao JQ *et al.* Hydrostatic pressure modulates proteoglycan metabolism in chondrocytes seeded in agarose. *Arthritis Rheum.* 2003; 48 : 2865-2872.

Trowbridge IS, Thomas ML. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12 : 85-116.

Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther.* 2003; 5 : 32-45.

Tuan RS. Biology of developmental and regenerative skeletogenesis. *Clin Orthop Relat Res.* 2004; 427 : S105-117.

Urban JP. The chondrocyte: a cell under pressure. *Br J Rheumatol.* 1994; 33 : 901-908.

Van de Breevaart Bravenboer J, In der Maur CD, Bos PK, Feenstra L *et al.* Improved cartilage integration and interfacial strength after enzymatic treatment in a cartilage transplantation model. *Arthritis Res Ther.* 2004; 6 : R469-476.

Van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 1991; 5 : 2814-2823.

Verfaillie CM. Stem cell research: future implications for internal medicine. *Acta Clin Belg.* 2005; 60 : 277-283.

Vignon E, Bejui J, Mathieu P *et al.* Histological cartilage changes in a rabbit model of ostéoarthritis. *J Rheumatol.* 1987; 104-106.

Villemure I, Chung MA, Seck CS *et al.* Static compressive loading reduces the mRNA expression of type II and X collagen in rat growth-plate chondrocytes during postnatal growth. *Connect Tissue Res.* 2005; 46 : 211-219.

Vunjak-Novakovic G, Martin I, Obradovic B *et al.* Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *J Orthop Res.* 1999; 17 : 130-138.

- Waldman SD, Spiteri CG, Grynblas MD *et al.* Long-term intermittent compressive stimulation improves the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng.* 2004; 10 : 1323-1331.
- Waldman SD, Spiteri CG, Grynblas MD *et al.* Long-term intermittent shear deformation improves the quality of cartilaginous tissue formed in vitro. *J Orthop Res.* 2003; 21 : 590-596.
- Wang CC, Deng JM, Ateshian GA *et al.* An automated approach for direct measurement of two-dimensional strain distributions within articular cartilage under unconfined compression. *J Biomech Eng.* 2002; 124 : 557-567.
- Wang JF, Wang LJ, Wu YF *et al.* Mesenchymal stem/progenitor cells in human umbilical cord blood as support for ex vivo expansion of CD34(+) hematopoietic stem cells and for chondrogenic differentiation. *Haematologica.* 2004; 89 : 837-844.
- Wang Y, Kim UJ, Blasioli D *et al.* In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2005; 26 : 7082-7094.
- Wendt D, Jakob M, Martin I. Bioreactor-based engineering of osteochondral grafts: from model systems to tissue manufacturing. *J Biosci Bioeng.* 2005; 100 : 489-494.
- Wendt D, Marsano A, Jakob M *et al.* Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. *Biotechnol Bioeng.* 2003; 84 : 205-214.
- Wendt D, Stroebel S, Jakob M *et al.* Uniform tissues engineered by seeding and culturing cells in 3D scaffolds under perfusion at defined oxygen tensions. *Biorheology.* 2006; 43 : 481-488.
- Weston AD, Rosen V, Chandraratna RA *et al.* Regulation of skeletal progenitor differentiation by the BMP and retinoid signaling pathways. *J Cell Biol.* 2000; 148 : 679-690.
- Wiesmann A, Bühring HJ, Mentrup C *et al.* Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. *Head Face Med.* 2006. 312 : 8-13.
- Wilkins RJ, Hall AC. Control of matrix synthesis in isolated bovine chondrocytes by extracellular and intracellular pH. *J Cell Physiol.* 1995; 164 : 474-481.
- Wimmer MA, Grad S, Haenni M *et al.* Volumetric changes of articular cartilage during stress relaxation in unconfined compression. *J Biomech.* 2000; 33 : 1049- 1054.
- Wong M, Siegrist M, Cao X. Cyclic compression of articular cartilage explants is associated with progressive consolidation and altered expression pattern of extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.* 1999; 18 : 391-399.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ *et al.* Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* 1988; 242 : 1528-1534.

- Wu QQ, Chen Q. Mechanoregulation of chondrocyte proliferation, maturation, and hypertrophy: ion-channel dependent transduction of matrix deformation signals. *Exp Cell Res.* 2000; 256 : 383-391.
- Xie J, Han Z, Kim SH *et al.* Mechanical loading-dependence of mRNA expressions of extracellular matrices of chondrocytes inoculated into elastomeric microporous poly (L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold. *Tissue Eng.* 2006; 12 : 1811-1820.
- Xin X, Hussain M, Mao JJ. Continuing differentiation of human mesenchymal stem cells and induced chondrogenic and osteogenic lineages in electrospun PLGA nanofiber scaffold. *Biomaterials.* 2007; 28 : 316-325.
- Yang JW, de Isla N, Huselstin C, Wang Y *et al.* Evaluation of human Mesenchymal Stem Cells cell cycle, viability in different alginate culture conditions. *Biomed Mater Eng.* 2007; sous presse.
- Yoon DM, Fisher JP. Chondrocyte signaling and artificial matrices for articular cartilage engineering. *Adv Exp Med Biol.* 2006; 585 : 67-86.
- Yoshimura H, Muneta T, Nimura A *et al.* Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.* 2007; 327 : 449-462.
- Young HE, Steele TA, Bray RA *et al.* Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec.* 2001; 264 : 51-62.
- Zhang L, Gardiner BS, Smith DW *et al.* The effect of cyclic deformation and solute binding on solute transport in cartilage. *Arch Biochem Biophys.* 2007; 457 : 47-56.
- Zhang X, Mitsuru A, Igura K *et al.* Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 340 : 944-952.
- Zhang Y, Wu Y, Cao L *et al.* Versican modulates embryonic chondrocyte morphology via the epidermal growth factor-like motifs in G3. *Exp Cell Res.* 2001; 263 : 33-42.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002; 13 : 4279-4295.
- Zur Nieden NI, Kempka G, Rancourt DE *et al.* Induction of chondro-, osteo- and adipogenesis in embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2 : effect of cofactors on differentiating lineages. *Bmc Dev Biol.* 2005; 5 : 1-15.

**PUBLICATIONS**

# Human umbilical vein endothelial cells increase *ex vivo* expansion of human CD34<sup>+</sup> PBPC through IL-6 secretion

N Li<sup>1,2</sup>, A Eljaafari<sup>1,2</sup>, D Bensoussan<sup>1,2</sup>, Y Wang<sup>1</sup>, V Latger-Cannard<sup>3</sup>, B Serrurier<sup>2</sup>,  
C Boura<sup>1</sup>, A Kennel<sup>4</sup>, JF Stoltz<sup>1,2</sup> and P Feugier<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Ingénierie et Thérapie Cellulaire et Tissulaire, UMR CNRS 7563 and IFR111, Faculté de Médecine, Université Henri Poincaré, Vandoeuvre-lès Nancy, France, <sup>2</sup>Unité de Thérapie Cellulaire et Tissulaire, CHU Brabois, Vandoeuvre-lès Nancy, France, <sup>3</sup>Hématologie Adulte, CHU Brabois, Vandoeuvre-lès Nancy, France, and <sup>4</sup>Laboratoire Immunologie, Faculté de Médecine, Université Henri Poincaré, Vandoeuvre-lès Nancy, France

## Background

*Ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells (HSC) can help reduce cytopenia following transplantation, especially in NHL patients whose BM is deficient because of extensive chemotherapy. We have previously reported that human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) can contribute to improved PBPC expansion when used in co-culture with CD34<sup>+</sup> cells.

## Methods

We evaluated the roles of direct HUVEC CD34<sup>+</sup> contact and HUVEC-produced soluble factors. We cultured CD34<sup>+</sup> PBPC harvested from NHL patients in four different conditions: (1) liquid culture without HUVEC; (2) co-culture in contact with HUVEC; (3) co-culture with HUVEC but without direct contact; (4) liquid culture with HUVEC-conditioned medium (CM). Thrombopoietin (Tpo), Flk2Flt3 ligand (FL) and c-kit ligand (KL) with or without rhIL-6 were added to these four culture conditions.

## Results and discussion

Our results showed that HUVEC co-culture or addition of HUVEC-CM to Tpo, FL and KL (TFK) improved CD34<sup>+</sup> PBPC expansion compared with liquid culture, as determined by total viable nucleated cells (TNC), colony-forming cell assay (CFC) and week-6 cobblestone area-forming cells (Wk-6 CAFC) expansions. Non-contact culture led to similar PBPC expansion as contact co-culture; moreover, HUVEC-CM improved PBPC expansion. However, when rhIL-6 was added to HUVEC-CM with TFK, no significant difference was observed. Finally, high quantities of IL-6 were detected in HUVEC-CM and addition of anti-IL-6 Ab inhibited the positive effect of HUVEC on PBPC expansion. Our results thus suggest that HUVEC may improve PBPC expansion, at least through IL-6 secretion.

## Keywords

CD34<sup>+</sup>, *ex vivo* expansion, human endothelial co-culture, stem cells.

## Introduction

The number and quality of hematopoietic stem cells (HSC) within a graft are the major determinants of the time and durability of hematopoietic reconstitution of a transplant recipient [1–3]. *Ex vivo* expansion of HSC is a very promising approach for cellular therapy and can improve the safety and efficacy of autologous and allogeneic stem cell transplantation.

A variety of combinations and concentrations of cytokines have been used to achieve HSC expansion. Throm-

bopoietin (Tpo), Flk2Flt3 ligand (FL) and c-kit ligand (KL) have been identified as major cytokines capable of improving survival and proliferation of HSC [4–9]. They can replace marrow stromal cells for expansion of progenitor cells over a short period *in vitro*. In the case of neonatal cord blood, stem cells can sustain their long-term expansion [10–14]. Furthermore, addition of rhIL-6 in combination with Tpo, FL and KL (TFK) can promote further proliferation and expansion of human long-term *in vivo* repopulating cells for up to 3 weeks of culture *in vitro* [15].

Correspondence to: Pierre Feugier, MD, PhD, Hématologie Adulte, Allée du Morvan, 54511 Vandoeuvre-lès Nancy, France. E-mail p.feugier@chu-nancy.fr

© 2006 ISCT

DOI: 10.1080/14653240600845062

Endothelial cells have been shown to play an active role in the BM stromal microenvironment, acting as a cell source of numerous hematopoietic growth factors [16,17]. It has been demonstrated that porcine microvascular endothelial cells, and human brain endothelial cell cultures elaborate growth factors that regulate hematopoiesis and support the proliferation of myeloid, erythroid and megakaryocytic progenitors [18–20]. HUVEC produce most of the cytokines known to play a role in hematopoiesis [21–24]. We have previously shown that HUVEC can provide a clinically relevant co-culture system for *ex vivo* expansion of G-CSF-mobilized CD34<sup>+</sup> PBPC cells collected from normal donors as well as NHL patients [25]. Addition of TFK in the HUVEC co-culture system induced a synergistic increase of HSC rate [25]. In accordance with our findings, Yildirim *et al.* [26] have recently published that autologous HUVEC increase cord blood CD34<sup>+</sup> cell expansion rates. However, it is not clear if this effect is the result of direct interactions between HSC and HUVEC or between HSC and their extracellular matrix, or of HUVEC-derived soluble cytokines. To analyze further the role of HUVEC in PBPC expansion, we investigated whether cellular contact between CD34<sup>+</sup> cells and HUVEC is necessary for HUVEC-dependent PBPC expansion. Moreover, we explored the possibility of using HUVEC-conditioned medium (CM) instead of a HUVEC co-culture system to improve expansion of PBPC *in vitro*, and to develop further a clinically suitable medium for expanding PBPC *ex vivo*.

## Methods

### HUVEC and MS-5 stromal cells

HUVEC were obtained from freshly collected umbilical cord as reported previously by Jaffe *et al.* [27], and cultured in medium consisting of 40% RPMI-1640 (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA), 40% MEM 199 (GIBCO), 20% pooled human AB serum, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (GIBCO). HUVEC-CM was obtained by growing HUVEC to 90% confluency, and refeed by IMDM supplemented with 10% FBS (Hyclone, Logan, UT, USA). After 2 days of culture, CM was harvested and non-adherent cells were removed by centrifugation. CM was then stored at –20°C until use. MS-5 were grown in  $\alpha$ -minimal essential medium ( $\alpha$ -MEM; GIBCO) supplemented with 10% FBS.

### Purification of CD34<sup>+</sup> cells

CD34<sup>+</sup> cells were purified from human peripheral blood leukapheresis product following G-CSF treatment of NHL patients. Hematopoietic progenitors expressing CD34 Ag were obtained by using the immunomagnetic isolation kit MACS CD34 (QBEND10; Miltenyi Biotec, Paris, France), according to the manufacturer's instructions.

### Recombinant human cytokines

Recombinant purified human cytokines including 10 ng/mL Tpo, 50 ng/mL FL, 50 ng/mL KL and 10 ng/mL IL-6 (all from R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), were used in these studies as a TFK (Tpo<sup>+</sup>, FL<sup>+</sup>, KL) or 6TFK (IL-6<sup>+</sup>, Tpo<sup>+</sup>, FL<sup>+</sup>, KL) combination.

### CD34<sup>+</sup> PBPC cultures

#### *Stroma-free expansion cultures*

Fifty thousand CD34<sup>+</sup> PBPC cells were cultured at 37°C in flat-bottomed 6-well plates (Costar, Cambridge, MA, USA) in 2 mL IMDM supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (named as standard medium) with a TFK or 6TFK combination.

#### *Contact HUVEC co-culture*

Confluent HUVEC from secondary passage were used as feeder layer. Fifty thousand CD34<sup>+</sup> PBPC cells were plated in direct contact with confluent HUVEC and were subcultured in 6-well plates, in standard medium with the TFK combination.

#### *Non-contact HUVEC co-culture*

A transwell insert (0.45 µm pore size; Costar) was placed above a HUVEC confluent feeder and CD34<sup>+</sup> cells were plated in the upper wells in standard medium with the TFK combination.

#### *Culture in HUVEC-CM*

In several experiments, HUVEC-CM was added (from 25% to 100% vol.) to standard medium in addition to the TFK or 6TFK combination. For IL-6 neutralizing experiments, HUVEC-CM were pre-incubated with 10 ng/mL polyclonal anti-human IL-6 Ab (R&D) at 37°C for 30 min before using for expansion cultures.

#### Maintenance of expansion culture

All culture were performed in triplicate and maintained in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Cytokines and fresh medium were added to each series twice a week.

#### Evaluation of PBPC expansion

After 2 weeks of culture, adherent and non-adherent PBPC were collected by washing the wells twice with PBS-supplemented 0.4% EDTA. Total viable nucleated cell (TNC) numbers were determined by trypan blue exclusion and the number of clonogenic assays and week-6 cobblestone area-forming cells (Wk-6 CAFC) were analyzed.

#### Clonogenic assay

Input CD34<sup>+</sup> cells ( $1 \times 10^3$  cells) and expanded cells ( $5 \times 10^3$  cells) were plated in triplicate in 35-mm tissue culture dishes containing 1 mL methylcellulose semi-solid culture medium (MethoCult H4435; Stem Cell technologies, Grenoble, France). After 14 days of incubation at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, CFU-GM, BFU-E and CFU-GEMM were scored using standard scoring criteria. The total colony number was expressed as CFC.

#### Wk-6 CAFC production

Wk-6 CAFC were assessed by replating non-adherent and adherent cells on MS-5 stroma for a further 6 weeks. CD34<sup>+</sup> PBPC or expanded cells were placed onto confluent monolayers (eight different dilutions with 24 replicate wells for each) of MS-5 stroma in 96-well plates using limiting dilution assays [28]. The cultures were fed weekly by replacement of half of the culture volume with fresh medium. The medium was prepared by supplementing  $\alpha$ -MEM with 12.5% horse serum, 12.5% FBS, 4 mM l-glutamine (GIBCO), 100 U/mL penicillin and 5  $\mu$ M hydrocortisone (Sigma, Saint-Quentia Fallovier, France). After 6 weeks of culture, the percentage of wells with at least one phase-dark hematopoietic clone of at least five cells beneath the stromal layer was determined. Wk-6 CAFC frequency was then calculated according to Poisson statistics.

#### Measurement of IL-6 level by ELISA

Aliquots of HUVEC-CM stored at -20°C were thawed and the IL-6 level was measured using a Quantikine kit IL-6 (R&D) according to the manufacturer's instructions. Samples were measured in triplicate, and were properly

diluted to ensure that measured values were within the concentration range of the standard curve.

#### Statistical analysis

Data were analyzed with either paired Student's *t*-tests or one-way anova as appropriate, using STATVIEW Software for Windows (SAS Institute Inc). Results were considered statistically significant at *P* values lower than 0.05.

#### Results

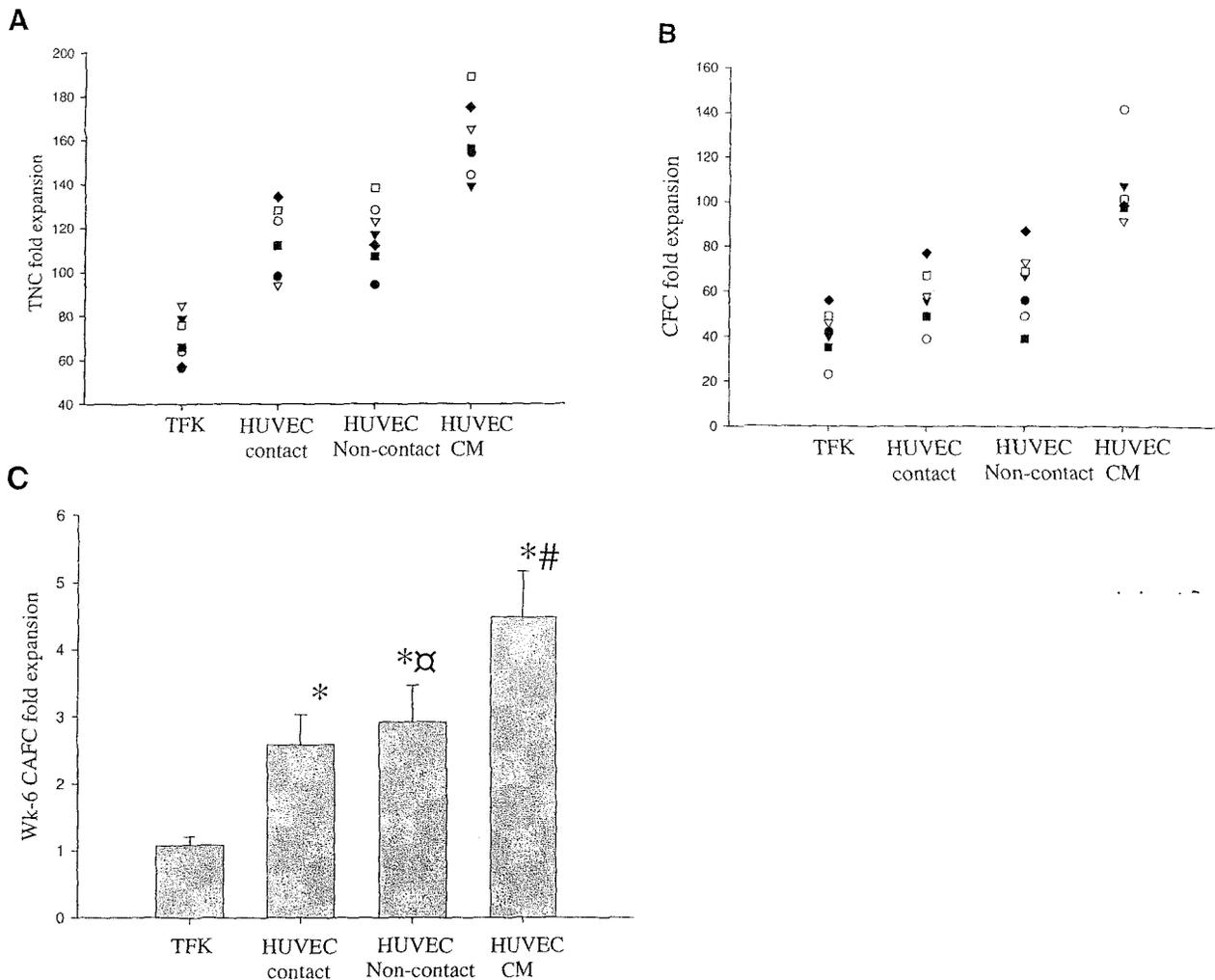
##### HUVEC co-culture increases CD34<sup>+</sup> PBPC expansion

In the first series of experiments, we measured the effect of HUVEC co-culture plus TFK on the expansion of human CD34<sup>+</sup> PBPC cells during 6 weeks ( $n = 6$ ). We confirmed that HUVEC plus TFK co-culture resulted in increased PBPC expansion rates, which peaked at week 2 (data not shown). Consistent with previous reports [19,22,23], HUVEC co-culture plus TFK generated higher TNC, CFC and Wk-6 CAFC outputs than TFK culture alone. As shown in Figure 1A, B, at week 2 of culture with TFK a  $70 \pm 11$ -fold expansion of TNC together with a  $41 \pm 9.8$ -fold expansion of CFC was observed. Addition of HUVEC to TFK resulted in higher TNC ( $110 \pm 16$ -fold) and CFC ( $56 \pm 11.7$ -fold) expansion rates ( $P < 0.05$ ). Moreover, HUVEC co-culture plus TFK induced a  $2.58 \pm 0.45$ -fold Wk-6 CAFC expansion, compared with  $1.09 \pm 0.13$  without HUVEC (Figure 1C;  $P < 0.05$ ).

##### Effect of non-contact HUVEC culture on CD34<sup>+</sup> PBPC expansion

To investigate whether HUVEC-induced PBPC expansion required a direct contact between HUVEC and PBPC, CD34<sup>+</sup> PBPC cells were co-cultured with HUVEC plus TFK but were separated by transwell inserts ( $n = 6$ ). As shown in Figure 1A-C, HUVEC non-contact plus TFK co-culture resulted in a  $116 \pm 13.7$ -,  $62 \pm 14.5$ - and  $2.92 \pm 0.53$ -fold expansion of TNC, CFC and Wk-6 CAFC, respectively. These rates were higher than those obtained with TFK only ( $P < 0.05$ ). However, we did not observe any significant difference between contact and non-contact HUVEC co-cultures in terms of TNC, CFC and Wk-6 CAFC expansion ( $P > 0.05$ ). Thus these data suggest that (1) contact between CD34<sup>+</sup> and HUVEC may not be absolutely required for hematopoietic progenitor and primitive stem cell expansion, and (2) soluble factor(s)





**Figure 1.** Two-week expansion of TNC, CFC and Wk-6 CAFC in the presence of TFK minus or plus HUVEC (contact and no-contact) or HUVEC-CM. (A, B) Each point represents the expansion of TNC and CFC in an independent experiment initiated with  $5 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup> PBPC cells ( $n = 7$ ). (C) Data are presented as the fold expansion of Wk-6 CAFC compared with input cells ( $n = 6$ )  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  with respect to TFK, # $P < 0.05$  with respect to HUVEC culture (contact and non-contact),  $\alpha P > 0.05$  with respect to HUVEC contact.

may be responsible for the favorable effect of HUVEC on PBPC expansion.

### HUVEC-CM increased PBPC expansion compared with HUVEC co-culture

To investigate more precisely the effects of HUVEC-derived soluble factor(s) on HSC expansion, we evaluated the synergistic activity of HUVEC-CM with TFK on CD34<sup>+</sup> PBPC cells. With this aim, HUVEC-CM was added to TFK at different concentrations, and its effect was evaluated on CFC expansion. Maximal CFC expansion was observed with 50% HUVEC-CM plus TFK (Figure 2). Based on these results, we used 50% HUVEC-CM in the further experiments. We observed that

HUVEC-CM in addition to TFK induced higher TNC, CFC and Wk-6 CAFC expansion rates ( $158 \pm 17$ ,  $106 \pm 15$  and  $4.48 \pm 0.68$ , respectively) compared with TFK culture ( $P < 0.05$ ) and HUVEC co-culture plus TFK in contact or non-contact (Figure 1A–C;  $P < 0.05$ ).

### HUVEC enhance PBPC expansion through secretion of IL-6

According to previous reports [15,29], addition of rhIL-6 in combination with TFK induces a  $139 \pm 17.5$ -,  $89 \pm 19.7$ -,  $3.9 \pm 0.68$ -fold expansion of CFC, TNC and Wk-6 CAFC, respectively. However, we did not observe any improvement in TNC, CFC and Wk-6 CAFC production when rhIL-6 was added to HUVEC-CM plus TFK

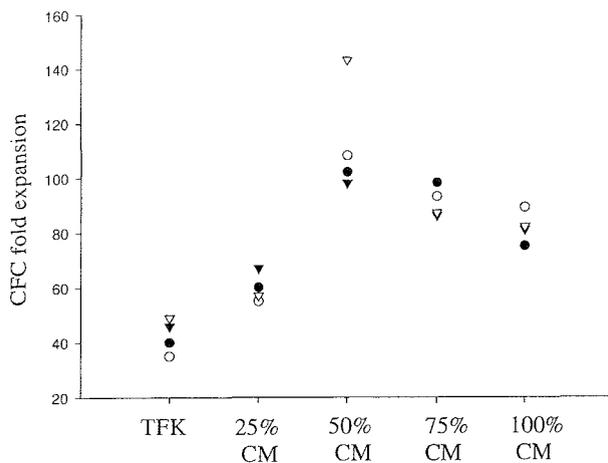


Figure 2. Fold expansion of CFC in the presence of various concentrations of HUVEC-CM. CFC expansion was evaluated after 2 weeks in culture in the presence of TFK. Every point represents the CFC expansion of an independent experiment initiated with  $2 \times 10^4$   $CD34^+$  cells ( $n = 4$ ).

(Figure 3A–C). To investigate further the role of IL-6 in this latter culture system, we evaluated the role of IL-6 activity by adding anti-IL-6 Ab to HUVEC-CM culture. We observed a 32% inhibition effect on TNC and CFC expansion when anti-IL-6 was added to HUVEC-CM (Figure 4;  $P < 0.05$ ). In addition, high levels of IL-6 were detected in HUVEC-CM, i.e.  $290 \pm 76$  pg/mL.

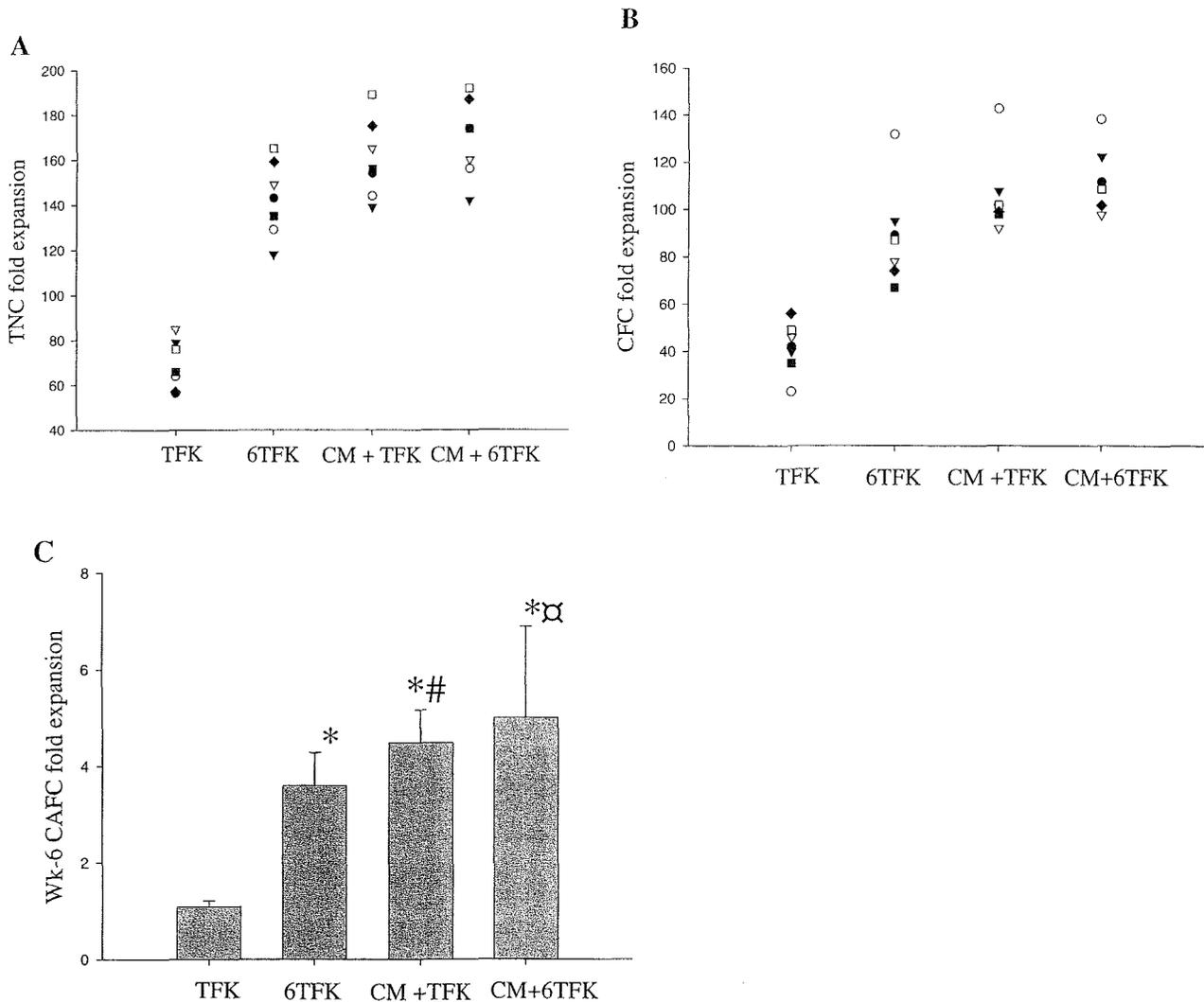
## Discussion

We have recently shown that co-culture of PBPC with HUVEC in the presence of TFK results in HSC expansion [25]. In the present study, we have investigated the possible mechanisms that lead to such a HUVEC-positive effect on PBPC expansion. We have shown that (1) direct cell–cell contact is not absolutely required for  $CD34^+$  PBPC expansion improvement and (2) HUVEC co-culture can even be advantageously replaced by HUVEC-CM. Finally, we have shown that IL-6 secreted by HUVEC is partly responsible for the HUVEC-positive effect on  $CD34^+$  PBPC expansion.

Interaction between HSC and stromal cells is an important factor for HSC support [30–33]. Verfaillie [34] has shown that direct contact between human BM stromal cells and HSC is not absolutely required. Supporting these results, studies using transwell insert culture systems suggested that most of the effect of endothelial cells (HUVEC and PMVEC) on hematopoiesis is mediated by constitutively produced soluble factor [35,36]. Accord-

ing to these reports, our comparative analysis between contact and non-contact HUVEC co-cultures do not show any significant differences for maximal CFC and Wk-6 CAFC expansion, indicating that cell-to-cell contact is not necessary for expansion of HSC and suggesting that soluble factors secreted by HUVEC may play an important role in the regulation of proliferation and differentiation of hematopoietic progenitors. In contrast to these studies, Breem *et al.* and Koller *et al.* [32,33] have shown that the best conservation of graft quality is observed when HSC are co-cultured in contact with irradiated stromal cells or FBMD-1, L87/4 or L88/5 stroma cell lines. These discordant results could be explained by the various experimental conditions used, as numerous mechanisms may be involved in the improvement of HSC expansion by stromal or endothelial cells.

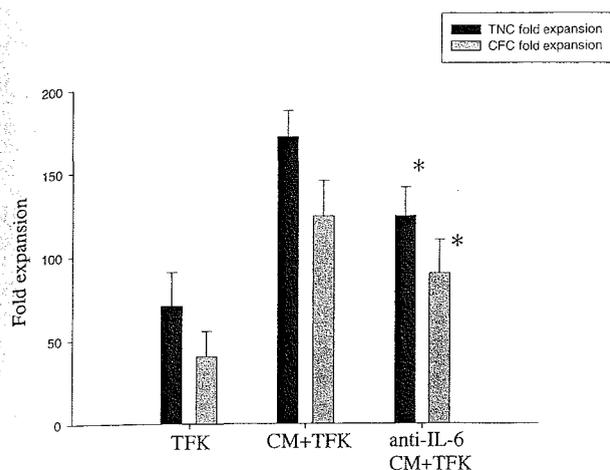
Stromal or endothelial co-culture systems require the establishment of a confluent layer, and the separation of HSC from the feeder layer is technically difficult. It has been demonstrated that CM harvested from different endothelial cells, such as human brain endothelial cells, porcine brain microvascular endothelial cells and human BM microvascular endothelial cells, can support the *ex vivo* expansion of human primitive hematopoietic BM progenitor cells with a high replating potential [35–37]. In our study, HUVEC-CM significantly improved expansion of HSC when added to TFK compared with TFK alone. Moreover, we observed that HUVEC-CM also significantly improved  $CD34^+$  PBPC cell expansion in 2-week culture, compared with HUVEC co-culture (contact and non-contact) systems. This latter result was unexpected, as HUVEC co-culture was thought likely to improve HSC expansion through both adhesion signaling and secretion of soluble factors. Therefore, a possible explanation for the better results obtained with HUVEC-CM could be related to apoptosis or necrosis of HUVEC during the long co-culture period. Indeed, growth of HUVEC in this co-culture system could have resulted in the induction of negative signals because of the impossibility of performing passages. Another possibility could be that HUVEC-CM contains much more soluble factor than HUVEC co-cultures because of the experimental conditions used. However, these results suggest that HUVEC-CM, together with TFK, is sufficient to improve PBPC expansion and could serve as a relevant source of growth factors for PBPC *ex vivo* expansion in cell therapy programs.



**Figure 3.** Expansion of TNC, CFC and secondary Wk-6 CAFC with TFK or 6TFK, minus or plus 50% HUVEC-CM. (A, B) Each point represents the expansion of TNC and CFC in an independent experiment initiated with  $5 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup> PBPC cells ( $n = 7$ ). (C) Data are presented as Wk-6 CAFC expansion compared with input cells ( $n = 6$ )  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  with respect to TFK, # $P < 0.05$  with respect to 6TFK,  $\square$   $P > 0.05$  with respect to CM plus TFK.

Moreover, these results suggest that the hematopoietic activity of HUVEC-CM is probably related to the presence of soluble factors that act in addition to Tpo, FL and KL. IL-6 has already been reported to have a positive effect on primitive cell expansion, and the 6TFK combination has been shown to promote proliferation and expansion of human long-term *in vivo* repopulating cells [15,29,38,39]. Gammaitoni *et al.* [15] have recently reported that successful secondary engraftment was observed with 6TFK-expanded cells, while negligible or no secondary engraftment was obtained with TFK-cultured cells. Indeed, in their study 6TFK induced a 5-fold expansion of LTC-IC, after a 2-week *in vitro* culture system, whereas

only a 1.3-fold LTC-IC expansion was obtained with TFK. According to these findings, we have shown here that the addition of rhIL-6 to the TFK combination greatly increased CFC and Wk-6 CAFC expansion. However, addition of rhIL-6 to HUVEC-CM did not increase PBPC expansion in the presence of TFK, which leads us to hypothesize that HUVEC-CM improved PBPC expansion through IL-6 secretion. IL-6-neutralizing experiments allowed us to demonstrate this hypothesis, as anti-IL6 Ab partially blocked the effect of HUVEC-CM on PBPC expansion. Moreover, in accordance with this possibility, we observed the presence of IL-6 in HUVEC-CM. Thus, altogether, these data suggest that, among the



**Figure 4.** Effect of anti-IL-6 blocking polyclonal Ab on HUVEC-CM-induced CD34<sup>+</sup> PBPC expansion. HUVEC-CM was incubated for 30 min at 37°C with polyclonal IL-6 neutralizing Ab, before being added to HSC cultures. CD34<sup>+</sup> BPC cells were cultured with TFK, in the presence HUVEC-CM or anti-IL-6 pre-treated HUVEC-CM. Data represent the mean  $\pm$  SEM of four experiments (n = 4). Cell expansion (TNC), CFC expansion. \*P < 0.05 with respect to CM plus TFK.

HUVEC-secreted factors that improve purified CD34<sup>+</sup> PBPC expansion, IL-6 may play an important role.

In addition to IL-6, other soluble factors may also contribute to the effect of HUVEC-CM on PBPC expansion. Recent studies have reported the important roles of candidate proteins in the maintenance of HSC *in vitro*, such as Notch ligand, WNT-protein family and bone morphogenetic protein (BMP) [40–42]. Thus whether HUVEC could act, directly or indirectly, by increasing the protein levels of these transcription factors in PBPC, remains to be investigated.

### Acknowledgements

This work was partly supported by a grant 'Incitation à la Recherche Clinique' (CIRC 2000) and a grant 'Programme de Recherche Clinique' (CPRC 2002).

### References

- 1 Van der Wall E, Richel DJ, Holtkamp MJ *et al.* Bone marrow reconstitution after high dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: effect of graft size. *Ann Oncol* 1994;5:795–802.
- 2 Feugier P, Bensoussan D, Girard F *et al.* Hematologic recovery after autologous PBPC transplantation: importance of the number of post thaw CD34<sup>+</sup> cells. *Transfusion* 2003;43:878–84.

- 3 Mounier N, Larghero J, Manson J *et al.* Long term hematologic recovery after autologous stem cell transplantation in lymphoma patients: impact of the number of prefreeze and post-thaw CD34<sup>+</sup> cells. *Bull Cancer* 2005;92:E31–8.
- 4 Yagi M, Ritchie KA, Sitnicka E *et al.* Sustained *ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells mediated by thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:1–6.
- 5 Ku H, Yonemura Y, Kaushansky K, Ogawa M. Thrombopoietine, the ligand for the Mpl receptor, synergized with steel factor and other early acting cytokines in supporting proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice. *Blood* 1996;87:4544–51.
- 6 Shapiro F, Yao T-J, Moskowitz C *et al.* Effects of prior therapy on the in-vitro proliferative potential of stem cell factor plus figrastim-mobilized CD34-positive progenitors cells. *Clin Cancer Res* 1997;3:1571–8.
- 7 Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 1997;90:1345–64.
- 8 Lyman SD, Jacobsen SE. C-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distance activities. *Blood* 1998;91:1101–34.
- 9 Shah AJ, Smogorzewska EM, Hannum C, Crooks GM. Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells and maintains progenitor cells *in vitro*. *Blood* 1996;87:3563–70.
- 10 Sutherland HJ, Hogge DE, Cook D, Eaves CJ. Alternative mechanisms with and without steel factor support primitive human hematopoiesis. *Blood* 1993;81:1465–70.
- 11 Simmons PJ, Aylett GW, Niutta S *et al.* C-kit is expressed by primitive human hematopoietic cells that give rise to colony-forming cells in stroma-dependent or cytokine-supplemented culture. *Exp Hematol* 1994;22:157–65.
- 12 Levesque JP, Haylock DN, Simmons PJ. Cytokine regulation of proliferation and cell adhesion are correlated events in human CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors. *Blood* 1996;88:1168–76.
- 13 Zandstra PW, Conneally E, Petzer A *et al.* Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self renewal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4698–703.
- 14 Petzer AL, Hogge DE, Landsorp PM *et al.* Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) *in vitro* and their expansion in defined medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1470–4.
- 15 Gammaitoni L, Bruno S, Piacibello W *et al.* *Ex vivo* expansion of human adult stem cells capable of primary and secondary hematopoietic reconstitution. *Exp Hematol* 2003;31:261–70.
- 16 Rafii S, Mohle R, Shapiro F *et al.* Regulation of hematopoiesis by microvascular endothelium. *Leuk Lymphoma* 1997;27:375–86.
- 17 Jazwiec B, Solanilla A, Grosset C *et al.* Endothelial cell support of hematopoiesis is differentially altered by IL-1 and glucocorticoids. *Leukemia* 1998;12:1210–20.
- 18 Brandt JE, Bartholomew AM, Fortman JD *et al.* *Ex vivo* expansion of autologous bone marrow CD34<sup>+</sup> cells with porcine microvascular endothelial cells results in graft capable of rescuing lethally irradiated baboons. *Blood* 1999;94:106–13.

- 19 Rosler E, Brandt J, Chute J *et al.* Coculture of umbilical cord blood cells with endothelial cells leads to extensive amplification of competent CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells. *Exp Hematol* 2000;28:841-52.
- 20 Chute JP, Saini AA, Chute DJ *et al.* *Ex vivo* culture with human brain endothelial cells increases the SCID-repopulating capacity of adult human bone marrow. *Blood* 2002;100:4433-9.
- 21 Yamaguchi H, Ishii E, Tashiro K *et al.* Role of umbilical vein endothelial cells in hematopoiesis. *Leuk Lymph* 1997;31:61-9.
- 22 Lewis ID, Almeida-Porada G, Du J *et al.* Umbilical cord blood cells capable of engrafting in primary, secondary, and tertiary xenogeneic hosts are preserved after *ex vivo* culture in a noncontact system. *Blood* 2001;97:3441-9.
- 23 Yamaguchi H, Ishii E, Saito S *et al.* Umbilical vein endothelial cells are an important source of c-kit and stem cell factor which regulate the proliferation of haemopoietic progenitor cells. *Br J Haematol* 1996;94:606-11.
- 24 El Andaloussi AE, Duchez P, Rieffers J *et al.* Expression of thrombopoietin by umbilical vein endothelial cells. *Eur Cytokine Netw* 2001;12:268-73.
- 25 Feugier P, Jo DY, Hung J *et al.* *Ex vivo* expansion of stem and progenitor cells in co-culture of mobilized peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells on human endothelium transfected with adenovectors expressing thrombopoietin, c-kit ligand, and flt-3 ligand. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:127-38.
- 26 Yildirim YS, Boehmler AM, Kanz L, Möhle R. Expansion of cord blood CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells in coculture with autologous umbilical vein endothelial cells (HUVEC) is superior to cytokine-supplemented liquid culture. *Bone Marrow Transplant* 2005;36:71-9.
- 27 Jaffe EA, Nachmann RL, Becker CG. Culture of endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphological and immunological criteria. *J Clin Invest* 1973;52:2745-52.
- 28 Ploemacher RE, van der Sluijs JP, Voerman JS *et al.* An *in vitro* limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood* 1989;74:2755-63.
- 29 Ueda T, Tsuji K, Yoshino H *et al.* Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J Clin Invest* 2000;105:1013-21.
- 30 Harvey K, Dzierzak E. Cell-cell contact and anatomical compatibility in stromal cell-mediated HSC support during development. *Stem Cells* 2004;22:253-8.
- 31 Shimakura Y, Kawada H, Ando K *et al.* Murine stromal cell line HESS-5 maintains reconstituting ability of *ex vivo*-generated hematopoietic stem cells from human bone marrow and cytokine-mobilized peripheral blood. *Stem Cells* 2000;18:183-9.
- 32 Broom DA, Blokland EAW, Siebel KE *et al.* Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during *ex vivo* expansion of CD34<sup>+</sup> mobilized peripheral blood stem cells. *Blood* 1998;91:1111-7.
- 33 Koller MR, Oxender M, Jensen TC *et al.* Direct contact between CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> cells and stroma induces a soluble activity that specifically increase primitive hematopoietic cell production. *Exp Hematol* 1999;27:734-41.
- 34 Verfaillie C. Direct contact between human primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stroma is not required for long-term hematopoiesis. *Blood* 1992;79:2821-6.
- 35 Chute JP, Muramoto GG, Fung J, Oxford C. Soluble factors elaborated by human brain endothelial cells induced the concomitant expansion of purified human BM CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells and SCID repopulating cells. *Blood* 2005;105:576-83.
- 36 Davis TA, Black AT, Kidwell WR *et al.* Conditioned medium from primary porcine endothelial cells alone promotes the growth of primitive human hematopoietic progenitor cells with a high replating potential: evidence for a novel early haematopoietic activity. *Cytokines* 1997;9:263-75.
- 37 Rafii S, Shapiro F, Pettengell R *et al.* Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors. *Blood* 1995;86:3353-63.
- 38 Feng JF, Zhuang M, Zhu LJ *et al.* Effect of IL-6/sIL-6R on *ex vivo* expansion of human cord blood derived CD34<sup>+</sup> cells. *Ai Zhong* 2004;23:715-8.
- 39 Kollet O, Aviram R, Chebath J *et al.* The soluble interleukin-6(IL-6)receptor/IL-6 fusion protein enhances *in vitro* maintenance and proliferation of human CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>/low cells capable of repopulating severe combined immunodeficient mice. *Blood* 1999;94:923-31.
- 40 Varnum-Finney B, Brashem-Stein C, Bernstein I. Combined effects of Notch signaling and cytokines induce a multiple log increase in precursors with lymphoid and myeloid reconstituting ability. *Blood* 2003;101:1784-9.
- 41 Willert K, Brown J, Danenberg E *et al.* Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003;423:448-52.
- 42 Sadlon TJ, Lewis ID, D'Andrea RJ. BMP4: its role in development of the hematopoietic system and potential as a hematopoietic growth factor. *Stem Cells* 2004;22:457-74.

# **The effect of alginate culture and mechanical stimulation on cartilaginous matrix synthesis of rat dedifferentiated chondrocytes**

Yun Wang <sup>a, b</sup>, Natalia de Isla <sup>a</sup>, Céline Huselstein <sup>a</sup>, Binghua Wang <sup>b</sup>, Patrick Netter <sup>c</sup>,  
Jean-François Stoltz <sup>a</sup>, Sylvaine Muller <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Groupe Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, UMR7563 CNRS-UHP-INPL LEMTA et IFR 111,  
Faculté de Médecine, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

<sup>b</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Wuhan University,  
430071, Wuhan, P.R. China

<sup>c</sup> Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires, UMR7561 CNRS-UHP  
Nancy I, Faculté de Médecine, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

\*Corresponding author: Sylvaine Muller

Address: Laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, UMR7563 CNRS,  
Faculté de médecine, Université Henri Poincaré, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Tel.: 33-3-83683456

Fax: 33-3-83683459

Email: [sylvaine.muller@medecine.uhp-nancy.fr](mailto:sylvaine.muller@medecine.uhp-nancy.fr)

## **Abstract.**

To investigate whether the application of alginate culture and mechanical stimulation will improve the synthesis of cartilaginous matrix in dedifferentiated chondrocytes, rat chondrocytes underwent dedifferentiation upon serial monolayer culture up to passage 6, and then were encapsulated in 2% alginate gel and subject to static culture. After 28 days culture in static, the beads were exposed to 48 h of mechanical stimulation with continuous agitation. The sGAG content in alginate bead was measured by alcian blue staining. The expression of collagen protein was detected using immunofluorescence. After 28 days culture in alginate bead, the dedifferentiated chondrocytes remained round in shape and re-synthesized the chondrocyte-specific matrix. Compared with static culture, mechanical stimulation induced statistically increases in the production of glycosaminoglycan ( $p \leq 0.01$ ), as well as in the synthesis of collagen type II protein ( $p \leq 0.05$ ). On the contrary, no positive expression of collagen type I protein was observed at the end of culture. Our results demonstrated that both of alginate culture and mechanical stimulation help to restore chondrocyte phenotype and promotes the synthesis of cartilaginous matrix.

Keywords: Alginate, mechanical stimulation, matrix, chondrocyte, cartilage tissue engineering

## 1. Introduction

Articular cartilage has a limited self-healing potential after injury. Tissue engineering could be used to cure articular cartilage defects using autologous bioengineered cartilage tissue or cells [1, 2]. The main problem with such techniques is the small amount of obtainable autologous chondrocytes. It is possible to multiply articular chondrocytes by monolayer culture but this multiplication leads to dedifferentiation, a process during which the cells change their morphology from round to spindle-shaped, and switch their collagen production from type II to type I, as those of fibroblast cells [3]. Therefore, it is important to search for parameters favoring a redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes.

Previous studies have demonstrated that three-dimension culture such as agarose culture, pellet culture or alginate culture could induce the production of cartilage-specific extracellular matrix components and promote chondrogenesis in embryonic precursor cells [4-6].

Mechanical stress plays an important role in tissue morphogenesis and extracellular matrix metabolism. For example, cartilage homeostasis is regulated by mechanical stress not only during endochondral bone formation in limb development but also during fracture repair and skeletal remodeling in adult [7]. It has been reported that in vitro mechanical stimulation, including shear stress, dynamical compression and low-intensity pulsed ultrasound *etc*, is helpful to the expression of chondrocyte phenotype [8-10].

Therefore, in this work we tested whether the application of both alginate culture and mechanical stimulation will contribute to the synthesis of cartilaginous matrix of dedifferentiated chondrocytes. We focused on the production of extracellular matrix including

sulfated glycosaminoglycan (sGAG) and collagen type I and type II protein. Our data suggested that alginate culture and agitation stimulation support the synthesis of extracellular matrix of the dedifferentiated chondrocytes.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 Chondrocytes isolation and monolayer culture*

Chondrocytes were enzymatically isolated from femoral head cartilage from male Wistar rats (250–275 g) (Charles River, France). The articular cartilage was diced into small pieces and was digested in 0.9% NaCl containing 2 mg/ml protease (Sigma, France) for 2 h at 37°C. The remaining tissue was then incubated in DMEM/F12 medium containing 2 mg/ml collagenase B (Roche, France) at 37°C overnight. The cells were isolated from the digest solution by centrifugation for 5 min at 250 g then resuspended in culture medium. Total cell number and cell viability were determined using the trypan blue exclusion method with a Thoma Cell. For monolayer cultures,  $1 \times 10^6$  cells were plated in 75 cm<sup>2</sup> culture flask. The cells were cultured using DMEM/F12 medium (GibcoBRL, Life Technologie, France) supplemented with 10% (v/v) inactive fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2.5 µg/ml amphotericin B and 2 mM L-glutamine (GibcoBRL, Life Technology, France). Cultures were maintained in a humidified atmosphere consisting of 95% air/5% CO<sub>2</sub> at 37°C and culture medium was changed three times a week. The confluent primary culture, designated as passage P0, was subcultured up to P5 to induce de-differentiation.

### *2.2 Alginate culture*

Dedifferentiated chondrocytes were encapsulated into alginate gel as described previously [11]. Briefly, P5 Chondrocytes were suspended at  $3 \times 10^6$  cells/ml in 2% (w/v)

medium-viscosity sodium alginate (Sigma, France) prepared in 0.9% NaCl, pH 7.4. This chondrocyte/alginate solution was dropped through an 18-gauge needle into a 100 mM CaCl<sub>2</sub> to form alginate beads. The beads were allowed to further polymerize in the CaCl<sub>2</sub> solution for 15 min, then were washed three times in 0.9% NaCl and once in culture medium. The beads were then established in culture in six-well plates, typically 15 beads per well with 5 ml culture medium. This time point was designed as day 0 of the experiment. The medium was changed every 2 days.

### *2.3 Mechanical stimulation*

After 28 days in static culture, the beads were transferred 10 by 10 into 15 ml sterile plastic tubes containing 10 ml culture medium, and then exposed to mechanical stimulation with continuous agitation on a Gyro-Rocker™ (STUART, UK) for 48 hours at 30 rpm at 37°C [12].

### *2.4 Alcian blue assay of sGAG content*

The deposition of sGAG in alginate beads were investigated using alcian blue staining as described previously [13] with a little modification. Briefly, the beads were fixed with 95% ethanol for 20 minutes at room temperature, and then rinsed in 0.1 N HCl (pH 1.0) for 15 minutes to equilibrate the pH. The fixed beads were stained with 1% alcian blue 8GX (sigma, France) in 0.1 N HCl (pH 1.0) for 24 h. After removing the dye solution, the beads were briefly washed twice by distilled water to remove excessive staining. Then the stained beads were solubilized in 8 M guanidine hydrochloride (Sigma, France) and quantitated by its absorbance at a wavelength of 595 nm with use of a spectrophotometer (Beckman, USA). Alginate beads without cells under the same experimental condition were used as blank

control to subtract the interference from the alginate to A595 value.

### *2.5 Immunofluorescence staining of collagen protein expression*

The beads were briefly washed three times with phosphate-buffered saline (PBS), and then were blocked with 0.5% BSA in PBS for 15 min at room temperature. The specimens were then incubated for 24 h at 4°C with rabbit polyclonal antibody (Calbiochem, France) against collagen type I (1/100 dilution) or collagen type II (1/100 dilution) in the presence of 0.5% (w/v) BSA. After binding of the primary antibodies, the samples were washed with 0.5% BSA in PBS and then incubated for 1h at 37°C in the dark with the secondary antibody, Alexa TM-488 conjugated goat anti-rabbit IgG (1/200 dilution). Finally, after additional washing in PBS, the beads were observed under a laser scanning confocal microscopy (SP2-Leica micro systems, Germany). The percentage of immunopositive cells was calculated by counting the total number of cells and the number of immunopositive cells in five random, non-contiguous fields.

### *2.6 Statistical analysis*

All data was presented as means  $\pm$  standards deviation (SD) of three independent experiments. One-way ANOVA analysis followed by Student's t-test was used for statistical analyses. A p-value less than 0.05 was considered to be statistically significant.

## **3. Results**

### *3.1 Changement in cell morphology*

From P0 to P5, chondrocytes underwent dedifferentiation and became fibroblast-like cells. After encapsulation in alginate gel, the dedifferentiated chondrocytes regained their spherical morphology (Fig.1A). After depositing of newly synthesized extracellular matrix in

the pericellular region, the cells became larger than the initially encapsulated cells (Fig.1B). Compared to static culture (Fig.1C), we found that there were more cells demonstrating exuberant matrix production after agitation (Fig.1D), which could be confirmed by the difference in cell size. As shown in Table 1, the percentage of large cell in agitation culture was significantly higher than that in static culture.

### *3.2 The effect on the production of sGAG*

As shown in Fig.2, the sGAG content of dedifferentiated chondrocytes in alginate beads augmented 1297.3% after 28 days culture in static ( $p \leq 0.01$ ). Compared to static culture, 48 h of agitation induced 100.56% increase in the production of sGAG ( $p \leq 0.01$ ).

### *3.3 The effect on the expression of collagen protein*

Dedifferentiated chondrocytes lost its phenotype and converted to expression of collagen type I (data not shown). However, after 28 days culture in static, the chondrocytes regained its immunopositive reaction to collagen type II. It was showed that a pericellular meshwork of newly synthesized collagen type II fibers surrounded chondrocyte in alginate culture (Fig.3B). On the contrary, no obviously neosynthetic collagen type I was observed at the end of culture (Fig.3A, C, and D). Moreover, mechanical stimulation did improve the synthesis of collagen type II protein (Fig.3E and Fig.3F). The immunopositive percentage in static culture increased from  $24.4\% \pm 3.6\%$  to  $39.3\% \pm 5.1\%$  in agitation culture ( $p \leq 0.05$ ).

## **4. Discussion**

The success of autologous cell-based cartilage repair system depends on the ability of the implanted cells to synthesis hyaline cartilage matrix. Previous studies [3, 14] have demonstrated that multiplication of articular chondrocytes in monolayer leads to

dedifferentiation, in which cells lose their chondrocyte phenotype. The dedifferentiated cells assume a fibroblast-like appearance and produce less glycosaminoglycan. The cells also produce less cartilage-specific collagen type II but greater amounts of collagen type I. Consequently, in this study we examined the hypothesis that the factors mimicking the *in vivo* environment of auricular chondrocytes like three-dimensionality and mechanical stimulation might influence their ability to synthesize cartilaginous matrix.

Suspension of chondrocytes in three-dimension hydrogels has been shown to maintain or promote chondrogenic phenotype. These artificial matrices may also provide temporary cell attachment and generate a functional form for successful chondrocyte transplantation [15]. Alginate is a classical matrix for *in vitro* studies focusing on chondrogenesis. Chondrocytes cultured in alginate have been shown to secrete a matrix that is similar to that seen in native human cartilage [16]. Chondrocytes in alginate culture remain phenotypically stable for at least 8 months and continue to synthesize collagen type II [17]. Consistent with the previous researches, our results also showed that passaged chondrocytes encapsulated in alginate typically exhibited a differentiated chondrocyte morphology. After static culture in alginate bead, the synthesis of sGAG content increased. In addition, the expression of collagen type I in dedifferentiated cells was replaced by collagen type II at the end of culture.

Another possible method for retaining the chondrocytic phenotype is to use mechanical stimulus. Several investigators have reported the importance of shear forces and cyclic compressive during cartilage development *in vitro* and *in vivo* [8, 9, 18]. The continuous agitation on a gyroscopic rocker was used as a mechanical stimulation in this study to test its effect on the biosynthesis activity of chondrocytes. Our data demonstrated that

agitation exert the positive effect on the cartilaginous matrix synthesis in dedifferentiated chondrocyte in alginate bead. Compared to static culture, the production of sGAG and collagen type II protein did be enhanced after 48 h of agitation. Previous studies have shown that bioreactors including spinner flask, rotating-wall vessel, and flow-through perfusion systems have a profound effect on the proliferation and phenotype of chondrocytes in three-dimensional scaffold [19-21]. Therefore, we supposed that the agitation culture system might be similar to these bioreactors which not only can enhance the nutrient and oxygen transfer to affect the chondrocytes metabolism, but also provide the possibility of applying a mild mechanical stimulation to the cell-construct to influence the biosynthesis activity in chondrocytes.

In conclusion, our study demonstrated that the differentiated chondrocytes which were encapsulated in alginate beads and under mechanical stimulation could regain the chondrocyte phenotype and re-synthesis of cartilaginous matrix. Accordingly, our work also suggested that this agitation-alginate culture system could be used for the redifferentiation of monolayer-passaged chondrocytes for their implication in cartilage tissue engineering.

### **Acknowledgments**

The authors would like to acknowledge Dr. Dominique Dumas for his technical assistance in the use of confocal microscope. This work was supported in part by the fellowship of Ph.D. thesis from French Embassy in Beijing and the research funding from Lorraine Region (CPER).

## References

- [1] Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* **331**(14) (1994), 889–895.
- [2] Richardson JB, Caterson B, Evans EH, Ashton BA, Roberts S. Repair of human articular cartilage after implantation of autologous chondrocytes. *J. Bone. Jt. Surg.* **81**(6) (1999), 1064–1068.
- [3] Sittinger M, Braunling J, Kastenbauer E, Hammer C, Burmester G, Bujia J. Proliferative potential of nasal septum chondrocytes for in vitro culture of cartilage transplants. *Laryngorhinootologie* **76**(2) (1997), 96–100.
- [4] Mauck RL, Soltz MA, Wang CC, Wong DD, Chao PH, Valhmu WB, Hung CT, Ateshian GA. Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *J. Biomech. Eng.* **122**(3) (2000), 2522-60.
- [5] Goldberg AJ, Lee DA, Bader DL, Bentley G. Autologous chondrocyte implantation. Culture in a TGF-beta-containing medium enhances the re-expression of a chondrocytic phenotype in passaged human chondrocytes in pellet culture. *J. Bone. Joint. Surg. Br.* **87**(1) (2005), 128-134.
- [6] Gaissmaier C, Fritz J, Krackhardt T, Flesch I, Aicher WK, Ashammakhi N. *Biomaterials* **26**(14) (2005), 1953-1960.
- [7] Wu Q, Zhang Y, Chen Q. Indian hedgehog is an essential component of mechanotransduction complex to stimulate chondrocyte proliferation. *J. Biol. Chem.* **276**(38) (2001), 35290-35296.

- [8] Malaviya P, Nerem RM. Fluid-induced shear stress stimulates chondrocyte proliferation partially mediated via TGF-beta1. *Tissue. Eng.* **8**(4) (2002), 581-590.
- [9] Elder SH, Sanders SW, McCulley WR, Marr ML, Shim JW, Hasty KA. Chondrocyte response to cyclic hydrostatic pressure in alginate versus pellet culture. *J. Orthop. Res.* **24**(4) (2006), 740-747.
- [10] Iwashina T, Mochida J, Miyazaki T, Watanabe T, Iwabuchi S, Ando K, Hotta T, Sakai D. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates cell proliferation and proteoglycan production in rabbit intervertebral disc cells cultured in alginate. *Biomaterials* **27**(3) (2006), 354-361.
- [11] De Isla NG, Yang JW, Huselstein C, Muller S, Stoltz JF. IL-1beta synthesis by chondrocyte analyzed by 3D microscopy and flow cytometry: Effect of Rhein. *Biorheology.* **43**(3-4) (2006), 595-601.
- [12] Gigant-Huselstein C, Hubert P, Dumas D, Dellacherie E, Netter P, Payan E, Stoltz JF. Expression of adhesion molecules and collagen on rat chondrocyte seeded into alginate and hyaluronate based 3D biosystems. Influence of mechanical stresses. *Biorheology.* **41**(3-4) (2004), 423-431.
- [13] Masuda K, Shirota H, Thonar EJ. Quantification of 35S-labeled proteoglycans complexed to alcian blue by rapid filtration in multiwell plates. *Anal. Biochem.* **217**(2) (1994), 167-175.
- [14] Homicz MR, Schumacher BL, Sah RL, Watson D. Effects of serial expansion of septal chondrocytes on tissue-engineered neocartilage composition. *Otolaryngol. Head. Neck. Surg.* **127**(5) (2002), 398-408.

- [15] Gruber HE, Hoelscher GL, Leslie K, Ingram JA, Hanley EN Jr. Three-dimensional culture of human disc cells within agarose or a collagen sponge: assessment of proteoglycan production. *Biomaterials* **27**(3) (2006), 371-376.
- [16] Hauselmann HJ, Masuda K, Hunziker EB, et al. Adult human chondrocytes cultured in alginate form a matrix similar to native human articular cartilage. *Am. J. Physiol.* **271** (1996), C742–C752.
- [17] Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, et al. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J. Cell Sci.* **107** (1994), 17–27.
- [18] Milentijevic D, Rubel IF, Liew AS, Helfet DL, Torzilli PA. An in vivo rabbit model for cartilage trauma: a preliminary study of the influence of impact stress magnitude on chondrocyte death and matrix damage. *J. Orthop. Trauma.* **19**(7) (2005), 466-473.
- [19] Wendt D, Marsano A, Jakob M, Heberer M, Martin I. Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. *Biotechnol. Bioeng.* **84**(2) (2003), 205-214.
- [20] Marlovits S, Tichy B, Truppe M, Gruber D, Schlegel W. Collagen expression in tissue engineered cartilage of aged human articular chondrocytes in a rotating bioreactor. *Int. J. Artif. Organs.* **26**(4) (2003), 319-330.
- [21] Xu X, Urban JP, Tirlapur U, Wu MH, Cui Z, Cui Z. Influence of perfusion on metabolism and matrix production by bovine articular chondrocytes in hydrogel scaffolds. *Biotechnol Bioeng.* **93**(6) (2006), 1103-1111.

## Illustrations:

### **Fig.1. Microscopic appearance of chondrocytes in alginate bead**

Dedifferentiated chondrocytes were encapsulated in alginate gel and were subject to static culture or agitation culture. The cell morphology was observed under phase-contrast microscopy. Asterisk indicated the cells founded rich in pericellular matrix. A: initially encapsulated chondrocyte in alginate bead; B: chondrocyte in alginate bead with depositing of pericellular matrix; C: chondrocytes in alginate bead after 28 days in static culture; D: chondrocytes in alginate bead after 48h of agitation.

### **Fig.2. Alcian blue staining assay of sGAG content**

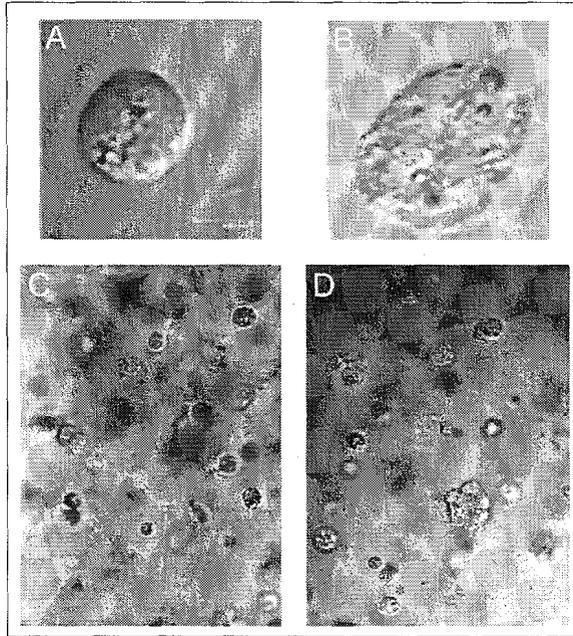
The production of sGAG by chondrocytes encapsulated in alginate bead at day 0, day 28 and after 48 h of agitation was analyzed using alcian blue staining. The value of A595 was in proportion to the content of sGAG. \*  $p \leq 0.01$  vs. day 0 in static culture; #  $p \leq 0.05$  vs. day 28 in static culture.

### **Fig.3. Immunofluorescence staining of collagen protein of chondrocytes in alginate bead.**

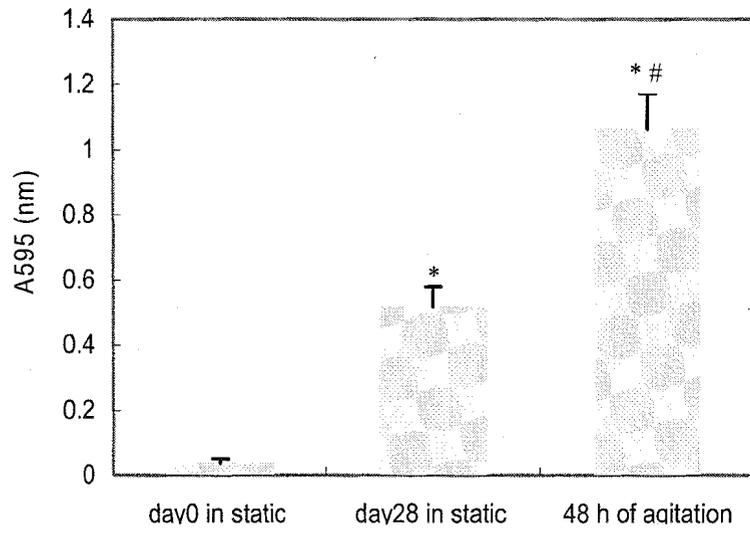
The expression of collagen type I and type II protein was detected by indirect immunofluorescence staining and was observed under confocal microscopy (Objective 40x). A: the negative expression of collagen type I protein; B: the positive expression of collagen type II protein; C: collagen type I expression in day 28 static culture; D: collagen type I expression after 48 h of agitation culture; E: collagen type II expression in day 28 static culture; F: collagen type II expression after 48 h of agitation culture.

**Table 1. Difference in cell size between static culture and agitation culture**

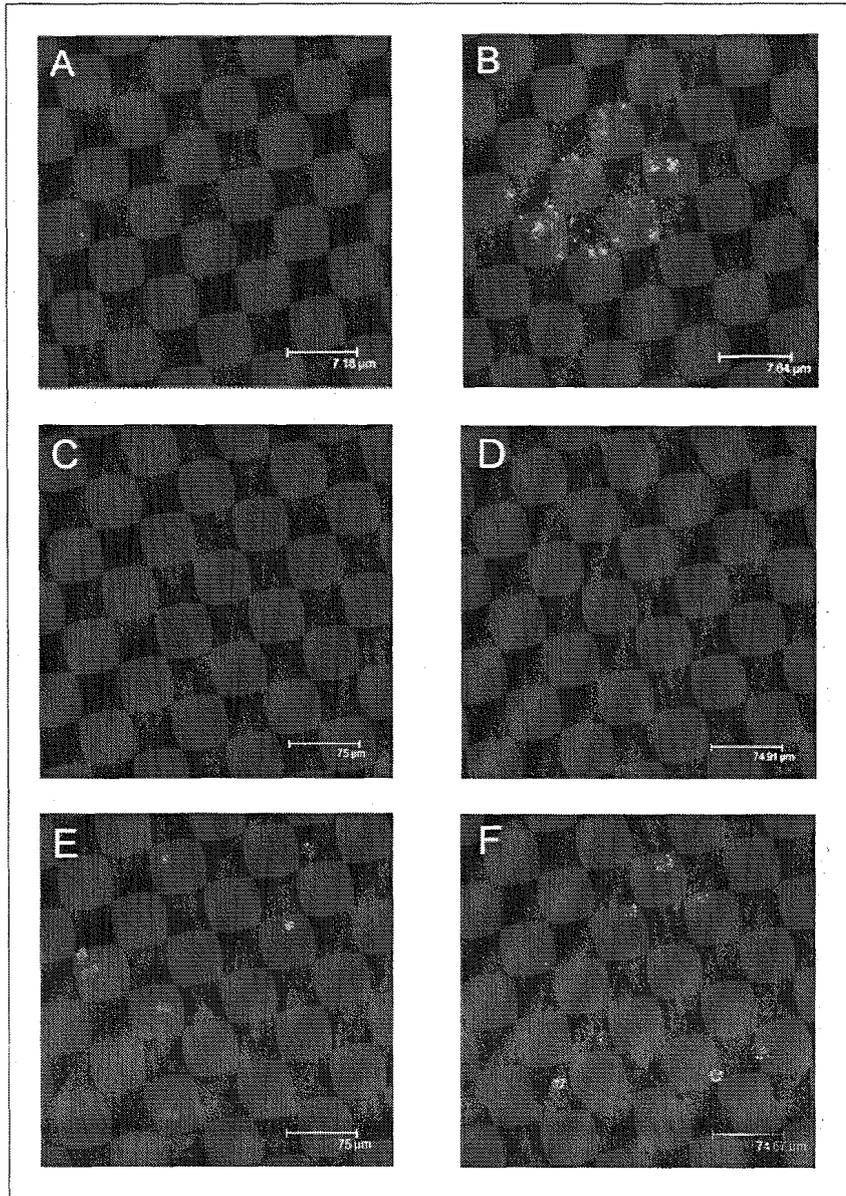
(%)	Cell size ( $\mu\text{m}$ )			
	$\leq 10$	10 – 15	15 – 20	$\geq 20$
In static culture	13.3	40.0	46.3	0.4
In agitation culture	1.6	26.7	65.1	6.6



**Fig.1. Microscopic appearance of chondrocytes in alginate bead**



**Fig.2. Alcian blue staining assay of sGAG content**



**Fig.3. Immunofluorescence staining of collagen protein of chondrocytes in alginate bead**

## **RESUME**

L'ingénierie tissulaire du cartilage permet de reconstruire un néo-cartilage réimplantable en utilisant des cellules telles que les chondrocytes et les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) cultivés dans des biomatériaux tridimensionnels. Des facteurs mécaniques et biochimiques y jouent un rôle essentiel.

Le but de nos travaux a été d'évaluer, dans un premier temps, l'influence de l'expansion des chondrocytes et des CSMs humains en monocouche sur l'évolution du phénotype cellulaire. Dans un deuxième temps, une étude concernant les réponses biologiques des chondrocytes et des CSMs exposés aux stimuli mécaniques (entrechoquement et compression dynamique intermittente) et biochimiques (TGF- $\beta$ 1 et BMP-2) a été réalisée dans un hydrogel d'alginate/HA.

Nos résultats ont montré une dédifférenciation notable des chondrocytes à partir du deuxième passage, alors que les CSMs ont maintenu leur phénotype indifférencié après 5 passages. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que l'application de contraintes mécaniques ainsi que la stimulation de facteurs de croissance peuvent améliorer l'activité métabolique, la prolifération cellulaire, l'expression des gènes chondrogéniques ainsi que la synthèse de la matrice cartilagineuse. Cependant, ces effets sont étroitement liés aux paramètres mécaniques (durée, fréquence) et au type cellulaire.

L'ensemble de ces travaux suggère que le contrôle des conditions de culture ainsi que l'application des contraintes mécaniques et biochimiques peuvent moduler le stade de différenciation chondrocytaire et donc la chondrogénèse.

**Mots clés :** Chondrocytes, Cellules souches mésenchymateuses, Différenciation, Contrainte mécanique, Facteur de croissance, Ingénierie tissulaire.

## **ABSTRACT**

Cartilage tissue engineering could lead to reconstruct a re-implantable neo-cartilage by using cells such as chondrocytes and mesenchymal stem cells (MSCs) cultured in a scaffold. Different mechanical and biochemical factors play an essential role in this process as well.

The aim of this study was to investigate firstly, the influence of monolayer expansion of human chondrocytes and MSCs on the cell phenotype. Secondly, the cellular responses of chondrocytes and MSCs to mechanical stimulations (agitation and intermittent dynamic compression) as well as to biochemical stimulations (TGF- $\beta$ 1 and BMP-2) have been examined in an alginate/HA hydrogel.

Our results showed that notable dedifferentiation of chondrocytes has occurred from passage 2, while MSCs have still kept their undifferentiated phenotype until passage 5. In addition, the application of these mechanical strains and growth factors has been demonstrated to improve metabolic activity, cell proliferation, chondrogenic gene expression as well as synthesis of cartilaginous matrix. These effects are closely related to the mechanical parameters (duration, frequency) and the cell type.

All of these results suggested that the control of culture conditions and the application of mechanical strains as well as growth factors could modulate the differentiation state and the chondrogenesis.

**Key words :** Chondrocytes, Mesenchymal stem cell, differentiation, Mechanical strain, Growth factor, Tissue engineering.

---

**Spécialité : Bioingénierie**

Groupe Ingénierie Cellulaire et Tissulaire

Equipe LEMTA-UMR 7562, CNRS/UFR 111 Bioingénierie

Faculté de Médecine, Nancy Université, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex